

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



Université Aboubekr Belkaïd -Tlemcen-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Laboratoire

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat

En Biologie

Option

Biochimie appliquée

Présentée par

Mme BEKKAL BRIKCI- BENHABIB Ouassila

Thème

**Recherche de biofilms mixtes sur des surfaces inertes
au Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen**

Soutenue le 16 Fevrier 2017

Devant le jury :

Président	Pr. Boucherit Kebir	Centre Universitaire d'Ain Temouchent
Directrice de thèse	Pr. Boucherit-Otmani Zahia	Université de Tlemcen
Examineurs	Pr. Hassaine Hafida	Université de Tlemcen
	Pr Adjmi-Hamoudi haïet	Hôpital Central de l'Armée-Alger
	Dr. Seddiki Sidi Mohamed Lahbib	Centre Universitaire de Naâma
	Dr Sari-Belkherroubi Lamia	Université de Tlemcen

Année universitaire 2016-2017

« Le mérite revient à celui qui commence, même si le suivant fait mieux »

Proverbe arabe

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, sous la direction de M^{me} BOUCHERIT-OTMANI Zahia, Professeur, au département de Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.

C'est un immense honneur qu'elle m'a fait en ayant accepté de diriger cette thèse. Je tiens à lui exprimer mes remerciements qui ne seront certainement pas suffisants pour témoigner toute ma gratitude pour ses précieux conseils, sa disponibilité et sa sérénité au travail. J'ai été ravie d'avoir pu travailler à ses côtés depuis le magister et durant cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de mon admiration. Merci pour tout !

J'adresse de vifs remerciements à M^r BOUCHERIT Kebir, Professeur, Directeur du Centre Universitaire d'Ain Temouchent pour avoir accepté de présider le jury. Je tiens également à lui exprimer ma sincère reconnaissance pour le rôle fondamental qu'il a joué dans ma formation et sa rigueur scientifique. J'ai été touchée par ses profondes qualités humaines, son comportement toujours aimable.

Je remercie M^{me} HASSAINE Hafida, Professeur au département de Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, d'avoir bien voulu participer au jury de cette thèse. Je la remercie pour son expérience, son enseignement dont elle m'a fait profiter et sa compagnie toujours très agréable.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance à M^{me} ADJMI-HAMOUDI Haiet, Professeur, Chef de service de parasitologie et mycologie à Hôpital Central de l'Armée (HCA) d'Alger, qui me fait l'honneur de siéger parmi les membres de ce jury.

Je remercie M^r SEDDIKI Sidi Mohamed Lahbib, Maître de conférences classe A, au centre universitaire de Naâma, pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je souhaite vivement remercier M^{me} SARI-BELKHERROUBI Lamia, Maître de conférences classe A, au département de Biologie. Faculté des Sciences de la

Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'associe également à mes remerciements le Professeur Serge CASAREGOLA, Responsable à la CIRM- levures à Grignon-Thiverval, pour m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire et aussi pour ses conseils et ses compétences dans la biologie moléculaire.

Par la même occasion, Christelle DEMONDESIR et Marine LUCAS avec qui j'ai collaboré pendant mon passage à la CIRM- levures, INRA / AgroParisTech, à Thiverval-Grignon. Merci pour votre contribution dans ce travail.

Mes remerciements reviennent à M^r Chakib DJEDIAT et au Professeur Cecile BERNARD du Muséum National d'histoire Naturelle (MNHN) à Paris, pour m'avoir accueillie au sein du plateau technique de microscopie électronique et microanalyses au MNHN.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude pour M^r LAHFA Boucif Farid, Doyen de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour m'avoir permis de profiter de la convention de bénévolat entre le MNHN à Paris et l'université de Tlemcen.

Toute ma reconnaissance va aussi à M^{me} KAZI TANI Zakat pour sa compagnie dans la salle des doctorants, son aide, sa gentillesse et sa patience notamment dans la relecture assidue de ce manuscrit.

Je mentionne le plaisir que j'ai eu en travaillant au sein du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique ». Merci à tous les doctorants et les membres du LapSab plus particulièrement Abdefettah, Hidaya et Rachida. Merci Imane pour tous les bons moments que j'ai partagés avec toi au LapSab et MNHN.

Je remercie également le chef de service de neurochirurgie du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن الالتهابات الفطرية التي يسببها أحادي النوع و متعددة أنواع من جنس *Candida* على القسطرة الوريدية الطرفية في قسم جراحة المخ والأعصاب في مستشفى جامعة تلمسان. تم تحديد مقاومة سلالات معزولة في وضع البلاكتونية و في شكل غشاء حيوي بحساب تركيز المثبطة الحد الأدنى من amphotericin B و caspofungin. بنية الأغشية الحيوية، أحادية ومتعددة الأنواع، قد تبين بشكل واضح بواسطة المجهر الإلكتروني. أظهرت النتائج أن معدل التدهور القسطرة الوريدية الطرفية هو من 13.28%. كشف هوية 38 سلالات منها 31 تنتمي إلى جنس *Candida* هي الأنواع السائدة. الدراسة الجزيئية للسلالات التي يقوم بها ITS PCR تسلسل الحمض النووي الربوزومي ، سمح لنا للتعرف على سلالة من *Candida guilliermondii* ، الذي لا يزال من الصعب تحديد بواسطة *Api Candida*.

-هذه النتائج تبين أن سلالات *Candida* سريعة التأثير ب amphotericin B و caspofungin في الحالات البلاكتونية، غير أنه في شكل غشاء حيوي (بيوفيلم) ، 70.76% منها تصبح قابلة للمضادات الحيوية السالفة الذكر. هذه الدراسة، كشفت أيضا عن تشكيل أغشية حيوية مختلطة بسلالتين متعازلتين من نفس القسطرة الوريدية الطرفية *Candida albicans* و *Candida glabrata* ، ولكن يجدر الذكر بأن 3/2 من هذه الأغشية الحيوية الثنائية النوع تعتبر مصدرا لنسبة ضئيلة من الأغشية الحيوية

-التحليل *Post-hoc* سمح بمقارنة مجموعات السلالات مثلى مثلى: مجموعتان من السلالات المتعازلة مع بعض مترابطتان بقوة.

تظهر صورة المجهر الإلكتروني هيكل ثلاثي الأبعاد من الأغشية الحيوية المختلطة التي شكلتها الأنواع معزولة شارك اثنان على الأسطح الداخلية والأجهزة الطرفية الخارجية القسطرة الوريدية.

الكلمات الرئيسية: القسطرة الوريدية الطرفية، *Candida* ، amphotercin B ، caspofungin ، الأغشية الحيوية أحادية النوع ، الأغشية الحيوية متعددة الأنواع.

RESUME :

Le but de cette étude est de rechercher les altérations fongiques mono et multi-espèces du genre *Candida* sur cathéters veineux périphériques au service de neurochirurgie du CHU de Tlemcen. Le profil de résistance des souches isolées en mode planctonique et sessile a été déterminé par calcul des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la caspofungine. L'architecture des biofilms, mono et multi-espèces, formés a été mise en évidence par microscopie électronique à balayage.

Les résultats obtenus ont montré que le taux d'altération des cathéters veineux périphériques est de 13,28%. L'identification a révélé que 31 souches appartiennent au genre *Candida* où l'espèce *albicans* est dominante. La PCR des séquences ITS de l'ADN ribosomal, a permis de corriger l'identification d'une souche de *Candida guilliermondii* parmi les isolats, qui reste difficile à identifier par Api *Candida*.

Les souches *Candida* isolées sont toutes sensibles à l'amphotéricine B et à la caspofungine à l'état planctonique, alors qu'à l'état sessile, 70,76% sont tolérantes aux deux antifongiques testés. De plus, *Candida albicans* et *Candida glabrata*, co-isolées d'un même cathéter, forment des biofilms mixtes dont l'activité métabolique varie significativement avec les proportions de chaque espèce dans le milieu. Cependant, 2/3 des souches co-isolées sont faiblement productrices de biofilms. L'analyse *post-hoc* a permis de comparer les groupes de souches 2 à 2. Deux groupes de souches co-isolées sont fortement corrélées.

L'observation au microscope électronique à balayage a révélé des biofilms mixtes hétérogènes formés sur les faces internes et externes des cathéters veineux périphériques. *Candida albicans* et *Candida glabrata* se distinguent par leurs morphologies et leurs tailles.

MOTS CLÉS : Cathéters Veineux Périphériques, *Candida*, Amphotéricine B ; Caspofungine ; Biofilms mono-espèces, Biofilms multiespèces.

SUMMARY:

The aim of this study is to investigate the mono and multi-species fungal alterations of *Candida* species on peripheral venous catheters at the neurosurgery unit of Tlemcen university hospital. The resistance profile of strains isolated in planktonic and sessile mode was determined by the minimal inhibitory concentrations of amphotericin B and caspofungin. The architecture of the biofilms, mono and multi-species, formed was demonstrated by scanning electron microscopy.

The results obtained showed that the rate of alteration of peripheral venous catheters was 13.28%. The identification revealed 38 strains of which 31 belong to the genus *Candida*. *Candida albicans* is the dominant species. The molecular identification of the strains carried out by PCR - ITS sequences of the ribosomal DNA allowed us to demonstrate the strain of *Candida guilliermondii*, which remains difficult to identify by Api *Candida*.

Candida strains are all susceptible to amphotericin and caspofungin in planktonic state. While the form of biofilms, 70.76% become tolerant to the two cited antifungal. This study also revealed the mixed biofilm formation by 2 co-isolated species *Candida albicans* and *Candida glabrata* from the same catheters. However, 2/3 of these biofilms evaluated dual-species are producers of weakly biofilms. The post-hoc test analysis was to compare two groups of strains 2 and showed that two sets strains isolated groups have strongly correlated.

The scanning electron microscopy image shows the three-dimensional structure of the mixed biofilms formed by the two co-isolated species on the inner and outer surfaces of the peripheral venous catheters.

Keywords: Peripheral Venous catheters; Colonization, *Candida*; Amphotericin B; biofilm monospecific, multispecies biofilm.

Sommaire

Première partie : Synthèse bibliographique	01
Deuxième partie : Matériel et méthodes	13
1. Matériel	14
1.1. Prélèvements des cathéters veineux périphériques	14
1.2. Préparation des solutions mères des antifongiques	14
1.3. Préparation des sels de tétrazolium (XTT) et de la Ménadione	14
2. Méthodes	15
2.1. Isolement et identification des souches de <i>Candida</i>	15
2.2. Identification par PCR ITS1-ITS4	15
2.2.1. Extraction de l'ADNr par la méthode des billes en verre	15
2.2.2. Amplification des séquences ITS	16
2.2.3. Electrophorèse et révélation	17
2.3. Evaluation de la capacité des souches à former des biofilms	17
2.3.1. Préparation des souches	17
2.3.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par technique de microdilution	18
2.3.3. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI)	18
2.3.4. Activité métabolique des souches isolées	19
2.4. Evaluation de la capacité des souches isolées à former des biofilms mixtes	20
2.5. Etude statistique	22

2.6. Observation des biofilms mixtes formés sur cathéters par Microscopie Electronique à Balayage	22
Troisième partie : Résultats et discussion	23
1. Isolement et identification des levures	24
2. PCR par amplification de ITS1/ ITS4 des levures isolées	27
3. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)	29
4. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI)	31
5. Quantification des biofilms par réduction des sels de tétrazolium (XTT)	34
6. Formation de biofilms mixtes	36
7. Etude statistique	39
8. Observation au microscope électronique à balayage des biofilms mixtes formés sur cathéters par <i>Candida albicans</i> et <i>Candida glabrata</i>	41
Quatrième partie : Conclusion générale	48
Cinquième partie : Références bibliographiques	52
Sixième partie : Annexes	64
Septième partie : Production scientifique	

Liste des tableaux

Tableau N°1	Mélange réactionnel de PCR des séquences ITS
Tableau N°2	Proportions de mixture de <i>Candida albicans</i> et de <i>Candida glabrata</i> co-isolées d'un même cathéter veineux périphérique
Tableau N°3	Fréquence d'isolement des levures à partir de cathéters veineux périphériques
Tableau N°4	CMI de l'amphotéricine B et la caspofungine vis-à-vis des souches de <i>Candida sp.</i> (CLSI, 2008)
Tableau N°5	Densités optiques à 490 nm des biofilms mono et multi-espèces formés par <i>Candida albicans</i> et <i>Candida glabrata</i>
Tableau N°6	Variance des différents mélanges <i>C. albicans/ C. glabrata</i>
Tableau N°7	Analyse <i>post-hoc</i> pour <i>Candida albicans/ Candida glabrata</i>

Liste des figures

- Figure N°1** Phases de développement d'un biofilm de *Candida albicans*
- Figure N°2** Altérations fongiques mono et multi-espèces des cathéters veineux périphériques
- Figure N°3** Extraction de l'ADN par la méthode de billes en verre à partir des isolats de *Candida* (a) et (b)
- Figure N°4** Produits de la PCR ITS1-ITS4 révélés par électrophorèse sur gel d'agarose
- Figure N°5** Concentrations Minimales Inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles de *Candida*
- Figure N°6** Concentrations Minimales Inhibitrices de la caspofungine vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles de *Candida*
- Figure N°7** Activités métaboliques des souches isolées *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* et des autres souches *non albicans* obtenues par réduction du XTT
- Figure N°8** Activité métabolique des isolats dans les biofilms mono et multi-espèces obtenus par réduction du XTT
- Figure N°9** Biofilms mixtes formés par *Candida albicans*/*Candida glabrata* selon les proportions 90 :10 ; 50 :50 et 10 :90

Liste des photos

- Photo N°1** Microphotographie d'un biofilm mixte de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* formé sur l'émail dentaire observé au MEB
- Photo N°2** Microphotographie prise par microscopie électronique à balayage des biofilms formés sur des lamelles de Thermanox à l'échelle 2 µm : *Candida albicans* (a), *Candida glabrata* (b) et biofilm mixte jeune de 24 heures de *Candida albicans/Candida glabrata* (c)
- Photo N°3** Microphotographie de la face externe d'un segment du cathéter veineux périphérique N°78
- Photo N°4** Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* sur la face externe d'un cathéter veineux périphérique par CAKT78/ CGKT78
- Photo N°5** Microphotographie d'une matrice exopolymérique enveloppant la totalité du biofilm mixte formé par CAKT152/CGKT152 sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique
- Photo N°6** Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* par CAKT209/CGKT209 sur la face externe d'un cathéter veineux périphérique
- Photo N°7** Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* par CAKT152/CGKT152 sur la face externe d'un cathéter veineux périphérique
- Photo N°8** Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* par CAKT78/CGKT78 sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique
- Photo N°9** Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* par CAKT152/CGKT152 sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique

Liste des abréviations

ANOVA	: Analysis of variance
AmB	: Amphotéricine B
BET	: Bromure d'éthidium
CIRM	: Centre International des Ressources Microbiennes
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
Csp	: Caspofungine
CVP	: Cathéter Veineux Périphérique
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
ITS	: Internal Transcribed Spacer
MOPS	: 3-(N-morpholino) propan sulfonic acid
Pb	: Paire de Bases
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymérase Chain Réaction
<i>r</i>	: Corrélation
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SCMI	: Concentration Minimale Inhibitrice des cellules Sessiles
TBE	: Tris acide borique EDTA
XTT	: 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5 [(phenylamino) carbonyl]-2-tetrazolium hydroxide
YPD	: Yeast Peptone Dextrose

Première partie

Synthèse bibliographique

Les infections associées aux soins (IAS) constituent une véritable préoccupation pour la sécurité des patients et un enjeu important pour les professionnels de la santé. Elles sont favorisées par les traitements antimicrobiens qui sélectionnent les germes résistants et le recours quasi-systématique à divers dispositifs médicaux **(Chouchene et coll., 2015)**.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 5 à 12 % des patients hospitalisés dans le monde développent une infection associée aux soins dont plus de 60 % sont liées à l'implantation d'un dispositif médical ou chirurgical **(Espinasse et coll., 2010)**. En effet, la mise en place d'un dispositif médical tel que le cathéter vasculaire constitue un site éventuel d'infection **(Silva et coll., 2011)**. Plus de 65% de toutes les infections microbiennes sont associées à la formation d'un biofilm à la surface des dispositifs médicaux **(Ramage et coll., 2006)**.

Même si les techniques aseptiques sont scrupuleusement respectées lors de l'implantation de ces dispositifs, le développement des biofilms est rapide et inéluctable sur la plupart des matériaux utilisés en médecine humaine **(Espinasse et coll., 2010)**.

Plusieurs microorganismes émergents ou multi-résistants sont à l'origine de ces infections et la place des levures appartenant au genre *Candida* n'est pas négligeable **(Chandra et coll., 2012)**.

Candida albicans est le pathogène fongique le plus fréquemment isolé en milieu hospitalier. Les autres espèces de *Candida non albicans* telles que *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* et *Candida tropicalis* ont été également retrouvées dans les isolats cliniques **[(Tumbarello et coll., 2007) ; (Pfaller et coll., 2011)]**.

Il est important de noter que les espèces de *Candida* sont difficiles à distinguer sur les seuls critères phénotypiques habituels ce qui limite leur prévalence exacte dans les infections fongiques. Ainsi, le développement de méthodes basées sur l'analyse des séquences d'ADN, permet, non seulement de définir de nouvelles espèces mais aussi, de distinguer entre les espèces proches sur le plan phénotypique **(Bougnoux et Espinasse 2003)**.

Par ailleurs, la majorité de ces microorganismes sont capables de former des biofilms et se développent préférentiellement à l'état sessile fixés à un support abiotiques (les surfaces inertes) ou biotiques (les tissus ou les cellules vivantes) plutôt qu'à l'état planctonique, libre (**Anderson et O'Toole, 2008**).

Selon **Bandara et coll., (2009)**, le biofilm peut être formé par un seul type d'espèce (biofilm mono-espèce) ou par deux ou plusieurs espèces différentes ; Il s'agit alors de biofilms mixtes ou multi-espèces.

Les études sur les infections associées aux biofilms polymicrobiens commencent à gagner une attention considérable en raison de leurs implications cliniques en termes de prise en charge thérapeutique. C'est pourquoi, il est important de comprendre les interactions microbiennes responsables du développement, de la maintenance et de la persistance de ces communautés microbiennes [(**Thein et coll., 2009**) ; (**Demuyser et coll., 2014**)].

Plusieurs espèces pathogènes du genre *Candida* telles que *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* peuvent s'associer avec d'autres microorganismes pour former des biofilms polymicrobiens (**Harriott et Noverr, 2010**).

