



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



Université de 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*

# MEMOIRE

Présenté par

**Mlle Khelil Amel**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

Domaine : Sciences de la Nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

## Thème

**Etude du profil de résistance de levures et de bactéries co-isolées  
de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen**

Soutenu le, 30 Juin 2020, devant le jury composé de :

Présidente :	Kazi Tani Zahira Zakia	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur :	Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur :	Seghir Abdelfettah	MCA	C.U. d'Ain Témouchent

**Année universitaire 2019/2020**

ملخص :

ركزت هذه الدراسة على تقييم خصائص مقاومة *Candida albicans* إلى الـ amphotéricine B والبكتيريا المخمرة وغير المخمرة سلبية الغرام (*Acinetobacter baumannii* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis*) للـ colistine والـ imipenème يتم عزل الخمائر والبكتيريا بشكل مشترك عن الأجهزة الطبية في وحدة العناية المركزة بالمستشفى الجامعي تلمسان

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن جميع سلالات *Candida albicans* حساسة للـ amphotéricine B مع CMI بين 0,25 et 1 µg/mL بعد 24 و 48 ساعة من الحضانة عند 37°C (CLSI 2008).  
colistine مقابل سلالات *Acinetobacter baumannii* و *Pseudomonas aeruginosa* هي 0,5µg/mL و 1µg/mL على التوالي. نظرًا لأن CMI أقل من 2µg/mL، يتم تعيين هذه السلالات للفئة الحساسة وفقًا لتوصيات **EUCAST 2019**. ويتم تصنيف سلالات *Proteus mirabilis* في الفئة المتوسطة للـ imipenème (CMI بين 2 و 8µg/mL) (EUCAST 2018).

الكلمات المفتاحية: الحساسية ، *Candida albicans* ، البكتيريا سالبة الجرام ، amphotéricine B ، colistine ، imipenème

### Résumé :

Cette étude a porté sur l'évaluation des profils de résistances de *Candida albicans* à l'amphotéricine B et de bactéries à Gram négatif fermentaires et non fermentaires (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et de *Proteus mirabilis*) à la colistine et à l'imipenème. Les levures et les bactéries sont co-isolées de dispositifs médicaux au service de réanimation du CHU de Tlemcen.

Les résultats obtenus nous ont permis de classer toutes les souches de *Candida albicans* testées, selon les recommandations du **CLSI 2008**, dans la catégorie sensible à l'amphotéricine B avec des CMI comprises entre 0,25 et 1 µg/mL après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C.

Les CMI de la colistine vis-à-vis des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* sont de 0,5µg/mL et de 1µg/mL respectivement. Les CMI étant inférieures à 2µg/mL, ces souches sont assignées à la catégorie sensible selon les recommandations d'**EUCAST 2019**. En revanche, en se référant aux données **EUCAST 2018**, les souches de *Proteus mirabilis* sont classées dans la catégorie intermédiaire pour l'imipenème (CMI comprise entre 2 et 8 µg/mL).

**Mots clés :** Sensibilité, *Candida albicans*, Bactéries à gram négatif, Amphotéricine B, Colistine, Imipenème.

### Abstract

This study focused on the evaluation of the resistance profiles of *Candida albicans* to amphotericin B and Gram-negative fermentative and non-fermentative bacteria (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*) to colistin and imipenem. Yeasts and bacteria are co-isolated from medical devices in the intensive care unit of Tlemcen University Hospital.

The results obtained showed that all the *Candida albicans* strains tested are sensitive to amphotericin B with MICs between 0.25 and 1 µg/mL after 24 and 48 hours of incubation at 37°C (CLSI 2008).

Colistin MICs for *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* strains are 0.5µg/mL and 1 µg/mL respectively. Since the MICs are less than 2µg/mL, these strains are assigned to the sensitive category according to the recommendations of EUCAST 2019. However, the *Proteus mirabilis* strains are classified in the intermediate category for imipenem (MIC between 2 and 8 µg/mL) (EUCAST 2018).

**Key words:** Sensibility, *Candida albicans*, Gram negative bacteria, Amphotericin B, Colistin, Imipenem.

## Table des matières

<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b> .....	1
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes</b> .....	6
1. Matériel .....	7
1.1. Microorganismes .....	7
1.2. Antimicrobiens.....	7
2. Méthodes.....	8
2.1. Préparation de la solution mère d'amphotéricine B.....	8
2.2. Préparation des solutions mères de la colistine et de l'imipenème .....	8
2.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CLSI M27 A3, 2008).....	8
2.3.1 Préparation de l'inoculum.....	8
2.3.2 Technique de microdilution sur microplaque .....	8
2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des bactéries(CLSI M27 A3, 2015) .....	9
<b>Troisième partie : Résultats et discussion</b> .....	10
1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B.....	11
2. Concentrations minimales inhibitrices de la colistine .....	12
3. Concentrations minimales inhibitrices de l'imipenème.....	14
<b>Quatrième partie : Conclusion générale</b> .....	16
<b>Cinquième partie : Références bibliographiques</b> .....	18
<b>Sixième partie : Annexes</b> .....	24

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail, fruit de mes études*

*À mes très chers et adorables parents*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*À mon très cher père*

*De tous les pères, tu es le meilleur.*

*Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme.*

*En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières.*

*Ta chaleur paternelle et ton soutien moral ont été et seront toujours pour moi d'un grand réconfort dans les moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite.*

*À ma très chère mère*

*Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.*

*Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.*

*Que Dieu vous protège et qu'il vous procure santé, prospérité et bonheur...*

*J'espère être toujours à la hauteur de vos espérances, car vous méritez tout ce qu'il y a de mieux en ce monde.*

