



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

Détermination des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B seule et associée au voriconazole et à la caspofungine vis-à-vis de souches planctoniques et sessiles de *Candida glabrata* isolées de dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen

Présenté par :

Melle Benammar Meriem

Soutenu le 08 Juillet 2017

Devant le jury :

Pr. Boucherit Kebir	Centre Universitaire d'Ain Témouchent	Président
Dr. Sari Belkherroubi Lamia	Université de Tlemcen	Examinatrice
Dr. Kazi Tani Zahira Zakia	Université de Tlemcen	Examinatrice
Pr. Boucherit-Otmani Zahia	Université de Tlemcen	Promoteur

Année Universitaire : 2016-2017

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Ma très chère mère BAHIDJA, Fondatrice de mes jours, je ne saurai t'exprimer mon amour. Je te dois la vie, je te dois ce que je suis. A travers ces lignes je voudrai te rendre hommage. Toutes les phrases aussi éloquentes soit-elles ne sauraient t'exprimer mes témoignages. Tu représenteras toujours pour moi un chef d'œuvre de tendresse et de délicatesse.

A mon très cher père RAFIK, Quoique je dise quoique je fasse, je ne saurai te traduire les vagues de sentiments qui déferlent en moi. Tu représenteras toujours pour moi l'exemple vivant de persévérance, d'indulgence, de sagesse, d'honnêteté, et de douce fermeté. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté.

Que Dieu vous protèges et que ce travail soit la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour pour vous

Veuillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel.

Puisse DIEU le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour. Inchallah.

A mes deux frères YOUCEF et DJAMEL-EDDINE, que dieu vous garde et vous protège que vos chemins soient pleins de succès.

A toute ma famille, je cite particulièrement ma douce tante TSOURIA, ton cœur est un chef d'œuvre de tendresse. Puisse ce travail témoigner de ma profonde affection et de mon sincère estime Que Dieu vous garde et vous bénisse

A ma sœur de cœur, SAMIA, en souvenir de tous les gracieux moments que nous avons passé ensemble, Je te dédie ce travail, en témoignage de mon amour et de mon affection.

A mes chers collègues et amis (es) HIDAYA, IMANE, SAID, MOHAMED, DOUNIAZED, CHAHRAZED, FERIEL, RACHIDA, ISMAHANE, et à tous ceux qui sont restés à mes côtés et qui ont rendu l'ambiance fort-sympathique, pour les bons moments passés ensemble et pour leur amitié.

A tous les membres du Laboratoire Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique, pour leur soutien.

A tous les étudiants de la promotion 2015-2017 Biochimie appliquée

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme 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, pour avoir accepté la charge de m'encadrer. Votre gentillesse et votre compréhension m'ont profondément marquées, vos directives m'ont permis d'aller de l'avant dans la réalisation de ce travail. Vous vous y êtes impliquée par vos instructions, vos remarques, mais aussi par vos encouragements dans les moments clés de son élaboration. Je tiens à vous remercier aussi pour cette liberté que vous nous avez permise, votre manière de penser et de procéder et votre manière d'être. Vous êtes un exemple à suivre, plus qu'un professeur à mes yeux, je vous respecte énormément...

Je voudrais remercier particulièrement Mr Boucherit Kebir, Professeur et Directeur du Centre Universitaire de Ain Témouchent, je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de ce jury. Vos qualités scientifiques, pédagogiques humaines et professionnelles jointes à votre compétence seront pour moi un exemple à suivre dans l'exercice de ma profession. Veuillez croire à l'expression de ma grande admiration et mon profond respect.

Je voudrais remercier chaleureusement Mme 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 de faire partie de ce jury, jamais je n'oublierais le professionnalisme dont vous avez fait preuve lors des cours de signalisation et communication cellulaire. Veuillez accepter, Madame, l'assurance de mon estime et profond respect.

Ma profonde reconnaissance s'adresse également à Mme Kazi-Tani Zahira Zakia Maître de conférences classe B 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 de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Vos remarques pertinentes contribueront sans doute au perfectionnement du présent travail. Votre compétence, votre rigueur et vos qualités humaines et professionnelles ont suscité en moi une grande admiration et un profond respect.

Je remercie également Mme Lahfa-Hassaine Imane et Melle Touil Fatima Zohra Hidaya Doctorantes au laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique», faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la

Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apporté pour la réalisation de ce travail. Les nombreuses discussions que nous avons eues m'ont été très utiles.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous mes enseignants durant mon cursus universitaire, en particulier Mmes Benmansour M., Benyelles L., Benariba N., Dali M., Dennouni N., Lahfa F., Djaziri R., Drissi M., et Azzi R

ملخص

ركزت دراستنا على تحديد اقل التركيزات المثبطة (CMI) واقل التركيزات المثبطة في حالة بيوفلم (SCMI) الخاصة بلامفوتريسين B وحده، اوفي حالة معقد مع الكاسبوفونجين او الفوريكونازول ضد بعض سلالات *Candida glabrata* المعزولة سريريا و سلالة *Candida albicans* ATCC10231 مرجعية.

وقد أظهرت النتائج أن مزيج الامفوترسين B بالكاسبوفونجين يعطي تفاعل تآزر ضد الخلايا العوالم من *Candida glabrata* بين ما مزيج الامفوترسين B بلفوريكونازول يعطي تأثير لا مبالاة ضد نفس الاعوالم.

اما في حالة بيوفلم فان مزج الامفوترسين B بمضادات الفطريات الاخرى أسفر عن انخفاض التركيزات المثبطة و ادى الى تحسين علاج الالتهابات المرتبطة بالبيوفلم الفطري المشكل على الاجهزة الطبية

الكلمات المفتاحية: *Candida glabrata*، امفوترسين B، كاسبوفونجين، مزيج مضادات الفطريات، البيوفيلم

RESUME

Notre étude a porté sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales inhibitrices sessiles de l'amphotéricine B seule et associée à la caspofungine et au voriconazole vis-à-vis d'isolats cliniques de *Candida glabrata* et d'une souche de référence *Candida albicans* ATCC10231

Les résultats obtenus ont montré que l'amphotéricine B associée à la caspofungine induit une interaction synergique vis-à-vis des cellules planctoniques de *Candida glabrata*. Cependant, l'association de l'amphotéricine B au voriconazole entraîne un effet d'indifférence envers les mêmes isolats.

Par ailleurs, les combinaisons amphotéricine B/caspofungine et amphotéricine B/voriconazole induisent une réduction significative des CMI des cellules sessiles de *Candida glabrata* et permettent de lutter contre la formation des biofilms fongiques sur les dispositifs médicaux.

Mots clés: *Candida glabrata*, amphotéricine B, caspofungine, voriconazole, association d'antifongiques, biofilm

SUMMARY

Our study focused on the determination of minimum inhibitory concentrations and Sessiles Minimum Inhibitory Concentrations of amphotericin B alone and complexed with caspofungin or voriconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* and a reference strain of *Candida albicans* ATCC10231

The results showed that amphotericin B associated with caspofungin induced a synergic interaction against planctonic cells of *Candida glabrata*, however, the association of amphotericin B and voriconazole leads to an indifferent effect towards the same isolats.