Au sein d'un même biofilm, les microorganismes développent soit des relations de synergie pour faciliter la cohabitation soit des relations d'antagonisme de type compétitif dans le cas de co-colonisation (**Filleron et coll., 2015**).

L'association levures-bactéries au sein d'un biofilm est souvent rencontrée dans la nature. En **2008**, **Ader et ses collaborateurs** ont étudié l'interaction entre *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* et ont montré que cette bactérie exploite les formes filamenteuses de *Candida albicans* pour promouvoir sa croissance et son organisation en biofilm, il s'agit d'un antagonisme entre ces deux espèces. Des tests *in vitro* ont mis en évidence la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à sécréter des agents inhibiteurs de la croissance de *Candida* tels que la Pyocyanine et le 1-Hydroxyphenazine. Ces composés ont un pouvoir antifongique, avec des CMI comparables à celles de l'amphotéricine B et du la fluconazole envers *Candida albicans* (**Kerr et coll., 1999**). Le développement des hyphes joue un rôle important dans la formation des biofilms, mais aussi dans la

production de substrats pour l'adhésion d'autres espèces, induisant des communautés polymicrobiennes (**Xu et coll., 2008**)

Cet antagonisme a été rapporté également par **Morales et coll., (2013)** et **Bandara et coll., en 2013**. Une autre interaction antagoniste a été mise en évidence par **Fox et coll., (2014)** entre *Candida albicans* et *Klebsiella pneumoniae*.

En revanche, d'autres interactions de synergie ont été observées entre *Candida albicans* et des staphylocoques [(**Klotz et coll., 2007**) ; (**Perloth et coll., 2007**)].

Staphylococcus aureus et *Candida albicans* ont été co-isolées des surfaces de divers biomatériaux tels que les prothèses dentaires, les implants médicaux et les sondes endotrachéales (**Shirliff et coll., 2009**) (**Photo N°1**).

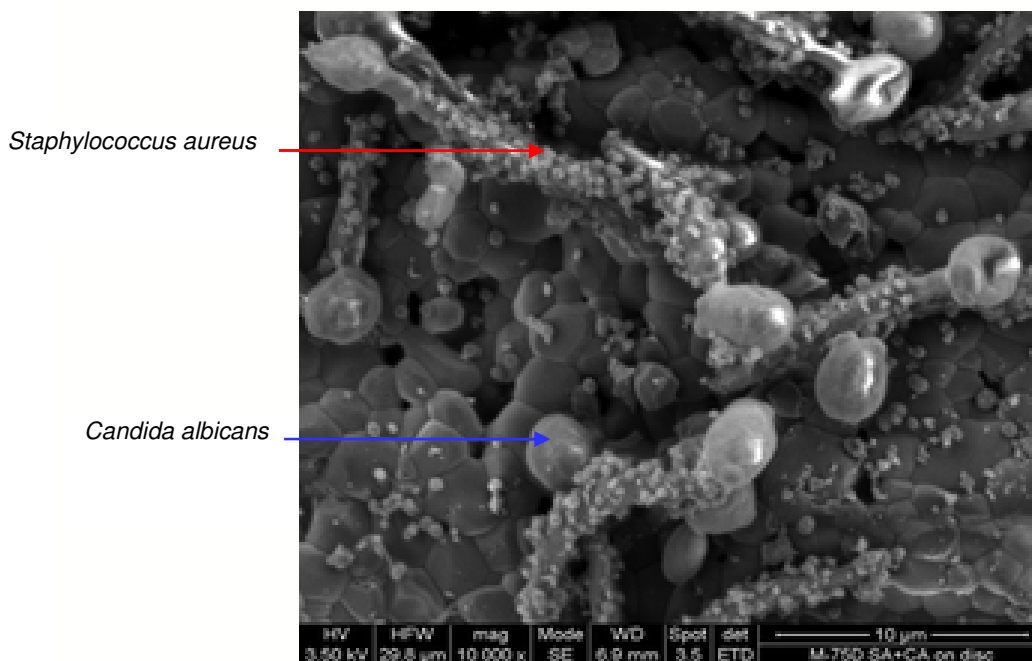


Photo N°1: Microphotographie d'un biofilm mixte de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* formé sur l'émail dentaire observé au MEB (**Shirliff et coll., 2009**).

Une récente étude menée par **Cavalcanti** et son équipe (**2016**) a mis en évidence l'interaction de façon synergique de *Candida albicans* et deux bactéries de la cavité buccale *Actinomyces oris* et *Streptococcus oralis*.

De plus, en **2015**, **Seghir et ses collaborateurs**, ont mis en évidence la formation de biofilms mixtes *in vitro* par *Candida albicans* et *Serratia liquefaciens*, *Candida albicans* et *Bordetella sp.* et *Candida albicans* et *Enterobacter cloacae*. Ils ont montré que la formation de biofilms mixtes dépend de la composition du milieu de culture, de son pH, et des espèces qui le constituent.

Candida albicans peut être impliquée également dans des interactions avec d'autres levures. Les données disponibles sur ce type d'interactions montrent qu'afin de former un biofilm mixte, les levures doivent maintenir un équilibre qui bascule de la synergie à l'antagonisme selon les conditions environnantes (**Santos et coll., 2016**).

Les mécanismes par lesquels les espèces levuriennes coexistent dans les biofilms mixtes (levures/levures) sont mal compris et les études menées jusqu'à présent se sont limitées à quelques espèces du genre *Candida*.

Selon **Kirkpatrick et coll., (2000)** *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* coexistent dans les cavités buccales et développent des relations d'antagonisme entre elles. En effet, en présence d'un support pour le biofilm mixte, *Candida dubliniensis* résiste aux pressions concurrentielles rigoureuses pour les éléments nutritifs de *Candida albicans*.

En 2004, **El Azizi et ses collaborateurs** ont mis en évidence des interactions de nature synergique entre *Candida albicans* et *Candida lipolytica* ou *Candida parapsilosis* d'une part, et une interaction antagoniste entre *Candida albicans* et *Candida guilliermondii* d'autre part.

De plus, **Silva et coll., (2011)** ont montré que *Candida albicans* et *Candida glabrata* peuvent former un biofilm mixte, est souvent responsable de pathologies buccodentaires. Ce dernier, est constitué de blastospores adhérentes à une surface de thermanox dentaire et des hyphes envahissant la matrice exopolymérique (**Photo N°2**).

D'autres interactions d'antagonismes entre *Candida albicans* et *Candida krusei* ont été rapportées par **Santos et coll. (2016)** qui suggèrent que l'espèce *Candida krusei* produit des molécules de signalisation qui inhibent la croissance et l'activité métabolique de *Candida albicans*.

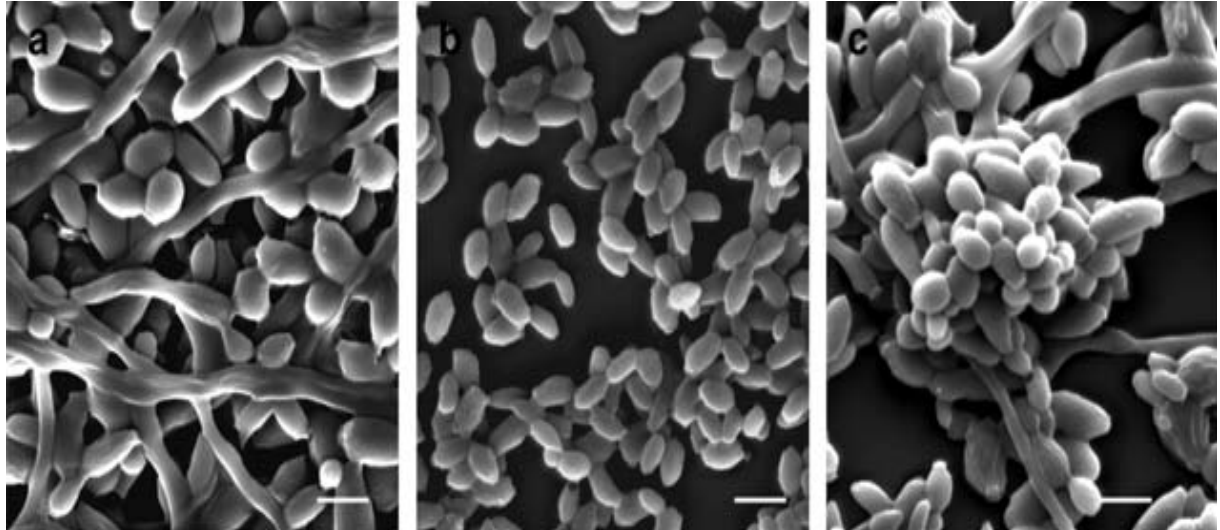


Photo N°2 : Microphotographie prise par microscopie électronique à balayage des biofilms formés sur des lamelles de Thermanox à l'échelle 2 μm : *Candida albicans* (a), *Candida glabrata* (b) et biofilm mixte jeune de 24 heures de *Candida albicans*/*Candida glabrata* (c) (**Ramage et coll., 2010**)

Les cellules incluses dans un biofilm développent différentes stratégies pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et deviennent tolérantes aux antimicrobiens (**Høiby et coll., 2010**).

Le biofilm mono ou multi-espèces est gouverné par de nombreux facteurs, tels que, le taux de croissance et le type de micro-organismes, la formation des substances polymériques extracellulaires, les caractéristiques de la surface (rugosité, hydrophobicité) ou de l'interface (solide, liquide ou gaz) et le temps de contact. La formation d'un biofilm mono ou multi-espèces dépend aussi des microorganismes qui le composent et des relations qui peuvent exister entre eux (**Wimpenny et coll., 2000**).

L'une des caractéristiques des biofilms (bactériens, fongiques ou mixtes) est la présence d'une matrice extracellulaire exopolymérique qui se dresse comme une barrière et ralentit l'infiltration, neutralise les agents antimicrobiens, protège les microorganismes du biofilm de la dessiccation et fournit une défense contre les phagocytes [(Hall-Stoodley et coll., 2004) ; (Clutterbuck et coll., 2007)].

Sa composition chimique varie en fonction des espèces microbiennes qui forment le biofilm (Al-Fattani et Douglas 2006). Elle contient des polysaccharides extracellulaires, de l'ADN, des protéines et de l'eau dont la teneur dépend de l'alimentation [(Branda et coll., 2005) ; (Comte et coll., 2007)].

Des composants sanguins de l'hôte peuvent être retrouvés également dans le biofilm en fonction de l'environnement où cette communauté s'est développée (Hall-Stoodley et coll., 2012).

Selon Silva et coll., (2009), la composition en glucides et en protéines de la matrice exopolymérique dépend de l'espèce levurienne qui forme le biofilm. En effet, la matrice exopolymérique produite par *Candida parapsilosis* isolée cliniquement est riche en glucides, alors que celle produite par *Candida tropicalis* est riche en protéines. En revanche, *Candida glabrata* produit une matrice exopolymérique avec autant de protéines que de glucides.

Ces substances constituent un des éléments clés de la morphologie du biofilm et permettent aux cellules de se lier entre elles (Stoodley et coll., 2002).

En 2007, Costerton en utilisant la microscopie confocale laser, a montré que le biofilm est traversé par des canaux d'eau qui facilitent le transport de nutriments, l'excrétion des déchets métaboliques et des sous-produits cellulaires.

La formation d'un biofilm mono ou multi-espèces est un processus régulé et complexe nécessitant un comportement collectif de coordination, d'interaction et de communication [(West et coll., 2006); (Danhorn et Fugua, 2007)].

Les micro-organismes ciblent un site favorable à leur association soit directement avec la surface soit avec d'autres micro-organismes précédemment installés (Kaiser, 2007). Cette phase se poursuit par transition de l'état planctonique à l'état sessile.

Quelque soit les microorganismes qui le composent, la formation des biofilms passe par quatre phases successives (**Figure N°1**).

- **Phase d'adhésion (0-11h)** : Elle commence dès l'adhésion des cellules planctoniques à une surface (**Ramage et coll., 2009**).
- **Phase intermédiaire (12-30h)** : pendant cette phase, les cellules se multiplient et se divisent aboutissant à la formation de microcolonies qui adhèrent de façon irréversible. La matrice extracellulaire est ainsi produite (**Stoodley et coll., 2002**).
- **Phase de maturation (31-72h)** : Elle est marquée par une croissance en multicouches donnant naissance à un biofilm. Ce dernier est sous contrôle du quorum sensing, un phénomène qui permet la coordination des comportements cellulaires au sein du biofilm (**Blankenship et Mitchell, 2006**).

Il s'agit d'un système de communication, au cours duquel des molécules de signalisation qui permettent de contrôler le surplus de la population et la compétition pour les nutriments, sont activées (**Hornby et coll., 2001**).

En ce qui concerne *Candida albicans*, il a été montré que le farnésol et le tyrosol sont les deux molécules clés contribuant au quorum sensing (**Kruppa, 2008**). Le farnésol agit lors de la transition morphologique par inhibition de la formation d'hyphes, à l'inverse du tyrosol qui stimule la production des tubes germinatifs [(**Hornby et coll., 2001**) ; (**Chen et coll., 2004**)].

- **Phase de dispersion** : c'est la phase de diffusion des cellules filles du biofilm. Elle joue un rôle extrêmement important dans la dissémination et la complication des infections systémiques. Le biofilm constitue un réservoir de pathogènes qui peuvent se détacher à tout moment et se disséminer dans la circulation sanguine, induisant ainsi une fongémie aiguë et/ou une infection générale [(**Zakikhany et coll., 2007**) ; (**Ramage et coll., 2012**)].

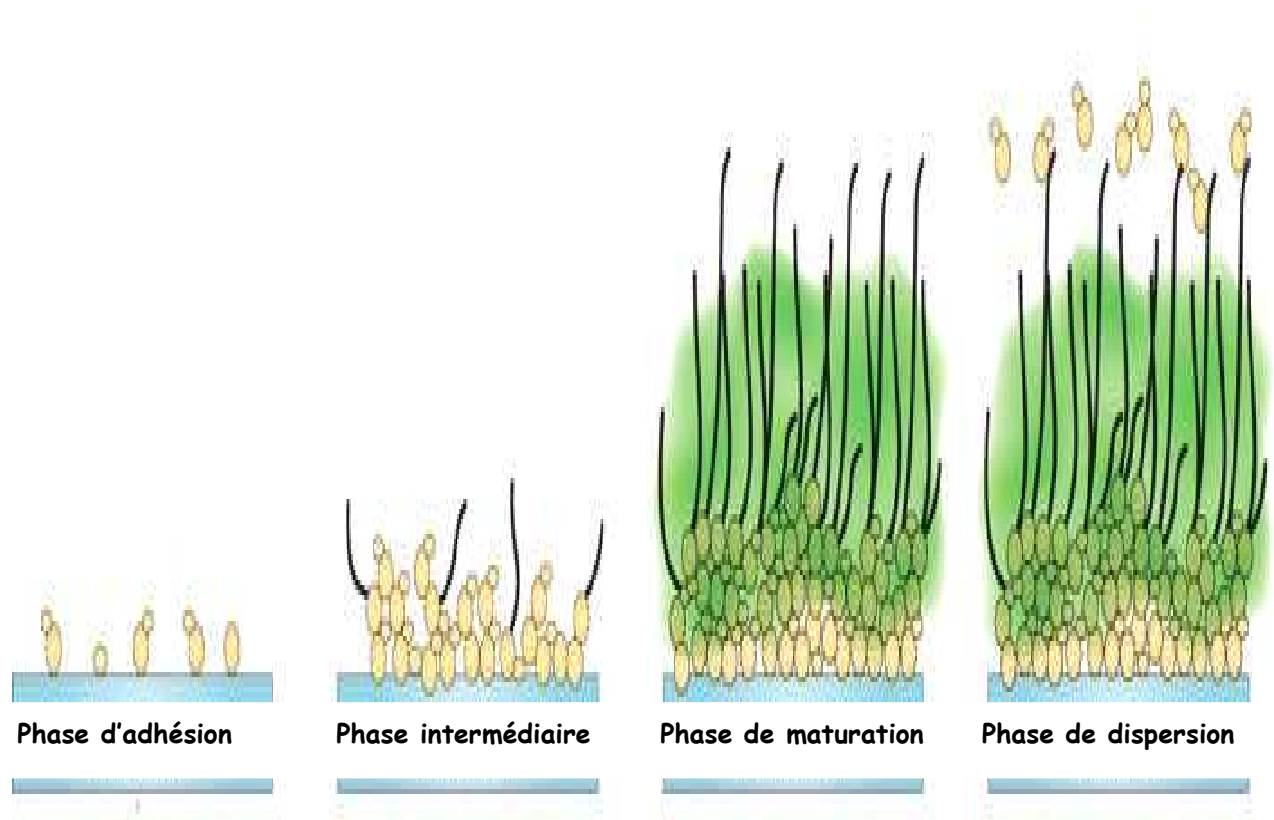


Figure N°1 : Phases de développement d'un biofilm de *Candida albicans* (Finkel et Mitchell, 2011).

Malgré des progrès considérables réalisés dans la compréhension des biofilms microbiens au cours de cette dernière décennie, il reste beaucoup à apprendre sur ce mode de vie ainsi que sur la résistance et la tolérance des microorganismes, deux phénomènes qui peuvent être à l'origine des échecs thérapeutiques (Coenye et coll., 2014).

Selon **Burmolle et coll., (2006)**, les biofilms multi-espèces sont plus tolérants aux antimicrobiens que les mono-espèces. Cette tolérance dépend de la composition de la matrice du biofilm et des espèces microbiennes qui le forment (Elias et Banin, 2012). En effet, les cellules sessiles de *Candida albicans* peuvent être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux antifongiques que leurs homologues planctoniques, toutefois, les levures peuvent être à la fois résistantes et tolérantes aux antimicrobiens (Tobudic et coll., 2012).

Plusieurs auteurs ont décrit la résistance accrue du biofilm fongique notamment à *Candida* par rapport à sa forme planctonique [(Ostrosky-Zeichner et coll., 2003); (Tobudic et coll., 2012)]. Cette résistance aux antifongiques est un phénomène réversible.

Les levures adhérentes qui se détachent retrouvent leur sensibilité aux antifongiques (Tobudic et coll., 2012). On parle alors de tolérance du biofilm plutôt que de résistance.

La tolérance est un phénotype multifactoriel non héréditaire associé au mode de vie en biofilm (cellules sessiles) et peut être induite par la présence d'agents antimicrobiens [(Ramage et coll., 2009) ; (Lebeaux et coll., 2014)].

