



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



Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen

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

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

En sciences biologiques

Option: Biochimie appliquée

Présenté

Par

Bentabet Chahrazad

Thème

Effet du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes *Candida albicans*/*Staphylococcus sp.* isolés des dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen

Soutenu le 15 Juillet 2017

Devant le jury :

Présidente :	Pr Boucherit-OtmaniZahia	Université de Tlemcen
Promoteur :	Pr Boucherit Kebir	Centre Universitaire d'Ain Témouchent
Examineurs :	Dr Kazi Tani Zakia	Université de Tlemcen
	Dr Rahmoun Mohammed Nadjib	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2016-2017

ملخص

ركزت هذه الدراسة على تأثير الوسط الحيوي ودرجة الحموضة على تشكيل الأغشية الحيوية المختلطة من فطريات *Candida albicans* و بكتيريا *Staphylococcus sp* معزولة من الأجهزة الطبية بالمستشفى الجامعي تلمسان.

أظهرت النتائج أن *Candida albicans* ليس لها نفس القدرة على تكوين الأغشية الحيوية مع بكتيريا *Staphylococcus sp*, كمية الأغشية الحيوية المنتجة تختلف باختلاف تكوين لوسط الحيوي ودرجة الحموضة. يبدو أن إضافة السكر إلى الوسط الحيوي قد يكون وسيلة واعدة لتشكل خيوط من *Candida albicans* مما يؤثر على ارتباطها مع لبكتيريا. وبالتالي تشكيل أغشية حيوية مختلطة.

الكلمات المفتاحية

Candida albicans/ Staphylococcus sp, مختلطة أغشية حيوية , وسط حيوي , درجة الحموضة , سكر جلوكوز

Résumé

Notre travail a porté sur l'étude de l'effet de la composition du milieu de culture ainsi que le pH sur la formation de biofilms mixtes *in vitro* de *Candida albicans/ Staphylococcus sp* isolés des dispositifs médicaux du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen.

Les résultats obtenus ont révélé que les espèces *Candida albicans* n'ont pas le même pouvoir de formation des biofilms mixtes avec *Staphylococcus sp*. La quantité de biofilms produits varie en fonction du milieu de culture et de son pH.

Les sources de carbone favorisent la formation des hyphes de *Candida albicans*, ce qui influence l'attachement des bactéries et la formation de biofilms mixtes.

Mots-clés: *Candida albicans*, *Staphylococcus sp*, Biofilm mixte, Milieu de culture, pH, Glucose

Summary

Our work focused on the study of the effect of the composition of the culture medium as well as the pH on the formation of mixed biofilms *in vitro* by *Candida albicans / Staphylococcus sp* isolated from the medical devices of the University Hospital of Tlemcen.

The results obtained revealed that the *Candida albicans* species do not have the same potency of formation of the mixed biofilms with *Staphylococcus sp*. The amount of biofilms produced varies according to the culture medium and its pH.

Carbon sources favor the formation of hyphae of *Candida albicans*, which influences the attachment of bacteria and the formation of mixed biofilm.

Keywords: *Candida albicans*, *Staphylococcus sp*, Mixed biofilm, Culture medium, pH, Glucose.

Dédicaces

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail:

A mes très chers parents et à ma grand-mère, pour les encouragements, tendresse, amour et soutien durant mes études ; vous trouverez ici le fruit de vos sacrifices et je souhaite que j'ai réalisé l'un de vos rêve par ce modeste travail. Puisse Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur.

*A mes chères sœurs Nesrine et Douniazad pour
leur amour et compréhension*

A ma petite nièce adorée « Hiba » pour tout l'amour qu'elle nous procure.

A toute ma famille ainsi qu'à tous mes amis.

Remerciements

Au Nom de Dieu le Très Miséricordieux – le Tout Miséricordieux – Que Dieu bénisse le Prophète Mouhammad, Imam des Bienheureux et Sauvegarde des Purifiés – ainsi que sa Noble Famille et ses Satisfaisants compagnons- Amin.

Je rends grâce à Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout.

Mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux s'adressent à mon promoteur, Monsieur Boucherit Kebir, Professeur, Directeur du Centre Universitaire d'Ain Témouchent pour avoir accepté la charge de m'encadrer. Votre grande générosité et votre détermination pour la recherche font de vous un exemple exceptionnel à suivre. Veuillez trouver dans cet ouvrage l'expression de mes plus profonds respects et mon entière reconnaissance.

J'exprime mes plus vifs remerciements, ma reconnaissance toute particulière et ma gratitude, qui ne seront jamais concrètement exprimées à l'égard de Madame Boucherit - Otmani Zahia, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université de Tlemcen, pour l'aide précieuse et chaleureuse qu'elle m'a offert. Votre générosité et votre grande patience m'ont à chaque fois permis de rebondir dans les moments difficile. Veuillez trouver par ces quelques mots, Madame le Professeur, l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.

Mes remerciements vont aussi à:

Mme Kazi Tani Zahira Zakia, Maître de conférences classe B au département de Biologie, de l'université de Tlemcen. Je lui exprime ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mr Rahmoun Mohammed Nadjib, Maître de conférences classe A au département de Biologie, de l'université de Tlemcen. Merci d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

M^{lle} Touil hidayet, doctorante au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique», pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements à toute ma famille. Merci pour votre soutien et vos encouragements. Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail. Qu'ils trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu en travaillant au sein du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique» et je remercie l'ensemble des doctorants ainsi que les techniciennes du laboratoire pour leur aide et leur amitié.

Très cordialement

Table des matières

Introduction générale	1
Première partie : Synthèse bibliographique	3
Deuxième partie : Matériel et Méthodes	
1. Matériel	8
1.1. Microorganismes	8
1.2. Milieux de culture	8
2. Méthodes	11
2.1. Préparation de l'inoculum de <i>Candida albicans</i>	11
2.2. Préparation des inocula bactériens	11
2.3. Evaluation de la capacité des souches isolées à former des biofilms mixtes <i>in vitro</i>	11
2.4. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet	12
Troisième partie : Résultats et discussion	
1. Effet de la nature du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes <i>Candida albicans/Staphylococcus sp</i>	14
2. Effet de la formation des biofilms mixtes sur le pH du milieu de culture	18
3. Effet de la supplémentation des milieux de culture en glucose sur la formation des biofilms mixtes	19
4. Effet du pH du milieu de culture additionné de glucose sur la formation des biofilms mixtes	21
Quatrième partie : Conclusion générale	24
Cinquième partie : Références bibliographiques	26

Liste des figures

Figure N°1 : Effet du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes au cours du temps.....	16
Figure N°2 : pH des milieux de culture utilisés après la formation des biofilms mixtes.....	18
Figure N°3 : Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes sur milieu Trypticase soja	20
Figure N°4 : Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes sur milieu BHIB.....	20
Figure N°5 : Variation du pH du milieu Trypticase soja en présence et en l'absence du glucose au cours de la formation de biofilms mixtes.....	22
Figure N°6 : Variation du pH du milieu BHIB en présence et en l'absence de glucose au cours de la formation de biofilms mixtes.....	23

Liste des abréviations

BHIB: *Brain Heart Infusion Broth.*

BHIBG: Brain Heart Infusion Broth additionné de glucose.

