



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



Université Abou Bekr 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
Magister en biologie moléculaire et cellulaire

Option : **Biochimie Appliquée**

Par
M^r Mehiaoui Samir

Thème

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

Soutenu le

Devant le jury :

Président :	M ^r Boucherit Kebir	Maître de conférences A, Université Tlemcen
Promoteur :	M ^{me} Boucherit - Atmani Zahia	Maître de conférences A, Université Tlemcen
Examineurs :	M ^r Abdelouahed Djamel Eddine	Professeur, Université Tlemcen
	M ^{me} Hassaïne Hafida	Maître de conférences A, Université Tlemcen
Invitée :	M ^{me} Sari - Belkherroubi Lamia	Maître de conférences B, Université Tlemcen

Année universitaire : 2010 - 2011

ملخص

عرفت السنوات الأخيرة انتشارا واسعا للأمراض الفطرية و التي أصبحت تشكل في وقتنا الحاضر مضاعفات خطيرة للمرضى في المصالح الإستشفائية. تعتبر الخميرة *Cryptococcus neoformans* واحدة من هذه الإصابات الجرثومية القادرة على أن تسبب حالات من العدوى المكتسبة في المستشفيات. يمكن لهذه الخمائر أن تنمو ملامسة لبعض الأجهزة الطبية الحديثة مثل القسطرات الوريدية الطرفية مشكلة الأغشية الحيوية و التي تتميز بخاصية مقاومة للمضادات الفطرية.

في هذا السياق، قمنا بإجراء دراسة عزلنا من خلالها سلالات للخميرة *Cryptococcus neoformans* من القسطرات الوريدية الطرفية المصنوعة من مادة polyvinyl chloride مباشرة بعد نزعها من المرضى، ثم تحققنا من قدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية، و أجرينا اختبار على مدى مقاومتها للمضاد الحيوي الأومفوترسين ب (AmB)، الدواء الأكثر استعمالا في علاج الأمراض الفطرية الجهازية.

من 281 عينة، 4 سلالات ل *Cryptococcus neoformans* تم عزلها، و قد أظهرت الدراسة الخاصة بالأومفوترسين ب بأن هذه الخلايا في شكل أغشية حيوية هي أكثر مقاومة لهذا المضاد من نظرائهن العوالق. بالإضافة إلى ذلك، وجدنا أن المقاومة مرتبطة بالتركيز الخلوي الابتدائي، بتجديد الوسط، و أيضا تتأثر بمختلف مراحل نمو هذه الأغشية.

الكلمات المفاتيح: *Cryptococcus neoformans*، القسطرة الوريدية الطرفية، الأغشية الحيوية، أومفوترسين ب.

RESUME

Les infections fongiques ont considérablement augmenté ces dernières années et sont devenues aujourd'hui parmi les complications des sujets à haut risque hospitalisé. *Cryptococcus neoformans* soit l'un des pathogènes identifiés lors de ces infections qui peut entraîner des cas de mycoses nosocomiales.

En effet, ces levures se développent en adhérant à des implants médicaux, tels que les cathéters veineux périphériques conduisant à la formation des biofilms qui leur confèrent des propriétés de résistances aux antifongiques.

Dans ce contexte nous avons entrepris ce travail qui consiste à isoler des souches de *Cryptococcus neoformans* à partir des cathéters veineux périphériques en chlorure de polyvinyle (PVC) usés directement après leurs excisions des patients, de vérifier leur capacité à former des biofilms et de tester leur résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B, traitement de première ligne des mycoses systémiques ou généralisées.

Sur 281 prélèvements, 4 souches de *Cryptococcus neoformans* ont été isolées. Il ressort de cette étude que les test antifongiques vis-à-vis de l'amphotéricine B montrent que les cellules sessiles formantes des biofilms de *Cryptococcus neoformans* sont nettement plus résistantes que leurs homologues planctoniques. De plus, la résistance de ces biofilms à l'amphotéricine B dépend de la concentration cellulaire de départ, du renouvellement du milieu et des différentes phases de formation des biofilms.

Mots clés : *Cryptococcus neoformans*, cathéter veineux périphérique, biofilms, amphotéricine B.

SUMMARY

Fungal infections have dramatically increased in recent years and have now become among the complications of high-risk patients hospitalized. *Cryptococcus neoformans* is one of the pathogens identified in these diseases which can causes nosocomial fungal infections.

In fact, these yeasts grow by adhering to medical devices, such as peripheral venous catheters leading to the formation of biofilms that confer properties of resistance to antifungal agents.