Au sein d'un biofilm, les levures peuvent être résistantes et/ou tolérantes aux antimicrobiens. Différents mécanismes sont associés à la tolérance des cellules en mode biofilm parmi lesquels nous pouvons citer :

-Les cellules persistantes (persister) : Il s'agit de variants phénotypiques qui peuvent être en grande partie responsables de la tolérance des biofilms fongiques. Elles représentent une sous-population infime (<1%) de la population du biofilm et sont différentes des mutants résistants par leur tolérance aux antimicrobiens (Van Acker et Coenye, 2016). Les persisters survivent à des concentrations élevées en agents antimicrobiens (Lewis, 2008 et 2010).

-La pénétration restreinte de l'agent antimicrobien : Elle est caractérisée par un défaut de pénétration des agents antimicrobiens dans les profondeurs du biofilm (Al-Fattani et coll., 2006). Les multiples couches de cellules et les exopolysaccharides constituent une structure complexe et compacte dont la pénétration des antimicrobiens et des désinfectants est restreinte à travers cette matrice (Bridier et coll., 2011).

En 2006, Burmolle et ses collaborateurs ont signalé que, dans un biofilm mixte, la présence d'une seconde espèce peut modifier la composition de sa matrice exopolymérique et par conséquent, ralentir la pénétration de l'agent antimicrobien.

-Les différentes sous-populations physiologiquement actives : Au sein d'un biofilm, les cellules ont des activités métaboliques très variées. Celles en surface ont un meilleur accès à l'oxygène et aux éléments nutritifs et peuvent libérer facilement leurs déchets métaboliques dans le fluide extérieur. Elles ont une croissance plus

active que les cellules situées dans les régions enfouies du biofilm dites dormantes (**Bridier et coll., 2011**). Il est à noter, que les cellules dormantes ne sont pas des persistantes (**Lebeau et coll., 2014**).

- **La réponse au stress nutritionnel ou réponse stringente** : Elle conduit à l'arrêt de la multiplication microbienne et à la tolérance aux antibiotiques (**Lebeau et coll., 2014**).

Quant aux mécanismes de résistance qui eux empêchent les antimicrobiens d'interagir avec la cible, ils sont souvent communs aux cellules sessiles et planctoniques (**Borghi et coll., 2016**). La résistance est généralement testée en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un agent antimicrobien (**Olsen, 2015**). Les déterminants de la résistance les plus fréquents sont :

- **La régulation positive des pompes à efflux** : Les pompes à efflux interviennent activement dans la résistance des biofilms formés par *Candida sp.* par expulsion des composés antimicrobiens [(**Nett et coll., 2009**) ; (**Ramage et coll., 2002**)]. La surexpression des protéines d'efflux est le mécanisme de résistance aux azolés le plus fréquemment rencontré chez les espèces du genre *Candida* isolées cliniquement (**Mathé et Van Dijck, 2013**)

-**La densité cellulaire** : La régulation génétique liée au quorum sensing peut aussi contribuer aux phénomènes de résistance (**Seneviratne et Samaranayake, 2008**).

-**La mutation** : Le changement de la sensibilité d'un biofilm vis-à-vis d'un antibiotique peut survenir par mutation du gène codant l'enzyme impliquée pour le métabolisme de l'antifongique (**Mathé et Van Dijck, 2013**). Durant le développement d'un biofilm, des cellules mutantes peuvent émerger et leur proportion peut augmenter en raison des multiples pressions de sélection qui s'y exercent (**Von Eiff et coll., 2006**).

-**La réduction du taux de croissance** : C'est un mécanisme de résistance rencontré seulement chez les cellules planctoniques de *Candida albicans*. Il est caractérisé par une faible expression des cibles et par conséquent, une diminution de l'efficacité des antifongiques (**Baillie et Douglas, 1998**).

Selon **Mah (2012)**, plusieurs mécanismes de résistance et/ou de tolérance agissent ensemble pour fournir un niveau élevé de protection contre les agents antimicrobiens.

Bien que, les études récentes commencent à mettre l'accent sur les biofilms mixtes principalement levures-bactéries, peu de travaux se sont intéressés aux biofilms mixtes levures/levures notamment *Candida albicans/Candida non albicans*.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui a porté sur trois principaux volets :

-Isolement et identification des espèces du genre *Candida* à partir de cathéters veineux périphériques implantés depuis 48 heures et plus au service de Neurochirurgie postopératoire du CHU de Tlemcen.

-Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des cellules planctoniques et sessiles vis-à-vis de l'amphotéricine B et de la caspofungine

-Quantification et mise en évidence *in vitro* de l'architecture des biofilms mono-espèces et mixtes (*Candida albicans/Candida non-albicans*) 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 de Tlemcen.

1. Matériel

1.1. Prélèvements des cathéters veineux périphériques

Durant la période allant de Janvier 2012 à Octobre 2014, 256 cathéters veineux périphériques sont prélevés du service de neurochirurgie en postopératoire du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen. Seuls les cathéters implantés depuis 48 heures et plus sont inclus dans cette étude.

Les extrémités distales des cathéters sont coupées à l'aide d'un bistouri stérile puis placées dans des tubes contenant 5 mL de milieu Sabouraud liquide. Après agitation au vortex pendant une minute, les tubes sont placés dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures [(Brun Buisson et coll., 1987) ; (Boucherit-Atmani et coll., 2011)].

1.2. Préparation des solutions mères des antifongiques

Deux antifongiques sont utilisés, l'amphotéricine B de la famille des polyènes, et la caspofungine de la classe des echinocandines. Les solutions mères d'antifongiques sont préparées Les solutions mères d'antifongiques sont préparées en solubilisant l'amphotéricine B dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et la caspofungine dans l'eau distillée stérile. Les concentrations finales en antifongique dans chaque puits sont comprises entre 0,03 et 16 µg/mL pour l'amphotéricine B et entre 0,015 et 8 µg/mL pour la caspofungine.

1.3. Préparation des sels de tétrazolium (XTT) et de la Ménadione

Le tétrazolium "XTT" (2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium 5-carboxanilide) (SIGMA) est préparé par dissolution dans le tampon phospahte salé PBS (pH 7,4, 10 mM) à une concentration de 5 mg/mL. Après stérilisation par des filtres millipores de diamètre de 0,22 µm, il est stocké à - 20°C à l'abri de la lumière. La ménadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) appelée également vitamine K3 (SIGMA) est utilisée comme accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire.

La solution mère de ménadione est préparée dans l'acétone à une concentration de 0,17 mg/mL puis stérilisée par filtration en extemporané.

2. Méthodes

2.1. Isolement et identification des souches *Candida*

A partir des tubes présentant un trouble, les inocula sont ensemencés sur gélose Sabouraud, puis incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. L'identification des souches est réalisée par galerie API *Candida* (BioMérieux[®], Marcy l'Etoile). Les souches isolées et identifiées reçoivent un code.

2.2. Identification par PCR ITS1-ITS4

Cette partie est réalisée au Centre International de la Recherche Microbienne-Levures (CIRM - Levures) dirigé par le Professeur Serge Casaregola (Thiverval-Grignon, France).

Nous avons utilisé PCR par amplification des séquences *Internal Transcribed Spacer* (ITS) de l'ADN ribosomale (ADNr).

Le principe consiste à amplifier les régions d'espacement intergéniques (ITS) de l'ADN ribosomique qui sont utilisées pour le diagnostic, l'identification, la taxonomie et la phylogénie des levures et fungi en milieu clinique (**Shokohi et coll., 2010**) (**Annexe 7**).

2.2.1. Extraction de l'ADNr par la méthode des billes en verre (**Hoffman et Winston (1987)**).

A partir d'une culture de 17 heures à 28°C dans le milieu Yeast Peptone Dextrose (YPD), les cellules sont transférées dans des tubes puis centrifugées à 2500 g pendant 3 minutes. Le surnageant est écarté et le culot est resuspendu dans 0,2 mL de tampon de lyse (1% de SDS, 2% de Triton, NaCl 100mM, EDTA-Tris (pH 8, 50 mM). 0,3 g de billes de verre (de diamètre compris entre 0,45-0,50 mm) et 200 µL de phenol/chloroforme à pH 8 sont ajoutés à la suspension.

Après une centrifugation à 12000 g pendant 5 minutes, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube auquel 500 µL de chloroforme sont ajoutés puis centrifugée à 12000 g pendant 2 minutes, l'ADN est précipité par addition de 500 µL d'isopropanol à 100% et centrifugation à 12000 g pendant 2 minutes.

Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec une solution d'éthanol à 70 % puis remis en suspension dans de l'eau ultra-pure stérile.

L'ADN génomique est récupéré par centrifugation à 12000 g pendant 4 min à + 4°C. Les tubes sont ensuite séchés et la suspension est remise dans 20 à 50 µL de tampon Tris- EDTA et 1 à 2 µL de RNase (10 mg/mL) afin d'éliminer les ARN.

La quantité d'extrait d'ADN est estimée visuellement en comparant les intensités des dépôts avec celles du marqueur de taille correspondant à 100 ng/µL.

2.2.2. Amplification des séquences ITS

Le mélange réactionnel (le mix) est constitué d'eau ultra-pure, de la Taq polymérase et des amorces spécifiques pour l'ADNr ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3') (**Tableau N°1**).

Tableau N°1 : Mélange réactionnel de PCR des séquences ITS

	Amorces	ITS1/ITS4
Mix		
ADN (25 ng)		2 µL
dNTP (2,5 mM)		2 µL
Amorce1 (5 pmol/µL)		1 µL
Amorce2 (5 pmol/µL)		1 µL
Tampon 10x		2,5 µL
Ex-Taq (5 U/µL)		0,1 µL
Eau ultrapure		17,4 µL

L'amplification est effectuée à +4°C par un Thermocycleur 2720 (Applied Biosystems) selon le programme décrit par CIRM-levures (Grignon-Thiverval, France) qui comporte les étapes suivantes :

Première étape : - Dénaturation initiale à + 94°C pendant 4 minutes

Deuxième étape : - Dénaturation à + 94°C pendant 30 secondes
- Hybridation à + 48°C pendant 40 secondes
- Elongation à + 72°C pendant 90 secondes

} 30 cycles

Troisième étape: - Elongation finale à + 72°C pendant 7 minutes

2.2.3. Electrophorèse et révélation

Les produits de PCR obtenus sont soumis à une électrophorèse à 90 Volts pendant 45 minutes, sur gel d'agarose à 0,8% contenant 5 µL de bromure d'éthidium à 10 mg/mL (BET, Promega). Après migration, les gels sont photographiés à l'aide d'un appareil photo relié à l'ordinateur et géré par le logiciel Gensnap Sgd.

2.3. Evaluation de la capacité des souches à former des biofilms (Ramage et coll., 2001)

2.3.1. Préparation des souches

Les souches isolées à partir des cathéters sont inoculées dans 20 mL de milieu Sabouraud liquide à 30°C pendant 8 heures sous agitation continue à 180 tours/min. Après centrifugation à 3000 g pendant 5 minutes à +4°C, le surnageant est éliminé et le culot est rincé deux fois avec du tampon phosphate salé (PBS 10mM, pH 7,4) puis resuspendu dans 20 mL de milieu RPMI-1640 tamponné avec l'acide morpholino-propane sulfonique (MOPS pH 7- 0,165 M).

La concentration cellulaire de départ est fixée à 10³ cellules/mL pour les cellules planctoniques et 10⁶ cellules/mL pour les cellules sessiles.

2.3.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par la technique de microdilution (CLSI M27-A3, 2008)

Dans chaque puits de la microplaque, nous introduisons 100 µL de milieu RPMI 1640. 100 µL de la solution antifongique à une concentration finale de 64 µg/mL sont ajoutés au premier puits.

Après homogénéisation, une série de dilution au ½ est réalisée de puits en puits. 100 µL de l'inoculum à une concentration finale allant de 10³ cellules/mL sont ajoutés dans tous les puits de la microplaque.

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

2.3.3. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI) (Ramage et coll., 2001)

Les concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles (SCMI) sont évaluées par réduction du XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-caboxanilide) en formazan, un composé orange, soluble dans l'eau.

L'activité métabolique est proportionnelle à l'intensité de la couleur de ce composé (Kuhn et coll., 2003).

Les mesures de SCMI sont évaluées à 50% et 80% d'inhibition selon la formule suivante :

$$SCMI = 100 \left(1 - \frac{\text{moyenne des DO à 490 nm (puits avec antifongique)}}{\text{moyenne des DO à 490 nm (puits témoins sans antifongique)}} \right)$$

100 µL de l'inoculum à une concentration de 10⁶ cellules/mL sont introduits dans chaque puits, la microplaque est scellée puis placée dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Le surnageant est aspiré et les puits sont rincés deux fois avec le PBS stérile afin d'éliminer les cellules non adhérentes aux surfaces des puits.

100 µL de milieu RPMI 1640 sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque. 100 µL de la solution antifongique (à une concentration finale de 64 µg/mL) sont incorporés dans le premier puits. Après homogénéisation, une série de dilution au 1/2 de puits en puits est effectuée.

Les microplaques sont scellées puis incubées pendant 24 h à 37°C. Après un lavage des puits avec du PBS stérile, 100 µL du mélange XTT/Ménadione sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque.

Les microplaques sont ré-incubées dans une étuve à 37°C pendant 3 à 4 heures. 75 µL du contenu de chaque puits sont transférés dans une nouvelle microplaque stérile. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 490 nm dans un lecteur de microplaques spectrophotométrique (Biotek, ELx800).

2.3.4. Activité métabolique des souches isolées (Valentin et coll., 2007)

Le XTT est réduit par les levures en formazan, dont la concentration est déterminée par mesure de la densité optique dans le milieu extracellulaire.

Les souches de *Candida* isolées sont considérées comme productrices de biofilms lorsque la densité optique mesurée à 490 nm est supérieure ou égale à 0,200.

Selon **Villar-Vidal et coll., 2011**, les souches sont regroupées en 6 catégories en fonction de la densité optique à 490 nm :

+6 (DO > 1,30) ; +5 (DO = 1 à 1,29) ; +4 (DO = 0,70 à 0,99) ; +3 (DO = 0,40 à 0,69) ; +2 (DO = 0,20 à 0,39) et +1 (DO < 0,20).

- Catégories +6, +5 : Souches hautement productrices de biofilms
- Catégories +3, +4 : Souches modérément productrices de biofilms
- Catégories + 2 : Souches faiblement productrices de biofilms
- Catégorie +1 : Souches non-productrices de biofilms

2.4. Evaluation de la capacité des souches isolées à former des biofilms mixtes

Nous avons testé la formation de biofilms mixtes des espèces *Candida albicans* et *Candida glabrata* isolées d'un même cathéter.

La production de biofilms mixtes est considérée comme positive si la densité optique à 490 nm est supérieure ou égale à 0,200.

Un volume de 100 µL d'une suspension cellulaire mixte à 10^6 cellules/mL, sont déposés dans les puits de la microplaque.

Les deux espèces sont mélangées selon les proportions suivantes : 100:0 ; 90:10 ; 50:50 ; 10:90 et 0:100 (**Tableau N°2**).

Tableau N°2 : Proportions de mixture de *Candida albicans* et de *Candida glabrata* co-isolées d'un même cathéter veineux périphérique

Co-culture Proportions	Combinaison entre <i>Candida albicans</i> / <i>Candida glabrata</i>		
	Combinaison 1 CAKT78/CGKT78	Combinaison 2 CAKT152/GKT152	Combinaison 3 CAKT209/CGKT209
<i>C. albicans</i> (100:0)	10 ⁶ cellules/mL	10 ⁶ cellules/mL	10 ⁶ cellules/mL
Mixte 1 (90:10)	0,9.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,1.10 ⁶ cellules /mL <i>C. glabrata</i>	0,9.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,1.10 ⁶ cellules/mL <i>C. glabrata</i>	0,9.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,1.10 ⁶ cellules/mL <i>C. glabrata</i>
Mixte 2 (50:50)	0,5.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,5.10 ⁶ cellules/mL <i>C. glabrata</i>	0,5.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,5.10 ⁶ cellules/mL <i>C. glabrata</i>	0,5.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,5.10 ⁶ cellules/mL <i>C. glabrata</i>
Mixte 3 (10:90)	0,1.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,9 .10 ⁶ cellules/mL <i>C. glabrata</i>	0,1.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,9.10 ⁶ cellules/mL <i>C. glabrata</i>	0,1.10 ⁶ cellules/mL <i>C. albicans</i> + 0,9.10 ⁶ cellules/mL <i>C. glabrata</i>
<i>C. glabrata</i> (0:100)	10 ⁶ cellules/mL	10 ⁶ cellules/mL	10 ⁶ cellules/mL

CA : *Candida albicans* ; CG : *Candida glabrata*

2.5. Etude statistique

Pour analyser les données des croissances en co-culture, nous avons réalisé une étude statistique par le logiciel StatPlus.

Les souches isolées à partir d'un même cathéter sont estimées avec une analyse de variance ANOVA. L'objectif de cette ANOVA est de tester l'hypothèse nulle H_0 selon laquelle les mixtures ne sont pas différentes pour *Candida albicans* et *Candida glabrata* en culture mixte.

Étant principalement intéressé par la formation de biofilms multi-espèces, les principaux effets significatifs sont explorés en comparant toutes les combinaisons utilisant *post-hoc*, qui permet de comparer des groupes sans qu'une hypothèse sur la relation entre ces groupes ait été posée avant d'examiner les données.

2.6. Observation des biofilms mixtes formés sur cathéters par Microscopie Electronique à Balayage

Pour mettre en évidence la formation des biofilms mixtes, des analyses par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) sont menées sur des échantillons formés sur cathéters. Cette partie de l'étude est réalisée au Plateau Technique de Microscopie Électronique et de Microanalyses du Muséum National d'Histoires Naturelles (MNHN) de Paris (France).

Les cathéters sont fixés par addition d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans le PBS.

Après incubation pendant 3 à 4 heures à température ambiante, les échantillons sont rincés 3 fois pendant 10 min avec le tampon Sorensen puis déshydratés par passages consécutifs dans des bains d'éthanol (30, 50, 70 et 100%).

Les échantillons sont amenés au point critique (+35°C sous 1200 à 1300 atmosphère) permettant un passage continu de la phase liquide à la phase gazeuse. Ils sont ensuite métallisés à l'or dans un évaporateur JEOL ION SPUTTER JFC-1200 (30 mA) puis observés au microscope électronique à balayage HITACHI SU 3500.