DO: Densité optique.

PBS: *Phosphate buffered saline.*

RPMI 1640: *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640.*

Introduction générale

Les dispositifs médicaux sont utilisés de manière systématique en milieu hospitalier. Cependant, ces derniers peuvent servir de support pour l'adhésion de certains microorganismes pathogènes et être à l'origine d'infections invasives dont le risque varie en fonction du site anatomique d'implantation, du terrain du patient, et de la durée de mise en place **(Lebeaux et coll., 2014)**.

Au-delà des bactéries, les levures du genre *Candida* représentent la deuxième cause des infections liées aux cathéters.

Candida albicans est considérée comme étant le principal agent pathogène responsable de ces infections malgré l'émergence d'espèces non *albicans* dans les isolats cliniques. Cette levure a une capacité d'adhérence supérieure à celles des autres espèces formant des biofilms, c'est ce qui explique sans doute sa plus grande virulence **(Cardinale, 2001)**.

Or, *Candida albicans* cohabite avec les bactéries dans l'environnement évoluant dans un contexte infectieux polymicrobien. Elle peut avoir un rôle important dans des situations cliniques où un patient souffre d'infections mixtes causées à la fois par des bactéries et des champignons **(Hogan et coll., 2004)**.

En effet, la cohabitation au sein de biofilms de levures de type *Candida albicans* et de bactéries semble correspondre à la situation la plus fréquente. Cette coexistence est liée principalement à la présence de multiples interactions entre ces deux germes **(Thein et coll., 2009)**.

Les données disponibles sur les interactions montrent qu'afin de former un biofilm mixte, les microorganismes doivent maintenir un équilibre rigoureux qui bascule de la synergie à l'antagonisme selon les conditions environnantes notamment la composition du milieu de culture qui favorise une adhésion différente des bactéries et des levures sur les supports.

C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant de réaliser ce travail qui porte sur l'étude de l'effet de la composition du milieu de culture ainsi que le pH sur la formation de biofilms mixtes *in vitro* par *Candida albicans*/*Staphylococcus sp* isolés des dispositifs médicaux du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen.

Première partie
Synthèse bibliographique

En **2013**, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé qu'entre 5 et 12 % des patients hospitalisés dans le monde développent une infection associée aux soins dont plus de 60 % sont liées à l'usage d'un dispositif médical ou chirurgical.

Ce dernier offre des surfaces d'adhésion pour le développement des microorganismes réfractaires aux traitements habituels, ce qui met en jeu le pronostic vital des patients. Parmi ces infections, celles d'origine fongique, particulièrement les candidoses, représentent environ 80% des cas (**Clinton et Duane, 2006**).

Ces candidoses constituent un réel problème de santé publique en raison de l'accroissement significatif de la mortalité, de la morbidité et du coût de prise en charge des patients qui leur sont liés (**Njall et coll., 2013**).

Malgré l'émergence d'espèces non *albicans* dans les isolats cliniques, *Candida albicans* reste l'espèce la plus incriminée dans ces infections qui, par leur fréquence et leur gravité, se situent au premier rang des candidoses (**Gil-Alonso et coll., 2015**).

Il s'agit de l'espèce la plus virulente en raison de la présence des phospholipases, des adhésines de surface et du phénomène de polymorphisme (**Gow et coll., 2011**). La croissance des hyphes protège *Candida albicans* de la phagocytose et favorise l'invasion des surfaces épithéliales de l'hôte (**Cavalcanti et coll., 2015**).

Candida albicans est capable d'une vie libre dans un environnement liquide (cellules planctoniques) ou attachée à une surface et encastrée dans une matrice de substance exo-polymérique auto-synthétisée dite biofilm (cellules sessiles) (**Bueno, 2014**).

Le développement du biofilm passe par cinq étapes, l'adhésion à la surface, la croissance, la formation de microcolonies, la maturation du biofilm et le détachement qui conduit à la colonisation d'une nouvelle surface (**Monroe, 2007**).

Les composants principaux de la matrice exopolymérique sont l'eau, les polymères extracellulaires excrétés par les microorganismes, les microorganismes, les particules emprisonnées et les substances dissoutes (**Flemming et coll., 1992**).

La matrice exopolymérique assure la survie des microorganismes en fournissant les nutriments essentiels mais crée également un environnement favorable pour leur intégrité architecturale (**Oliveira et coll., 2013**).

Il est important de noter que selon les données de la littérature, les infections fongiques causées par *Candida albicans* sont souvent associées aux bactéries et sont par conséquent, à l'origine d'infections mixtes ou multi-espèces **[(Wargo et Hogan, 2006) ; (Lynch et Robertson, 2008)]**.

En effet, la cohabitation au sein de biofilms de *Candida albicans* et de bactéries semble correspondre à la situation la plus fréquente dans un contexte infectieux. Cette coexistence est liée principalement à la présence de multiples interactions entre ces deux germes à savoir la synergie ou l'antagonisme **(Thein et coll., 2009)**.

Selon **Klotz et ses collaborateurs (2007)**, dans 27% des candidoses systémiques en milieu hospitalier, l'espèce *Candida albicans* est co-isolée avec *Staphylococcus aureus*.

De plus, les travaux de **Peters et Noverr en 2013**, ont mis en évidence une interaction synergique entre *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* avec une mortalité très élevée chez les animaux.

En effet, *Staphylococcus aureus* s'associe préférentiellement aux hyphes de *Candida albicans* et forme ainsi un biofilm mixte résistant à la vancomycine **(Harriott et Noverr, 2010)**.

Au sein des biofilms, les levures et les bactéries sont souvent réfractaires aux traitements habituels en raison de la résistance accrue aux agents antimicrobiens. De plus, la composition du milieu de culture affecte la quantité de biofilms produits d'autant plus que les deux espèces sont différentes d'un point de vue métabolique. Une étude réalisée sur *Candida albicans* a montré que la biomasse du biofilm formé par cette espèce est plus importante en présence d'une concentration élevée en galactose **(Douglas, 1992)**.

En effet, l'addition des sucres dans le milieu de culture favorise la production de la matrice polysaccharidique des biofilms mais peut également empêcher l'adhésion des microorganismes aux surfaces par occupation des sites d'adhésion **[(Abu El-Teen et coll., 1989); (Ghannoum et coll., 1991)]**.

Selon **Goller** en **2008**, la formation et la dispersion d'un biofilm nécessite l'activation de facteurs environnementaux clefs parmi lesquels nous pouvons citer :

- La température.
- Le pH du milieu environnant qui modifie la charge des surfaces des microorganismes ainsi que celles des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation des groupements fonctionnels selon leur pKa (**Hamadi et coll., 2004**).
- La source de carbone qui influe sur la formation et la maturation d'un biofilm (**Martinez, 2007**).
- Les concentrations en cations (sodium Na⁺, Calcium Ca²⁺, ion ferrique Fe³⁺) qui inhibent l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre (**Fletcher, 1988**).