*À toute ma famille, oncles, tantes, cousines, cousins et à tous ceux qui ont rendu ma vie agréable.*

*Une spéciale dédicace à une personne particulière qui a été toujours là pour moi pour me soutenir, m'aider et m'écouter ; Mohammed, que dieu te protège et te procure la joie et le bonheur que tu mérites.*

*À mes très chère(s) ami(e)s de cœur : Rayhane, Wafaa, Manel, Téma, Wissem, Razia, Djazila, Amina, Abdelillah, Ryad et Zakaria pour votre présence à mes côtés. « Il y'a de la famille et il y'a les ami(e)s, et puis il y'a les ami(e)s qui deviennent de la famille, merci d'embellir ma vie ».*

*À tous mes camarades de promotion pour ces années passées ensemble, dans les meilleurs moments comme dans les pires. Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*

*À tous les enseignants qui m'ont accompagné tous le long de mon parcours et qui m'ont appris tout ce que je sais aujourd'hui.*

***Amel***

# Remerciements

Je ne saurais commencer sans remercier tout d'abord Allah, le tout puissant de m'avoir accordé paix, santé, sérénité et surtout abnégation et courage pour pouvoir poursuivre mes études et espérer un avenir meilleur.

Qu'il me soit permis d'exprimer mes sentiments d'estime et de considération les plus profonds envers mon encadreur, **M<sup>me</sup>** 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, qui m'a honoré en acceptant la direction de ce mémoire, de m'aider et de me guider au cours de cette expérience, j'aurais aimé en partager encore bien plus à vos côtés, sachez que vous êtes une des personnes qui m'ont transmis l'amour des sciences et du savoir, et rien que pour ceci, je vous exprime, ma reconnaissance et mon infinie gratitude. Je vous transmets mes remerciements pour les précieux conseils que vous m'avez accordés, votre compréhension, professionnalisme, disponibilité, confiance, encouragement, et pour votre œil critique qui nous a été très précieux pour structurer ce travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire.

Mes estimés et mes vifs remerciements aux honorables membres de jury pour avoir accepté de juger et d'examiner ce modeste travail, ce fut un honneur pour moi d'être une des personnes ayant eu la chance d'acquérir du savoir de votre part.

À la présidente du jury : **M<sup>me</sup>** Kazi Tani Zahira Zakia, Maître de Conférences 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. Je tiens à lui communiquer mon profond respect et ma sincère reconnaissance.

À l'examineur : **M<sup>r</sup>** Seghir Abdelfettah Maître de conférences classe A au Centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent, pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier profondément **M<sup>me</sup>** Halimi Amel, doctorante en Biologie pour sa disponibilité et son aide tout au long de la partie expérimentale.

Mes remerciements aux **responsables et membres du laboratoire** où m'a été permis d'effectuer toutes les manipulations nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Enfin, j'exprime ma gratitude et ma reconnaissance **pour tous les enseignants du département de Biologie**, qui m'ont formé tout au long de mon cursus universitaire. Je ne les remercierai jamais assez.

## Liste des abréviations

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**Ca:** *Candida albicans*

**Ab :** *Acinetobacter baumannii*

**Pm :** *Proteus mirabilis*

**CLSI:** *Clinical and Laboratory Standards Institute*

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

**EUCAST:** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**UFC :** Unité Formant Colonie

## Liste des figures

- Figure N°1** Morphologies et principaux facteurs de résistances associées au développement d'un biofilm. Exemple du biofilm de *Candida albicans* (Lohse et coll., 2018).
- Figure N°2** Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida albicans*.
- Figure N°3** CMI de la colistine vis-à-vis des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Figure N°4** CMI de l'imipenème vis-à-vis des souches de *Proteus mirabilis*.

*Première partie*

---

**Synthèse  
bibliographique**

Dans l'environnement, les microorganismes peuvent alterner entre deux modes de vie distincts. Un mode planctonique qui correspond aux cellules libres et isolées en suspension dans un milieu et un mode sessile où les cellules vivent en communautés attachées à un support, on parle alors de biofilms. Il s'agit du mode de vie adopté par plus de 99 % de microorganismes **(Garrett et coll., 2008)**.

Au sein des biofilms, les microorganismes sont en contact avec des surfaces biotiques ou abiotiques, enrobés de matrices hydratées riches en polymères extracellulaires.

Ces structures sont incriminées dans la majorité des situations pathologiques affectant l'homme. Impliquées dans plus de 60% des infections associées aux soins, la part des candidoses est non négligeable. En effet, les levures du genre *Candida* sont le plus souvent considérées comme le quatrième microorganisme responsable d'infections systémiques associées aux soins et la cause la plus commune d'infections fongiques chez les sujets immunodéprimés **[(Pfaller et Diekema 2007) ; (Harding et coll., 2009)]**.

Les infections liées au biofilm sont également causées par des bactéries pathogènes ou opportunistes, le plus souvent dans un contexte de chronicité. En effet, même si les antibiothérapies administrées permettent la disparition transitoire des symptômes, en éradiquant les cellules planctoniques libérées en continu de la structure du biofilm, ce dernier persistera et constitue donc un réservoir microbien à l'origine d'infections récidivantes **(Parsek et Singh, 2003)**.