In this context we undertook this work which is to isolate strains of *Cryptococcus neoformans* from polyvinyl chlorure (PVC) peripheral venous catheters worn directly after excision from patients, to check their powers to form biofilms and to test their resistance against amphotericine B.

From 281 samples, 4 strains of *Cryptococcus neoformans* were isolated. It appears from this study that the antifungal tests against AmB show that sessile cells of *Cryptococcus neofromans* are much more resistant than their planktonic counterparts. Moreover, resistance of biofilm to AmB depends on the concentration of the starting inoculum, the renewal of culture medium and different stages of biofilm formation.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, peripheral venous catheters, biofilms, amphotericin B.

Dédicace

C'est avec joie que je dédie ce modeste mémoire aux êtres les plus cher à mon

cœur :

Mon père et ma Mère pour leur soutien moral et leurs encouragements.

A mon frère Reda et mes très chers sœurs, Fayza et Leïla.

Sans que j'oublie ma grande sœur son marie et leurs enfants Zine eddine, Nadire

et Nadjib

A mes tantes et mes oncles et leurs enfants.

A ma grand-mère et à la mémoire de mes grands parents bien aimé.

A toutes la promotion du magister Biochimie appliquée 2008/2009 avec qui j'ai

vécu mes plus belles années.

Enfin, à tous ce que j'aime et qui m'aime de près et de loin.

Samir

Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, université ABOU BEKR BELKAID Tlemcen, sous la direction de M^{me} Boucherit-Atmani Z., maître de conférences A, au département de biologie, faculté SNVSTU, université de Tlemcen.

Je tiens à la remercier en tout premier lieu pour la façon dont elle a dirigé ce travail tout au long de sa réalisation, pour l'attention et le soutien qu'elle m'a porté. Pour sa disponibilité constante, ses précieux conseils, ses orientations bienveillantes et surtout pour le plaisir qu'elle a su me faire découvrir et la patience nécessaire dans la recherche.

Mon gratitude va également à Mr Boucherit K., maître de conférences A, au département de biologie, faculté SNVSTU, université de Tlemcen, responsable du magister Biochimie Appliquée, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce travail, je tiens à le remercier également pour son aide sur le plan pratique, ses qualités humaines aussi sa disponibilité permanente pour avoir mis à ma disposition tous les moyens, matériels scientifiques indispensables à la réalisation de ce travail.

Je remercie M^{me} Hassaine H., maître de conférences A, au département de biologie, faculté SNVSTU, université de Tlemcen, pour avoir accepté de siéger parmi les membres de jury. Je la remercie pour son expérience et son enseignement dont elle m'a fait profiter.

Je remercie également M^r Abdelouahed Dj., professeur, au département de biologie, faculté SNVSTU, université de Tlemcen, qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury de mémoire.

A Mme Sari L., Maître de conférences B, à la faculté de médecine, université de Tlemcen, qui a accepté de consacrer de son temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit, qu'elle trouve ici le témoignage de notre respectueuse gratitude.

J'adresse l'expression de mes sentiments les meilleurs à tous les enseignants de la faculté SNVSTU, université de Tlemcen, de m'avoir transmis leur savoir par ce travail, et M^r Rahmoun N. ingénieur de notre laboratoire pour son aide et soutien sur le plan pratique.

Mes vifs remerciements vont aussi à tout le personnel hospitalier avec qui j'ai collaboré durant ce travail. Je pense tout particulièrement au personnel du service de Chirurgie A du CHU de Tlemcen et l'unité de néonatalogie d'EHS de Tlemcen, merci pour votre contribution dans ce travail.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
1. Généralités	2
2. Caractères morphologiques de <i>Cryptococcus neoformans</i>	6
3. Phases de formation du biofilm de <i>Cryptococcus neoformans</i>	10
4. Architecture des biofilms	14
5. Résistance des biofilms aux antimicrobiens	19
Matériel et méthodes	
1. Prélèvements, isolement et identification de <i>Cryptococcus neoformans</i>	22
1.1. Prélèvements	22
1.2. Isolement et purification.....	23
1.3. Identification	23
1.3.1. Culture sur gélose maltosée de sabouraud.....	23
1.3.2. Technique d'encre de chine.....	23
1.3.3. Identification biochimique (Api Candida).....	23
2. Evaluation du potentiel des souches étudiées à former des biofilms	25
2.1. Détermination des CMI et des SCMI	25
2.1.1. Détermination des CMI	25
2.1.2. Test de réduction du XTT	26
2.1.3. Détermination des SCMI.....	27
a. Préparation des souches	27
b. Formation des biofilms.....	27
c. Test antifongique	28
2.2. Effet de la concentration cellulaire de départ sur les CMI et les SCMI	29
2.3. Détermination des SCMI au cours des phases de formation des biofilms.....	29
2.4. Effet du renouvellement du milieu de culture sur les SCMI	30