Partant de ces données, nous avons entrepris cette étude qui porte sur l'étude de l'effet de la composition du milieu de culture ainsi que le pH sur la formation de biofilms mixtes *in vitro* par *Candida albicans*/*Staphylococcus sp.* isolées de dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen.

Deuxième partie
Matériel et méthodes

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

1. Matériel

1.1. Microorganismes

Pour la formation des biofilms mixtes *Candida albicans*/*Staphylococcus sp.*, nous avons utilisé une collection de six (06) souches de *Candida albicans* et de sept (07) souches de *Staphylococcus sp* dont trois (03) *Staphylococcus aureus* et quatre (04) *Staphylococcus epidermidis* co-isolées de dispositifs médicaux des services de chirurgie ortho-traumatologie et d'anesthésie-réanimation du CHU de Tlemcen.

Les levures et les bactéries sont entretenues par repiquages réguliers et conservées à + 4°C sur gélose Sabouraud et sur gélose nutritive respectivement.

1.2. Milieux de culture

Afin de tester l'effet du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes, quatre milieux de composition et de pH différents sont utilisés. La composition pour un litre est la suivante:

➤ Trypticase soja

Composants	g/L
Peptone de caséine	17
Peptone de farine	3
D (+) glucose	2,5
Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique	2,5

➤ Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI)

Composants	g/L
Sels inorganiques	
Nitrate de calcium • 4H ₂ O	0,1
Sulfate de magnésium (anhydre)	0,04884
chlorure de potassium	0,4
Chlorure de sodium	6
Phosphate disodique (anhydre)	0,8
Acides aminés	
L-Arginine	0,2
L-Asparagine (anhydre)	0,05
Acide L-aspartique	0,02
L-cystine • 2HCl	0,0652
Acide L-glutamique	0,02
L-Glutamine	0,3
Glycine	0,01
L-Histidine	0,015
Hydroxy-L-Proline	0,02
L-Isoleucine	0,05
L-Leucine	0,05
L-Lysine • HCl	0,04
L-Méthionine	0,015
L-Phénylalanine	0,015
L-Proline	0,02
L-Serine	0,03
L-Thréonine	0,02
L-Tryptophane	0,005
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0,02883
L-Valine	0,02

➤ Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI) (suite)

Composants	g/L
Vitamines	
D-biotine	0,0002
Chlorure de choline	0,003
Acide folique	0,001
Myo-Inositol	0,035
Niacinamide	0,001
Acide p-aminobenzoïque	0,001
D-acide pantothénique (hémicalcium)	0,00025
Pyridoxine• HCl	0,001
Riboflavine	0,0002
Thiamine• HCl	0,001
Vitamine B12	0,000005
Autres	
D-Glucose	2
Glutathion (réduit)	0,001
Rouge de phénol • Na	0,0053
Suppléments	
Le bicarbonate de sodium	2

➤ Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

Composants	g/L
Cerveaux de veau	12,5
Cœur de bœuf	5,0
Peptone	10,0
Chlorure de sodium	5,0
D(+) Glucose	2,0
Phosphate disodique	2,5

➤ **Sabouraud liquide**

Composants	g/L
Glucose	20
Peptone	10
Extrait de levure	3

Nous avons également utilisé le milieu BHIB et le trypticase soja additionnés de 2% de glucose (**Buu et coll., 2014**).

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'inoculum de *Candida albicans*

Une préculture de 24 heures à 30°C sur milieu Sabouraud est centrifugée à 3000g pendant 5 minutes à +4°C. Après élimination du surnageant, le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate salé pH 7,4, 10mM (PBS) puis re-suspendu dans chaque milieu de culture à une concentration de 10⁶ cellules/mL.

2.2. Préparation des inocula bactériens

Une préculture de 24 heures à 30°C sur milieu BHIB est centrifugée à 1000g pendant 15 minutes à +4°C. Le surnageant est écarté et le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate salé pH 7,4, 10mM (PBS) puis re-suspendu dans chaque milieu de culture à une concentration de 10⁷ cellules/mL.

2.3. Evaluation de la capacité des souches isolées à former des biofilms *in vitro* (Ibarra-trujillo et coll., 2012)

Pour la formation des biofilms mixtes *C. albicans*/*Staphylococcus sp*, nous avons suivi le protocole d'Ibarra-trujillo et coll., (2012) qui consiste à introduire 50µL de la suspension levurienne et 50µL d'une suspension bactérienne dans tous les puits de la microplaque. Cette dernière est ensuite scellée et placée dans une étuve à 37°C pendant 24, 48 et 72 heures.

2.4. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet (Christensen et coll., 1985)

Après formation de biofilms, le milieu de culture est aspiré et les puits sont lavés trois fois avec du PBS 10mM, pH 7,4. Les microplaques sont laissées pendant 15 minutes à température ambiante puis 100µL d'une solution de crystal violet sont ajoutés dans tous les puits de la microplaque. Après une incubation de 45 minutes à température ambiante, les puits sont lavés et le crystal violet lié est libéré par addition de 100µL d'un mélange éthanol-acétone (80:20, v/v) **(León-Romero et coll., 2015)**. La densité optique est lue à 570nm à l'aide d'un lecteur de microplaques **(BioTek FLx800)**. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la biomasse du biofilm formé.

Troisième partie
Résultats et discussion

Notre travail a porté sur l'étude de l'effet du milieu de culture ainsi que le pH sur la formation des biofilms mixtes *in vitro* de six associations *Candida albicans*/*Staphylococcus sp.* co-isolés de dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen.

1. Effet de la nature du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes *Candida albicans* / *Staphylococcus sp.*

Les biomasses des biofilms mixtes formés par les associations *Candida albicans* / *Staphylococcus sp.* dans les différents milieux de culture après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 37°C sont représentées sur la **figureN°1**.

Nous remarquons que la quantité de biomasse dépend de l'âge du biofilm, elle atteint un maximum pour les biofilms matures c'est-à-dire après 48heures d'incubation à 37°C.

Pour les biofilms mixtes formés sur Sabouraud, nous constatons que l'association *Candida albicans* (3) / *Staphylococcus epidermidis* (2) produit la biomasse la plus importante après 48 heures d'incubation à 37°C avec une densité optique de 0,64. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Suma et coll., (2016)** qui ont montré que *Candida albicans* forme plus de biofilms sur les milieux riche en source de carbone qui favorise la production d'adhésines.

De même, les biofilms formés sur trypticase soja par les associations *Candida albicans* (2)/*Staphylococcus aureus*(1), *Candida albicans* (1)/*Staphylococcus epidermidis* (1) et *Candida albicans* (3)/*Staphylococcus epidermidis* (3) présentent les densités optiques les plus importantes et cela après 48 heures d'incubation.