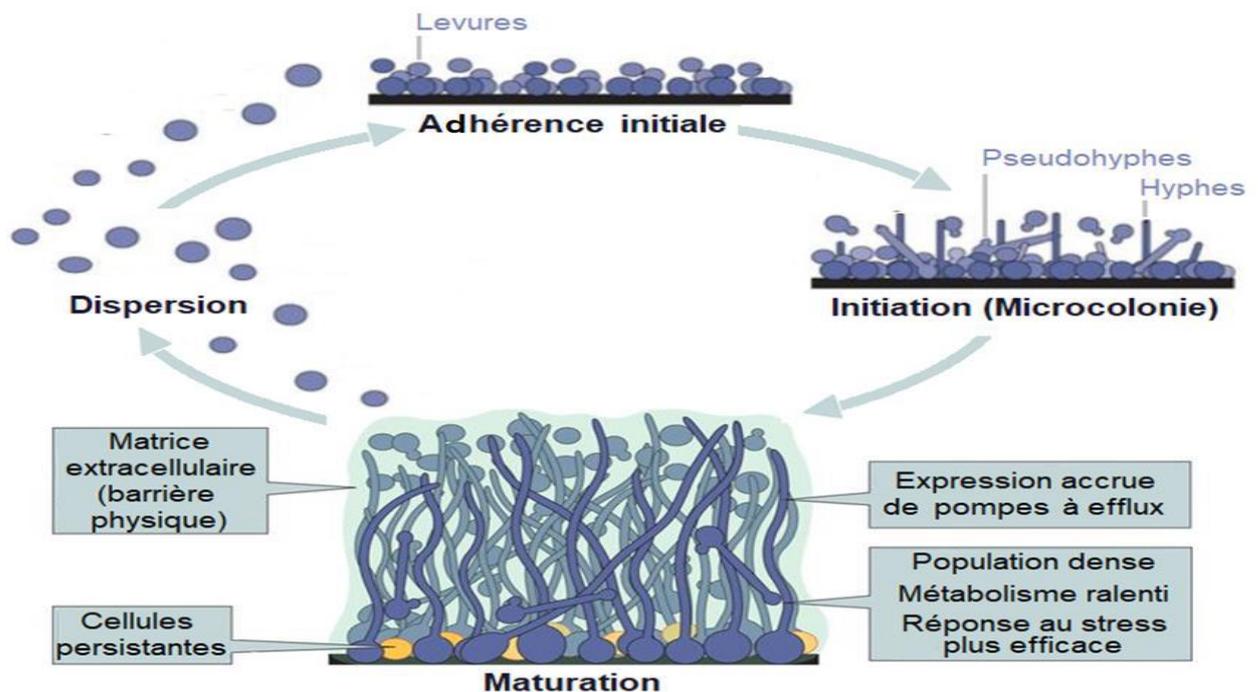
Les biofilms, peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (cathéter veineux central et périphérique, sonde endotrachéale, sondes urinaires...) ou encore sur les muqueuses du corps humain.

Après l'insertion d'un dispositif médical, les composés tissulaires recouvrent rapidement sa surface (protéines, plaquettes, fibres de collagène...) formant ainsi un film conditionnant sur lequel des bactéries et/ou des levures vont adhérer de façon réversible dans un premier temps. Cette étape est suivie d'une adhérence irréversible qui fait intervenir des adhésines et autres protéines de liaison. La phase suivante est marquée par l'adhésion des microorganismes entre eux

pour former une micro-colonie. La croissance microbienne et la sécrétion concomitante des composantes de la matrice se poursuivent pendant la phase de maturation. Le détachement et la dispersion des cellules du biofilm mature jouent un rôle important dans la transmission entre les hôtes et dans la propagation de l'infection chez un hôte (Dang et coll., 2016).

Contrairement à leurs homologues planctoniques, les cellules sessiles des microorganismes présentent une résistance accrue aux défenses immunitaires innées des patients et aux agents antimicrobiens (Kernien et coll., 2017).

La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens est un phénomène multifactoriel (Figure N°1) impliquant notamment, la densité cellulaire à l'intérieur du biofilm ; la présence de la matrice exopolymérique, le taux de stérols de la membrane dans le cas des levures, le ralentissement de la croissance microbienne et une pénurie en nutriments et l'expression de gènes de résistance, en particulier ceux codant pour des pompes à efflux et la présence de cellules «persistantes» (Lebeaux et coll., 2012).



**Figure N°1** : Morphologies et principaux facteurs de résistances associés au développement d'un biofilm. Exemple du biofilm de *Candida albicans* (Lohse et coll., 2018)

Il existe deux type de biofilms, ceux formés d'une seule espèce et qui sont surtout étudiés en laboratoire et ceux qui hébergent plusieurs espèces de microorganismes, on parle alors de biofilms multi-espèces ou mixtes et qui sont le plus rencontrés dans un contexte infectieux **(Lebeaux et coll., 2014)**.

Il est à noter que la levure *Candida albicans* est souvent co-isolées avec des espèces bactériennes appartenant au groupe ESKAPE, à savoir *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter sp.* **(Rodrigues et coll., 2019)**.

La présence de plusieurs espèces dans un environnement restreint fait naître des relations de compétition, mais aussi de collaboration. Des espèces qui cohabitent peuvent développer des relations synergiques ou antagonistes. *Staphylococcus aureus*, une bactérie multi-résistante, qui forme difficilement des biofilms par elle-même sur les surfaces abiotiques, peut former des colonies dans les biofilms de *Candida albicans* par adhésion à ses hyphes. De même *Staphylococcus epidermidis* peut se fixer à la fois sur les deux formes (hyphes et levure) de *Candida albicans* **[(Harriott et Noverr, 2009) ; (Peters et coll., 2010)]**. A l'inverse, *Pseudomonas aeruginosa* se fixe préférentiellement sur les hyphes de *Candida albicans* **(Hogan et Kolter, 2002)**. Cette intégration au biofilm fongique confère aux bactéries une résistance accrue aux antibiotiques **(Harriott et Noverr, 2010)**.