Otherwise, the association of amphotericin B to both antifungals against *Candida glabrata* biofilms induced a significant reduction of SCMI₅₀ and contributes to the improvement of the infection treatment of biofilms formed on medical devices

Key words: *Candida glabrata*, amphotericin B, caspofungin, voriconazole, association of antifungals, biofilm

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes	6
1. Matériel.....	6
1.1 Levures.....	6
1.2 Antifongiques.....	6
2. Méthodes.....	
2.1 Préparation de la solution antifongique.....	6
2.2 Préparation du XTT et de la ménadione.....	6
2.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices	6
2.3.1 Préparation de l'inoculum.....	7
2.3.2 Technique de microdilution sur microplaque.....	7
2.4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles	7
2.4.1 Préparation de l'inoculum.....	8
2.4.2 Technique de microdilution sur microplaque.....	8
2.4.3 Test de réduction du tétrazolium.....	8
2.5 Activité <i>in vitro</i> des associations d'antifongiques vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles.....	9
Troisième partie : Résultats et discussion	11
1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, de la caspofungine et du voriconazole.....	11
1.1 Amphotéricine B.....	11
1.2 Caspofungine	13
1.3 Voriconazole	13
2. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B associée à la caspofungine et au voriconazole vis-à-vis des cellules planctoniques de <i>Candida glabrata</i> et <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	15
2.1 Amphotéricine B/caspofungine.....	15
2.2 Ampohotéricine B/voriconazole.....	17
3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices sessiles	18
4. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B associée à la caspofungine et au voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida glabrata</i> et <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	21

4.1 Amphotéricine B/capofungine.....	21
4.2 Amphotéricine B/voriconazole.....	22
Quatrième partie : Conclusion Générale.....	25
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	27

Liste des abréviations

AmB : amphotéricine B

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO: Diméthylsulfoxyde

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute

PBS: Phosphate buffered saline

FICI : Indices des Concentrations Inhibitrices Fractionnaires

SCMI : Concentration Minimale Inhibitrice des cellules Sessiles

XTT : (2,3 bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tétrazolium (-carboxanilide)

Liste des figures

- Figure N°1:** Microphotographie du biofilm de *Candida glabrata* développé sur la face interne d'un cathéter vasculaire périphérique (**Seddiki et coll., 2015**)
- Figure N°2:** Mécanisme d'action des antifongiques (**Maubon, 2014**)
- Figure N°3:** Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida glabrata*
- Figure N°4:** Concentrations minimales inhibitrices de la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida glabrata*
- Figure N°5:** Concentrations minimales inhibitrices du voriconazole vis-à-vis des souches de *Candida glabrata*
- Figure N°6:** Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata*

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Concentrations minimales inhibitrices et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires de l'association amphotéricine B/caspofungine vis-à-vis de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

Tableau N°2 : Concentrations minimales inhibitrices et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires de l'association amphotéricine B/voriconazole vis-à-vis de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

Tableau N°3 : Concentrations minimales inhibitrices et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires de l'association amphotéricine B/caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

Tableau N°4 : Concentrations minimales inhibitrices et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires de l'association amphotéricine B/voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

Première partie

Synthèse bibliographique

L'incidence des candidoses invasives a fortement augmenté au cours des dernières décennies. Elles sont classées au troisième rang des infections associées aux soins en milieu hospitalier avec un taux de mortalité d'environ 40% dans le monde **(Arendrup, 2010)**. Cet accroissement est lié essentiellement à l'utilisation accrue de nouvelles thérapies immunosuppressives, de radiothérapie, d'antibiothérapie à large spectre ainsi que des procédures invasives (cathéters vasculaires, matériels prothétiques...) **(Cleveland et coll., 2015)**.

Par ailleurs, l'épidémiologie des germes responsables de ces infections a fortement changé en milieu clinique. En effet, *Candida albicans* était autrefois l'espèce la plus rencontrée dans les isolats cliniques, alors qu'actuellement, avec l'émergence des espèces «non *albicans*» telles que, *Candida parapsilosis*, *Candida famata*, *Candida krusei*, sa fréquence n'est que de 50% **(Guinea et coll., 2014)**.

Parmi les espèces émergentes, *Candida glabrata* est impliquée, depuis le début des années quatre-vingt-dix, dans 15% des cas de candidoses systémiques. Elle est souvent responsable d'un allongement de la durée de séjour et d'une augmentation de la charge en soins **[(Pfaller et coll., 2001) ; (Wisplinghoff et coll., 2004)]**

Il s'agit d'une levure commensale du tractus gastro-intestinal et des muqueuses des mammifères, qui n'est pas retrouvée dans l'environnement **(Khatib et coll., 2001)]**.

Elle se présente sous forme de levure et de blastospores ovoïdes de 1 à 4µm et se multiplie par bourgeonnement. L'espèce *Candida glabrata* est caractérisée par l'absence de filaments mycéliens.

Sur milieu standard, elle forme des colonies lisses, brillantes et crémeuses de couleur blanchâtre, alors que sur milieu carencé en azote, elle produit des pseudohyphes qui envahissent la gélose **[(Lachke et coll., 2002) ; (Vandeputte et coll., 2008)]**.

Par opposition aux autres espèces du genre *Candida*, elle est incapable de produire des protéases **(Silva et coll., 2012)**, néanmoins, elle présente certains facteurs de virulence qui contribuent à l'infection tels que la sécrétion de phospholipases, de lipases, d'hémolysine, ainsi que la synthèse des adhésines **(Kaur et coll., 2007)**.

Comme la plupart des microorganismes, *Candida glabrata* est capable d'une vie en mode libre (planctonique) et fixée à une surface vivante ou inerte, il s'agit du mode biofilm **(Espinasse et coll., 2010)**.

Les biofilms de *Candida glabrata* sont formés de blastospores enveloppées dans une matrice extracellulaire composée de protéines et de glucides, parmi lesquels les β -1,3-glucanes [(Nett et coll., 2007) ; (Silva et coll., 2009)] (Figure N°1).

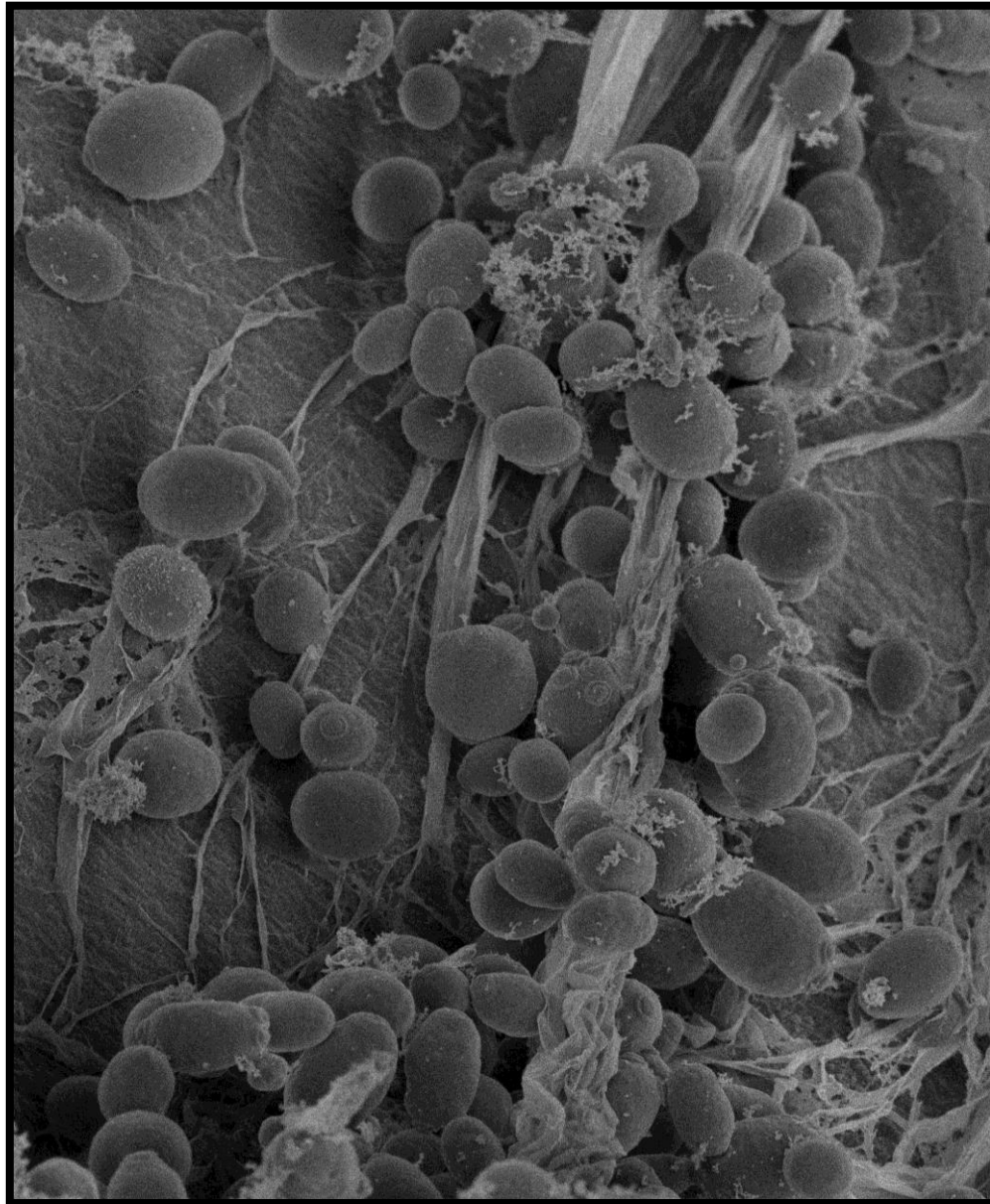


Figure N°1 : Microphotographie du biofilm de *Candida glabrata* développé sur la face interne d'un cathéter vasculaire périphérique (Seddiki et coll., 2015).