La biomasse du biofilm mixte dépend de la bactérie qui cohabite avec la levure sur le même dispositif médical. En effet, les densités optiques des biofilms sont de 0,50 et 0,42 pour les associations *Candida albicans* (3)/*Staphylococcus epidermidis* (3) et *Candida albicans* (3)/*Staphylococcus epidermidis* (2) respectivement. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Lynch et Robertson (2008)**, qui ont montré que certaines bactéries rentrent en compétition avec les levures pour les sites d'adhésion. Les bactéries peuvent également inhiber la croissance des levures par la sécrétion de toxines (**Hibbing et coll., 2010**).

Par ailleurs, les biofilms mixtes formés sur BHIB présentent des densités optiques de 0,49 pour l'association *Candida albicans*(3)/*Staphylococcus epidermidis*(2) et 0,54 pour *Candida albicans*(1)/*Staphylococcus epidermidis*(1) et 0,52 pour l'association *Candida albicans*(2)/*Staphylococcus aureus*(1). Cette différence est probablement liée à la richesse du BHIB en substrats qui favorisent l'adhésion et la croissance bactérienne.

Selon **Auger (2012)**, en cas d'appauvrissement du milieu environnant, les bactéries se trouvant encore à l'état planctonique auront tendance à être attirées par le biofilm qui représente alors une réserve en nutriments.

Sur milieu RPMI 1640, la biomasse du biofilm formé par l'association *Candida albicans*(2)/*Staphylococcus aureus*(1), après 24 heures d'incubation à 37°C, est la plus importante avec une densité optique de 0,56. En revanche, les biomasses des biofilms formés par les différentes associations sur ce milieu de culture après 48 heures d'incubation sont moins importantes que celles des biofilms formés par ces mêmes associations sur BHIB.

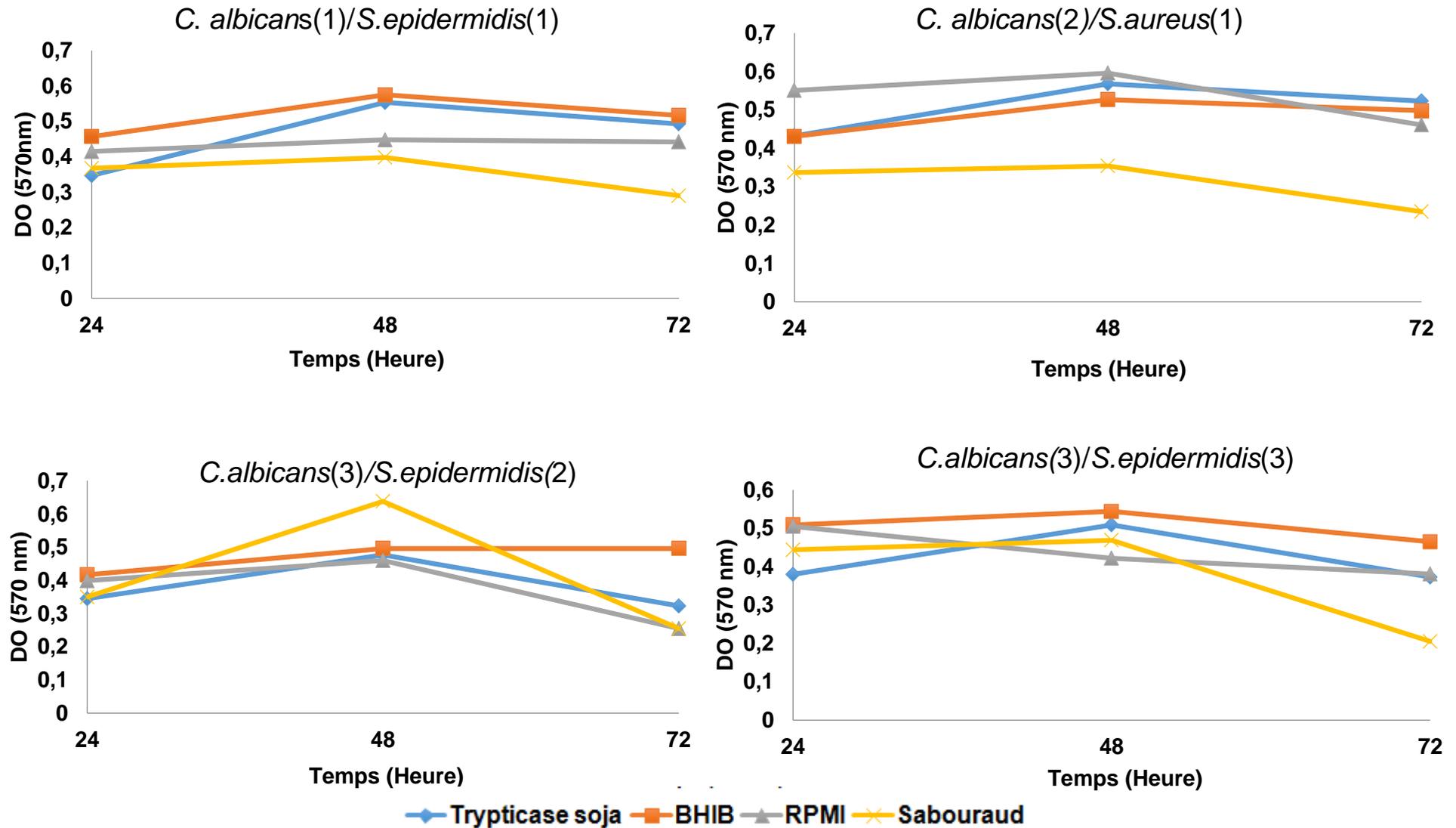


Figure N°1 : Effet du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes au cours du temps.

3. Effet de la formation des biofilms mixtes sur le pH du milieu de culture

La **figure N°2**, représente les variations du pH des différents milieux de culture utilisés pour la formation des biofilms mixtes de *Candida albicans*/*Staphylococcus sp.*

Nous constatons que la formation des biofilms mixtes par les différentes associations testées induit une baisse du pH des milieux de culture à l'exception du milieu Sabouraud où le pH reste presque inchangé (5,6).

Pour le trypticase soja (pH 7,3), les pH des différentes associations mesurés diffèrent légèrement pendant les trois temps d'incubation (24, 48 et 72 heures), ils varient entre 6,7 et 7. Concernant le BHIB, le pH passe de 7,4 à environ 6.

Cette diminution est plus accentuée sur milieu RPMI 1640 où le pH est passé de $7\pm 0,2$ à $4\pm 0,2$ après seulement 24 heures d'incubation à 37°C. Ceci pourrait être dû au fait que le milieu RPMI 1640 est particulièrement riche en acides aminés qui pourraient être utilisés par les levures comme source de carbone et d'azote pour la fermentation et la production d'acides.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Seghir et coll., (2015)** qui ont montré que sur milieu RPMI 1640, la biomasse des biofilms dépend de l'espèce bactérienne co-formatrices de biofilms avec *Candida albicans*.