En **2006**, **Al-Fattani et Douglas** ont montré que la résistance de *Candida albicans* aux antifongiques (amphotéricine B et fluconazole) et de *Staphylococcus epidermidis* aux antibiotiques (vancomycine) est plus importante dans un biofilm mixte formé par ces deux espèces en comparaison à leurs biofilms individuels.

Il est important de noter que la résistance aux antimicrobiens continue d'être un problème majeur de santé publique tant en Algérie qu'à l'étranger. Ce qui est particulièrement inquiétant est l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance aux carbapénèmes (Imipénème). Les défis majeurs de cette résistance sont rencontrés principalement chez différentes espèces d'entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*),

et de bacilles à Gram négatif non fermentant (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*).

De plus, le taux de mortalité élevé lié aux infections par les bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes est aggravé par l'apparition de gènes de résistance à la colistine, traitement considéré comme de dernier recours [(Halaby et coll., 2013) ; (Bedenić et coll., 2018) ; (Ghasemian et coll., 2018)]. Les travaux de Rolainet Olaitan (2016) ont montré que le plasmide porteur de cette résistance s'est répandu mondialement et n'est plus exclusif aux entérobactéries si bien qu'on le retrouve dans le microbiote de patients n'ayant jamais été exposés à l'antibiotique.

Chez la levure *Candida albicans*, les résistances acquises sont la conséquence de mécanismes d'adaptation sous pression antifongique. En effet, l'absence de transmission horizontale et le faible nombre de transmissions croisées chez les levures limitent fort heureusement la dissémination rapide de ces résistances (Maubon et Morio, 2018). Néanmoins, face à un arsenal thérapeutique très limité en nombre de molécules et de cibles antifongiques, l'émergence de ces résistances qui ont été associées récemment à un nombre croissant d'échecs cliniques, doit donner lieu à une vigilance accrue (Srivastava et coll., 2018).

De ce fait, la prise en charge des infections polymicrobiennes impliquant bactéries et levures est problématique et complexe étant donné la nécessité de combiner antibiotiques et antifongiques à des doses thérapeutiques efficaces et non toxiques.

Notre travail s'inscrit dans cet ordre d'idée et consiste à évaluer les profils de résistances de *Candida albicans* et de bactéries à Gram négatif co-isolées de dispositifs médicaux au service de réanimation du CHU de Tlemcen à un antifongique (amphotéricine B) et à deux antibiotiques (colistine et imipénème).

## *Deuxième partie*

---

# **Matériel et méthodes**

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

## **1. Matériel**

### **1.1. Microorganismes**

L'étude a porté sur une collection de souches appartenant au laboratoire de recherche Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique. Il s'agit de levures et de bactéries co-isolées d'un même dispositif médical. Les associations retenues pour cette étude sont les suivantes :

- 5 *Candida albicans/Proteus mirabilis* (Ca2/Pm1, Ca3/Pm5, Ca7/Pm10, Ca11/Pm12, Ca14/Pm16).
- 3 *Candida albicans/Acinetobacter baumannii* (Ca1/Ab2, Ca5/Ab7, Ca6/Ab8).
- 2 *Candida albicans/Pseudomonas aeruginosa* (Ca12/Pa12, Ca17/Pa10).

Ces souches sont entretenues par repiquages réguliers et conservées à +4°C sur gélose Sabouraud pour les levures et sur gélose nutritive pour les bactéries. La souche de référence *Candida albicans* ATCC10231 est utilisée comme contrôle interne pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices des levures.

Avant leur première utilisation, les souches sont revivifiées et purifiées par plusieurs passages successifs alternant bouillon nutritif et milieu sélectif Mac Conkey pour les bactéries et bouillon et gélose Sabouraud pour les levures.

### **1.2. Antimicrobiens**

Nous avons utilisé un antifongique systémique de référence, l'amphotéricine B (Sigma) et deux antibiotiques, la colistine et l'imipenème.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Préparation de la solution mère d'amphotéricine B**

La solution mère d'amphotéricine B est préparée en extemporané par sa dissolution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 1,6mg/mL.

### **2.2 Préparation des solutions mères de la colistine et de l'imipénème**

Les solutions mères de la colistine et de l'imipénème sont préparées en extemporané par leur dissolution dans l'eau distillée à une concentration de 5120µg/mL. Une gamme de dilution est ensuite réalisée pour ces deux antibiotiques selon le tableau représenté en **Annexe 1**.

### **2.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CLSI M27 A3, 2008)**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches étudiées sont déterminées par la technique de microdilution sur microplaque selon le protocole standard de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* publié en 2008 dans le document M27-A3 qui recommande le milieu *Roswell Park Memorial Institute*, (RPMI 1640) (sigma) tamponné à pH 7.

#### **2.3.1 Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture de 24 heures sur gélose Sabouraud, nous avons préparé une suspension levurienne de  $3.10^6$  cellules/mL dans l'eau physiologique stérile à 8,5% par dénombrement sur cellule de Thoma. Cette dernière est ensuite diluée au 1/50 puis au 1/20 dans le RPMI pour avoir une concentration finale de l'inoculum égale à  $1,5.10^3$  cellules/mL.

#### **2.3.2 Technique de microdilution sur microplaque**

Dans les 96 puits d'une microplaque contenant 100µL de l'inoculum (la suspension levurienne), nous avons ajouté 100µL de la solution d'amphotéricine B à des concentrations finales allant de 16 à 0,03µg/mL. La microplaque est ensuite scellée puis incubée à 35°C pendant 24 et 48 heures. Les CMI sont déterminées à l'œil nu.