La formation de biofilms par *Candida glabrata* augmente de manière significative les niveaux de résistance aux différentes antifongiques systémiques [(Coogan et coll., 2006) ; (Hasan et coll., 2009)].

En effet, en 2004, **Kuhn et ses collaborateurs** ont montré que les cellules sessiles incluses dans un biofilm sont moins sensibles aux antifongiques que leurs homologues planctoniques. Aussi, **Seidler et coll., (2006)** ont mis en évidence la résistance des cellules sessiles de *Candida glabrata in vivo* sur un modèle animal au fluconazole et à l'amphotéricine B. Selon **Sanguinetti et ses collaborateurs (2005)**, la résistance au fluconazole des isolats cliniques de *Candida glabrata*, peut être associée à la surexpression des pompes à efflux.

Face à l'ampleur des candidoses systémiques associées à l'utilisation des dispositifs médicaux, l'arsenal thérapeutique est limité par la résistance accrue des levures aux antifongiques au sein d'un biofilm, pour cela plusieurs chercheurs se sont penchés sur la mise en œuvre de l'association de certains antifongiques *in vitro*.

Mais avant de passer en revue ces travaux, rappelons les mécanismes d'action des principaux antifongiques systémiques.

En milieu clinique, trois principales classes d'antifongiques sont utilisées, il s'agit des polyènes, des dérivés azolés et des échinocandines.

Les polyènes représentés principalement par l'amphotéricine B, sont des molécules organiques cycliques. Leur mode d'action est basé sur une interaction avec l'ergostérol membranaire, ce qui induit la formation de pores ou de canaux transmembranaires. Il en résulte une dépolarisation de la membrane avec une augmentation de la perméabilité cellulaire et perte du contenu cytoplasmique (**Neumann et coll., 2013**).

La deuxième classe est représentée par les dérivés azolés qui ont fait leur apparition sur le marché vers la fin des années quatre-vingt (**Maertens, 2004**). Leur action membranaire se fait par inhibition de la lanostérol 14 α déméthylase, enzyme clé de la synthèse de l'ergostérol. Il s'ensuit des changements de perméabilité, une inhibition de la croissance cellulaire et la mort de la cellule (**Carillo-Munoz et coll., 2006**).

Enfin les échinocandines représentées essentiellement par la caspofungine, sont des antifongiques semi-synthétiques qui agissent par inhibition non compétitive de la (1,3)- β -D-glucane synthétase, un complexe enzymatique nécessaire à la formation des polymères de glucane de la paroi fongique (**Walsh et coll., 2000**) (**Figure N°2**).

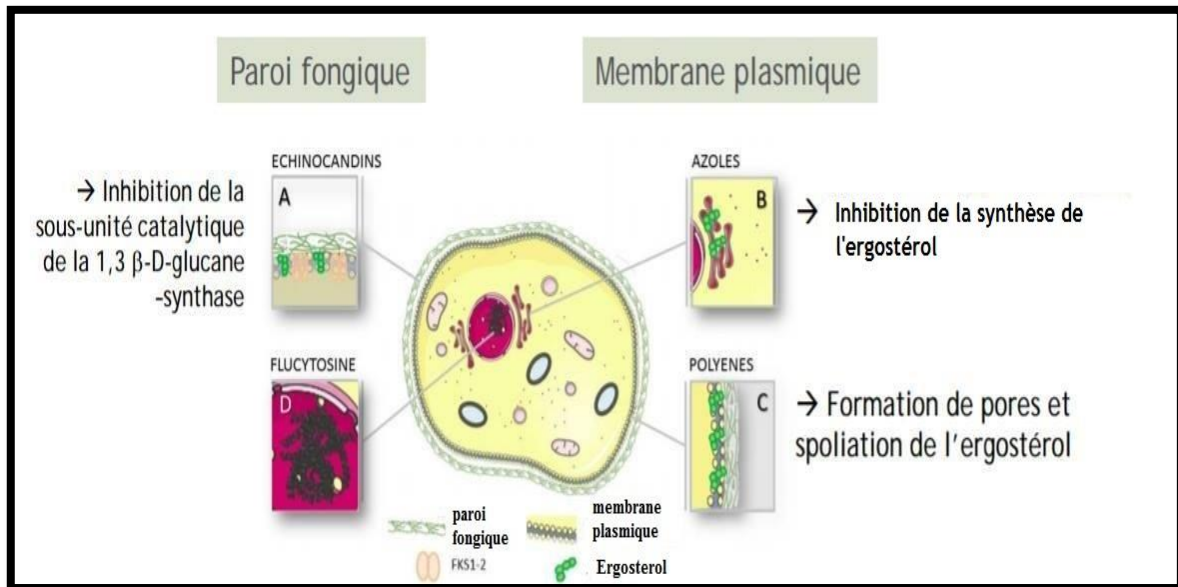


Figure N°2 : Mécanisme d'action des antifongiques (Maubon, 2014)

La plupart des études ont mis l'accent sur l'association de l'amphotéricine B au clotrimazole, au miconazole, ou à l'ecanazole et l'antagonisme a été l'effet le plus observé sur les espèces de *Candida* (Siau et coll., 1998).

De plus, selon Lortholary et ses collaborateurs (2004), l'association de l'amphotéricine B au fluconazole est soit bénéfique, soit délétère selon les sites infectieux, alors que la même année, les travaux menés par l'équipe de Johnson *in vivo* chez des souris ont montré que l'association simultanée ou séquentielle de l'amphotéricine B à l'itraconazole est délétère (Johnson et coll., 2004).

Par ailleurs, Hossain et ses collaborateurs (2003) ont mis en évidence l'efficacité de l'association amphotéricine B/Caspofungine vis-à-vis de souris infectées par *Candida albicans* comparée à la formulation conventionnelle.

Par contre, l'association de la caspofungine au fluconazole ne présente aucune différence par rapport aux deux antifongiques utilisés séparément *in vitro* (lortholary et coll., 2004).

Partant de ces données, nous avons entrepris cette étude qui porte sur la détermination du profil de résistance des souches de *Candida glabrata* planctoniques et sessiles obtenues à partir de prélèvements cliniques à l'amphotéricine B seule et combinée au voriconazole et à la caspofungine, dans le but d'optimiser l'effet thérapeutique de ces antifongiques.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

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

1. Matériel

1.1 Levures

Nous avons utilisé une collection de douze (12) souches de *Candida glabrata* isolées d'endoscopes du service de gastro-entérologie du CHU de Tlemcen, et une souche de référence, *Candida albicans* ATCC10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD., USA.)

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

1.2 Antifongiques

Nous avons utilisés trois antifongiques systémiques l'amphotéricine B, le voriconazole purs provenant des laboratoires SIGMA et la forme commercialisée de caspofungine (Cancidas®) des laboratoires MSD.

2. Méthodes

2.1 Préparation de la solution antifongique

Les solutions mères d'antifongiques sont préparées en extemporané en solubilisant l'amphotéricine B et le voriconazole dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), alors que la caspofungine est dissoute dans l'eau distillée stérile.

Nous avons testé l'efficacité des trois (03) antifongiques seuls ainsi que celle des combinaisons amphotéricine B/voriconazole et amphotéricine B/caspofungine.