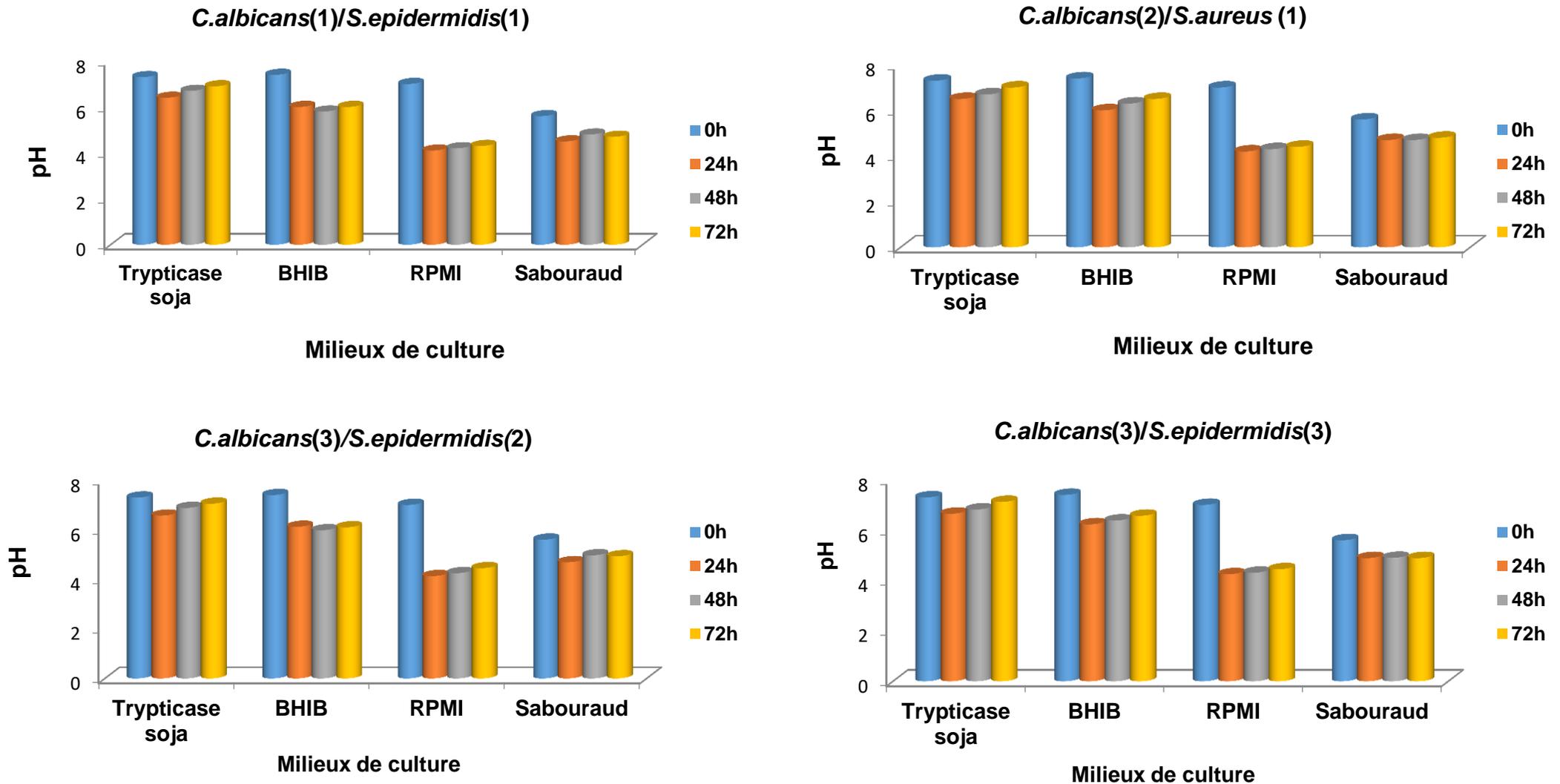


Figure N°2 : pH des milieux de culture utilisés après la formation des biofilms mixtes

3. Effet de la supplémentation des milieux de culture en glucose sur la formation de biofilms mixtes

Nous avons constaté que la quantité de biofilms produite dépend de la composition du milieu de culture, c'est pourquoi, nous avons jugé nécessaire de mesurer la biomasse des biofilms formés dans les milieux trypticase soja et BHIB additionnés de glucose à 2%. Les résultats obtenus sont représentés sur les **figures N°3 et 4**.

Nous remarquons que l'addition de 2% de glucose aux milieux trypticase soja et BHIB entraîne une augmentation de la biomasse des biofilms formés par toutes les associations testées. En effet, pour le milieu BHIB, les densités optiques passent de 0,34 à 0,41 pour l'association *Candida albicans*(1)/ *Staphylococcus epidermidis*(1), de 0,36 à 0,43 pour l'association *Candida albicans*(2)/ *Staphylococcus aureus*(1), de 0,36 à 0,39 pour l'association *Candida albicans*(3)/ *Staphylococcus epidermidis*(2) et de 0,23 à 0,27 pour l'association *Candida albicans*(3)/ *Staphylococcus epidermidis*(3). En ce qui concerne le milieu trypticase soja, elles varient de 0,4 à 0,43 pour l'association *Candida albicans*(1)/ *Staphylococcus epidermidis*(1), de 0,43 à 0,71 pour l'association *Candida albicans*(2)/ *Staphylococcus aureus*(1), de 0,33 à 0,51 pour l'association *Candida albicans*(3)/ *Staphylococcus epidermidis*(2) et de 0,4 à 0,53 pour l'association *Candida albicans*(3)/*Staphylococcus epidermidis*(3).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Cerca et coll., (2008)** et de **Suma et coll., (2016)** qui ont révélé que *Candida albicans* forme plus de biofilms en présence d'une source de carbone importante.