Troisième partie
Résultats et discussion

Dans cette étude nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à la recherche des altérations fongiques mono et multi-espèces des cathéters veineux périphériques prélevés du service de neurochirurgie post-opératoire au CHU de Tlemcen. Dans un deuxième temps, nous avons évalué le potentiel des souches isolées à former des biofilms mixtes (levures-levures) *in vitro* dont l'architecture est mise en évidence par Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

1. Isolement et identification des levures

Sur 256 cathéters veineux périphériques prélevés, 34 se sont révélés positifs soit un taux de 13,28 %. Ce taux est comparable à celui obtenu par **Seghir et coll., (2015)** qui ont montré que 11,92 % des cathéters veineux périphériques sont altérés par des levures aux services de chirurgie A, B et de cardiologie du CHU de Tlemcen.

Les résultats relatifs à l'identification des souches sont présentés dans le **tableau N°3**.

Tableau N°3 : Fréquence d'isolement des levures à partir de cathéters veineux périphériques

Souches isolées	Fréquence d'isolement : 256 Prélèvements
<i>Candida sp.</i>	(n=31) 81,58 %
<i>Candida albicans</i>	(n=14) 36,84%
<i>Candida parapsilosis</i>	(n=9) 23,68%
<i>Candida glabrata</i>	(n=5) 13,15%
<i>Candida guilliermondii</i>	(n=1) 2,63%
<i>Candida kefyr</i>	(n=1) 2,63%
<i>Candida famata</i>	(n=1) 2,63%
Non-<i>Candida</i>	(n= 7) 18,42%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(n=3) 7,89%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	(n=2) 5,26%
<i>Trichosporon spp.</i>	(n=2) 5,26%
Total	(n=38) 100%

A partir de 34 cathéters altérés, nous avons isolés 31 souches du genre *Candida* soit un taux de 81,58% et 7 du genre non *Candida* soit un taux de 18,42%.

Nous remarquons que l'espèce *Candida albicans* occupe la première place avec un taux de 36,84% suivie de *Candida parapsilosis* et de *Candida glabrata* avec des taux respectifs de 23,68% et 13,15%.

Candida guilliermondii, *Candida famata* et *Candida kefyr* occupent la dernière place avec un taux de 2,63%.

Candida albicans est l'espèce dominante dans nos isolats cliniques, ceci est en accord avec les données de la littérature, qui montrent que c'est la levure la plus fréquemment isolée et la plus impliquée dans l'infection en milieu hospitalier [(Micelli et coll., 2011) ; (Silva et coll., 2011)].

Les espèces *non albicans* sont isolées avec une fréquence de 44,73%. Ce taux est en accord avec les travaux de **Criseo et ses collaborateurs (2015)** qui ont mis en évidence l'émergence de ces levures en milieu hospitalier à travers le monde.

Selon **Eggiman et coll., (2003)**, la proportion des espèces *non albicans* varie en fonction des pathologies à risque, de l'âge des patients et des zones géographiques. De ce fait, il est recommandé de prendre en compte les données locales concernant les espèces prédominantes (**Pappas et coll., 2009**).

Il est intéressant de souligner que la répartition des levures isolées à partir des cathéters varie d'un centre hospitalier à un autre et d'un service à un autre. En effet, les travaux de **Seghir et coll., (2014)** au CHU de Tlemcen ainsi que ceux de **Bendjelloul et coll., (2016)** au CHU d'Oran ont montré que *Candida parapsilosis* est l'espèce dominante, alors qu'au CHU de Sidi Bel Abbas, l'espèce dominante est *Candida glabrata* (**Seddiki et coll., 2013**).

En 2006, l'équipe d'**Almirante** a montré que *Candida parapsilosis* et *Candida guilliermondii* sont des levures qui colonisent la peau et peuvent par conséquent, migrer vers le cathéter lors de son insertion (**Almirante et coll., 2006**).

Candida kefyr et *Candida famata* sont les moins fréquentes dans les isolats cliniques (**Brandt et Lockhart, 2012**).

De plus, **Miceli et coll., (2011)**, ont montré que les espèces non *Candida* peuvent être impliquées dans les infections fongiques associées aux soins.

Nous avons également isolé l'association *Candida albicans/Candida glabrata* de trois cathéters différents et *Candida parapsilosis/Trichosporon sp.* d'un seul cathéter (Figure N°2).

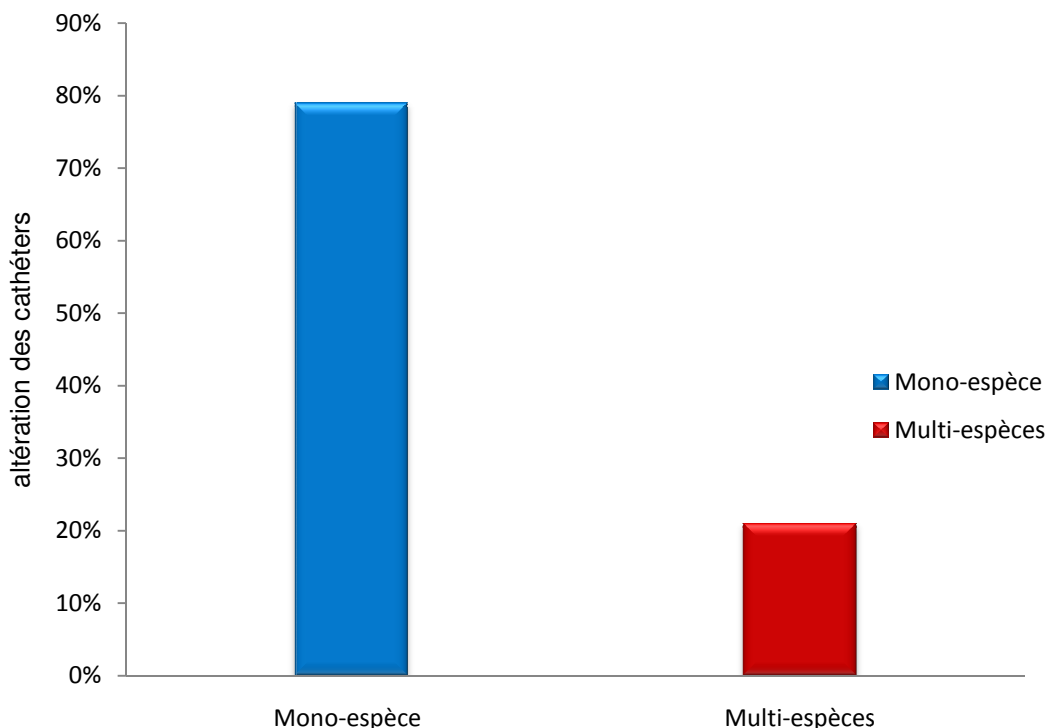


Figure N°2 : Altérations fongiques mono et multi-espèces des cathéters veineux périphériques

L'altération mono-espèce des cathéters est plus importante que celle des multi-espèces avec une fréquence de 79 et 21 % respectivement.

La présence de deux ou plusieurs espèces sur un même cathéter représente un éventuel risque d'une fongémie mixte (**Jensen et coll., 2007**).

Candida albicans/Candida non albicans est l'association la plus retrouvée dans les fongémies mixtes [(**Jensen et coll., 2007**) ; (**Klotz et coll., 2007**) ; (**Nace et coll., 2009**)].

Selon, **Silva et ses collaborateurs (2011)** la co-infection par *Candida albicans* et *Candida glabrata* est souvent rencontrée dans l'épithélium buccale.

2. PCR- ITS1/ ITS4

La pureté et la concentration de l'ADN ribosomal extrait de chaque échantillon ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure N°3**).

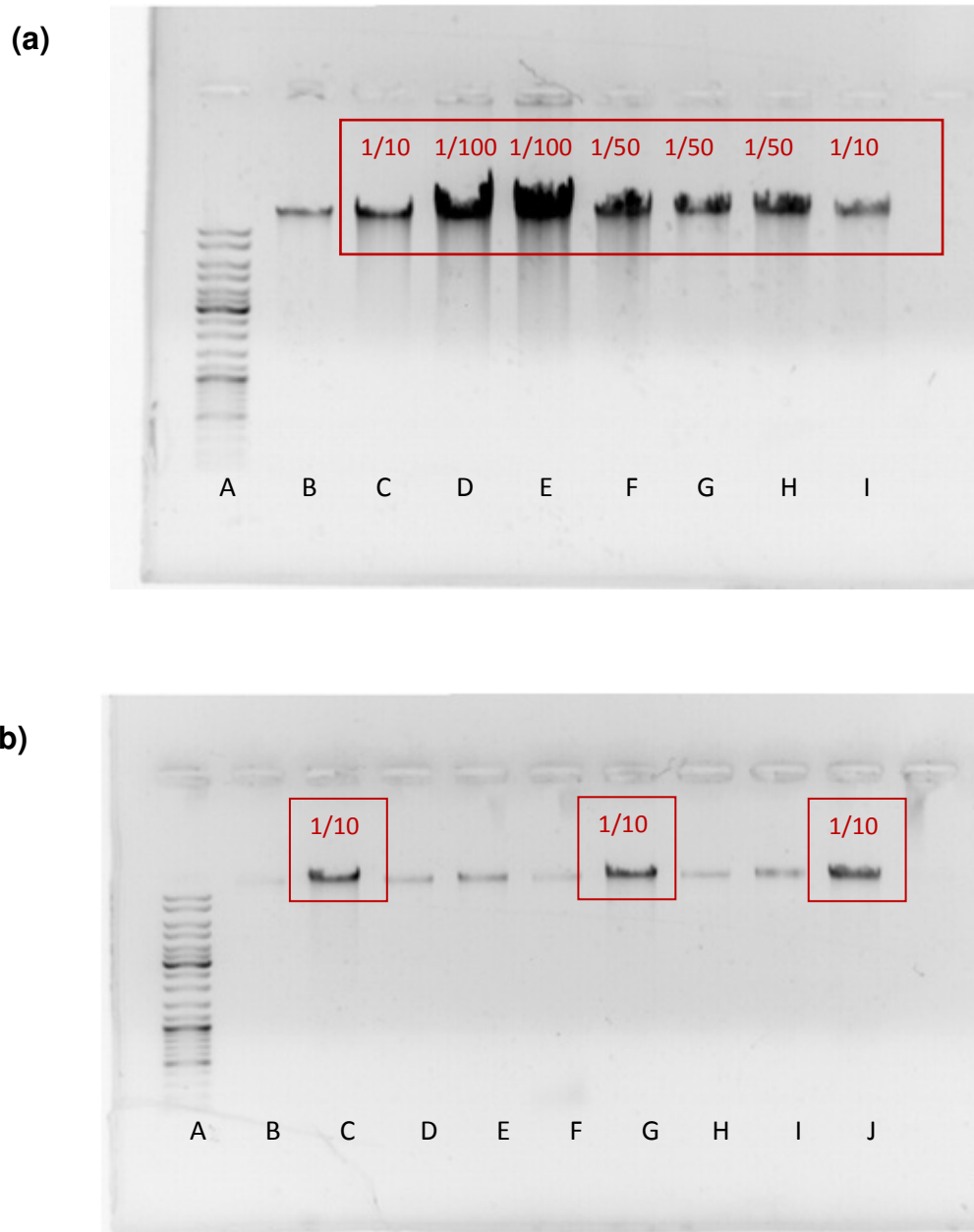


Figure N°3 : Extraction de l'ADN par la méthode de billes en verre à partir des isolats de *Candida* (a) et (b).

Carré en rouge : Dilutions

Il est important de signaler que pour la PCR, les produits d'extraction ayant une concentration importante doivent être dilués. Aucune contamination n'est observée.

Les régions ITS1 et ITS2 sont utilisées pour le diagnostic, l'identification, la taxonomie et la phylogénie des levures et fungi en milieu clinique en raison de leur position dans le gène 5.8S ADNr (Shokohi et coll., 2010).

Les profils électrophorétiques des souches de *Candida sp.* sur gel d'agarose sont représentés sur la **figure N°4**

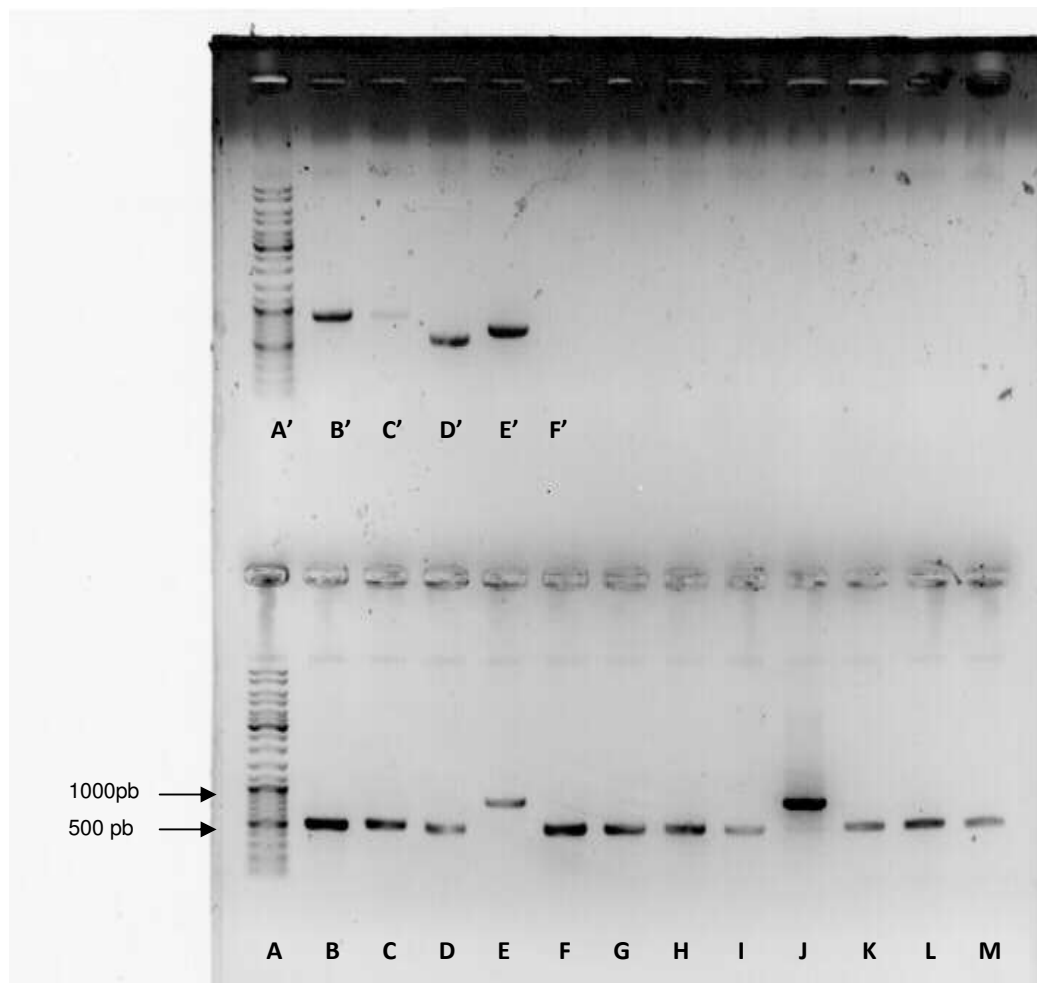


Figure N°4 : Produits de la PCR ITS1-ITS4 révélés par électrophorèse sur gel d'agarose

Bande A et A' : Marqueur de poids moléculaire de référence (100 pb)

Bandes B, B', C, C', D, D', E, F, G, H, I, J, K, L, M : souches isolées

Bande (E') : Témoin positif (CLIB 1458 : *Debaryomyces hansenii*)

Bande (F') : Témoin négatif

Nous remarquons que les séquences obtenues ont une taille comprise entre 511 et 871 paires de bases (pb).

Bande (B -D- F-G-H-K-L-M) : *Candida albicans* (530-535 pb)

Bande (E) : *Candida famata* (630-640 pb)

Bande (C-I) : *Candida parapsilosis* (511-520 pb)

Bande (J) : *Candida guilliermondii* (609 pb)

Bande (B') : *Candida kefyr* (682 pb)

Bande (D') : *Candida glabrata* (871 pb)

Les bandes obtenues pour les souches concordent avec les tailles théoriques de la base de données de la GenBank internationale contenant les séquences de la région correspondante ITS1-ITS4 pour les différentes espèces de *Candida* (**Annexe 8**).

Les résultats obtenus par PCR nous ont permis de corriger l'identification d'une souche de *Candida famata* effectuée par Api *Candida* qui s'est avérée appartenant à l'espèce *Candida guilliermondii*.

En 2008, **Desnos-ollivier et ses collaborateurs** ont mis en évidence la difficulté à distinguer entre ces deux espèces sur les seuls critères phénotypiques habituels.

3. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B et de la caspofungine vis-à-vis des cellules planctoniques des souches isolées sont présentées dans le **tableau N°4**.

Tableau N°4 : CMI de l'amphotéricine B et la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida sp.* (CLSI, 2008)

Souches (nombre)	CMI de l'AmB (µg/mL)	Souches (nombre)	CMI de Csp (µg/mL)
4	1	4	1
18	0,5	11	0,5
7	0,25	11	0,25
1	0,125	3	0,125
1	0,03	2	0,06

Nous remarquons que les CMI varient de 0,03 à 1 µg/mL pour l'amphotéricine B et de 0,06 à 1 µg/mL pour la caspofungine. Selon les recommandations du CLSI 2008, *Candida sp.* est considérée comme sensible à l'amphotéricine B et à la caspofungine si la CMI est inférieure à 1 et à 2 µg/mL respectivement (CLSI 2008). De ce fait, tous nos isolats cliniques de *Candida sp.* sont sensibles à ces deux antifongiques.

Pour l'amphotéricine B, 18 souches ont des CMI égales à 0,5 µg/mL, 4 souches ont des CMI de 1 µg/mL et 9 présentent des CMI comprises entre 0,03 et 0,25 µg/mL.

Pour la caspofungine, 4 souches ont des CMI de 1 µg/mL, 11 souches présentent une CMI de 0,5 µg/mL, 11 souches ont une CMI de 0,25 µg/mL, 3 ont une CMI de 0,125 µg/mL et deux ont une CMI de 0,06 µg/mL.

Les Concentrations Minimales Inhibitrices de l'amphotéricine B et de la caspofungine vis-à-vis de la souche de référence *Candida albicans* IP444 sont de 0,5 et 0,125 µg/mL respectivement.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Seghir et coll., (2014)**, **Bendjelloul et coll., (2016)**, qui ont montré que toutes les levures isolées des CHU de Tlemcen et d'Oran sont sensibles à l'amphotéricine B et à la caspofungine. La résistance acquise à l'amphotéricine B et à la caspofungine reste très rare et

inhabituelle, elle n'a été décrite que chez quelques espèces rares de *Candida*. [Pfaller et coll., 2011) ; (Dannaoui, 2013) ; (Razzaghi-Abyaneh et coll., 2014)].