Résultats et discussion

1. Prélèvements, isolement et identification de <i>Cryptococcus neoformans</i>	31
2. Evaluation du potentiel des souches isolées à former les biofilms.....	33
2.1. Détermination des CMI et des SCMI	33
2.1.1. Détermination des CMI par la méthode de NCCLS M27-A	33
2.1.2. Détermination des CMI par la méthode de Ramage et coll., (2001)	35
2.2. Effet de la concentration cellulaire de départ sur les CMI et les SCMI	37
2.3. Détermination des SCMI au cours des phases de formation des biofilms.....	38
2.4. Effet du renouvellement du milieu de culture sur les SCMI	44
Conclusion générale	46
Références bibliographiques	48

Annexes

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

SCMI : Sessile Concentration Minimale Inhibitrice

Ab : Anti body « Anticorps »

AmB : Amphotéricine B

CHU : Centre hospitalo-universitaire

EHS : Etablissement hospitalier spécialisé

VIH : Virus d'immunodéficience humain

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

PBS: Phosphate Buffered Saline

RPMI: Roswell Park Memorial Institut

ATCC: American Type Culture Collection

CLIN : comité de lutte contre les infections nosocomiales

EPS : Exopolymeric substances

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Visualisation de deux levures capsulées dans le liquide céphalorachidien observé au microscope après dilution dans l'encre de chine (grossissement x 1000).

Photo 2 : Biofilms de *Cryptococcus neoformans* B3501 formés sur des cathéters en polyvinyle *in vitro*.

Photo 3 : Microscopie électronique à balayage d'un biofilm mature (48h) formé par *Cryptococcus neoformans* B3501 sur une lamelle de verre.

Photo 4 : Microscopie optique du développement du biofilm de *Cryptococcus neoformans* B3501.

Photo 5 : Microscopie électronique confocale d'un biofilm mature de *Cryptococcus neoformans* formé dans une microplaque en polystyrène.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : les différentes phases de la formation des biofilms microbiens.

Figure 2 : Modèle d'inhibition médié par les anticorps dans la formation du biofilm de *Cryptococcus neoformans*.

Figure 3 : Détermination des SCMI de l'AmB des souches de références de *C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* 444 IP et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* durant les différentes phases de formation des biofilms.

Figure 4 : Evolution de la résistance du biofilm de *Cryptococcus neoformans* au cours des différentes phases de sa formation vis-à-vis de l'AmB.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N° 1 : Répartition des prélèvements entre les deux services.

Tableau N° 2 : Nombre de prélèvements et de souches de *Cryptococcus neoformans* isolées dans chaque service.

Tableau N° 3 : Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* selon le protocole du NCCLS M27-A.

Tableau N° 4 : CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* selon les protocoles de NCCLS M27-A et de Ramage et coll., (2001).

Tableau N° 5 : CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* à une concentration cellulaire de départ de 10^8 cellules/ml.

Tableau N° 6 : SCMI de l'AmB vis-à-vis des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* durant la formation des biofilms à une concentration cellulaire de départ de 10^6 cellules/ml.

Tableau N° 7 : CMI de l'AmB vis-à-vis des cellules sessiles des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* avec des milieux de culture renouvelés à des concentrations cellulaires de départ de 10^6 et 10^8 cellules/ml.

INTRODUCTION

Introduction

Les cathéters veineux périphériques, sont les implants médicaux les plus utilisés en milieu hospitalier, avec un pourcentage de 30 à 80% de patients exigeant ce genre de dispositif durant leurs hospitalisation [(Lederle et coll., 1992) ; (Pujol et coll., 2007) ; (Zingg et Pittet, 2009)].

Ces derniers, largement utilisés, présentent un problème majeur de santé publique, et constituent des supports importants d'adhésion des microorganismes d'où la formation des biofilms. Par conséquent, les patients sont face à un risque potentiel par ces communautés qui servent de sources de microorganismes, à la fois résistants aux antimicrobiens et aux défenses immunitaires.