**2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des bactéries (CLSI M27 A3, 2015)**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la colistine et de l'imipénème sont déterminées par les méthodes de dilution sur milieu gélosé et de micro-dilution en microplaque 96 puits. Les inocula de  $10^4$  UFC/spot et de  $10^6$  UFC/mL sont mis au contact avec des concentrations croissantes comprises entre 0,06 et 32 $\mu$ g/mL pour la colistine et entre 1 et 512 $\mu$ g/mL pour l'imipénème.

Après une incubation de 24 heures à 37°C, la CMI est définie comme étant la plus petite concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil nu.

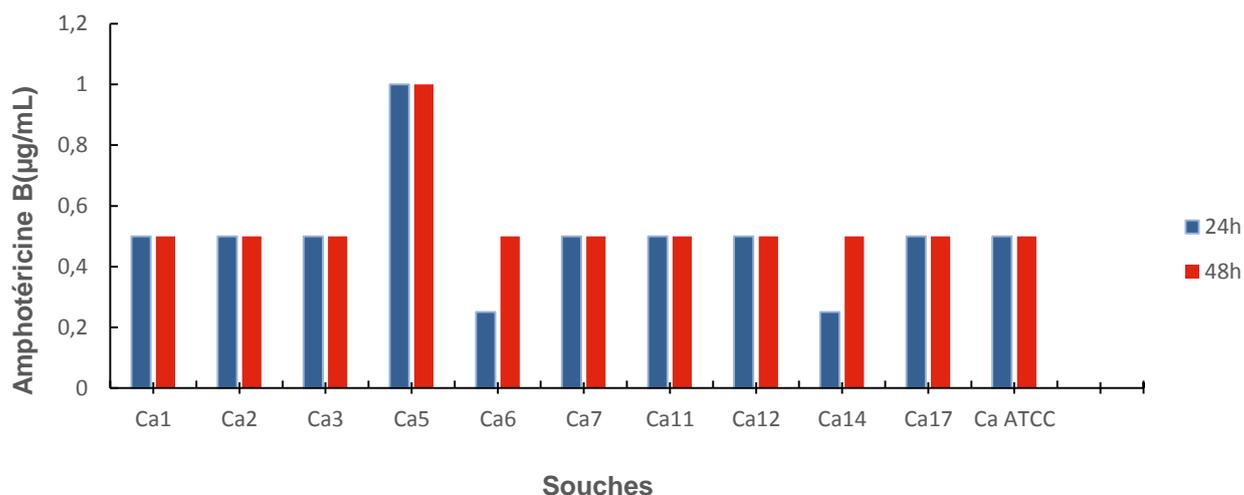
## *Troisième partie*

---

# **Résultats et discussion**

### 1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B

Les résultats relatifs aux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules planctoniques des souches hospitalières de *Candida albicans* et de la souche de référence de *Candida albicans* ATCC10231 obtenues après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C sont représentées sur la figure N°2.



**Figure N°2 :** Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida albicans*.

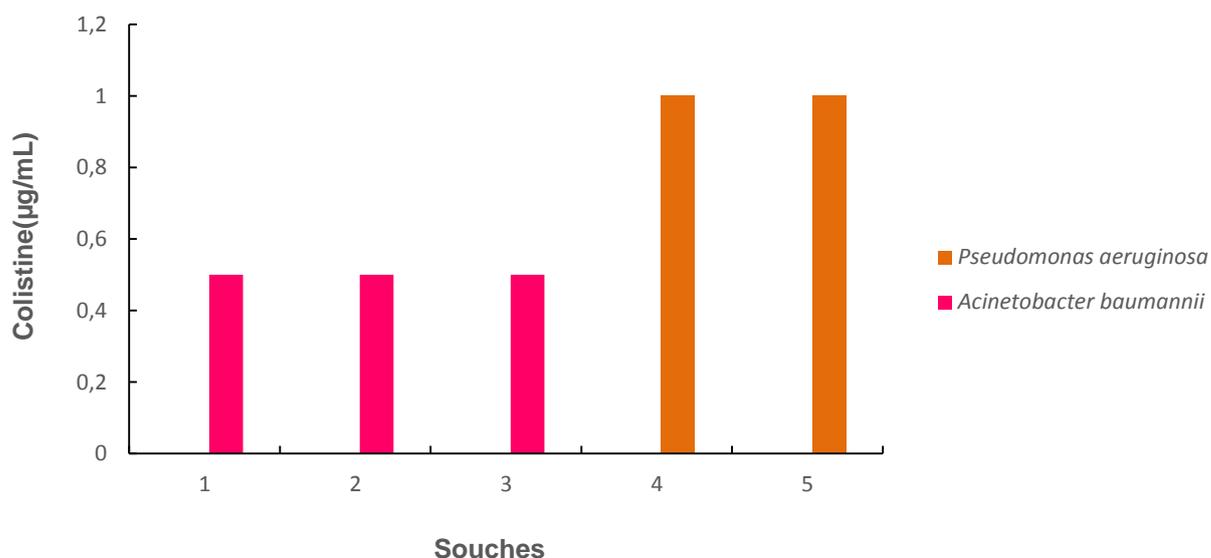
Nous remarquons qu'après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C, les CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des levures de *Candida albicans* utilisées pour cette étude sont comprises entre 0,25 et 1µg/mL. Selon les recommandations du CLSI 2008, *Candida* sp. est considérée comme sensible à l'amphotéricine B si la CMI est inférieure à 1µg/mL (**CLSI 2008**). De ce fait, toutes les souches testées sont sensibles à l'amphotéricine B.