La caspofungine présente moins d'effets indésirables que l'amphotéricine B, elle constitue une alternative intéressante dans la prise en charge des infections fongiques invasives en milieu hospitalier (Constantin et coll., 2008).

4. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules sessiles (SCMI)

Les figures N°5 et 6 représentent les résultats relatifs aux Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules planctoniques et sessiles (CMI et SCMI) de l'amphotéricine B et de la caspofungine vis-à-vis des isolats de *Candida sp.*

Nous remarquons que les SCMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida sp.* varient de 0,25 à 8 µg/mL à l'exception de *Candida albicans* (CAKT209) qui présente une valeur de 16 µg/mL. Celles de la caspofungine sont comprises entre 0,5 et 16 µg/mL (Annexe 9).

Il est à noter que le retrait du cathéter CAKT209 a été effectué suite à des rougeurs que présentait le patient autour du pansement qui couvrait le site d'insertion.

Selon Ramage et coll. (2001), l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles par rapport à leurs homologues planctoniques témoigne de leur capacité à former les biofilms.

Les valeurs des SCMI de l'amphotéricine B et de la caspofungine vis-à-vis de *Candida albicans* CAKT183, CAKT218, CAKT237 et CAKT24 sont restées dans l'intervalle de sensibilité à ces deux antifongiques. En revanche, toutes les autres souches ne sont pas sensibles à l'amphotéricine B et à la caspofungine.

Les SCMI sont jusqu'à 32 fois plus importantes que les CMI pour l'amphotéricine B et 64 fois pour la caspofungine. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Bojsen et coll., (2014) qui ont montré que les cellules sessiles fongiques peuvent être jusqu'à mille fois plus tolérantes aux agents antimicrobiens que leur homologues planctoniques.

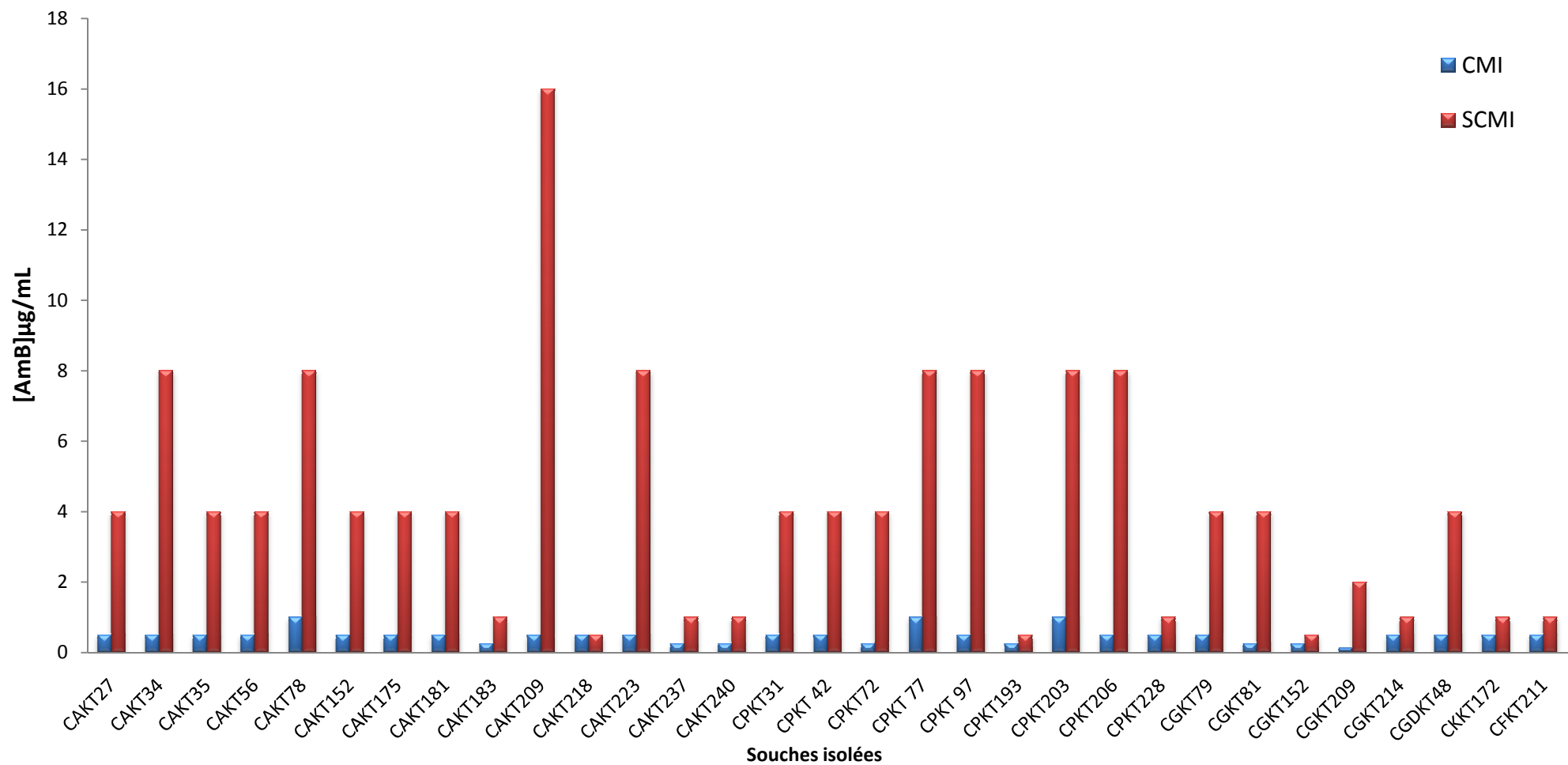


Figure N°5 : Concentrations Minimales Inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles de *Candida*.

KT : cathéter veineux périphérique ; CA : *Candida albicans* ; CG : *Candida glabrata* ; CP : *Candida parapsilosis* ; CGD : *Candida guilliermondii* ; CK : *Candida kefyr* ; CF : *Candida famata*

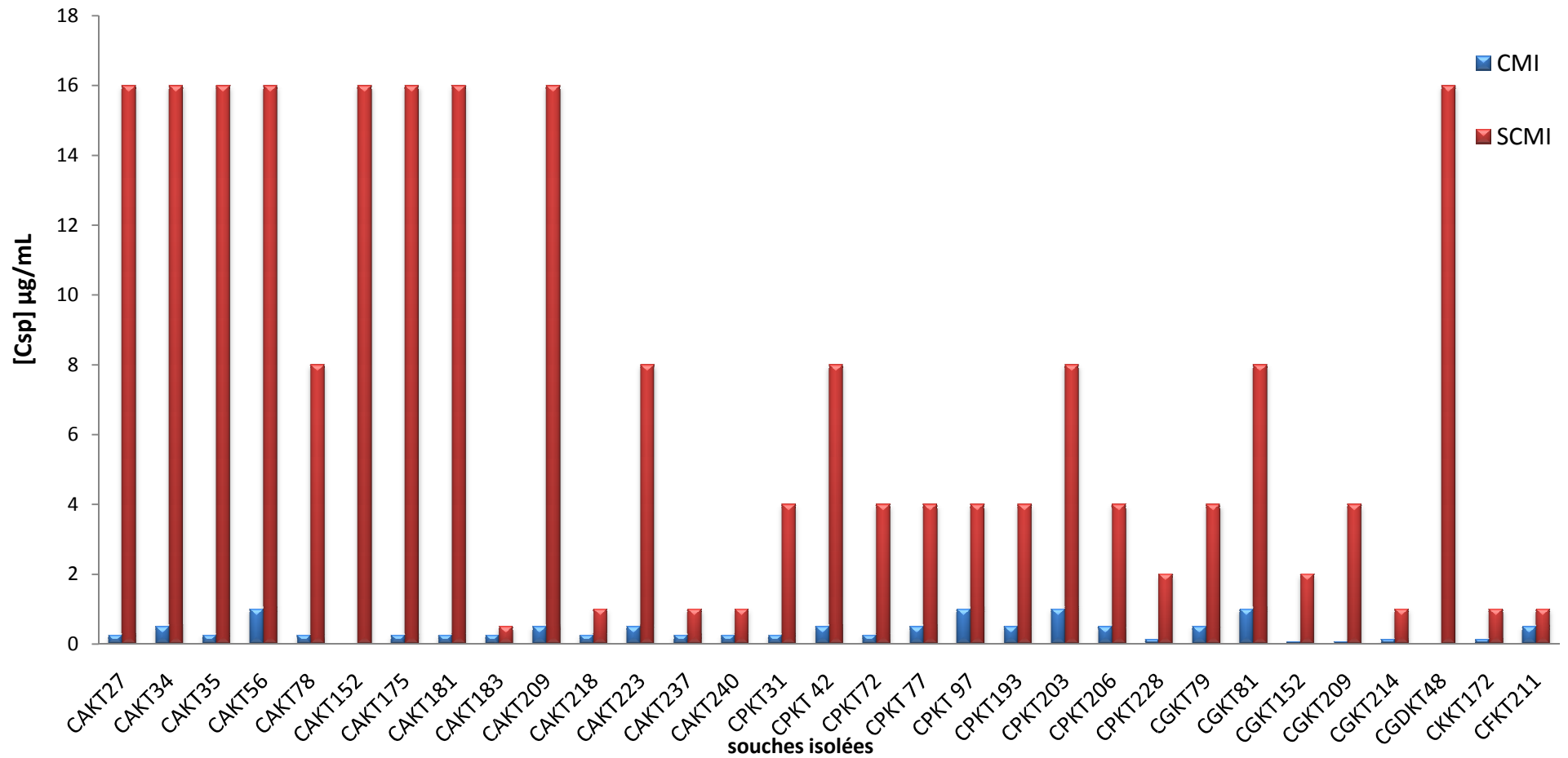


Figure N° 6 : Concentrations Minimales Inhibitrices de la caspofungine vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles de *Candida*.

KT : cathéter veineux périphérique ; CA : *Candida albicans* ; CG : *Candida glabrata* ; CP : *Candida parapsilosis* ; CGD : *Candida guilliermondii* ; CK : *Candida kefyr* ; CF : *Candida famata*

5. Quantification des biofilms par réduction des sels de tétrazolium (XTT)

En se référant aux travaux de **Valentin et coll., (2007)** et **Villar-Vidal et coll., (2011)**, les souches de *Candida sp.* sont considérées comme productrices de biofilms lorsque la densité optique mesurée à 490 nm est supérieure ou égale à 0,2. L'activité métabolique des cellules adhérentes de *Candida sp.* dans un biofilm est mesurée après 24 et 48 heures d'incubation. Les souches productrices de biofilms sont regroupées par catégorie. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure N°7**.

Nous remarquons que les densités optiques varient de 0,002 à 0,539 et de 0,05 à 0,542 après 24 et 48 heures d'incubation respectivement. Onze (11) souches appartiennent à la catégorie +1 et sont non formatrices de biofilms, vingt (20) sont faiblement ou modérément productrices de biofilms et se répartissent comme suit :

-Quatorze (14) souches dont neufs (09) *Candida albicans*, quatre (04) *Candida parapsilosis* et une (01) *Candida glabrata*, présentant des densités optiques comprises entre 0,20 et 0,39, appartiennent à la catégorie +2.

-Six (06) souches dont une (01) *Candida albicans*, trois (03) *Candida parapsilosis*, une (01) *Candida glabrata* et une (01) *Candida guilliermondii* présentent des DO allant de 0,7 à 0,99. Elles sont classées dans la catégorie +3.

Ce résultat est en accord avec les travaux de **Tumbarello et coll., (2012)** qui ont rapporté que les isolats cliniques de *Candida sp.* forment des biofilms mono espèces avec des densités optiques comprises entre 0,125 et 1,358. De plus, **Li et coll., 2003** ainsi que **Pathak et coll., (2012)** ont montré que pour une même espèce de levure, la capacité de former un biofilm varie d'une souche à une autre et dépend du temps d'incubation et par conséquent de la maturité du biofilm. En effet, après un temps d'incubation de 24 et 48 heures, les souches de *Candida glabrata* CGKT152 et CGKT78 passent de la catégorie +1 à +2 et de +2 à +3 respectivement.

Ces résultats sont confirmés par ceux de **Jin et son équipe (2003)**, qui ont mis en évidence l'existence d'une grande variabilité dans la capacité des souches cliniques à produire un biofilm. Aussi, les travaux de l'équipe de **Sánchez-Vargas, (2013)** ont révélé que le potentiel de formation de biofilms par les souches de *Candida sp.* dépend du temps d'incubation et de l'origine clinique de l'espèce.

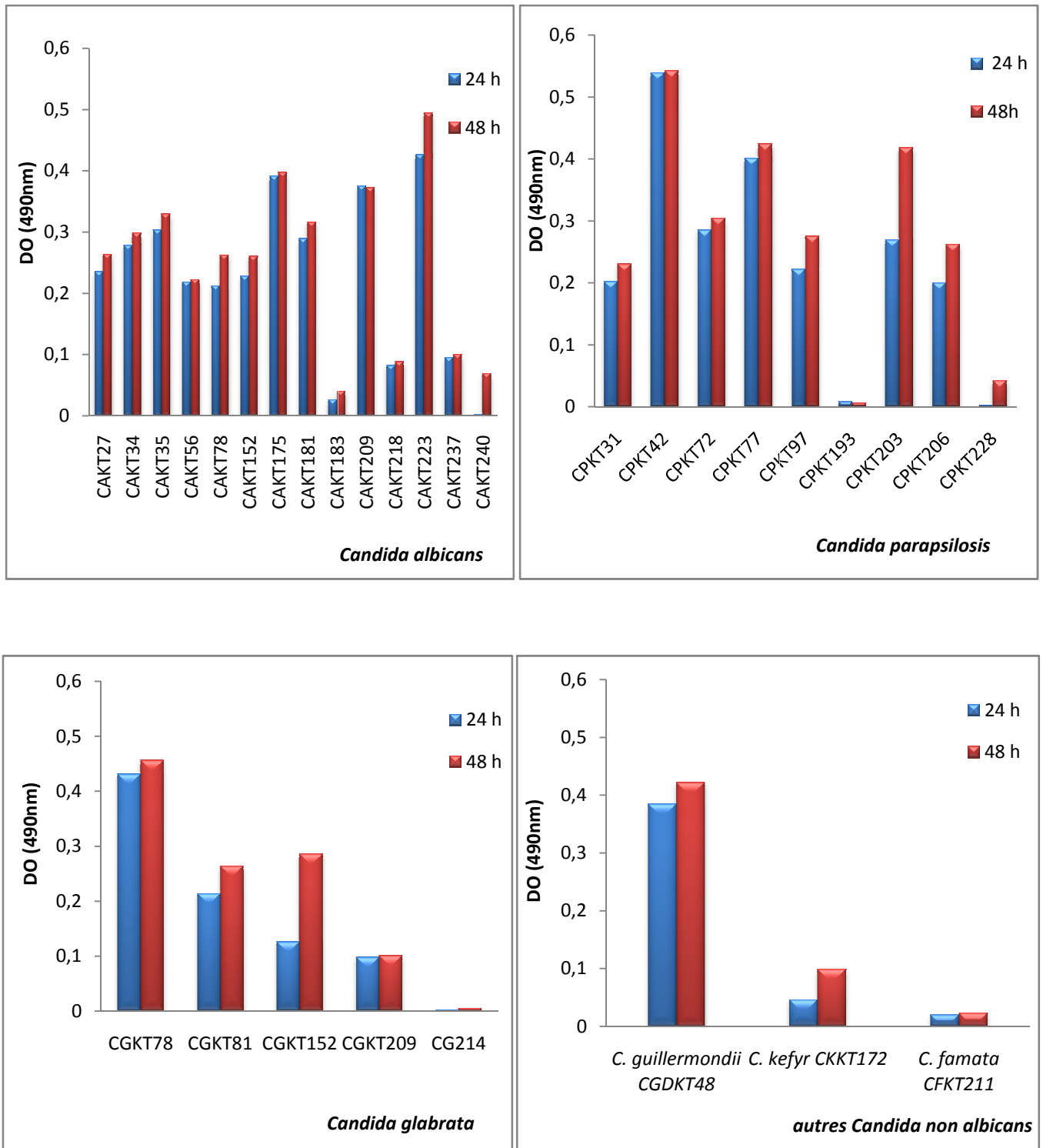


Figure N°7 : Activités métaboliques des souches isolées *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* et des autres souches *non albicans* obtenues par réduction du XTT

6. Formation de biofilms mixtes

Les biofilms mixtes sont ceux formés par les espèces de levures appartenant au genre *Candida* co-isolées d'un même cathéter. Il s'agit de l'association *Candida albicans* / *Candida glabrata* retrouvée sur les cathéters N°78, 152 et 209.

Afin d'étudier le biofilm mixte, *Candida albicans*/*Candida glabrata* *in vitro*, nous avons testé les proportions suivantes pour le mélange des deux espèces 100:0, 90:10, 50:50, 10:90 et 0:100

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité métabolique des levures dans un biofilm mono-espèce et mixte par réduction du XTT, sont regroupés dans le **tableau N°5 et la figure N°8**.

Tableau N°5 : Densités optiques à 490 nm des biofilms mono et multi-espèces formés par *Candida albicans* et *Candida glabrata*.