Plusieurs études sur le plan médical ont été réalisées concernant les biofilms bactériens, alors que ceux d'origine fongique, notamment ceux liés à la levure *Cryptococcus neoformans* demeurent moins éclaircis, et beaucoup de choses sont jusqu'à présent mal comprises.

Les cryptococcoses sont des mycoses cosmopolites affectant principalement les immunodéprimés, causant des neuroméningites mortelles. Leur traitement est difficile, en raison de l'absence d'antifongiques à la fois efficaces et non toxiques. De plus, la résistance de ces levures aux agents antifongiques est un facteur limitant leur éradication. Cette résistance est plus importante dans le cas des biofilms.

C'est dans ce cadre que notre étude a été entreprise au service de chirurgie A du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Tlemcen et du service de néonatalogie de l'établissement hospitalier spécialisé (EHS) hôpital mère et enfant de Tlemcen.

Elle consiste à rechercher et à isoler les levures de *Cryptococcus neoformans* à partir des cathéters veineux périphériques en chlorure de polyvinyle (PVC), directement après leurs ablations et de vérifier leur pouvoir à former des biofilms, et enfin de tester leur résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B en calculant les Concentrations Minimales Inhibitrices «CMI» et les Sessiles Concentrations Minimales Inhibitrices «SCMI» (des biofilms) selon différents protocoles.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités

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

Depuis les trois dernières décennies, on a assisté à une augmentation drastique des infections fongiques systémiques en raison de l'extension de la population immunodéprimés, résultant principalement de la transplantation d'organes, le traitement du cancer et l'infection à VIH **[(Bohme et Karthaus, 1999); (Brown, 2004); (Rapp, 2004)]**.

En effet, la méningite cryptococcique, causée par la levure *Cryptococcus neoformans*, peut causer plus de 30 % de mortalité chez les patients porteurs du SIDA dans les régions pauvres telles que l'Asie du sud **[(Chariyalertsak et coll., 2001); (Helbok et coll., 2005); (Kumarasamy et coll., 2005)]** et l'Afrique subsaharienne **[(Casadevall et Perfect, 1998); (Hakim et coll., 2000); (Holmes et coll., 2003); (Kohno, 2005)]**.

La cryptococcose est une infection grave due à une levure capsulée *Cryptococcus neoformans*. Elle survient le plus souvent sur un terrain de déficit immunitaire. C'est une infection opportuniste au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dont l'épidémiologie a profondément évolué ces dernières années **(Dromer et Lortholary, 2004)**.

La cryptococcose se présente le plus souvent sous la forme d'une méningoencéphalite disséminée dont la mortalité aiguë est de 100 % en l'absence de prise en charge thérapeutique adaptée, et de l'ordre de 20 % malgré les traitements antifongiques, y compris chez les patients sans facteurs de risque sous-jacent **(Dromer et Lortholary, 2004)**.

On note également l'émergence d'infections mycosiques profondes sur cathéters **(López-Ribot, 2005)**.

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

La mise en évidence de *Cr. neoformans* dans un prélèvement biologique implique la recherche d'autres localisations et la mise en route rapide du traitement. La prise en charge thérapeutique (choix des antifongiques, traitement de l'hypertension intracrânienne, ou chirurgie) dépend de la gravité des localisations et du terrain sous-jacent **(Dromer et Lortholary, 2004)**.

Il existe deux variétés de l'espèce *Cryptococcus neoformans* qui sont les seules représentantes du genre *Cryptococcus* pathogènes pour l'homme. Il s'agit de *Cr. neoformans* var. *neoformans* (sérotypes A et D) et *Cr. neoformans* var. *gattii* (sérotypes B et C). Actuellement, *Cr. neoformans* var. *gattii* est classée comme une seule variété, et les sérotypes A et D sont séparés pour donner deux variétés différentes : *Cr. neoformans* var. *grubii* (sérototype A) et *Cr. neoformans* var. *neoformans* (sérototype D) **[(Kwon-Chung et Varma, 2006); (Lin et Heitman, 2006)]**.

La prévalence de l'exposition à *Cryptococcus neoformans* est élevée puisque 80 % des sujets ont des anticorps anti-*Cr. neoformans* en l'absence de cryptococcose, **(Goldman et coll., 2001)**, mais la maladie est relativement rare et survient, le plus souvent sur un terrain de déficit profond de l'immunité cellulaire **(Dromer et Lortholary, 2004)**.