En effet, après 24 heures d'incubation, les CMI sont de 0,25µg/mL pour deux souches (Ca6 et Ca14), de 0,5µg/mL pour huit souches et la souche de référence (Ca1, Ca2, Ca3, Ca7, Ca11, Ca12 et Ca17 et *Candida albicans* ATCC10231) et de 1µg/mL pour une souche (Ca5). En revanche, les CMI lues après 48 heures d'incubation passent de 0,25 à 0,5µg/mL pour deux souches (Ca6, Ca14) et restent inchangées pour le reste des souches testées.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Seghir et coll., (2014)**, **Bekkal Brikci-Benhabib (2016)**, **Lahfa-Hassaine et coll., (2017)**, **Touil et coll., (2018)** qui ont montré que toutes les souches de *Candida albicans* isolées de différents services du CHU de Tlemcen sont sensibles à l'amphotéricine B. Il est à noter que la résistance acquise à l'amphotéricine B reste très rare et inhabituelle, elle n'a été décrite que chez quelques espèces rares de *Candida sp.* [(Dannaoui, 2013) ; (Razzaghi-Abyaneh et coll., 2014) ; (Scorzoni et coll., 2017)].

## 2. Concentrations minimales inhibitrices de la colistine

Les CMI de la colistine vis-à-vis des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues après 24h d'incubation à 37°C sont représentées sur la **figure N°3**.



**Figure N°3** : CMI de la colistine vis-à-vis des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa*

Les valeurs de CMI de la colistine sont de 0,5µg/mL et de 1µg/mL pour les souches d'*Acinetobacter baumannii* et pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* respectivement. Ces résultats ont permis d'assigner ces souches à la catégorie sensible (CMI<2µg/mL) (**EUCAST 2019**).

Ce résultat est en accord avec les travaux de **Jayol et coll., (2017)** qui ont montré que seules quelques genres/espèces sont naturellement résistants à la colistine (les

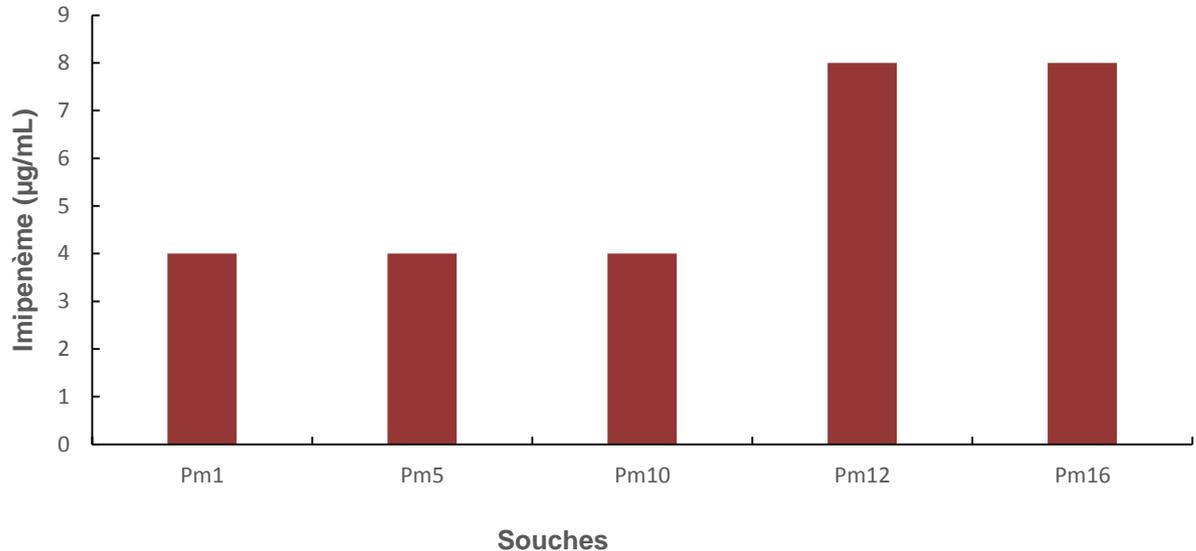
plus connues étant *Serratia sp.*, *Proteus sp.*, *Morganella sp.*, *Providencia sp.*, *Burkholderia cepacia* et *Hafnia alvei*). En effet, les polymyxines, classe d'antibiotiques à laquelle appartient la colistine, possèdent un spectre d'activité antibactérien étroit limité aux seules bactéries à gram-négatif (incluant les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter sp.*).

La colistine a été utilisée en thérapeutique humaine pour le traitement des infections à bactéries à gram négatif depuis les années 1960. Dès les années 1970 son utilisation a rapidement diminué en raison d'une part des effets secondaires rapportés (nephrotoxicité, neurotoxicité) et d'autre part de l'introduction de nouveaux antibiotiques plus actifs et moins toxiques (aminoglycosides, quinolones,  $\beta$ -lactames). La recrudescence des bactéries à gram-négatifs multi-résistantes et pan-résistantes (en particulier les entérobactéries productrices de carbapénémases) a contribué à la réintroduction de l'utilisation de la colistine depuis une dizaine d'année en médecine humaine.

Suite à la réintroduction de la colistine en médecine humaine pour la prise en charge des infections sévères occasionnées par des bactéries multi-résistantes, la résistance à cet antibiotique a rapidement émergé et est en augmentation constante. Cette résistance résulte souvent de mutations chromosomiques dans divers gènes conduisant à des modifications de la structure du lipopolysaccharide (LPS) site d'action de fixation de la colistine sur la paroi bactérienne **[(Dortet et coll., 2016) ; (Glupczynski and Huang Te-Din, 2017)]**.

### 3. Concentrations minimales inhibitrices de l'imipénème

La figure N°4 regroupe les concentrations minimales inhibitrices de l'imipénème vis-à-vis des 5 souches de *Proteus mirabilis* testées.