Les antifongiques sont additionnés au milieu réactionnel au temps zéro pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et après 48h d'incubation à 37°C pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI).

2.2 Préparation du XTT et de la ménadione

La solution mère de XTT (2,3 bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tétrazolium (-carboxanilide), utilisée pour la numération des cellules vivantes, est préparée en extemporané à l'abri de la lumière dans le tampon phosphate salé (PBS) 10mM, pH 7,4 à une concentration de 5mg/mL.

La ménadione (2-méthyl-1,4-naphtoquinone) ou vitamine K₃ est dissoute dans l'acétone à une concentration mère de 0,17mg/mL.

1µL de la solution de ménadione est mélangée avec 10mL de la solution XTT puis filtrée à travers un filtre millipore de porosité 0,22µm.

2.3 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) (CLSI M27 A3, 2008)

2.3.1 Préparation de l'inoculum

Une colonie d'une culture de 24 heures sur gélose Sabouraud est ressuspendue dans 1mL d'eau physiologique stérile (8,5‰). La concentration cellulaire est ajustée à $3 \cdot 10^6$ cellules/mL par un dénombrement cellulaire sur cellule de Thoma. Cet inoculum est ensuite dilué au 1/100 puis au 1/20 dans le RPMI pour avoir une concentration finale égale à $1,5 \cdot 10^3$ cellules/mL.

2.3.2 Technique de microdilution sur microplaque

Dans les puits d'une microplaque contenant 100µL des solutions antifongiques à des concentrations finales allant de 0,03 à 16µg/mL pour l'amphotéricine B et le voriconazole, et de 0,015 à 8µg/mL pour la caspofungine, nous avons ajouté 100µL de l'inoculum.

Les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 à 48 heures.

Les CMI sont déterminées à l'œil nu pour l'amphotéricine B et par dénombrement des cellules viables sur cellule de Thoma pour le voriconazole et la caspofungine.

2.4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles (SCMI) (Pierce et coll., 2008)

Le principe de cette technique est basé sur la réduction du XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-caboxanilide) en formazan par les cellules sessiles.

2.4.1 Préparation de l'inoculum

Une préculture de 24h sur milieu Sabouraud est centrifugée à 3000g pendant 5 min à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est lavé deux fois avec du tampon PBS (10mM pH 7) puis ressuspendu dans 20mL de milieu RPMI-1640. La concentration cellulaire est ajustée à 10^6 cellules/mL.

2.4.2 Technique de microdilution sur microplaque

Dans les puits d'une microplaque à fond rond contenant des biofilms matures de 48h, nous avons introduit 100µL du milieu RPMI 1640. Ensuite 100µL des solutions antifongiques à des concentrations de 64µg/mL pour l'amphotéricine B et la caspofungine et de 256µg/mL pour le voriconazole sont ajoutées au premier puits. Après homogénéisation, une série de dilutions au ½ de puits en puits est effectuée jusqu'au dernier puits.

Nous avons préparé un témoin négatif et un témoin positif dans les mêmes conditions expérimentales. Le premier contient le milieu de culture seul et le deuxième renferme les levures sans antifongiques.

Les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

2.4.3 Test de réduction du tétrazolium

Après un lavage de la microplaque par du PBS stérile, 100µL du mélange XTT/ménadione sont ajoutés dans chaque puits. Les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 2 à 3 heures.

75µL du contenu de chaque puits sont transférés dans une nouvelle microplaque stérile et les densités optiques sont lues à une longueur d'onde de 490nm dans un lecteur de microplaque (Biotek, ELx800).

Selon **Dalleau et coll., (2008)**, les SCMI correspondant à 50% d'inhibition sont calculées selon la formule suivante :

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

A_{490} : Densité optique à 490nm.

2.5 Activité *in vitro* des associations d'antifongiques vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles (Tobudic et coll., 2009)

La technique de **Tobudic et coll., (2009)** ou carré-échiquier-damier permet de tester les activités de plusieurs médicaments en combinaison vis-à-vis de nombreuses souches en déterminant les indices de concentrations inhibitrices fractionnaires (FICI) des associations testées.

Cette technique consiste à déposer dans les puits d'une microplaque 50µL d'amphotéricine B le long de l'axe des ordonnées et 50µL du deuxième antifongique (voriconazole ou caspofungine) le long de l'axe des abscisses. 100µL de l'inoculum sont ensuite ajoutés dans tous les puits de la microplaque.

Les CMI et les SCMI sont déterminées selon le protocole de **CLSI 2008** et de **Pierce et coll., (2008)** respectivement.

L'interaction de la combinaison des antifongiques est classée en fonction de l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FICI) qui est calculé selon la formule suivante :

$$FICI = \frac{Ac}{Aa} + \frac{Bc}{Ba}$$

Ac et Bc : CMI des antifongiques A et B en association

Aa et Ba : CMI des antifongiques A et B seuls.

Les interactions sont regroupées en 3 types en fonction de FICI :

- La synergie si le $FICI \leq 0,5$,
- L'indifférence si le $0,5 > FICI \leq 4$
- L'antagonisme si le $FICI > 4$.

		Voriconazole ou Caspofungine			
		1/4CMI	1/2CMI	1CMI	2CMI
Amphotéricine B	1/4CMI				
	1/2CMI				
	1CMI				
	2CMI				

Troisième partie

Résultats et discussion

Notre travail a porté sur l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B seule et associée à la caspofungine et au voriconazole vis-à-vis de cellules planctoniques et sessiles de *Candida glabrata*.

1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, de la caspofungine et du voriconazole

1.1 Amphotéricine B

La figure N°3 regroupe les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B obtenues après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C vis-à-vis des souches testées.

De 24 à 48h d'incubation à 37°C, les CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches testées passent de 0,125 à 0,5µg/mL pour quatre souches (I30, I81, I82 et F88) de 0,25 à 0,5µg/mL pour cinq souches (P10, P22, P83, I74 et F21), de 0,5 à 1µg/mL pour une seule souche (P24), alors qu'elle reste inchangée (0,5µg/mL) pour deux souches de *Candida glabrata* (P3 et P91).

Tous les isolats cliniques de *Candida glabrata* testés présentent des CMI inférieures à 2µg/mL après 48h d'incubation. Elles sont par conséquent sensibles à l'amphotéricine B (**Negri et coll., 2009**).

Ce résultat est en accord avec celui de **Seddiki et coll., 2015** ainsi que celui de **Seghir et coll., 2014** qui ont mis en évidence la sensibilité à l'amphotéricine B, des souches de *Candida glabrata* isolées de dispositifs médicaux des CHU de Sidi Bel Abbès et de Tlemcen respectivement.

Selon les travaux de **Pfaller et coll., (2004)**, le taux d'isolats de *Candida glabrata* résistant à l'amphotéricine B est très faible. Il est inférieur à 1% aux Etats Unis et atteint environ 4,4% en Europe.