De plus, l'utilisation des cathéters a connu un essor considérable lié aux progrès médicaux. Cependant, la principale complication liée à cette manipulation est l'infection **[(Hennequin, 1996); (Veyssier et coll., 1998); (Boo et coll., 2005)]**.

Plusieurs rapports d'infections à *Cryptococcus neoformans* sur des fistules de dialyse et des prothèses valvulaires cardiaques constituées de polytetrafluoroéthylène mettent en évidence la capacité de ces microorganismes d'adhérer à des dispositifs médicaux **[(Braun et coll., 1994); (Banerjee et coll., 1997); (Penk et Pittrow, 1999)]**.

Il est donc possible de trouver des infections à *Cryptococcus neoformans* sur des cathéters.

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

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

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

Les biofilms sont définis comme étant des communautés microbiennes structurées qui sont attachées fortement à une surface de manière irréversible et encastrées dans une matrice de substance exo-polymérique (EPS) qui peut occuper jusqu'à 75 % ou plus du volume d'un biofilm mature **[(Monds et O'toole, 2008); (Kokar et coll., 2009)]**.

La formation du biofilm comporte des changements considérables dans la forme et la fonction qui constituent la transition vers le mode dominant de la vie microbienne **[(Donlan et Costerton, 2002); (Monds et O'toole, 2008)]**.

Beaucoup d'études sont réalisées sur les biofilms bactériens **[(Beloin et coll., 2008); (Otto, 2008)]**, alors que les biofilms fongiques sont restés dans l'ombre **(Robertson et Casadevall, 2009)**. *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* sont connues par leurs capacités à former les biofilms **[(Ramage et coll., 2005); (Robertson et Casadevall, 2009)]**.

Les biofilms constitués d'innombrables cellules cryptococciques enfermées dans une matrice polysaccharidique peuvent causer des cas de cryptococcoses humaines **(Walsh et coll., 1986)**.

Cryptococcus neoformans peut former les biofilms sur une gamme de surface y compris le verre, le polystyrène, le polyvinyl et les dispositifs médicaux comme les cathéters **(Martinez et Casadevall, 2007)**.

De ce fait, les infections associées aux biofilms sur ces implants médicaux représentent un problème majeur d'infections nosocomiales **[(Chandra et coll., 2005); (Nett et coll., 2007)]**.

Les biofilms peuvent être causés par une seule espèce microbienne ou par un ensemble d'espèces bactériennes et/ou fongiques **(Douglas, 2003)**.

Ils constituent le mode prédominant de l'infection microbienne liée aux dispositifs médicaux. Ce sont des niches protectrices pour les microorganismes qui se trouvent à l'abri des traitements antimicrobiens et des défenses immunitaires de l'hôte **[(Chandra et coll., 2001a); (Kuhn et coll., 2002a et b); (Soll, 2008)]**.

De plus, Martinez et Casadevall, (2006a), ont montré que les biofilms de *Cryptococcus neoformans* réduisent considérablement la sensibilité à l'amphotéricine B et à la caspofungine ce qui rend leurs traitements difficile à réaliser, et présentent un grand problème de santé publique.

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

La sévérité de la pathologie sous-jacente, la durée d'exposition aux techniques invasives et l'immunodépression éventuelle représentent des facteurs de risques majeurs de ces infections, ce qui facilite la rencontre avec des biomatériaux implantés et la plupart des surfaces d'accueil **(Ramage et coll., 2005)**.

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

2. Caractères morphologiques de *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans est une levure encapsulée, sphérique ou ovale, à bourgeonnement uni et multilatéral, donnant des colonies blanches à crèmes, opaques, mucoïdes et peut être de plusieurs millimètres de diamètre [(Mitchell et Perfect, 1995); (Casadevall et Perfect, 1998)].

C'est un champignon au caractère opportuniste qui cause des méningo-encéphalites chez les patients immunodéprimés, et peut entraîner occasionnellement la maladie chez les sujets sains (Mitchell et Perfect, 1995).

Il peut exister en tant que hyphes ou pseudohyphes chez certaines souches (Casadevall et Perfect, 1998).

La cellule de *Cryptococcus neoformans* possède un élément qui la distingue des autres levures d'intérêt médicale : la capsule polysaccharidique, formée principalement par le glucuronoxylomannane (GXM) constitué de l'acide glucuronique, de xylose et de mannose, qui joue un rôle majeur dans sa virulence [(Mitchell et Perfect, 1995); (Casadevall et Perfect, 1998); (Vecchiarelli, 2000)].