Proportions de <i>C. albicans</i> / <i>C. glabrata</i> (10 ⁶ cellules/mL)	100 : 0	90 :10	50 : 50	10 : 90	0 :100
<i>C. albicans</i> CAKT78	0,262	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> CAKT152	0,260	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> CAKT209	0,392	-	-	-	-
CAKT78/CGKT78	-	0,501	0,522	0,401	-
CAKT152/CGKT152	-	0,284	0,292	0,294	-
CAKT209/CGKT209	-	0,332	0,200	0,118	-
<i>C. glabrata</i> CGKT78	-	-	-	-	0,456
<i>C. glabrata</i> CGKT152	-	-	-	-	0,286
<i>C. glabrata</i> CGKT209	-	-	-	-	0,101

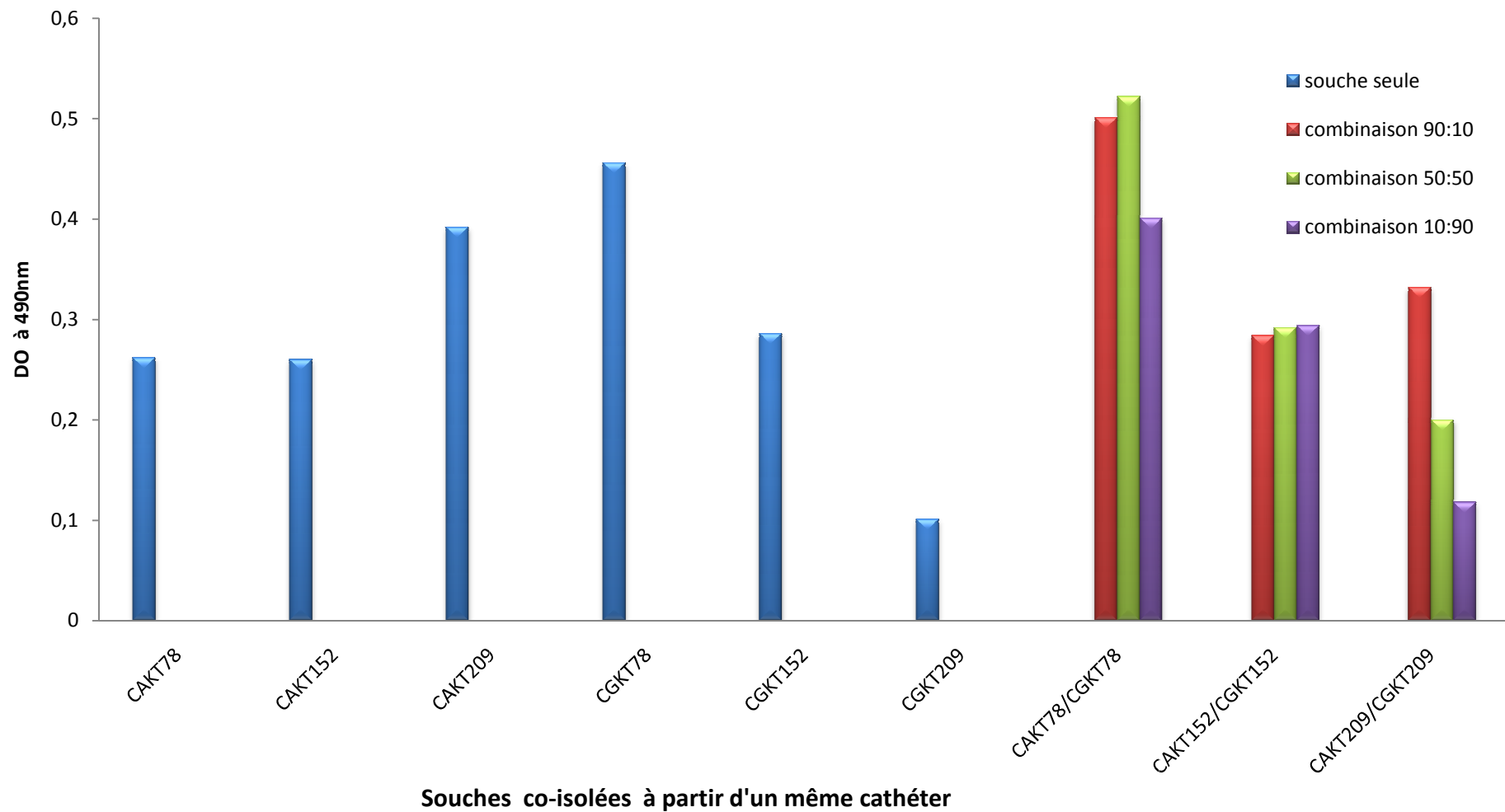


Figure N°8 : Activité métabolique des isolats dans les biofilms mono et multi-espèces obtenus par réduction du XTT

Nous constatons que, quelque soit la proportion de *Candida albicans* et de *Candida glabrata* dans le biofilm mixte, les activités métaboliques sont supérieures à celles des biofilms formés par chaque espèce séparément.

Les densités optiques varient respectivement de 0,262 à 0,392 et de 0,101 à 0,456 pour *Candida albicans* et *Candida glabrata* seules. En revanche, pour les biofilms mixtes formés par ces deux espèces, les densités optiques dépendent de la proportion de chacune d'elles dans le mélange.

En effet, dans les différentes proportions testées, l'association *Candida albicans* et *Candida glabrata* co-isolées du cathéter N°152 présentent un potentiel de formation de biofilm identique à celui des espèces seules, alors que celles co-isolées du cathéter N°78 forment un biofilm avec des densités optiques supérieures à 0,2.

Selon **Valentin et coll., (2007)**, elles sont classées dans les catégories +2 et +3 et sont par conséquent, de bonnes formatrices de biofilms. Par ailleurs, le biofilm formé par *Candida albicans/Candida glabrata* co-isolées du cathéter N°209 à la proportion 90:10, produit une densité optique de 0,332 similaire à celle du biofilm formé par *Candida albicans* seule.

Ce résultat va dans le même sens que ceux de **Tati et coll., (2016)** qui ont montré que la biomasse du biofilm jeune formé par *Candida albicans* et *Candida glabrata* est plus importante que celle du biofilm formé par ces espèces séparées.

De ce fait, nous pouvons émettre une hypothèse selon laquelle dans le biofilm mixte formé sur le cathéter N°209 par ces deux espèces, *Candida glabrata* est probablement à l'état planctonique.

En effet, *Candida glabrata* co-isolée du cathéter N°209 présente une SCMI de 2 et 4 µg/mL pour l'amphotéricine B et la caspofungine respectivement, qui est nettement inférieure à celle de *Candida albicans* isolée du même cathéter et dont la SCMI est de 16 µg/mL pour ces deux antifongiques.

L'hétérogénéité structurale du biofilm multi-espèces peut être marquée par la diversité des espèces microbiennes et de leur distribution spatiale (**Stewart et Franklin, 2008**).

Les biofilms hébergent des cellules dans plusieurs états physiologiques, cette hétérogénéité est un facteur important dans la tolérance du biofilm (**Stewart, 2015**).

Dans la présente étude, la cohabitation de *Candida albicans* et *Candida glabrata* est retrouvée sur des cathéters veineux périphériques, or, cette association est souvent responsable de pathologies buccodentaires (**Silva et coll., 2011**).

De plus, selon **Burmolle et coll., (2010)**, les biofilms en milieu clinique sont généralement mono-espèces, même si l'infection est mixte (multi-espèces). Cependant, le biofilm polymicrobien peut émerger pendant les derniers stades de l'infection. La présence de différentes espèces sur un même cathéter constitue un risque pour une fongémie mixte (**Seghir et coll., 2014**).

7. Etude statistique

L'analyse des données de croissance de *Candida albicans* et *Candida glabrata* en co-culture a été réalisée par une étude statistique.

Les boîtes à moustaches représentées par les rectangles dans la **figure N°9**, des biofilms mixtes selon les proportions proposées précédemment, indiquent que la densité optique lue à 490 nm du mélange CAKT152/CGKT152 ne varie pas avec les proportions des souches (variance = 0,00003), alors que dans la première et la troisième boîte qui correspondent aux mélanges CAKT78/CGKT78 et CAKT209/CGKT209, nous remarquons que les variances sont de 0,00418 et 0,01166 respectivement, ce qui permet de mettre en évidence l'existence d'une activité métabolique cellulaire qui dépend des proportions des souches dans le milieu de culture (**Tableau N°6**).

Tableau N°6 : Variance des différents mélanges *C. albicans*/ *C. glabrata*

Groupes	Taille de l'échantillon	Moyenne	Variance
CAKT78/CGKT78	3	0,47467	0,00418
CAKT152/CGKT152	3	0,29	0,00003
CAKT209/CGKT209	3	0,21667	0,01166

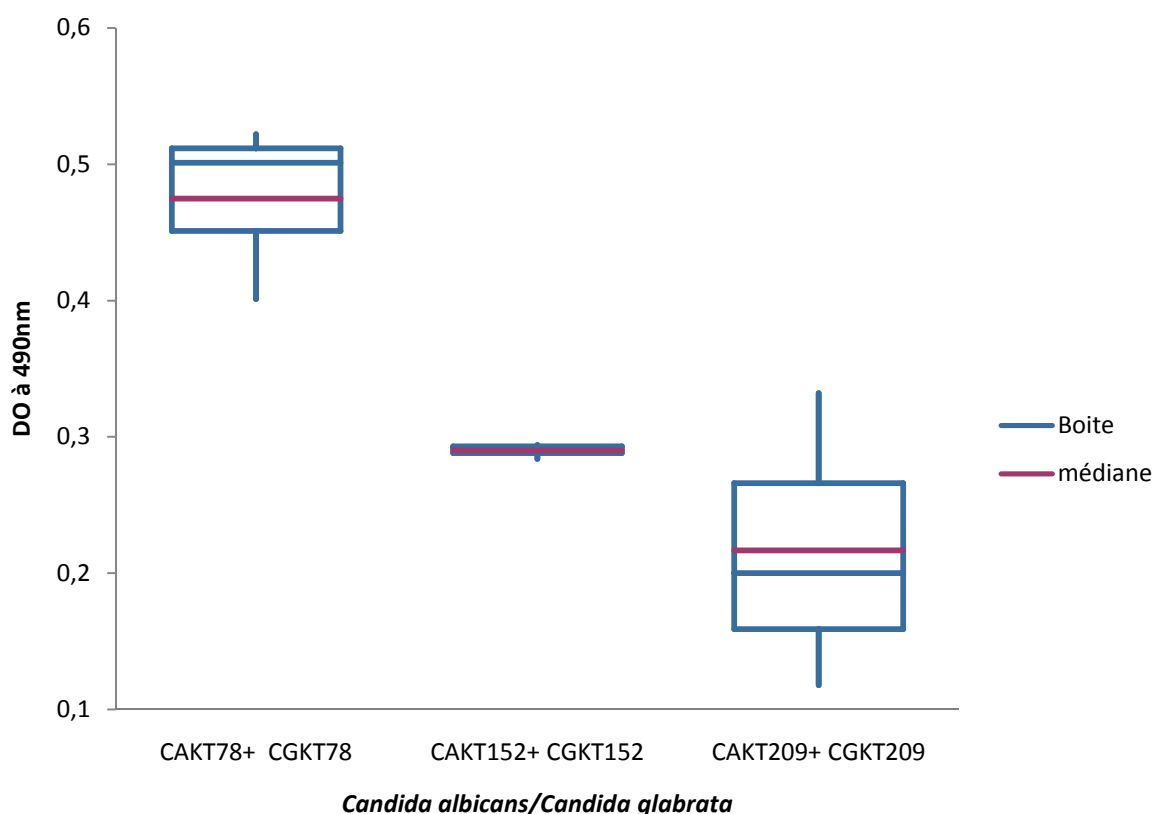


Figure N°9 : Biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Candida glabrata* selon les proportions 90 :10 ; 50 : 50 et 10 : 90

Afin de vérifier si les résultats que nous avons obtenus des trois mélanges de souches co-cultivées sont statistiquement différents, une analyse de variance d'ANOVA est réalisée avec comme hypothèse nulle, H_0 qui stipule que les mixtures ne sont pas différentes. H_0 est rejetée si $P < 0,05$, ce qui indique que les mixtures étudiées sont statistiquement différentes.

Les résultats de cette analyse montrent un seuil de significativité de $0,0122 \leq 0,05$, par conséquent, l'hypothèse nulle est rejetée.

Les trois mélanges sont significativement différents. Pour une meilleure compréhension de ces différences de variances, nous avons effectué une analyse complémentaire par le test *post-hoc* qui permet de comparer les mixtures deux à deux. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau N°7**.

Tableau N° 7 : Analyse *post-hoc* pour *Candida albicans*/*Candida glabrata*

Séries vs Séries <i>C. albicans</i>/<i>C. glabrata</i> vs <i>C. albicans</i>/<i>C. glabrata</i>	<i>r</i>
CAKT209/CGKT209 vs CAKT152/CGKT152	-0,98019
CAKT209/CGKT209 vs CAKT78/CGKT78	0,68163
CAKT152/CGKT152 vs CAKT78/CGKT78	-0,5232

Nous remarquons que les densités optiques lues à 490nm obtenues par les mixtures CAKT209/CGKT209 et CAKT152/CGKT152 sont fortement corrélées contrairement à ceux de CAKT78/CGKT78.

Les tests statistiques montrent que la présence de certaines mixtures peut être bien corrélée. Néanmoins, les échantillons ne nous permettent pas de conclure sur la nature de cette corrélation. Une étude approfondie sur les facteurs intervenant sur le lien des mixtures peut être complémentaire.

8. Observation au microscope électronique à balayage des biofilms mixtes formés sur cathéters par *Candida albicans* et *Candida glabrata*

Pour mettre en évidence l'architecture des biofilms mixtes formés *in vitro* par *Candida albicans* et *Candida glabrata* par Microscopie Electronique à Balayage (MEB), des segments de cathéters veineux périphériques ont été utilisés comme support.

L'observation au MEB d'un cathéter veineux périphérique à la barre d'échelle 500 µm, révèle l'existence de cellules fongiques sur toute sa surface externe (**Photo N°3**).

A la barre d'échelle de 10 µm, nous constatons que *Candida albicans* et *Candida glabrata* sont présentes sur le même cathéter. Les cellules de *Candida glabrata* paraissent plus petites que celles de *Candida albicans* (**Photo N°4**).

La taille des levures varie de 1 à 4 μm pour *Candida glabrata* et de 4 à 6 μm pour *Candida albicans* (Rodrigues et coll., 2014).

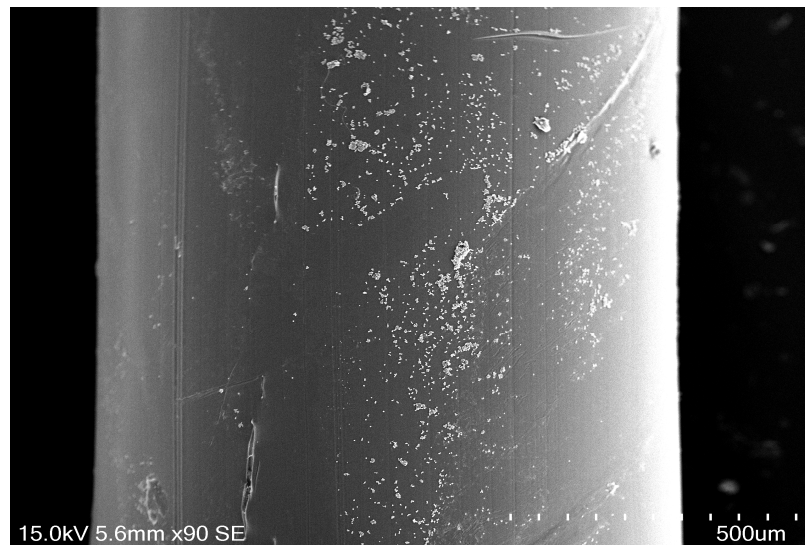


Photo N°3 : Microphotographie de la face externe d'un segment du cathéter veineux périphérique N°78

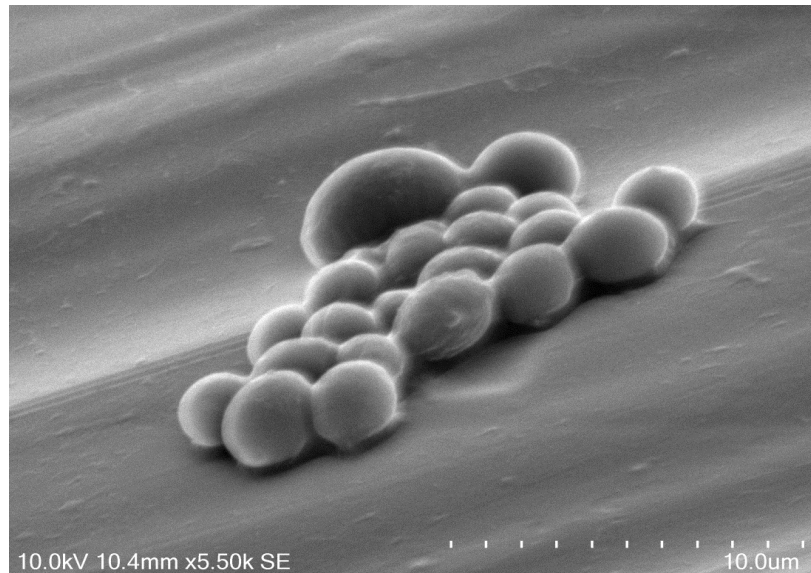


Photo N°4 : Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* sur la face externe d'un cathéter veineux périphérique par CAKT78/ CGKT78.

La **photo N°5** correspond à la matrice exopolymérique dans laquelle se développent les cellules adhérentes du biofilm mixte.

Cette matrice auto-produite constitue une barrière physique et confère une résistance et/ou tolérance aux biofilms (**Lebeaux et ses coll., 2012**).

Elle intervient également dans l'adhésion initiale au support, fournit une stabilité mécanique aux biofilms, modèle leur structure, protège les cellules contre la phagocytose et limite la diffusion de substances antifongiques [(**Flemming et Wingender, 2010**) ; (**Santos et coll., 2016**)].

La **photo N°6** met en évidence la présence d'un tube germinatif de *Candida albicans* le long duquel les cellules de *Candida glabrata* sont rangées. Ceci est en accord avec les travaux de **Tati et coll., (2016)** qui ont rapporté que *Candida glabrata* est capable d'adhérer et se lier aux hyphes de *Candida albicans*.

Nous remarquons que les cellules de *Candida glabrata* sont ovales, plus petites que celles de *Candida albicans*. Les deux espèces même entremêlés dans un même biofilm sont reconnues par leurs différentes tailles.