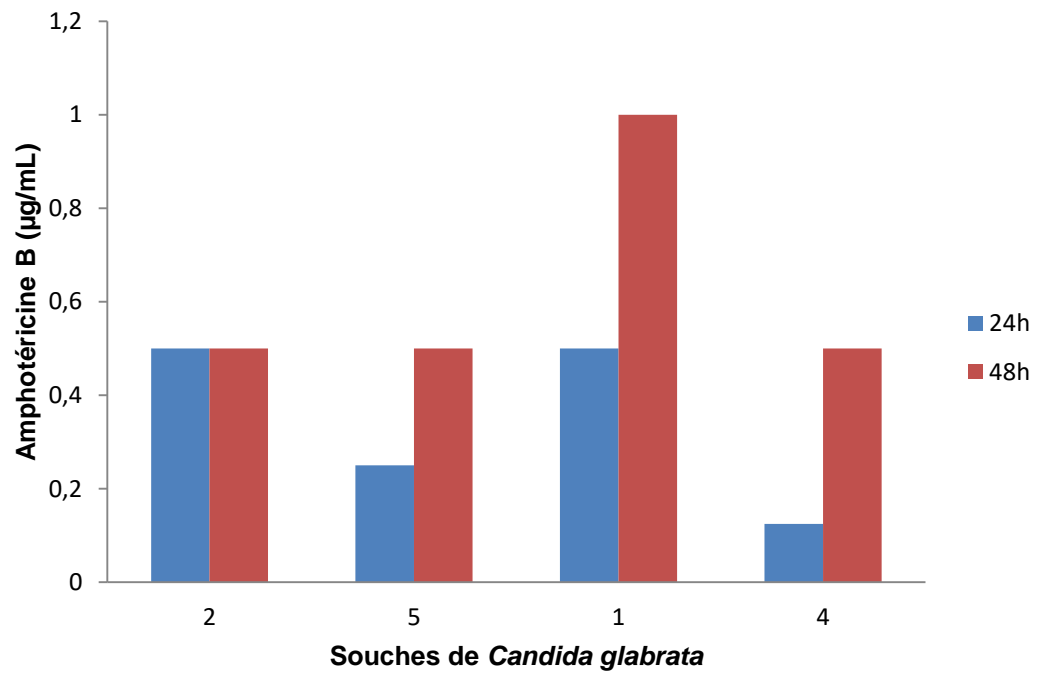


Figure N°3: Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida glabrata*

1.2 Caspofungine

Les concentrations minimales inhibitrices de la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida glabrata* sont comprises entre 0,06 et 0,25µg/mL (Figure N°4).

Elles sont égales à 0,06µg/mL pour deux souches (P3 et I30), 0,125µg/mL pour huit souches (P10, P83, P91, I81, I74, I82, F21 et F88) et 0,25µg/mL pour deux souches (P22 et P24)

Les souches de *Candida glabrata* testées présentent des CMI inférieures à 2µg/mL, elles sont toutes sensibles à la caspofungine (**CLSI, 2008**).

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Seghir et coll., (2014)** et de **Bendjelloul et coll., (2016)** qui ont montré que toutes les souches de levures isolées des CHU de Tlemcen et d'Oran sont sensibles à la caspofungine.

Selon **Razzaghi-Abyanneh et coll., (2014)**, la résistance acquise à la caspofungine reste inhabituelle et n'a été rencontrée que chez quelques espèces rares de *Candida*. De plus, la caspofungine présente moins d'effets indésirables que l'amphotéricine B, elle peut, par conséquent être recommandée dans la prise en charge des infections fongiques invasives en milieu hospitalier (**Constantin et coll., 2008**).

1.3 Voriconazole

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices du voriconazole vis-à-vis des souches de *Candida glabrata* testées après 48 heures d'incubation à 35°C sont regroupés sur la figure N°5.

Les CMI du voriconazole vis-à-vis des souches de *Candida glabrata* varient de 0,0625 à 0,5µg/mL. Elles sont de 0,0625µg/mL pour trois souches (P3, I74 et I82) de 0,125µg/mL pour quatre souches (P10, P22, P24 et P83) et de 0,25µg/mL pour quatre autres souches (P91, I81, F21 et F88). Une seule souche (I30) présente une CMI de 0,5µg/mL. Selon les recommandations du **CLSI, 2008**, toutes les souches sont sensibles au voriconazole avec des CMI qui ne dépassent pas 4µg/mL.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Groll et coll., (2001)** ainsi que ceux de **Pfaller et Diekema, (2011)** qui ont mis en évidence la sensibilité de *Candida glabrata* au voriconazole, alors qu'elles sont résistantes à un autre dérivé azolé, le fluconazole.

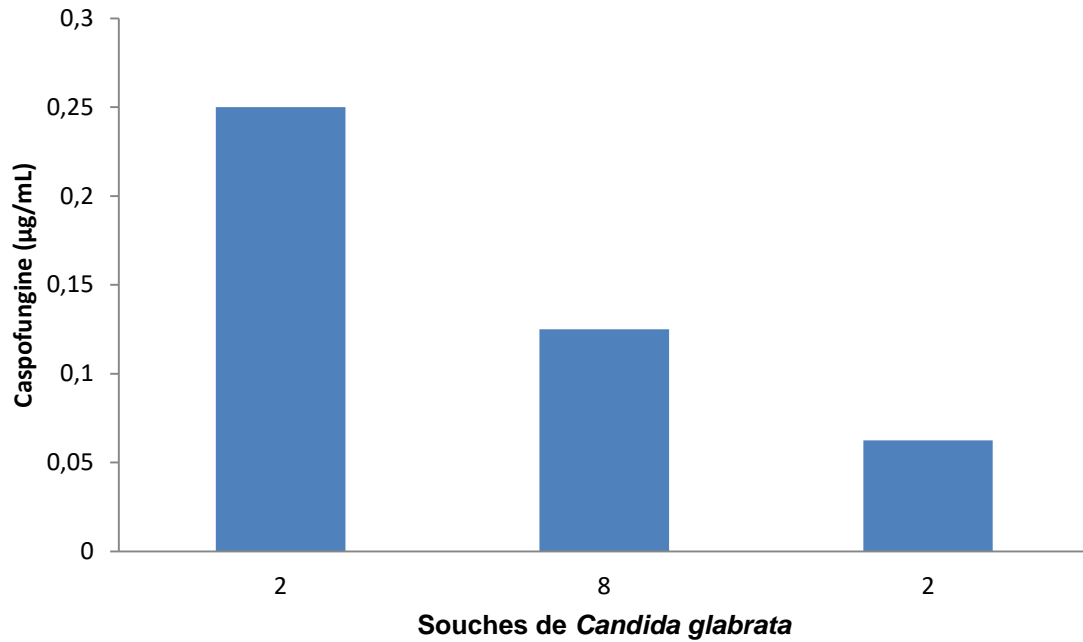


Figure N°4 : Concentrations minimales inhibitrices de la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida glabrata*

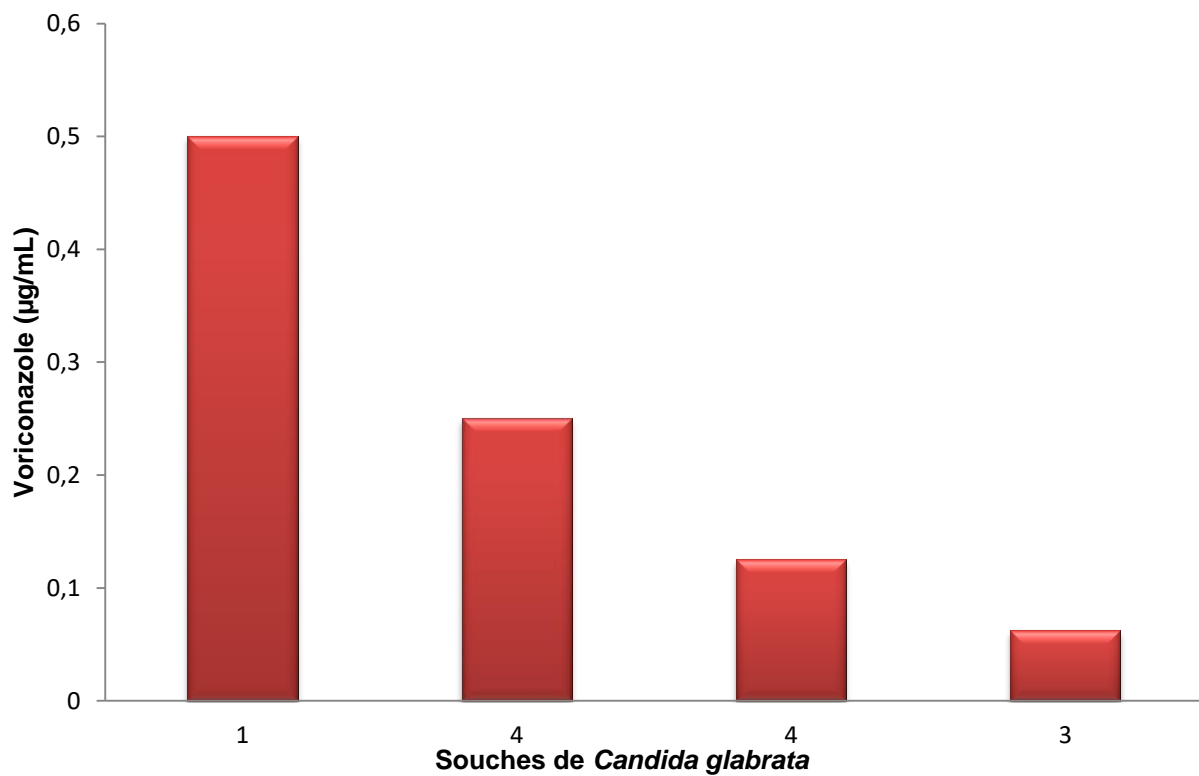


Figure N°5 : Concentrations minimales inhibitrices du voriconazole vis-à-vis des souches de *Candida glabrata*

2. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B associée à la caspofungine et au voriconazole vis-à-vis des cellules planctoniques de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

2.1 Amphotéricine B/caspofungine

Les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B seule et associée à la caspofungine après 24 heures d'incubation à 35°C vis-à-vis des isolats cliniques de *Candida glabrata* et de la souche de référence *Candida albicans* ATCC10231 ainsi que les indices des concentrations inhibitrices fractionnaires, sont regroupés dans le tableau N°1.