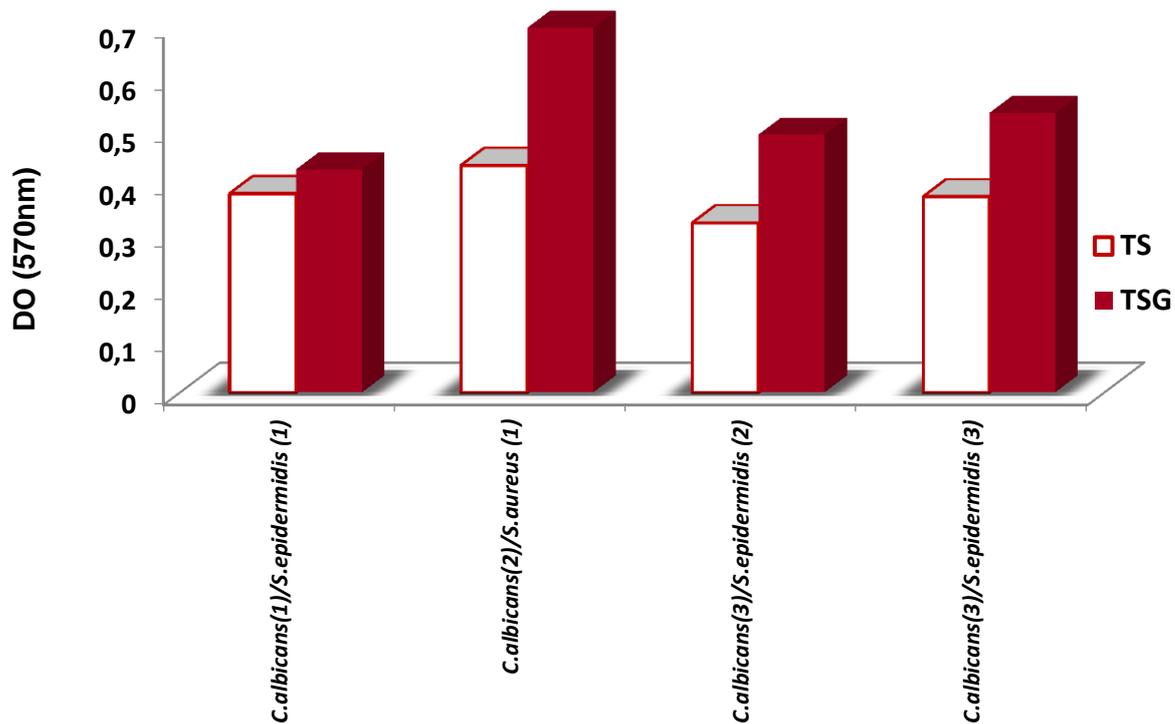


Figure N°3 : Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes sur milieu Trypticase soja

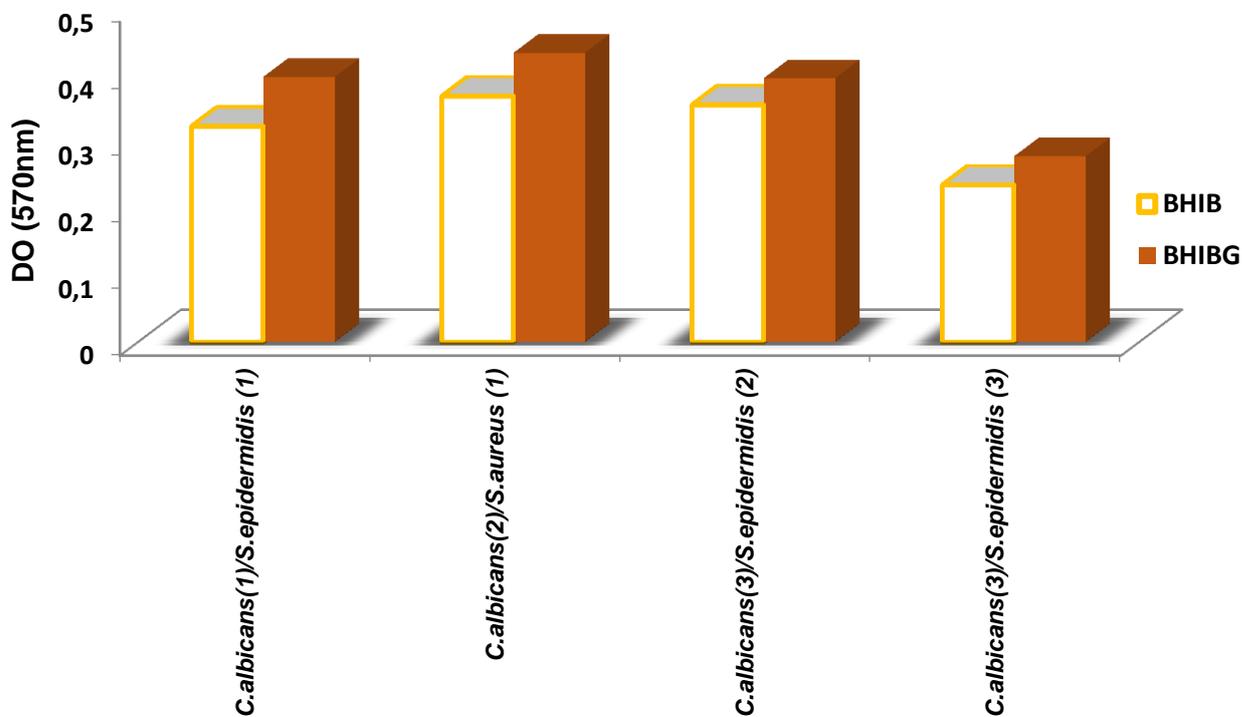


Figure N°4 : Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes sur milieu BHIB.

4. Effet du pH du milieu de culture additionné de glucose sur la formation des biofilms mixtes

Les **figures N°5 et 6** représentent la variation du pH des milieux Trypticase soja et BHIB supplémentés de 2% de glucose au cours de la formation des biofilms par *Candida albicans*/*Staphylococcus sp.*

Il ressort de ces figures que pour toutes les associations testées, la supplémentation des milieux de culture en glucose entraîne une diminution du pH pour les biofilms formés après 24, 48 ou 72 heures d'incubation à 37°C. Cela pourrait être expliqué par la croissance en faveur des levures qui a été confirmée par une observation au microscope optique.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Gow et coll., (2011)** qui ont révélé que la présence d'une source de carbone (glucose) favorise la formation des hyphes chez les levures, tout en diminuant le pH environnemental.