**Figure N°4 :** CMI de l'imipénème vis-à-vis des souches de *Proteus mirabilis*.

Les CMI de l'imipénème, vis-à-vis des souches de *Proteus mirabilis* étudiées, lues après 24 heures d'incubation à 37°C sont de 4µg/mL pour 3 souches et de 8µg/mL pour 2 souches.

Selon les recommandations de **EUCAST 2018**, les souches de *Proteus mirabilis* que nous avons testées sont classées dans la catégorie intermédiaire (CMI comprise entre 2 et 8 µg/mL).

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Ghessoum et coll., (2017)**, de **Lange et coll., (2017)** et de **Kanzari et coll., (2018)** qui ont montré que les souches de *Proteus mirabilis* présentent des niveaux de résistance très élevés à l'imipénème. La résistance à l'imipénème observée chez les souches étudiées peut être la conséquence de la pression de sélection due à l'usage souvent abusif de cet antibiotique au sein du service de réanimation du CHU de Tlemcen. En effet, une étude menée par **Hassaine (2009)** sur la consommation des antibiotiques au CHU de Tlemcen a montré que le service de réanimation était le service le plus consommateur de l'imipénème avec 183 doses définies journalières (DDJ)/1000 jours.

d'hospitalisation en 2007 et 165 doses définie journalière (DDJ)/1000 jours d'hospitalisation en 2008.

Par ailleurs, en **2014, Robert et ses collaborateurs** ont montré que toutes les espèces d'entérobactéries sont naturellement sensibles à tous les carbapénèmes à l'exception de *Proteus mirabilis* et *Morganella morganii* qui ont une sensibilité naturellement diminuée à l'imipénème en raison de la présence de protéines liant la pénicilline (PLP) (**Robert et coll., 2014**).

## *Quatrième partie*

---

# **Conclusion générale**

L'étude que nous avons réalisée a porté sur l'étude des profils de résistance de *Candida albicans* et de bactéries à Gram négatif co-isolées de dispositifs médicaux au service de réanimation du CHU de Tlemcen à un antifongique (l'amphotéricine B) et à deux antibiotiques (la colistine et l'imipenème).

Il ressort de cette étude que :

- Les CMI de l'amphotéricine B, vis-à-vis des levures de *Candida albicans* utilisées pour cette étude, lues après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C, sont comprises entre 0,25 et 1µg/mL. Selon les recommandations du CLSI 2008, *Candida sp.* est considérée comme sensible à l'amphotéricine B si la CMI est inférieure à 1µg/mL (**CLSI 2008**). De ce fait, toutes les souches testées sont sensibles à l'amphotéricine B.
- Les niveaux des CMI de la colistine sont de 0,5µg/mL pour les souches d'*Acinetobacter baumannii* et de 1µg/mL pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats ont permis d'assigner ces souches à la catégorie sensible (CMI < 2µg/mL) (**EUCAST 2019**).
- Les CMI de l'imipenème, vis-à-vis des souches de *Proteus mirabilis* testées sont de 4µg/mL pour 3 souches et de 8µg/mL pour 2 souches. Les souches de *Proteus mirabilis* que nous avons testées sont classées dans la catégorie intermédiaire (CMI comprises entre 2 et 8 µg/mL) (**EUCAST 2018**).

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Tester l'efficacité de l'amphotéricine B, de la colistine et de l'imipenème sur les associations *Candida albicans*/bactéries en mode planctonique
- Evaluer le potentiel des souches testées à former des biofilms mono et multi-espèces.
- Déterminer l'effet de l'antifongique et des deux antibiotiques seuls et combinés sur ces associations de microorganismes en mode sessile.

## ***Cinquième partie***

---

### **Références bibliographiques**

1. Al-Fattani., M. A., Douglas., L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J. Med. Microbiol.*55, 999–1008.
2. Bedenić, B., Vranić-Ladavac, M., Venditti, C., Tambić-Andrašević, A., Barišić, N., *et al.* (2018) Emergence of colistin resistance in *Enterobacter aerogenes* from Croatia. *J. Chemother.*30,120-123.
3. Bekkal Brikci-Benhabib O. (2016). Recherche de biofilms mixtes sur des surfaces inertes au Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen. Thèse de Doctorat en Sciences option biochimie appliquée. Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.
4. Dalhoff, A. (2012) Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 37, doi:10.1155/2012/976273.
5. Dang, H., Lovell., C. R. (2016). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*80, 91–138.
7. Dannaoui E. (2013). Résistance des *Candida* aux antifongiques: détection et mécanismes. *revue francophone des laboratoires*, 2013(450), 71-77. 33.
8. Danhorn T., Fuqua C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 61, 654-663.
9. Dortet L., Bonnin R., Jousset A., Gauthier L., Naas T. (2016). The emergence and spread of plasmid-mediated resistance to colistin in *Enterobacteriaceae*: Compromising the last bastion on the way to pan-drug resistance! *Journal des Anti-infectieux* 18, 139-159.
10. Garrett T.R., Bhakoo M. and Zhang Z. (2008), Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci.* 18(9):1049-56.
11. Ghasemian, A., Shafiei, M., Hasanvan, F., Shokouhi, M., Seyyed, K. (2018) Carbapenem and colistin resistance in *Enterobacteriaceae*: worldwide spread and future perspectives. *Rev. Med. Microbiol.*29, 173–176.
12. Ghessoum R., Yakhlef I. (2017). Isolement et étude de *Klebsiella sp.* et *Proteus sp.*, bactéries uréolytique impliquées dans les infections urinaires. Université des Frères Mentouri Constantine. Mémoire de diplôme de Master.