La capsule est connue par la présence d'un halo clair entourant une levure après mélange du liquide biologique (ou mieux, d'un culot de centrifugation) avec une suspension d'encre de chine qui permet le diagnostic (Photo 1). Certaines levures sont très peu capsulées, rendant difficile le diagnostic et prêtant à confusion avec d'autres levures exceptionnellement responsables de méningites (*Candida*, *Histoplasma sp*) (Dromer et Lortholary, 2004).

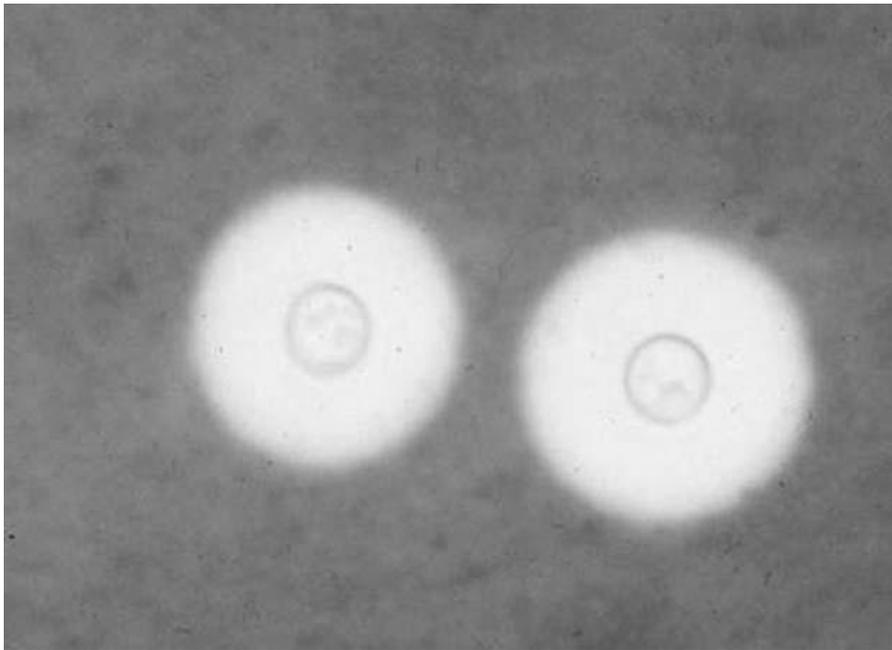


Photo 1 : Visualisation de deux levures capsulées dans le liquide céphalorachidien observé au microscope après dilution dans l'encre de chine (grossissement x 1000) (**Dromer et Lortholary, 2004**).

De grandes quantités de GXM sont libérées lors de l'infection cryptococcique, causant des effets délétères sur la réponse immunitaire de l'hôte **[(Casadevall et Perfect, 1998); (Vecchiarelli, 2000)]**.

De plus, en 2005, Martinez et Casadevall ont signalé que la libération du GXM de *Cryptococcus neoformans* est nécessaire pour l'adhésion à un support solide et la formation du biofilm. (Photos 2 et 3)

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

La libération du GXM lors de la formation du biofilm de *Cryptococcus neoformans*, contribue donc dans la résistance de ces communautés vis-à-vis du système immunitaire et les agents antimicrobiens entraînant par la suite des infections chroniques **(Martinez et Casadevall, 2006a et b)**.

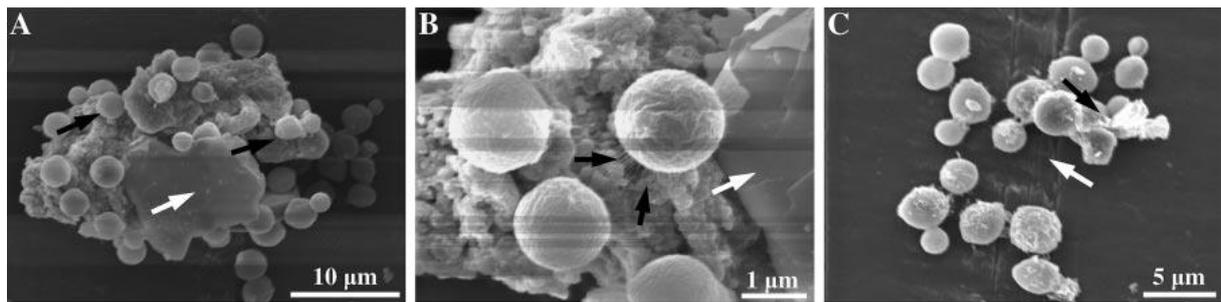


Photo 2 : Biofilms de *Cryptococcus neoformans* B3501 formés sur des cathéters en polyvinyle *in vitro* montrant une forte adhésion des cellules au substrat. Les flèches noire et blanche désignent le polysaccharide et le substrat respectivement (Martinez et Casadevall, 2007).