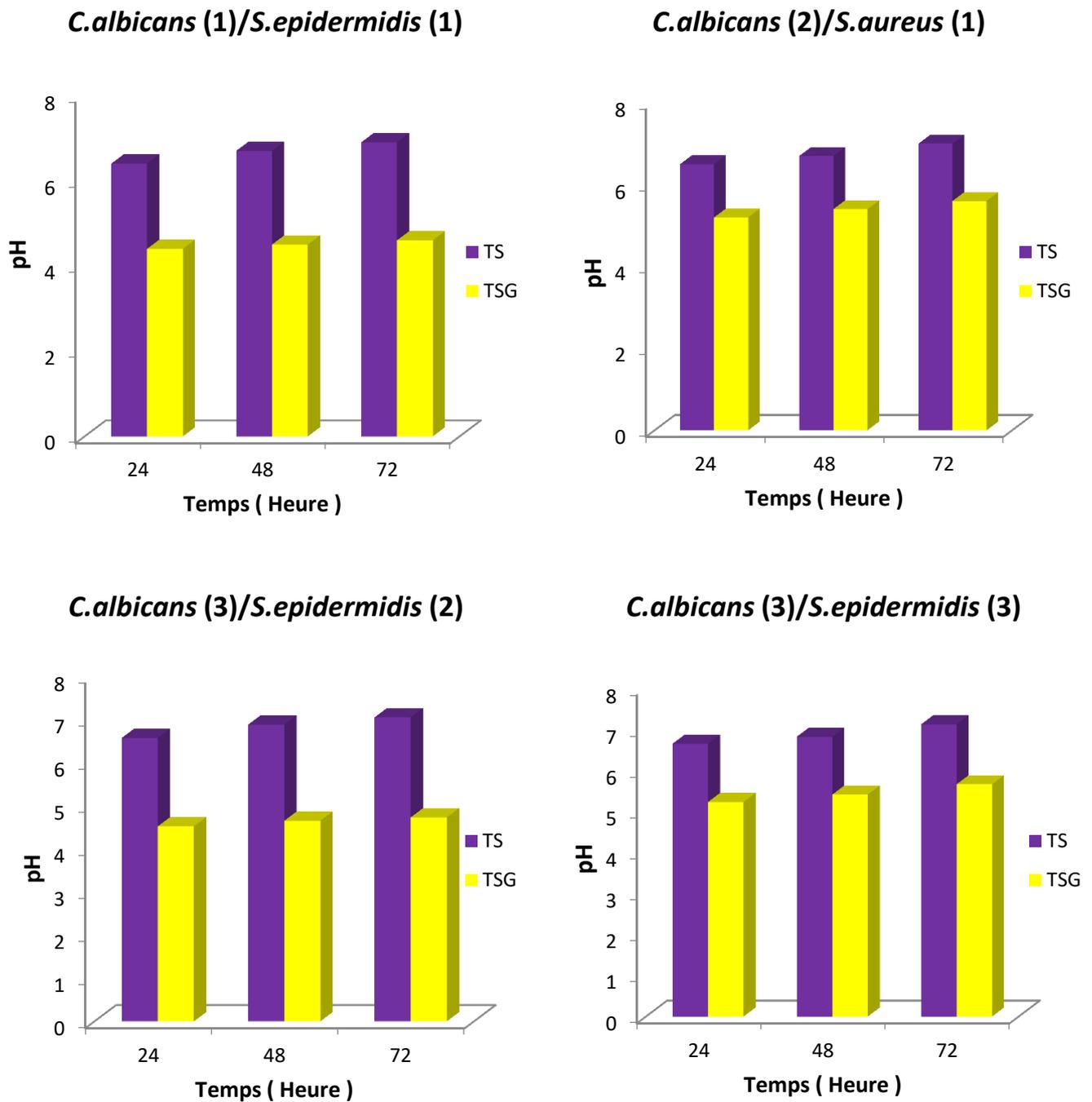


Figure N°5 : Variation du pH du milieu Trypticase soja en présence et en l'absence de glucose au cours de la formation de biofilms mixtes

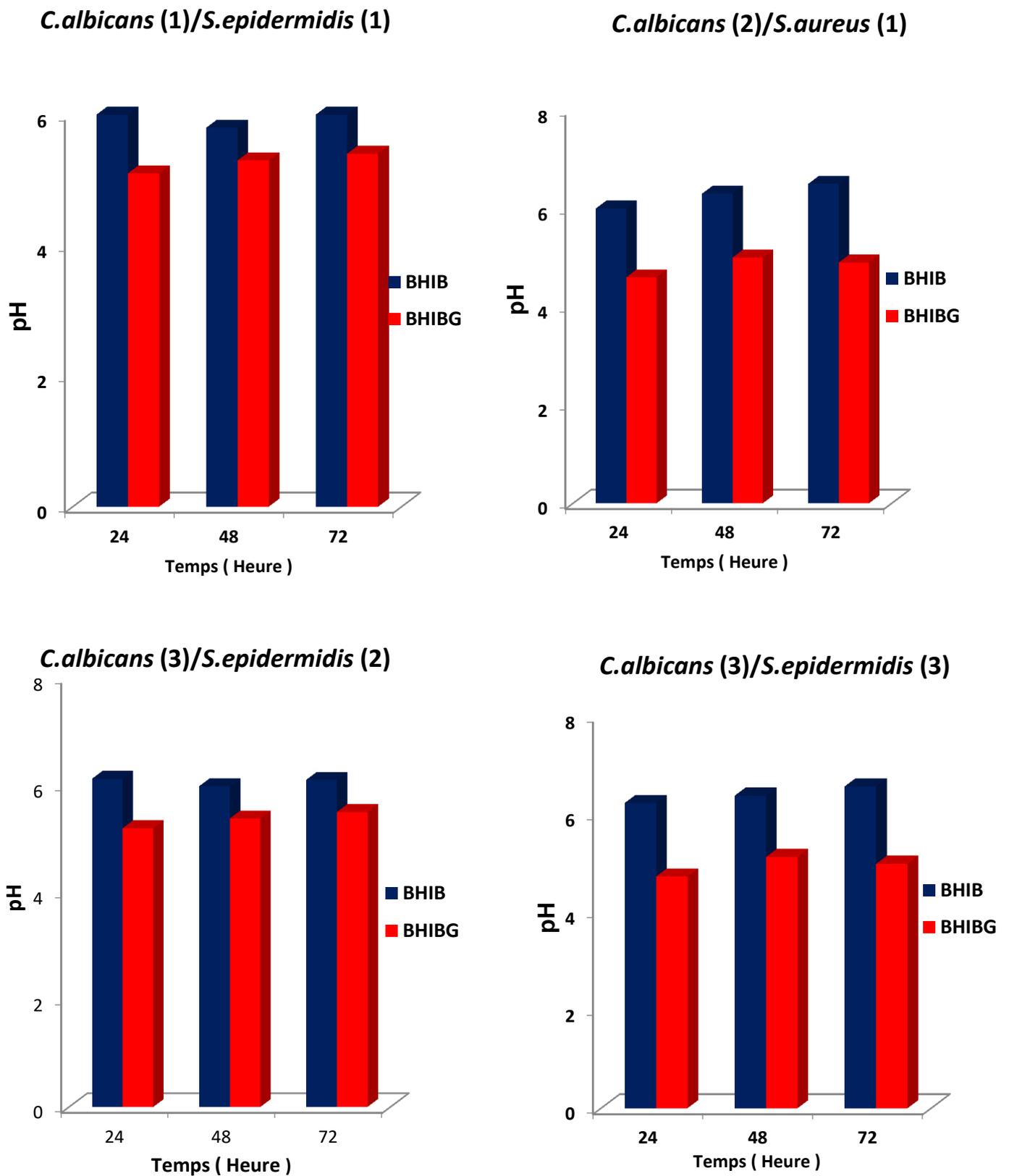


Figure N°6 : Variation du pH du milieu BHIB en présence et en l'absence de glucose au cours de la formation de biofilms mixtes

Quatrième partie
Conclusion générale

Dans le cadre des travaux de recherches entrepris au « laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » sur la formation des biofilms mixtes, nous avons entrepris cette étude qui a porté sur l'évaluation de l'effet du milieu de culture et du pH sur la formation des biofilms mixtes (*Candida albicans*/*Staphylococcus sp.*) isolés des dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen. Il ressort de ce travail que:

- Les isolats de *Candida albicans* ont une capacité variable à produire des biofilms *in vitro* avec les bactéries co-isolées du même dispositif médical.
- La quantité des biofilms produit varie en fonction des souches, des espèces, de la composition du milieu de culture et du pH, ces facteurs jouent un rôle primordial en favorisant la dominance des bactéries ou des levures.
- Les sources de carbone influencent la capacité d'adhésion de *Candida albicans* et le développement de biofilms. Après l'ajout du glucose dans les deux milieux Trypticase soja et BHIB, la biomasse de toutes les associations a augmenté.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant d':

- Etudier le pouvoir de formation des biofilms mixtes par plusieurs espèces bactériennes et fongiques, dans différentes conditions physico-chimiques.
- Utiliser de nouveaux matériaux pour la colonisation des microorganismes et à la formation de biofilm.
- Etudier la méthode phénotypique permettant de prédire la capacité d'une souche à produire du biofilm.