Les CMI de l'amphotéricine B associée à la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231 sont comprises entre 0,06 et 0,125µg/mL.

La combinaison de l'amphotéricine B à la caspofungine induit une diminution des CMI d'un facteur de 4 pour six souches (P3, P10, P22, P83, P91 et *Candida albicans* ATCC10231) et de 8 pour les sept autres souches (P24, I30, I74, I81, I82, F21 et F88).

Pour toutes les souches étudiées, les indices des concentrations inhibitrices fractionnaires sont inférieurs à 0,5, il s'agit d'une action synergique entre l'amphotéricine B et la caspofungine.

Le phénomène de synergie observé pour l'amphotéricine B associée à la caspofungine peut être expliqué par le mécanisme d'action des deux antifongiques. En effet, l'amphotéricine B agit sur les stérols membranaires, alors que la caspofungine inhibe la synthèse du β 1-3 glucane synthase, le constituant majeur de la paroi des levures.

Ce résultat va dans le même sens que celui de **Kiraz et ses collaborateurs (2009)** qui ont mis en évidence une action synergique entre l'amphotéricine B et la caspofungine dans 46% d'isolats cliniques de *Candida glabrata*. En revanche, aucun antagonisme n'a été observé.

Tableau N°1: Concentrations minimales inhibitrices et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires de l'association amphotéricine B/caspofungine vis-à-vis de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

ATF Souches	CMI (µg/mL)		FICI
	Amphotéricine B	AmphotéricineB/caspofungine	
P3	0,5	0,125/0,03	0,5
P10	0,5	0,125/0,06	0,31
P22	0,5	0,125/0,125	0,275
P24	1	0,125/0,125	0,25
P83	0,5	0,125/0,25	0,5
P91	0,5	0,125/0,03	0,28
I30	0,5	0,06/0,015	0,15
I74	0,5	0,06/0,03	0,15
I81	0,5	0,06/0,25	0,37
I82	0,5	0,06/0,25	0,37
F21	0,5	0,06/0,06	0,18
F88	0,5	0,06/0,06	0,18
<i>C. albicans</i> ATCC10231	0,5	0,125/0,03	0,28

2.2 Amphotéricine B/voriconazole

Les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B seule et associée au voriconazole après 24 heures d'incubation à 35°C vis-à-vis des isolats cliniques de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231 ainsi que et les indices des concentrations inhibitrices fractionnaires, sont regroupés dans le tableau N°2.

Les CMI de l'amphotéricine B associée au voriconazole vis-à-vis des souches de *Candida glabrata* et de la souche de référence *Candida albicans* ATCC10231 sont comprises entre 0,25 et 1µg/mL.

Nous remarquons que les CMI de l'amphotéricine B associée au voriconazole restent inchangées pour sept souches (P22, P83, P91, I30, I74, I81et I82) et ont diminué d'un facteur de 2 pour trois souches (P24, F21 et F88). Par contre, pour trois autres souches (P3, P10 et *Candida albicans* ATCC10231), les CMI ont doublé.

Pour toutes les souches étudiées, les indices des concentrations inhibitrices fractionnaires sont supérieurs à 0,5, il s'agit d'une action indifférente entre l'amphotéricine B et le voriconazole.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Barchiesi et ses collaborateurs (2004)** qui ont montré que l'interaction de l'amphotéricine B au voriconazole est indifférente vis-à-vis de vingt souches de *Candida glabrata* malgré une diminution significative des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B (de 1,5 à 0,39µg/mL).

Selon l'étude de **Ghannoum et coll., (2002)**, cette indifférence peut être expliquée par le mécanisme d'action membranaire commun aux deux antifongiques. En effet, l'exposition des espèces *Candida* à l'amphotéricine B en premier lieu conduit à la formation de pores qui facilitent un meilleur accès du voriconazole à l'espace intracellulaire, inhibant ainsi la 14- α -démethylase responsable de la transformation du lanostérol en ergostérol, ce qui entraîne une efficacité accrue de l'association des deux médicaments.

Tableau N°2: Concentrations minimales inhibitrices et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires de l'association amphotéricine B /voriconazole vis-à-vis de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

ATF Souches	CMI (µg/mL)		FICI
	Amphotéricine B	Amphotéricine B/voriconazole	
P3	0,5	1/0,125	4
P10	0,5	1/0,015	2,12
P22	0,5	0,5/0,125	2
P24	1	0,5/0,25	2,5
P83	0,5	0,5/0,03	1,25
P91	0,5	1/0,03	2,12
I30	0,5	0,5/0,03	1,06
I74	0,5	0,5/0,03	1,48
I81	0,5	0,5/0,03	1,12
I82	0,5	0,5/0,03	1,48
F21	0,5	0,25/0,25	1,5
F88	0,5	0,25/1	1,5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	0,5/0,03	1,48

3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices sessiles

Les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata* sont représentées sur la figure N°6.

Les SCMI₅₀ varient de 2 à 32µg/mL, de 2 à 128µg/mL et de 0,25µg/mL à 64µg/mL pour l'amphotéricine B, le voriconazole et la caspofungine respectivement.

D'une manière générale, les concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles ont fortement augmenté par rapport à celles de leurs homologues planctoniques. En effet, les SCMI de l'amphotéricine B sont 64 fois supérieures aux CMI pour les souches P3 et P91 alors que celles du voriconazole et de la

capofungine sont environ 500 fois supérieures aux CMI pour les souches P91 et P24 respectivement.

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

Toutes les souches de *Candida glabrata* étudiées sont résistantes aux trois antifongiques.

Ce résultat est en accord avec ceux de **Ferreira et coll., (2013)** qui ont observé que 100% des isolats cliniques de *Candida sp.* avaient le potentiel de former des biofilms.

De plus, **D'Enfert (2006)** a montré qu'en mode biofilm, les levures de *Candida sp.* sont plus résistantes aux différents antifongiques utilisés en milieu hospitalier. Cette résistance peut être expliquée soit par une diminution de la pénétration des antifongiques à travers la matrice extracellulaire du biofilm (**Samaranayake et coll., 2005**), soit par une modification du métabolisme microbien (**Kumamoto, 2002**) ou de l'expression des gènes de résistance (**Douglas, 2003**).