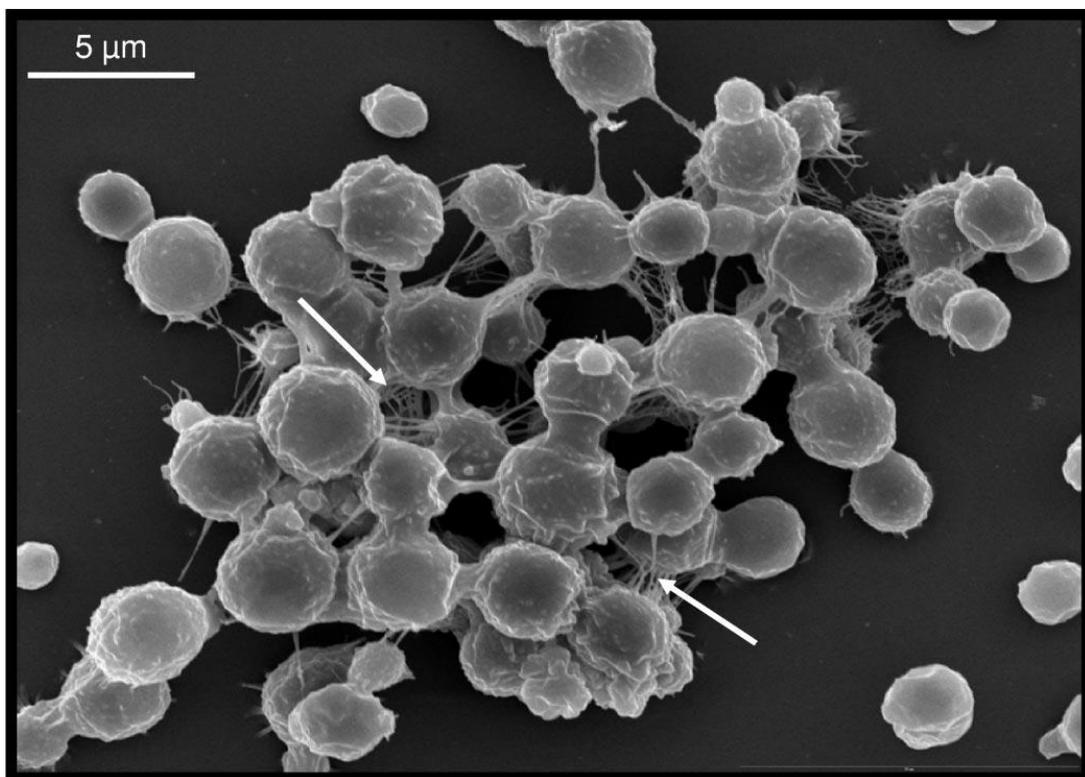


Photo 3 : Microscopie électronique à balayage d'un biofilm mature (48h) formé par *Cryptococcus neoformans* B3501 sur une lamelle de verre montrant ainsi des cellules reliées entre elles par de grandes quantités de polysaccharide. Les flèches désignent le polysaccharide (Martinez et Casadevall, 2005).

3. Phases de formation du biofilm de *Cryptococcus neoformans*

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

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

Ces étapes comprennent l'attachement des cellules à un substrat, la croissance et l'agrégation des cellules en microcolonies, la maturation et le maintien de l'architecture du biofilm [(Davey et coll., 2003); (Davies et coll., 1998)]. (Figure 1)