Cinquième partie
Références bibliographiques

1. Abu El-Teen K., Ghannum M. and Stretton R.J. (1989) Effects of sub-inhibitory concentrations of antifungal agents on adherence of *Candida spp.* to buccal epithelial cells *in vitro*. *Mycoses*, 32(11), 551-562.
2. Auger M. (2012) Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques de *Escherichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales.
3. Buu L.M. and Chen Y.C. (2014) Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Journal of Biomedical Science*; 21:22.
4. Bueno J. (2014) Anti-Biofilm drug susceptibility testing methods: Looking for new Strategies against resistance mechanism. *J. Microbial. Biochem. Technol.* S3: 004.
5. Cardinale V. (2001) Les candidoses vaginales récidivante à *Candida albicans*. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 54(9), 3746-3755.
6. Cavalcanti Y., Morse D., Silva D. Antoninha A., Cury D., Wei X., Wilson M., Milward P., Lewis M., Bradshaw D. and Williams D. (2015) Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* enhanced in biofilms containing oral bacteria. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. Vol.31, No.1,27 38.
7. Cerca N., Brooks J. L. and Jefferson K.K. (2008) Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (*icaR*) by SarA, sigmaB, and IcaR in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190, 6530–6533 10.1128/JB.00482-08.
8. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. and Beachey E.H. (1985) Adherence of coagulase negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
9. Clinton K. M., Duane R.H., Beckius M.L., Karon L. F. and Lynn L. Horvath. (2006) Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium chromagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* ; p 5: 1.
10. Douglas L.J. (1992) Mannoprotein adhesins of *Candida albicans*, p. 34-50. In J. E. Bennett, R. J. Hay, and P. K. Peterson (ed.), *New strategies in fungal disease*. Churchill Livingstone, Edinburgh.

11. Flemming H.C., Schaule G. and Mc Donogh R. (1992) Biofouling on membranes. A short review. "Biofilms-science and technology", (Eds), *Kluwer Academic Press*, pp 487-497.
12. Fletcher M. (1988) Attachment of *pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *J. Bacteriol.*, 170: 2027-2030.
13. Ghannoum M. A., Abu-El Teen K., Ibrahim A. and Stretton R. (1991) Protection against *Candida albicans* gastro intestinal colonization and dissemination by saccharides in experimental animals. *Microbios*, 67(271), 95-105.
14. Gil-Alonso S., Jauregizar N., Cantón E., Eraso E. and Quindós G. (2015) Comparison of the *in vitro* activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time–kill curves. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 82: 57–61.
15. Goller C.C. and Romeo T. (2008) Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 37- 66.
16. Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M. and Kouider N. (2004) Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology.* 54: 213-225.
17. Gow A.J., Johnson W., Pattie A., Brett C.E., Roberts B., Starr J.M. and Deary I.J. (2011) Stability and change in intelligence from age 11 to ages 70, 79 and 87: the lothian birth cohorts of 1921 and 1936. *Psychology and aging. Mol. Cell*, 26:232–240.
18. Harriott M.M. and 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.
19. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R. and Peterson S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Review Microbiology*, 8(1), 15-25.
20. Hogan D.A., Vik Å. And Kolter R. (2004) A *pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology*, 54(5), 1212-1223.

21. Ibarra-Trujillo C., Villar-Vidal M., Gaitán-Cepeda L., Pozos-Guillen A., Mendoza-de Elias R. and Sánchez-Vargas L. (2012) Formation and quantification assay of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Mixed Biofilm. *Rev Iberoam. Micol.* 29 (4), 214-222.
22. Jabra-Rizk M.A., Meiller T.F., James C.E. And Shirtliff M.E. (2006) Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1463-1469.
23. Jackson W., Kazushi Suzuki., Lawrence O., Jerry W., Mark E. and Tony R. (2002) Biofilm Formation and dispersal under the Influence of the Global Regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 184(1) : 290–301.
24. Klotz S.A., Chasin B.S., Powell B., Gaur N.K. and 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.
25. Lebeaux D., Ghigo M. and Beloin C. (2014) Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-infectieux*, 5(2):26-86.
26. León-Romero A., Domínguez-Manzano J., Garrido-Fernández A., Arroyo-López F. and Jiménez-Díaz R. (2015) Assessment of *in vitro* mixed-species biofilm formation between *Lactobacillus pentosus* and yeasts isolated from Spanish-style green table olive fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*.
27. Lynch A.S. and Robertson G.T. (2008) Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review of Medicine*, 59, 415-428.
28. Martinez LR. And Casadevall A. (2007) *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold and UV light. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4592-4601.
29. Monroe M.C., Morzunov S.P., Johnson A.M., Bowen M.D., Artsob H., Yates T., Peters C.J., Rollin P.E., Ksiazek T.G. and Nichol S.T. (2007) Genetic diversity and distribution of peromyscus-borne Hantaviruses in North America. *Emerging Infectious Diseases*, 5(1):75-86.

30. Njall C., Adiogo D., Bitu A., Ateba N., Sume G. and Kollo B. (2013) Ecologie bactérienne de l'infection nosocomiale au service de réanimation de l'hôpital Laquintinie de Douala, Cameroun. *Pan Afr Med J.* 14:140.
31. Oliveira D.C. and Tomasz A. and Delencastre H. (2013) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet Infect. Dis*; 3:180-189.
32. Organisation mondiale de la santé (2013). *The burden of health care-associated infection worldwide.*
33. Peters B.M. and Noverr M.C. (2013) *Candida albicans-Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infection and Immunity* 81:2178–89.
34. Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormeley F.L., Mowat E., Ramage G. and Lopez-Ribot J.L. (2008) A simple and reproducible 96-Well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*;3 (9) : 1494—1500.
35. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Sari-Belkharroubi L. and Anselme-Bertrand I. (2015) Evaluation of mixed biofilm formation between *Candida albicans* and a variety of bacterial species isolated from peripheral catheters at Tlemcen CHU. First study in Algeria, *Journal de Mycologie Médicale* (25, 123—129.
36. Suma C., Pemmaraju., Parul A. and Pruthi R. (2016) Modulation of *Candida albicans* biofilm by different carbon sources. *Mycopathologia* DOI 10.1007/s11046-016-9992-8.
37. Thein Z.M., Seneviratne C.J., Samaranayake Y.H. and Samaranayake L.P. (2009) Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses*, 52(6), 467-475.
38. Wargo M.J. and Hogan D.A. (2006) Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Current opinion in microbiology*, 9(4), 359-364.
39. Zhao X., Yeater K. M., Chandra J., Cheng G., Mukherjee P. Rodriguez-Zas, S.L., Kwast K.E., Ghannoum M.A. and Hoyer L. (2011) Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology* 153, 2373–2385.