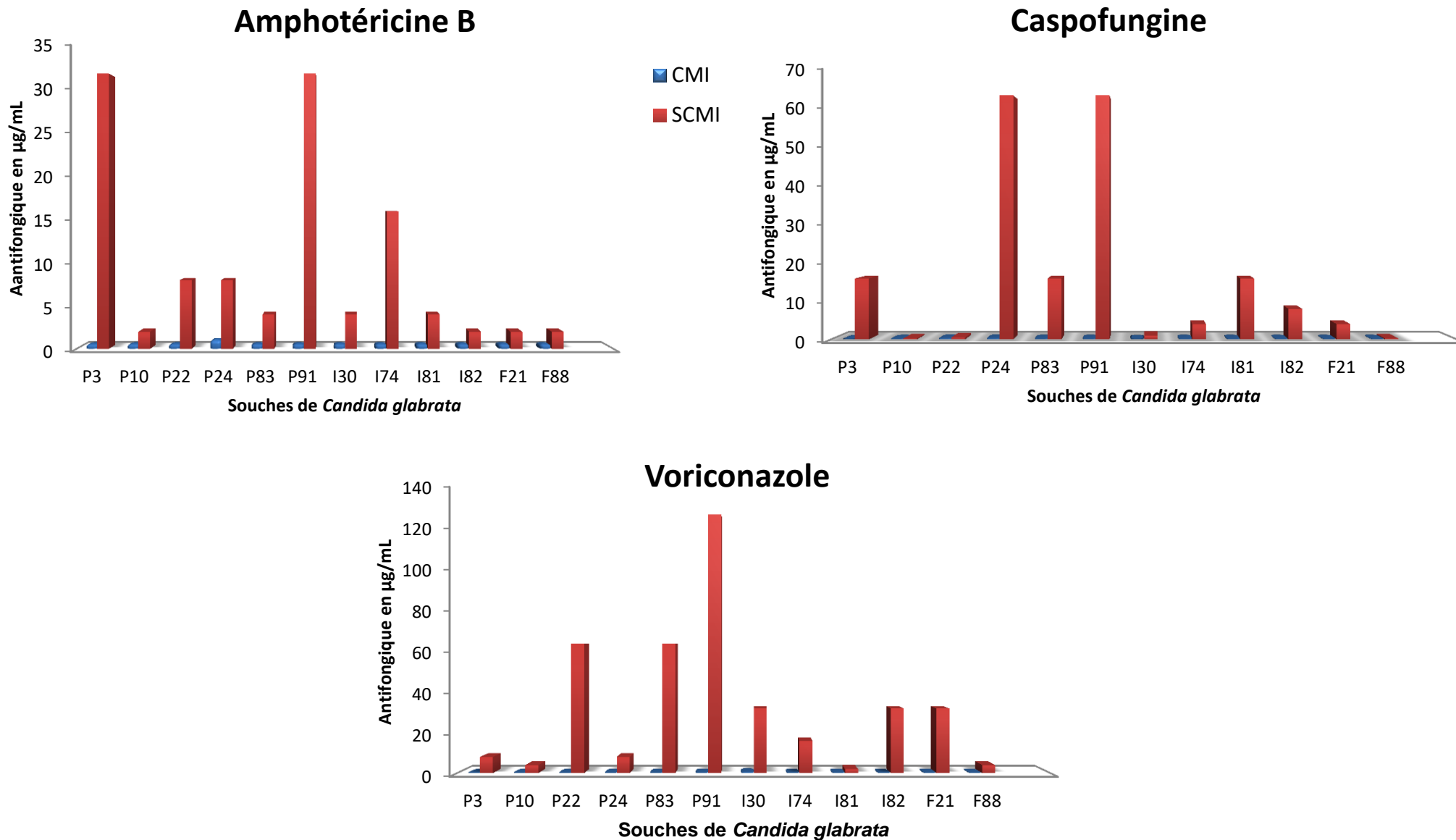


Figure N°6: Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata*

4. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B associée à la caspofungine et au voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

4.1 Amphotéricine B/caspofungine

Les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B seule et associée à la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231 ainsi que les indices des concentrations inhibitrices fractionnaires, sont regroupés dans le tableau N°3

L'utilisation de l'amphotéricine B associée à la caspofungine induit une nette réduction de ses SCMI₅₀ vis-à-vis des levures étudiées pouvant atteindre un facteur de 8 pour les souches P24 et I 74

Le calcul des FICI de l'association amphotéricine B/caspofungine a donné des valeurs inférieures à 0,5 pour les souches P3, P24, P83, I74, F21 et *Candida albicans* ATCC10231, l'interaction est de type synergique. En revanche, pour les souches P91, I30, I81, I82, et F88, les FICI sont supérieurs à 0,5, il s'agit d'une indifférence.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Tobudic et coll., (2009)** qui ont montré que l'utilisation de combinaisons antifongiques améliore le traitement des infections associées aux biofilms de *Candida* et limite l'émergence de la résistance.

Tableau N°3 : Concentrations minimales inhibitrices et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires de l'association amphotéricine B/caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

ATF Souches	SCMI (µg/mL)		FICI	Interaction
	Amphotéricine B	Amphotéricine B/caspofungine		
P3	32	8/4	0,5	Synergie
P24	8	1/16	0,325	Synergie
P83	4	1/4	0,5	Synergie
P91	32	16/8	0,625	Indifférence
I30	4	1/0,5	0,625	Indifférence
I74	16	2/1	0,325	Synergie
I81	4	1/8	0,625	Indifférence
I82	2	0,25/1	0,25	Synergie
F21	2	0,25/1	0,375	Synergie
F88	2	1/0,03	0,625	Indifférence
<i>C. albicans</i> ATCC10231	4	0,5/4	0,325	Synergie

4.2 Amphotéricine B/voriconazole

Les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B seule et associée à la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231 ainsi que les indices des concentrations inhibitrices fractionnaires, sont regroupés dans le tableau N°4

L'utilisation de l'amphotéricine B associée au voriconazole induit une nette réduction de ses SCMI₅₀ vis-à-vis des levures étudiées pouvant atteindre un facteur de 8 pour les souches P24 et I74

Le calcul des FICI de l'association amphotéricine B/voriconazole a donné des valeurs inférieures à 0,5 pour les souches P83, P91, I82, F21 et *Candida albicans* ATCC10231, l'interaction est de type synergique. En revanche, pour les souches

P3, P24, I74, I30, I81 et F88, les FICI sont supérieurs à 0,5, il s'agit d'une indifférence.

Des travaux antérieurs ont montré que la synergie vis-à-vis des biofilms de *Candida sp* est obtenue en raison de la réduction de la résistance au posaconazole exprimée par une diminution significative de la SCMI de ce dernier lorsqu'il est utilisé en association avec l'amphotéricine B (Tobudic et coll., 2009).

De même que le posaconazole, le voriconazole possède une structure hydrophobe unique alors que les biofilms sont composés d'une matrice hydrophile, de cellules et d'hyphes. De ce fait, sa combinaison à l'amphotéricine B pourrait engendrer un changement de structure affectant la matrice et les cellules fongiques au sein du biofilm (Tobudic et coll., 2009).

Tableau N°4 : Concentrations minimales inhibitrices et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires de l'association amphotéricine B/voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata* et *Candida albicans* ATCC10231

ATF Souches	SCMI (µg/mL)		FICI	Interaction
	Amphotéricine B	Amphotéricine B/voriconazole		
P3	32	8/4	0,75	Indifférence
P24	8	1/4	0,625	Indifférence
P83	4	1/8	0,375	Synergie
P91	32	8/16	0,375	Synergie
I30	4	2/16	1	Indifférence
I74	16	2/8	0,625	indifférence
I81	4	1/1	0,625	Indifférence
I82	2	0,25/8	0,325	Synergie
F21	2	0,25/8	0,375	Synergie
F88	2	1/1	0,625	Indifférence
<i>C. albicans</i> ATCC10231	4	1/2	0,5	Synergie

Quatrième partie

Conclusion Générale

L'étude que nous avons réalisée a porté sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales inhibitrices sessiles de l'amphotéricine B seule et associée à la caspofungine et au voriconazole vis-à-vis d'une collection de souches de *Candida glabrata*.