13. Glupczynski Y. and Huang Te-Din D. (2020). Résistance à la colistine chez les bactéries à gram-négatif. *Bulletin pour la prévention et la maîtrise des infections associées aux soins* vol 24, N°1.
14. Halaby, T., al Naiemi, N., Kluytmans, J., van der Palen, J., Vandenbroucke-Grauls, C. (2013) Emergence of colistin resistance in *Enterobacteriaceae* after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3224 –3229.
15. Han, J.H., Goldstein, E.J., Wise, J., Bilker, W.B., Tolomeo, P., Lautenbach, E. (2017) Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a network of long-term acute care hospitals. *Clin. Infect. Dis.* 64, 839-844.
16. Harding MW., Marques LLR., Howard RJ., Olson ME. (2009). Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol.* 17(11):475-80.
17. Harriott, M. M., Noverr, M. C. (2009) *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3914-3922.
18. Harriott, M. M., Noverr, M. C. (2010) Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3746-3755.
19. Hassaine H. (2009). Essai de l'évaluation de la consommation d'antibiotiques au CHU de Tlemcen. Mémoire de fin d'étude. Université de Tlemcen, Algérie.
20. Hu, Y.S., Shin, S., Park, Y.H., Park, K.T. (2017) Prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from swinefeces in Korea. *J. Food Prot.* 80, 1145-1151.
21. Jayol A., Nordmann P., Brink A., Villegas M.V., Dubois V., et Poirel L. (2017), High-level resistance to colistin mediated by various mutations in the *crrB* gene among carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Volume 61 Issue 11 e01423-17.
22. Kernien, J., Snarr, B. D., Sheppard, D. C., Nett, J. E. (2017) The interface between fungal biofilms and innate immunity. *Front. Immunol.* 8, 1968.

23. Lahfa-Hassaine I., Boucherit-Otmani Z., Sari-Belkherroubi L. and Boucherit K. (2017), Retrospective study of *Candida sp.* contaminations of endoscopes at the University Hospital of Tlemcen (Algeria). *Journal de Mycologie Médicale* 27(2) 127-132.
24. Lebeaux, D., Ghigo, J. M. (2012) Infections associées aux biofilms : Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *Med. Sci. (Paris)*, 28, 727-739.
25. Lebeaux D, Ghigo J-M, LUCET J-C. (2014) Physiopathologie et prévention des infections liées aux dispositifs médicaux implantés. *Rev Prat.* 64(5):620–625.
26. Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., Nobile, C. J. (2018) Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 19–31.
27. Mamadou Tidiani Coulibaly. (2016). Les infections associées aux soins au service d'urologie du CHU Gabriel Toure. *Mali médical 2020 TOME XXXV N°1.*
28. Morales, D. K., Jacobs, N. J., Rajamani, S., Krishnamurthy, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Hogan, D. A., (2010) Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Mol. Microbiol.* 78, 1379-1392.
29. Morales, D. K., Grahl, N., Okegbe, C., Dietrich, L. E. P., Jacobs, N. J., Hogan, D. A. (2013) Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *mBio* 4, e00526-12.
30. Mukherjee PK and Chandra J. (2004) *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* ; 7 : 301-9.
31. Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E. (2010) Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 493-503.
32. Pfaller MA. and Diekema DJ. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.*; 20 : 133-63.

33. Razzaghi-Abyaneh M., Sadeghi G., Zeinali E., Alirezaee M., Shams Ghahfarokhi M., Amani A., Mirahmadi R., Tolouei R. (2014) Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* sp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *Journal of Medical Mycology*, 24(2), e43-e50.
34. Robert J., Pantel A., Merens A (2014) Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Clinical isolates in France : a prospective nationwide study in 2011-2012. *J Antimicrob. Chemother* ; 69 : 2706-12.
35. Rodrigues M., Fernanda G., Rodrigues C. (2019). *Candida* sp./Bacteria mixed biofilms. *J.Fungi* 2020,6,5 ;doi :10.3390/jof6010005.
36. Rolain, J.M., Olaitan, A.O. (2016) Plasmid-mediated colistin resistance: the final blow to colistin? *Int. J. Antimicrob. Agents*. 47, 4–5.
37. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Belkherroubi-Sari L., Boucherit K. (2014). Catheterization and fungal infection risk in the University Hospital of Tlemcen: Epidemiology and susceptibility to antifungals. *Journal of Medical Mycology*, 24(4), e179-e184.
38. Scorzoni L., Ana C. A. de Paula e Silva, Caroline M. Marcos, Patrícia A. Assato, Wanessa C. M. A. de Melo, Haroldo C. de Oliveira and coll., (2017). Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis, Volume 8, article 36.
39. Srivastava, V., Singla, R.K., Dubey, A.K. (2018) Emerging virulence, drug resistance and future anti-fungal drugs for *candida* pathogens. *Curr. Top. Med. Chem.* 18, 759–778.
40. Touil H.F.Z., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. (2018). *In vitro* activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from medical devices in an intensive care department. *Journal de Mycologie Médicale* 821; No. of Pages 5.
41. Williamson, D., Albert, M., Perreault, M., Delisle, M.-S., Muscedere, J.(2011)The relationship between *Candida* species cultured from the respiratory tract and systemic inflammation in critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Can. J. Anaesth.* 58, 275-284.

## ***Sixième partie***

---

### **Annexes**

**Annexe N°1 : Préparation des solutions d'antibiotiques (Courvallin et coll., 2006)**

Solution initiale (µg/mL)	Solution mère (mL)	Eau distillée (mL)	Concentration Obtenue (µg/mL)	Concentration finale dans le milieu (µg/mL)
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	3,5	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25
20	0,5	7,5	1,25	0,125