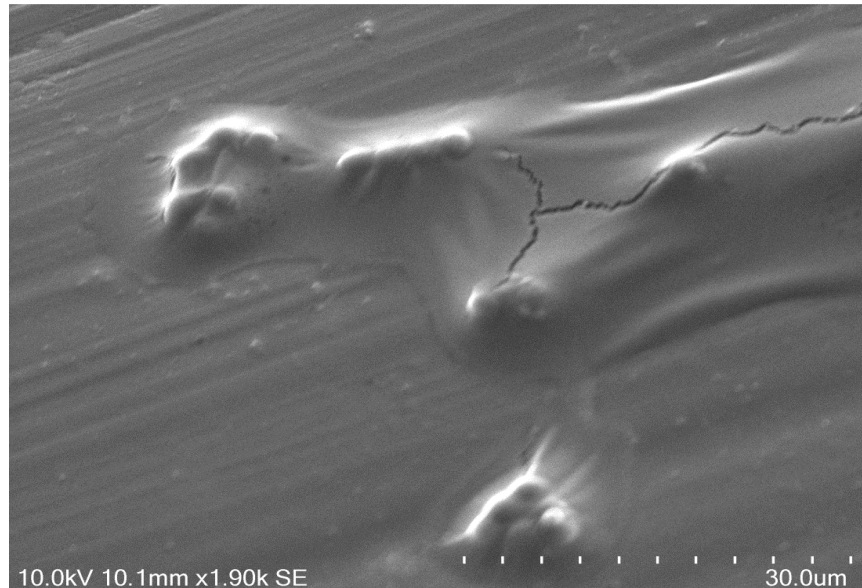


Photo N°5 : Microphotographie d'une matrice exopolymérique enveloppant la totalité du biofilm mixte formé par CAKT152/CGKT152 sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique

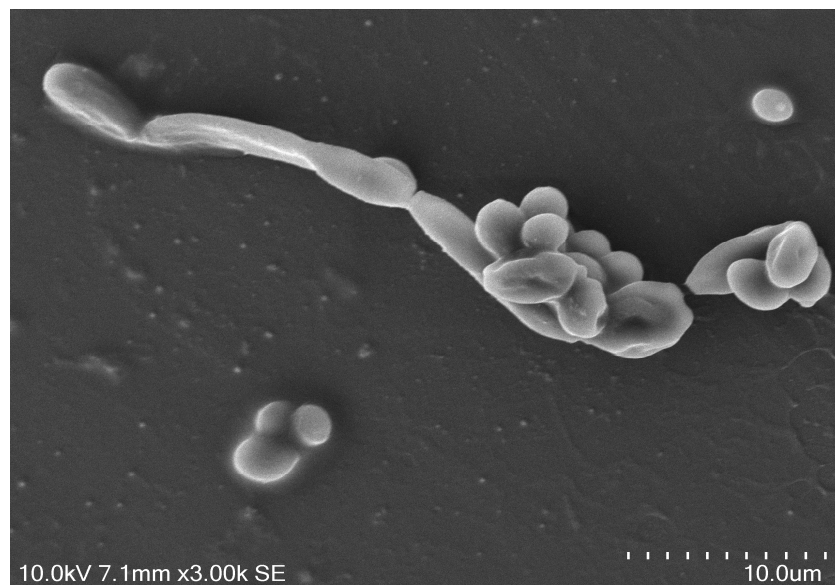


Photo N°6 : Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* par CAKT209/CGKT209 sur la face externe d'un cathéter veineux périphérique

Les cellules de *Candida albicans* sont moins abondantes que celles de *Candida glabrata* (**Photo N° 7**).

Récemment, l'équipe de **Martins** a révélé l'effet inhibiteur des hyphes de *Candida albicans* par *Candida glabrata*. Ces deux espèces sont probablement en concurrence pour les éléments nutritifs et/ou l'une des espèces génère des métabolites toxiques (**Martins et coll., 2016**).

Selon **Villar-Vidal et coll., (2011)** l'un des facteurs clés de la morphogénèse des levures est la nature de l'environnement. La croissance des hyphes est favorisée par une faible teneur en oxygène et en nutriments.

La **photo N°8** représente l'architecture hétérogène d'un biofilm mixte dense formé par *Candida albicans* et *Candida glabrata*. Les cellules de *Candida glabrata* sont monomorphiques, facilement observables alors que celles de *Candida albicans* se présentent sous différentes formes morphologiques, blastospores (encerclés en rouge), pseudohyphes et hyphes.

Les biofilms multi-espèces sont plus épais, plus structurés et mieux armés contre les agressions extérieures que les biofilms formés par chaque espèce séparément (**Briandet et coll., 2012**).

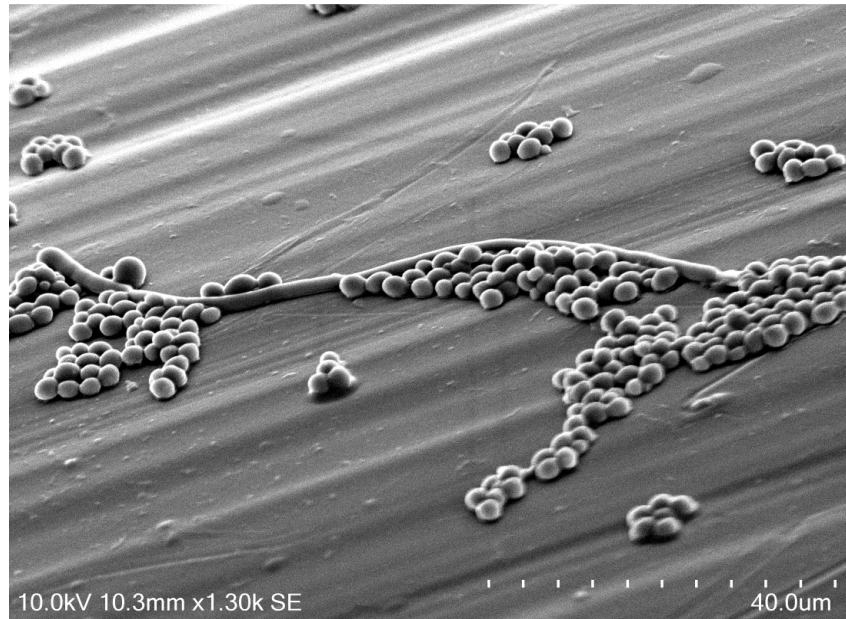


Photo N°7 : Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* par CAKT152/CGKT152 sur la face externe d'un cathéter veineux périphérique.

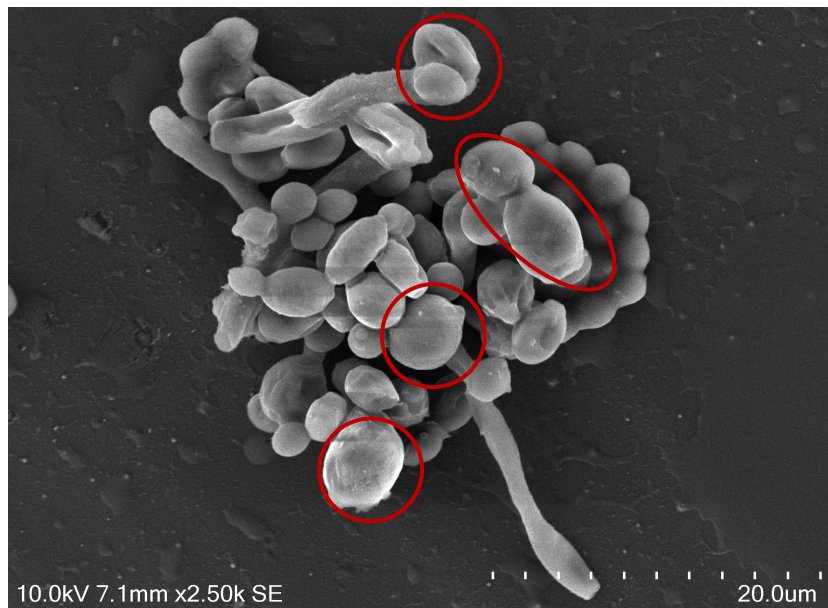


Photo N°8 : Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* par CAKT78/CGKT78 sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique.

La **photo N°9** représente l'architecture du biofilm de *Candida albicans* et *Candida glabrata* formé sur la face interne du cathéter.

Le biofilm mixte apparaît très complexe, dense et hétérogène. *Candida albicans* sont observées sous des formes variées, blastospores (encadrés en rouge), pseudohyphes et hyphes. Tandis que les cellules de *Candida glabrata* sont de tailles plus petites et de forme ovoïde uniquement sous forme levure.

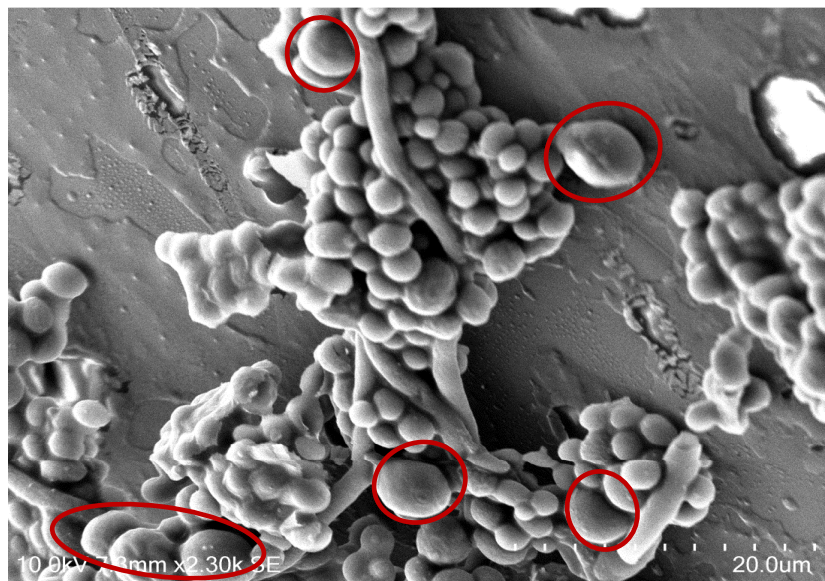


Photo N°9 : Microphotographie d'un biofilm mixte formé *in vitro* par CAKT152/CGKT152 sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique

Selon l'équipe d'**El-Azizi (2004)**, *Candida glabrata* utilise *Candida albicans* comme un échafaudage afin de maintenir l'intégrité du biofilm. Les espèces de *Candida* ont tendance à modifier leurs caractéristiques de biofilm en développement (**Parahitiyawa et coll., 2006**).

Quatrième partie
Conclusion générale

Les infections associées aux actes de soins ont vu leur incidence croître cette dernière décennie en raison de l'extension des procédures invasives telle que le cathétérisme.

Le cathéter veineux implanté peut devenir un site d'une éventuelle infection fongique notamment levurienne. En revanche, les levures sont capables de former des biofilms mono ou multi-espèces, qui ont pour origine une tolérance élevée aux agents antimicrobiens utilisés cliniquement.

Notre travail mené dans le service de neurochirurgie postopératoire du CHU de Tlemcen (Algérie) a pour objectif de rechercher le taux d'altérations fongiques mono ou multi-espèces des cathéters veineux périphériques par les levures du genre *Candida*, de tester leur sensibilité à l'amphotéricine B et la caspofungine à l'état planctonique et aussi en mode de biofilms.

Nous avons également évalué l'activité métabolique des cellules de *Candida sp.* adhérentes à l'intérieur du biofilm mono et multi-espèces et mettre en évidence l'architecture de ces derniers par microscopie électronique à balayage.

Les résultats obtenus, ont montré que 34 cathéters soit 13,28 % parmi les 256 prélevés sont altérés par une ou plusieurs espèces de levures. 31 souches de *Candida* sont isolées dont 14 *Candida albicans*, 9 *Candida parapsilosis*, 5 *Candida glabrata*, 1 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida kefyr* et 1 *Candida famata* et 7 levures *non-Candida sp.*

La caractérisation moléculaire des souches par PCR des séquences ITS a révélé qu'une souche était identifiée comme étant *Candida famata*, alors qu'il s'agit de *Candida guilliermondii*, une raison pour laquelle l'identification moléculaire garde toute sa place dans la stratégie d'identification des levures.

La totalité des souches isolées sont sensibles à l'amphotéricine B et la caspofungine à l'état planctonique, alors qu'à l'état sessile (en mode biofilm), 20 souches présentent une tolérance aux deux antifongiques testés.

Nos résultats ont montré également que nos isolats cliniques de *Candida sp.* sont faiblement ou modérément producteurs de biofilms mono-espèces et multi-espèces. De plus, *Candida albicans* et *Candida glabrata*, co-isolées d'un même cathéter, forment des biofilms mixtes dont l'activité métabolique varie significativement avec les proportions de chaque espèce dans le milieu (*p value* 0,0122).

Le *post-hoc* nous a montré que les souches en co-culture CAKT209/CGKT209 et CAKT152/CGKT152 sont fortement corrélées, contrairement aux souches CAKT78/CGKT78.

Même s'il est peu probable que plusieurs espèces levuriennes contaminent la même zone stérile (le cathéter) en même temps, les microphotographies réalisées par microscopie électronique à balayage ont montré que *Candida albicans* et *Candida glabrata* sont capables de cohabiter sur un même cathéter, en formant un biofilm mixte *in vitro*.

Pour compléter cette étude, il serait souhaitable d'étudier la nature de l'interaction (Synergie ou antagonisme) qui existe entre *Candida albicans* et *Candida glabrata* dans le biofilm mixte à différentes proportions.

De ce fait, le rôle du biofilm mono ou multi-espèces dans les infections associées aux dispositifs médicaux ne doit pas être ignoré. Une meilleure compréhension de leur implication en milieu clinique doit être explorée davantage.

Dans l'attente du développement d'une approche thérapeutique anti-biofilm, leur maîtrise passe actuellement par :

- La prévention du risque infectieux s'appuyant sur la formation et la sensibilisation du personnel médical
- Une hygiène stricte et une asepsie maximale tout au long de la prise en charge des patients hospitalisés est indispensable ;
- Le choix du matériau limitant la colonisation microbienne, sachant que les cathéters en polyuréthane, en téflon ou en silicone présenteraient moins de risque de s'infecter que les cathéters en PVC ou en polyéthylène.

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. Ader F., Faure K., Guery B., Nseir S. (2008) Interaction de *Pseudomonas aeruginosa* avec *Candida albicans* dans les voies respiratoires: de la physiopathologie à une perspective thérapeutique. *Pathologie Biologie*, 56(3), 164-169.
2. Al-Fattani M.A. and Douglas L.J. (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*, 55(8), 999-1008.
3. Almirante B., Rodríguez D., Cuenca-Estrella M., Almela M., Sanchez F., Ayats J., Alonso-Tarres C., Rodríguez-Tudela J.L., Pahissa A. (2006) Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of clinical microbiology*, 44(5), 1681-1685.
4. Anderson G.G., O'toole G.A. (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. In *Bacterial Biofilms*, pp. 85-105.
5. Baillie G.S., Douglas L.J. (1998) Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 1900-1905.
6. Bandara H.M.H.N., K Cheung B.P., Watt R.M., Jin L.J., Samaranayake L.P. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide inhibits *Candida albicans* hyphae formation and alters gene expression during biofilm development. *Molecular oral microbiology*, 28(1), 54-69.
7. Bandara H.M., Yau J.Y.Y., Watt R.M., Jin L.J., Samaranayake L.P. (2009) *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate *in vitro* *Candida* biofilm formation. *Journal of medical microbiology*, 58(12), 1623-1631.
8. Bendjelloul M., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. (2016) Study of strains of *Candida spp.* Isolated from catheters in UHC of Oran (Algeria): Identification and antifungal susceptibility. *Journal de mycologie medicale*.
9. Blankenship J.R., Mitchell A.P. (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*, 9(6), 588-94
10. Bojsen R., Regenber B., Folkesson A. (2014) *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. *BMC microbiology*, 14(1), 305.

11. Borghi E., Borgo F., Morace G. (2016) Fungal biofilms: update on resistance. *Adv Exp Med Biol*, 1-11. http://dx.doi.org/10.1007/5584_2016_7.
12. Boucherit-Atmani Z., Seddiki S.M.L., Boucherit K., Sari-Belkharoubi L., Kunkel D. (2011) *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 21(3), 182-187.
13. Bougnoux M.E., Espinasse F. (2003) Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *Revue française des laboratoires*, 2003 (351), 67-71.
14. Branda S.S., Vik Å., Friedman L., Kolter R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13(1), 20-26.
15. Brandt M.E., Lockhart S.R. (2012) Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. *Current Fungal Infection Reports*, 6(3), 170-177.
16. Briandet R., Fechner L., Naïtali M., Dreanno C. (2012) Biofilms, quand les microbes s'organisent. *Editions Quae*.
17. Bridier A., Dubois-Brissonnet F., Greub G., Thomas V., Briandet R. (2011) Dynamics of biocide action in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(6), 2648-2654.
18. Brun-Buisson C., Abrouk F., Legrand P., Huet Y., Larabi S., Rapin M. (1987) Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Archives of internal medicine*, 147(5), 873-877.
19. Burmølle M., Thomsen T.R., Fazli M., Dige I., Christensen L., Homøe P., Tvede M., Nyvad B., Tolker-Nielsen T., Givskov M., Moser C. (2010) Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 324-336.
20. Burmølle M., Webb J.S., Rao D., Hansen L.H., Sørensen S.J., Kjelleberg S. (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 3916-3923.

21. Cavalcanti I.M., Nobbs A.H., Ricomini-Filho A.P., Jenkinson H.F., Cury A.A.D.B. (2016) Interkingdom cooperation between *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* and *Actinomyces oris* modulates early biofilm development on denture material. *Pathogens and disease*, 74(3), ftw002.
22. Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2012) *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses*, 55(s1), 46-57.
23. Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink, G.R. (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 5048-5052.
24. Chouchene I., Bouafia N., Cheikh A.B., Toumi B., Mahjoub M., Bannour W., Helali R., Njah M., Bouchoucha S. (2015) Incidence des infections associées aux dispositifs médicaux dans un service de réanimation tunisien. *Santé Publique*, 27(1), 69-78.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast -Third Edition: Approved Standard M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008
26. Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 121(1), 1-17.
27. Coenye T., Van Dijck P., Bjarnsholt T., Forsberg A. (2014) Microbial biofilms—the coming of age of a research field. *Pathogens and disease*, 70(3), 203-204.
28. Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2007) Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation. *Journal of hazardous materials*, 140(1), 129-137.
29. Constantin J.M., Roszyk L., Guerin R., Bannier F., Chartie C., Perbet S., and Bazin J.E. (2008) Tolérance de la caspofongine chez les patients de réanimation: étude prospective. In *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* (Vol. 27, No. 10, pp. 819-824
30. Costerton J.W. (2007) *The biofilm primer* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.

31. Criseo G., Scordino F., Romeo O. (2015) Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *Journal of microbiological methods*, 111, 50-56.
32. Dannaoui E. (2013) Résistance des *Candida* aux antifongiques: détection et mécanismes. *revue francophone des laboratoires*, 2013(450), 71-77.
33. Danhorn T., Fuqua C. (2007) Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 61, 654-663.
34. Demuyser L., Jabra-Rizk, M.A., Van Dijck P. (2014) Microbial cell surface proteins and secreted metabolites involved in multispecies biofilms. *Pathogens and disease*, 70(3), 219-230.
35. Desnos-Ollivier M., Ragon M., Robert V., Raoux D., Gantier J.C., Dromer F. (2008) *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3237-3242.
36. Eggimann P., Garbino J., Pittet D. (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet infectious diseases*, 3(11), 685-702.
37. El-Azizi M.A., Starks S.E., Khardori N. (2004) Interactions of *Candida albicans* with other *Candida spp.* and bacteria in the biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1067-1073.
38. Elias S., Banin E. (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), 990-1004.
39. Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B. (2010) Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires*, 2010(426), 51-63.
40. Filleron A., Jumas-Bilak E. (2015) Implantation du microbiote intestinal chez l'enfant: ontogenèse d'une niche écologique. *Revue Francophone des Laboratoires*, , 2015(469), 27-35.
41. Finkel J.S., Mitchell A.P. (2011) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 109-118.