Il ressort de ce travail que:

- La totalité des souches étudiées de *Candida glabrata* sont sensibles à l'amphotéricine B, à la caspofungine et au voriconazole, leurs CMI correspondent aux seuils de sensibilité établis par le **CLSI (2008)**
- L'association de l'amphotéricine B à la caspofungine a donné une synergie vis-à-vis des cellules planctoniques de *Candida glabrata* avec une diminution des CMI de l'amphotéricine B. Il s'agit d'une voie très prometteuse pour le traitement des mycoses systémiques.
- Par contre, l'association de l'amphotéricine B au voriconazole a révélé des FICI inférieurs à 0,5, les isolats cliniques de *Candida glabrata* sont donc indifférents à cette combinaison
- Les Concentrations minimales inhibitrices sessiles de l'amphotéricine B seule ou combinée à la caspofungine et au voriconazole vis-à-vis des souches testées sont supérieures aux CMI. Par conséquent, toutes les souches étudiées possèdent le potentiel de former des biofilms.
- L'association de l'amphotéricine B à la caspofungine et au voriconazole peut améliorer son efficacité vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida glabrata*

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Tester l'association de l'amphotéricine B à la caspofungine et au voriconazole sur d'autres souches de *Candida sp*
- Déterminer les CMI et les SCMI de l'association de la caspofungine au voriconazole
- Appliquer les associations d'antifongiques en milieu clinique (*In vivo*)
- Identifier les gènes qui codent pour la résistance des cellules sessiles

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. Arendrup MC (2010) Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*; 16: 445-52.
2. Barchiesi, F., E. Spreghini, M. Maracci, A. W. Fothergill, I. Baldassarri, M. G. Rinaldi, and G. Scalise. (2004). *In vitro* activities of voriconazole in combination with three other antifungal agents against *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3317–3322.
3. Bendjelloul M., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. (2016). Study of strains of *Candida sp.* Isolated from catheters in UHC of Oran (Algeria): Identification and antifungal susceptibility. *Journal de Mycologie Médicale*. "in press"
4. Carrillo-Munoz AJ (2006) Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*; 19(2), 130-139.
5. Cleveland A.A., Harrison L.H., Farley M.M. (2015) Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas results from population-based surveillance. *PLoS One*; 10 (3), e0120452.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3rd ed. Document M27-A3. Wayne, PA: CLSI; USA
7. Constantin J.M., Roszyk L., Guerin R., Bannier F., Charlie C et Bazin J.E. (2008) Tolérance de la caspofungine chez les patients de réanimation : étude prospective. In *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* (Vol. 27, No. 10 pp. 819-824.
8. Coogan M.M., Fidel P. L., Komesu M.C., Maeda N. and Samaranayake L.P (2006) (B1). *Candida* and mycotic infections. *Adv Dent Res*; 19: 130-138.
9. Dalleau S., Cateau E., Berges T., Berjeaud J-M., Imbert C (2008) *In vitro* activity of terpens against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 31 ; (6), 572–576
10. Douglas L. J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*; 11(1), 30-36.
11. D'Enfert C (2006) Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets* 7(4):465-70
12. Espinasse F., Pageb B., Cottard-Boullea B (2010) Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Rev Fr Lab*; 426: 51—63.

13. Ferreira, F. A., Souza, R. R., de Sousa Moraes, B., de Amorim Ferreira, A. M., Ame´rico, M. A., Fracalanza, S. E., Dos Santos Silva Couceiro, J. N. and Sa´Figueiredo, A. M. (2013). Impact of agr dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) variant of the lineage ST1- SCCmecIV. *BMC Microbiol* 13, 93.
14. Ghannoum M.A., Hossain M. A., Reyes G H., Long L.A., and Mukherjee P. K. (2002). Efficacy of caspofungin combined with amphotericin B against azole-resistant *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother* ; 51:1427–1429
15. Guinea, J. (2014) Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect* 20,(Suppl 6), 5–10.
16. Groll, A. H., and T. J. Walsh. (2002). Antifungal chemotherapy: advances and perspectives. *Swiss Med. Wkly.* 132:303–311
17. Hasan F., Xess I., Wang X., Jain N., Feries B.C. (2009). Biofilm formation in clinical *Candida* isolates in association with virulence. *Microbes and Infection*; 11: 753-761.
18. Hossain M.A., Reyes G.H., Long L.A., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A (2003) Efficacy of caspofungin combined with amphotericin B against azole-resistant *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*, 51: 1427-9.
19. Johnson M.D., MacDougall C., Ostrosky-Zeichner L., Perfect J.R., Rex J.H (2004) Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 693–715.
20. Kaur R.B and Cormack B. P (2007) "A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(18), 7628-33.
21. Khatib R., Riederer K. M., Ramanathan J and Baran Jr. (2001). "Faecal fungal flora in healthy volunteers and inpatients." *Mycoses*; 44(5), 151-6.
22. Kiraz N., Dag I., Yamac M., Kiremitci A., Kasifog˘lu N., and Akgun Y. (2009). Antifungal activity of caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*: comparison of disk diffusion, E-test, and Time-Kill methods. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* ;(53) 788–790
23. Kuhn D.M and Ghannoum M. A (2004) *Candida* biofilms: Antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr Opin investigating drugs*; 5: 186-197.

24. Kumamoto C.A. (2002) *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 608 - 611
25. Lachke S. A., Joly S., Daniels K and Soll D.R (2002) "Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*." *Microbiology*; 148(Pt 9), 2661-74.
26. Lortholary O (2004) Associations d'antifongiques. Conférence de consensus commune SFAR, SPILF, SRLF. *Ann Fr Anesth Reanim*: 60–70
27. Maertens J.A (2004) History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 10; (Suppl 1):1–10.
28. Maubon D., Garnaud C., Calandra T., Sanglard D., Cornet M (2014) Resistance of *Candida sp.* to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive care med*.
29. Nett J., Lincoln L., Marchillo K., Massey R., Holoyda K., Hoff B., VanHandel M. and Andes D (2007) Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 510–520.
30. Negri M., Henriques M., Svidzinski T., Rodrigues C., and Oliveira R (2009) Correlation between E-tests, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* species from infection and colonization. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 23 : 324–330
31. Neumann A., Baginski M and Czub J (2013) 'the effects of sterols on amphotericin B self-aggregation in a lipid bilayer as revealed by free energy simulations'. *Biophysical Journal*; 104: 1485-1494.
32. Pfaller M.A., Diekema D.J., Jones R.N., Sader H.S., Fluit A.C. and Hollis R.J. (2001) International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J. Clin. Microbiol* ;39:3254–9
33. Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L., Tendolkar S., Hollis R.J., Diekema D. J. (2004) Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *Journal of clinical microbiology*, 42(7): 3142-3146.

34. 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.
35. Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr, Mowat E., Ramage G. and Lopez-Ribot J.L. (2008) A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing, *Nature Protocols*; 3 : 1494-1500.
36. Ramage G, Vande WK, Wickes BL et al (2001). Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 2475 –9.
37. Razzaghi-Abyaneh M., Sadeghi G., Alirezaee M., Amani A., Mirahmadi R., Tolouei R. (2014) Spices distribution and antifungal susceptibility testing of *Candida sp.* isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *Journal of medical mycology*, 24(2), e43-e50.
38. Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. (2005) *In vitro* method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms *J. Clin. Microbiol*; 43: 818–825.
39. Sanguinetti M., Posteraro B., Fiori B., Ranno S., Torelli R., Fadda G (2005) Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 668-679.
40. Seddiki S.M.L., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Kunkel D (2015) Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida sp.* Formation des biofilms et résistance. *Journal de Mycologie Médicale* ; 25 : 130-135.
41. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Belkherroubi-Sari L., and Boucherit K (2014) Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen : épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. *Journal de Mycologie Médicale* 24(4), e179-e184.
42. Seidler M., Salvenmoser S. and Muller FM (2006) *In vitro* effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. *Int. J. Antimicrob. Agents*; 28: 568-573.

43. Siau H and Kerridge D (1999) 5-Fluorocytosine antagonizes the action of sterol biosynthesis inhibitors in *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother*; 43: 767–775.
44. 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. *Med. Mycol.*; 47: 681–689.
45. Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams DW., Azeredo J (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*; 36(2): 288–305.
46. Tobudic S., Kratzer C., Lassnigg A., Graninger W., and Presterl E (2009) *In vitro* activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 65: 271 –274
47. Vandeputte P., G. Tronchin G., Larcher E., Ernoult T., Berges D., Chabasse and Bouchara J.P (2008). "A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*." *Antimicrob. Agents Chemother*, 52(10), 3701-9.
48. Walsh T.J., Viviani M.A., Arathoon E., Chiou C., Ghannoum M., Groll A.H, et coll (2000) New targets and delivery systems for antifungal therapy. *Med Mycol*; 38(S1), 335–47.
49. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent SM., Seifert H., Wenzel RP., Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis*; 39:309–317