42. Flemming H.C., Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
43. Fox E.P., Cowley E.S., Nobile C.J., Hartooni N., Newman D.K., Johnson A. D. (2014) Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Current Biology*, 24(20), 2411-2416.
44. Hall-Stoodley L., Stoodley P., Kathju S., Høiby N., Moser C., Costerton J.W., Moter A., Bjarnsholt T. (2012) Towards diagnostic guidelines for biofilm associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 127-145.
45. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95-108.
46. Harriott M.M., Noverr M.C. (2010) Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(9), 3746-3755.
47. Hoffman C.S., Winston F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2), 267-272.
48. Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin, S., Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332.
49. Hornby J.M., Jensen E.C., Lisek A.D., Tasto J.J., Jahnke B. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* ; 67(7): 2982-92
50. Jensen J., Muñoz P., Guinea J., Rodríguez-Crélixems M., Peláez T., Bouza E. (2007) Mixed fungemia: incidence, risk factors, and mortality in a general hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 44(12), e109-e114.
51. Jin Y.Y.H.K., Yip H.K., Samaranayake Y.H., Yau J.Y., Samaranayake L.P. (2003) Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *Journal of clinical microbiology*, 41(7), 2961-2967.

52. Kaiser D. (2007) Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr. Biol*, 17, 561-570.
53. Kerr J.R., Taylor G.W., Rutman A., Hoiby N., Cole P.J., Wilson R. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of clinical pathology*, 52(5), 385-387.
54. Kirkpatrick W.R., Lopez-Ribot J.L., McAtee R.K., Patterson T.F. (2000) Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *Journal of clinical microbiology*, 38(2), 902-904.
55. Klotz S.A., Chasin B.S., Powell B., Gaur N.K., Lipke P.N. (2007) Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59(4), 401-406.
56. Kruppa M. (2008) Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*, 52(1), 1-10.
57. Kuhn D.M., Balkis M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2003) Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 506-508.
58. Lebeaux D., Ghigo J.M. (2012) Infections associées aux biofilms: quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *Medecine/Sciences*, 28(8-9), 727-739
59. Lebeaux D., Ghigo J.M., Beloin C. (2014) Tolérance des biofilms aux antibiotiques: comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-infectieux*, 16(3), 112-121.
60. Lewis K. (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. In *Bacterial Biofilms*, pp. 107-131.
61. Lewis K. (2010) Persister Cells. In *Annual Review of Microbiology*, 64, 357-372.
62. Li X., Yan Z., Xu J. (2003) Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353-362.
63. Mah T.F. (2012) Regulating antibiotic tolerance within biofilm microcolonies. *Journal of bacteriology*, 194(18), 4791-4792

64. Martins C.H.G., Pires R.H., Cunha A.O., Pereira C.A.M., De Lacorte Singulani J., Abrão F., and Mendes-Giannini M.J.S. (2016) *Candida/Candida* biofilms. First description of dual-species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm. *Fungal biology*, 120(4), 530-537.
65. Mathé L., Van Dijck P. (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current genetics*, 59(4), 251-264.
66. Miceli M.H., Díaz J.A., Lee S.A. (2011) Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet infectious diseases*, 11(2), 142-151
67. Morales D.K., Hogan D.A. (2010) *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*, 6:e1000886
68. Morales D.K., Grahl N., Okegbe C., Dietrich L.E., Jacobs N.J., Hogan D.A. (2013) Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *mbio*, 4(1), e00526-12.
69. Nace H.L., Horn D., Neofytos D. (2009) Epidemiology and outcome of multiple-species candidemia at a tertiary care center between 2004 and 2007. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(3), 289-294
70. Nett J.E., Lepak A.J., Marchillo K., Andes D.R. (2009) Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. *Journal of infectious diseases*, 200(2), 307-313
71. Olsen I. (2015) Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(5), 877-886.
72. Ostrosky-Zeichner L., Rex J.H., Pappas P.G., Hamill R.J., Larsen R.A., Horowitz H.W., Powderly W.G., Hyslop N., Kauffman C.A., Cleary J., Mangino J.E., Lee J. (2003) Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(10), 3149-3154.
73. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D., Benjamin D.K., Calandra T.F., Edwards J.E., Filler S.G., Fisher J.F., Kullberg B.J., Zeichner L.O., Reboli, A.C. (2009) Clinical practice guidelines for the management candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 48(5), pp.503-535.

74. Parahitiyawa N.B., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Ye J., Tsang P.W.K., Cheung B.P.K., Yau J.Y.Y., Yeung S.K.W. (2006) Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *Apmis*, 114(4), 298-306.
75. Pathak A.K., Sharma S., Shrivastva P. (2012) Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *Journal of Applied Oral Science*, 20(1), 70-75.
76. Perlot J., Choi B., Spellberg B. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, 45(4), 321–346.
77. Pfaller M.A., Moet G.J., Messer S.A., Jones R.N., Castanheira M. (2011) Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *Journal of clinical microbiology*, 49(1), 396-399.
78. Ramage G., Bachmann S., Patterson T.F., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L. (2002) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother*, 49(6), 973–980
79. Ramage G., Martinez J.P., Lopez-Ribot J.L. (2006) *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem,” *FEMS Yeast Research*. *FEMS Yeast research*, 6 (7), 979-986.
80. Ramage G., Mowat E., Williams C., Lopez-Ribot J.L.L. (2009) our current understanding of fungal biofilms. *Informa Healthcare*, 35(4): 340-355
81. Ramage G., Mowat E., Williams C., Ribot J.L.L. (2010) Yeast biofilms. In *Pathogenic Yeasts*, (pp. 121-144). Springer Berlin Heidelberg.
82. Ramage G., Rajendran R., Sherry I., Williams C. (2012) Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*, 528521.
83. Ramage, G., Walle, K.V., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L. (2001) Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2475-2479.

84. Razzaghi-Abyaneh M., Sadeghi G., Zeinali E., Alirezaee M., Shams-Ghahfarokhi M., Amani A., Mirahmadi R., Tolouei R. (2014) Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida spp.* isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *Journal of Medical Mycology*, 24(2), e43-e50.
85. Rodrigues C.F., Silva S., Henriques M. (2014) *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(5), 673-688.
86. Sánchez-Vargas L.O., Estrada-Barraza D., Pozos-Guillen A.J., Rivas-Caceres R. (2013) Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Archives of oral biology*, 58(10), 1318-1326.
87. Santos J.D.D., Piva E., Vilela S.F.G., Jorge, A.O.C., Junqueira, J.C. (2016) Mixed biofilms formed by *C. albicans* and *non-albicans* species: a study of microbial interactions. *Brazilian oral research*, 30(1).
88. Seddiki S.M.L., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Badsji-Amir S., Taleb M., Kunkel D. (2013) Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *International journal of general medicine*, 6, 1.
89. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Belkherroubi-Sari L., Boucherit K. (2014) Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen: épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. *Journal of Medical Mycology*, 24(4), e179-e184.
90. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Sari-Belkharroubi L., Anselme-Bertrand I. (2015) Evaluation du potentiel de formation de biofilms mixtes entre *Candida albicans* et quelques espèces bactériennes isolées de cathéters vasculaires périphériques au CHU de Tlemcen. Première étude en Algérie. *Journal of Medical Mycology*, 25(2), 123-129.
91. Seneviratne C.J., Jin L., Samaranayake L.P. (2008) Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral diseases*, 14(7), 582-590
92. Shirtliff M.E., Peters B.M., Jabra-Rizk M.A. (2009) Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 299(1), 1–8.

93. Shokohi T., Hashemi Soteh M.B., Pouri Z.S., Hedayati M.T., Mayahi S. (2010) Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Indian journal of medical microbiology*, 28(2), 147.
94. Silva S., Henriques M., Martins A., Oliveira R., Williams D., Azeredo J. (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*, 47(7), 681-689.
95. Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., Azeredo J. (2011) Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*, 19: 241-247.
96. Stewart P.S. (2015) Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiology spectrum*, 3(3).
97. Stewart P.S., Franklin M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* , 6(3),199–210
98. Stoodley P., Sauer K., Davies, D.G., Costerton J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.
99. Tati S., Davidow P., McCall A., Hwang-Wong E., Rojas I.G., Cormack B., Edgerton, M. (2016) *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS Pathog*, 12(3), e1005522.
100. Thein Z.M., Seneviratne C.J., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. (2009) Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses*, 52(6), 467-475.
101. Tobudic S., Kratzer C., Lassnigg A., Presterl E. (2012) Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, 55(3), 199-204.
102. Tumbarello M., Fiori B., Trecarichi E.M., Posteraro P., Losito A.R., De Luca A., Sanguinetti M., Fadda G., Cauda R.,Posteraro B. (2012) Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS One*, 7(3), e33705.
103. Tumbarello M., Posteraro B., Trecarichi E. M., Fiori B., Rossi M, Porta R., de Gaetano D.K., La Sorda M., Spanu T., Fadda G., Cauda R., 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.
104. Valentín A., Cantón E., Pemán J., Quindós G. (2007) *In vitro* activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms . *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(4), 272-277.
105. Van Acker H., Coenye T. (2016) The role of efflux and physiological adaptation in biofilm tolerance and resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12565-12572.
106. Villar-Vidal M., Marcos-Aria, C., Eraso E., Quindós G. (2011) Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(9), 660-665
107. Von Eiff C., Peters G., Becker K. (2006) The small colony variant (SCV) concept- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*, 37(2), S26-S33.
108. West S.A., Griffin A.S., Gardner A., Diggle S.P. (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol*, 4(8), 597-607.
109. Wimpenny J., Manz W., Szewzyk U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 661-671.
110. Xu X.L., Lee R.T., Fang H.M., Wang Y.M., Li R., Zou H., Zhu Y., Wang Y. (2008) Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. *Cell Host & Microbe*, 4(1), 28-39.
111. Zakikhany K., Naglik J.R., Schmidt-Westhausen A., Holland G., Schaller M., Hube B. (2007) *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell. Microbiol*, 9(12), 2938-2954.

Questionnaire

Prélèvement N°:

Date:

Service :

Patient

Nom :Prénom.....

cathéter implanté depuis 48H : OuiNon.....

Intervention chirurgicale :

Non _____

Oui (détails) : _____

Traitement antimicrobiens (antibiotiques, antifongiques, corticoïdes....

Non _____

Oui (détails) : _____

Signe d'inflammation local ou générale :

Non _____.

Oui (Précisions): _____

Annexe 2 : Yeast extract Peptone Dextrose (YPD)

- 10 g d'extrait de levure
 - 20 g de tryptone (digestion pancréatique de caséine) 20 g
 - 20 g de glucose
 - Ajuster à 1 L d'eau distillée
 - 15 g d'agar
- pH 6,2

Annexe 3 : Une solution saline tamponnée au phosphate (PBS):

- 8 g de chlorure de sodium
 - 0,2 g de chlorure de potassium
 - 1,44 g Na_2HPO_4
 - 0,24 g de KH_2HPO_4
 - 800mL Eau distillée
- pH 7,4

Annexe 4 : Ménadione (10 mM):

- 172 mg de ménadione
- 10 mL d'acétone

Protéger de la lumière, à la température ambiante.

Annexe 5 : Sabouraud dextrose agar

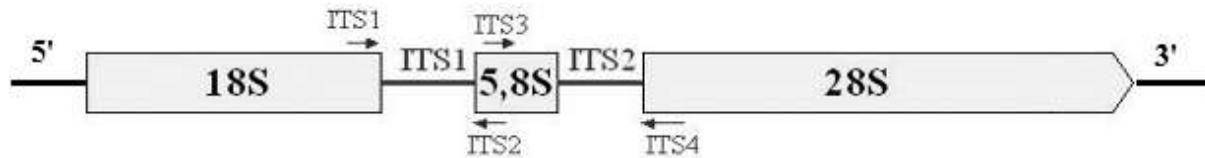
- 20 g de dextrose
- 10 g de peptone
- 15 g d'agar
- 1000 mL d'eau distillée
-

Annexe 6 : RPMI 1640 avec L-glutamine sans bicarbonate (Rosewell Park Memorial Institut):

Le RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) avec de la glutamine, sans bicarbonate

- 10,4 g de RPMI
- 34,53 g de MOPS
- 1000 mL d'eau distillée

Annexe 7 : Représentation schématique de l'organisation des gènes de l'ADNr avec les régions ITS (bougnoix et Espinasse 2003).



Annexe 8 : Analyse des séquences et interprétation

L'analyse des séquences s'effectue avec le logiciel Seqscape (Applied Biosystems). L'identification moléculaire s'effectue par comparaison des séquences obtenues pour la souche à analyser avec les séquences déposées dans les bases de données internationales GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Tailles théoriques des bandes amplifiées par le couple d'amorces ITS1-ITS4

<i>Candida sp.</i>	Taille du fragment	N° de séquence de la genBank
<i>C. albicans</i>	535	L47111
<i>C. glabrata</i>	871	AF167993
<i>C. parapsilosis</i>	520	L47109
<i>Candida guilliermondii</i>	608	L 47110
<i>C. kefyr</i>	721	EF568057

Annexe 9 : Profils de résistance des souches isolées vis-à-vis de l'amphotéricine B et de la caspofungine.

Souches isolées	Amphotéricine B			Caspofungine		
	CMI	SCMI 50%	sCMI 80%	CMI	SCMI 50%	SCMI 80%
CAKT27	0,5	1	4	0,25	4	16
CAKT34	0,5	4	8	0,5	8	16
CAKT35	0,5	1	4	0,25	4	16
CAKT56	0,5	1	4	1	4	16
CAKT78	1	2	8	0,25	2	8
CAKT152	0,5	1	4	0,5	4	16
CAKT175	0,5	1	4	0,25	4	16
CAKT181	0,5	1	4	0,25	4	16
CAKT183	0,25	1	1	0,25	0,25	0,5
CAKT209	0,5	2	16	0,5	8	16
CAKT218	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	1
CAKT223	0,5	2	8	0,5	4	8
CAKT237	0,25	0,5	1	0,25	0,5	1
CAKT240	0,25	0,5	1	0,25	1	1
CPKT31	0,5	1	4	0,25	1	4
CPKT 42	0,5	1	4	0,5	2	8
CPKT72	0,25	1	4	0,25	1	4
CPKT 77	1	4	8	0,5	1	4
CPKT 97	0,5	4	8	1	1	4
CPKT193	0,25	0,25	0,5	0,5	2	4
CPKT203	1	2	8	1	2	8
CPKT206	0,5	2	8	0,5	2	4
CPKT228	0,5	0,5	1	0,125	1	2
CGKT79	0,5	2	4	0,5	1	4
CGKT81	0,25	1	4	1	1	8
CGKT152	0,25	0,25	0,5	0,06	1	2
CGKT209	0,125	1	2	0,06	1	4
CFKT211	0,5	0,5	1	0,5	0,25	1

KT : cathéter veineux périphérique avec le numero du prélèvement

CA : *Candida albicans* ; CG : *Candida glabrata* ; CP : *Candida parapsilosis* ;
CGD : *Candida guilliermondii* ; CK : *Candida kefyr* ; CF : *Candida famata*

Production scientifique

Proceeding édités

- Brikci-Benhabib O.B., Atmani-Boucherit Z., Sari L., Boucherit K., Gendarme C. (2011, October). *Candida* biofilms and their role in neonatal infection. In *Mycoses* (Vol. 54, pp. 125-125).
- Bekkal Brikci Benhabib O., Boucherit Otmani Z., Boucherit K., Gendarme C. (2012, January). Venous catheter, front door to fungal pathogens: Biofilm formation and resistance. In *Mycoses* (Vol. 55, pp. 334-334).
- Benhabib O.B., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Seghir A. (2016) Pathogenic *Candida* biofilms producers involved in healthcare associated infections. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Science Index, Health and Medical Engineering, 2(3), 19.

Communications Orales et affichées

- O. Bekkal Brikci-Benhabib, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, C. Gendarme, Samir Mehiaoui. Contamination of peripheral venous catheter associated fungal biofilms. 11th European Conference on Fungal Genetics (ECFG11) March 30- April 2, 2012 Marburg, Germany.
Grant provided from Federation of European Microbiological Societies (FEMS) ECFG11, Philipps Universitat, March 30- April 2, 2012, Marburg, Germany.
- O. Bekkal Brikci-Benhabib, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, C. Gendarme. Pathogènes fongiques producteurs de biofilms. 8ème congrès de biologie et hygiène hospitalière. 5 avril 2012, Paris, France.
- O. Bekkal Brikci-Benhabib, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, C. Gendarme. Cathéter veineux, une porte d'entrée propice aux pathogènes fongiques: formation de biofilms et résistance 5ème journée Nationale d'Hygiène Hospitalière et de lutte contre les infections associées aux soins. 24 Mai 2012, Alger, Algérie

- O. Bekkal Brikci-Benhabib, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, C. Gendarme. Biofilm formation by pathogenic yeasts clinically isolated. BIOFILMS 5 international conference. 10-12 decembre 2012, Paris, France.
- O. Bekkal Brikci- Benhabib, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, I. Lahfa - Hassaine, S. Casaregola, C. Djediat. Cathéters veineux, la voie des pathogènes *Candida sp.* producteurs de biofilms. Xxème Journée Nationale De Parasitologie-Mycologie. 19 Mai 2016. Alger, Algérie
- Z. Boucherit- Otmani, O. Benhabib-Bekkal Brikci, K. Boucherit, A. Seghir. Biofilms fongiques mono et multi-espèces / formation et mise en évidence par mise en évidence par microscopie électronique à balayage. Les 12^{èmes} Journées Nationales de *Microbiologie*, 18 - 20 Novembre 2016, Hammamet, Tunisie

Articles soumis :

- O. Bekkal Brikci-Benhabib, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, F. Bekkal Brikci I. Lahfa-Hassaine, C. Djediat. Biofilm formation by dual strains *Candida albicans/Candida glabrata* clinically co-isolated from peripheral venous catheter
- O. Bekkal Brikci-Benhabib, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit. Cathéters veineux prélevés au CHU de l'ouest Algérien : Des voies d'accès propices aux *Candida sp.* producteurs de biofilms.

Formation

- **Online Course on Biofilms**
Bacterial biofilms and their role in chronic infections
University of Copenhagen
Course N°: **6018-14-00-00**
Period: **01/09/2014 - 07/11/2014**