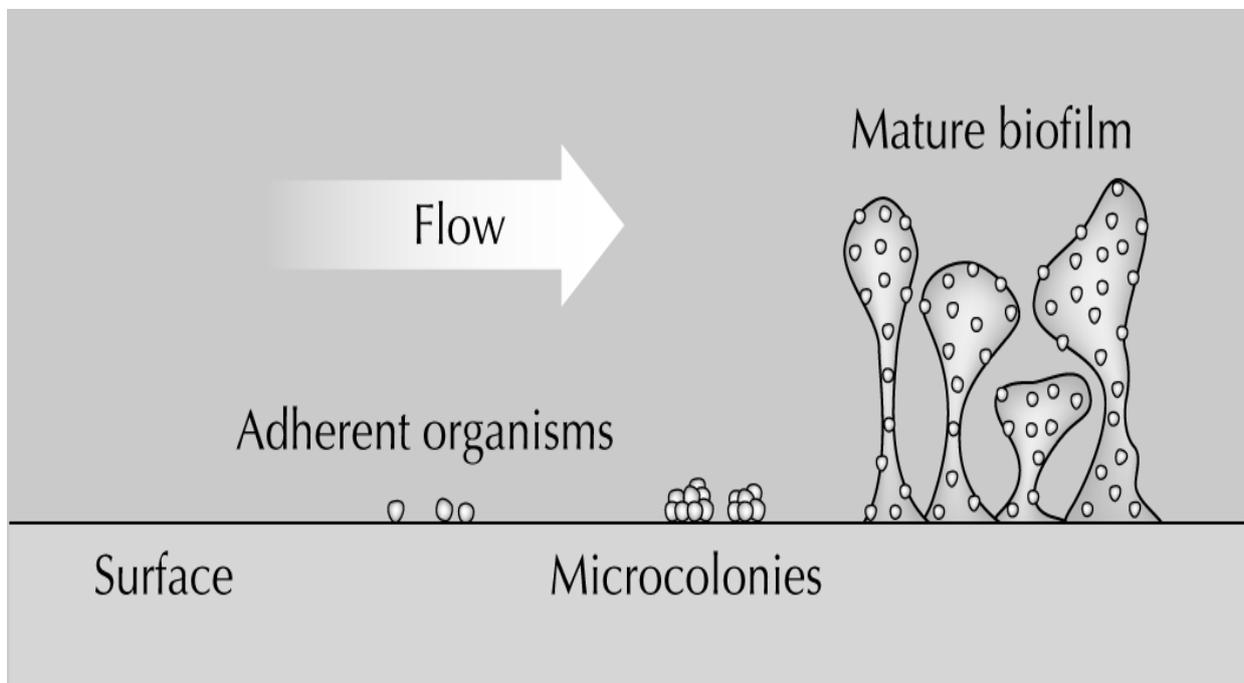


Figure 1 : les différentes phases de la formation des biofilms microbiens (Bell, 2001).

La formation du biofilm commence par une adhésion des microorganismes à la surface suivie par une cascade d'expression génétique résultant par le phénotype biofilm **(Martinez, 2006)**.

Pour certains microbes, les structures de la surface cellulaire comme les fimbriae, les flagelles et les capsules, influencent le taux et l'extension de l'adhérence des cellules microbiennes **(Bullit et Makowski, 1995)**.

Le polysaccharide capsulaire des *Cryptococcus neoformans* fournit à ces levures un avantage dans le processus d'adhésion, ainsi, la nature dynamique de la capsule permet à ces cellules d'adhérer à plusieurs substrats favorisant l'attachement à ces supports **(Martinez et Casadevall, 2005)**.

La phase intermédiaire de la formation du biofilm est caractérisée par une agrégation homogène des cellules flottantes à la surface du substrat sous forme de microcolonies **(Martinez, 2006)**.

Le biofilm mature est constitué d'un arrangement dense de cellules encastrées dans une quantité importante de matériel exopolymérique qui peut être plat ou en forme de champignon dépendant de la source nutritive **[(Stoodley et coll., 2001); (Hall-Stoodley et coll., 2004)]**.

Selon Martinez et Casadevall en 2005, La formation du biofilm par *Cryptococcus neoformans* suit une séquence d'évènements discrets y compris la phase d'adhésion et la phase de formation des microcolonies connues par un métabolisme actif et enfin la phase de production de la matrice extracellulaire. (Photo 4)

- Phase d'adhésion (2 à 4 h) : les cellules de *Cryptococcus neoformans* se trouvent fermement attachées à la surface du substrat sous forme de monocouche et apparaissent en fort état de croissance par la présence des cellules bourgeonnantes. (Photo 4 A et B)
- Phase intermédiaire (8 à 16 h) : le nombre de cellules augmente significativement et ces levures se propagent tout au long du substrat formant des microcolonies. (Photo 4 C et D)

Synthèse bibliographique

- Phase de maturation (24 à 48 h) : durant cette étape l'architecture du biofilm devient plus complexe par l'excrétion croissante du matériel extracellulaire qui entoure les cellules et produit des structures compactes qui sont attachées avec ténacité au substrat. (Photo 4 E et F).

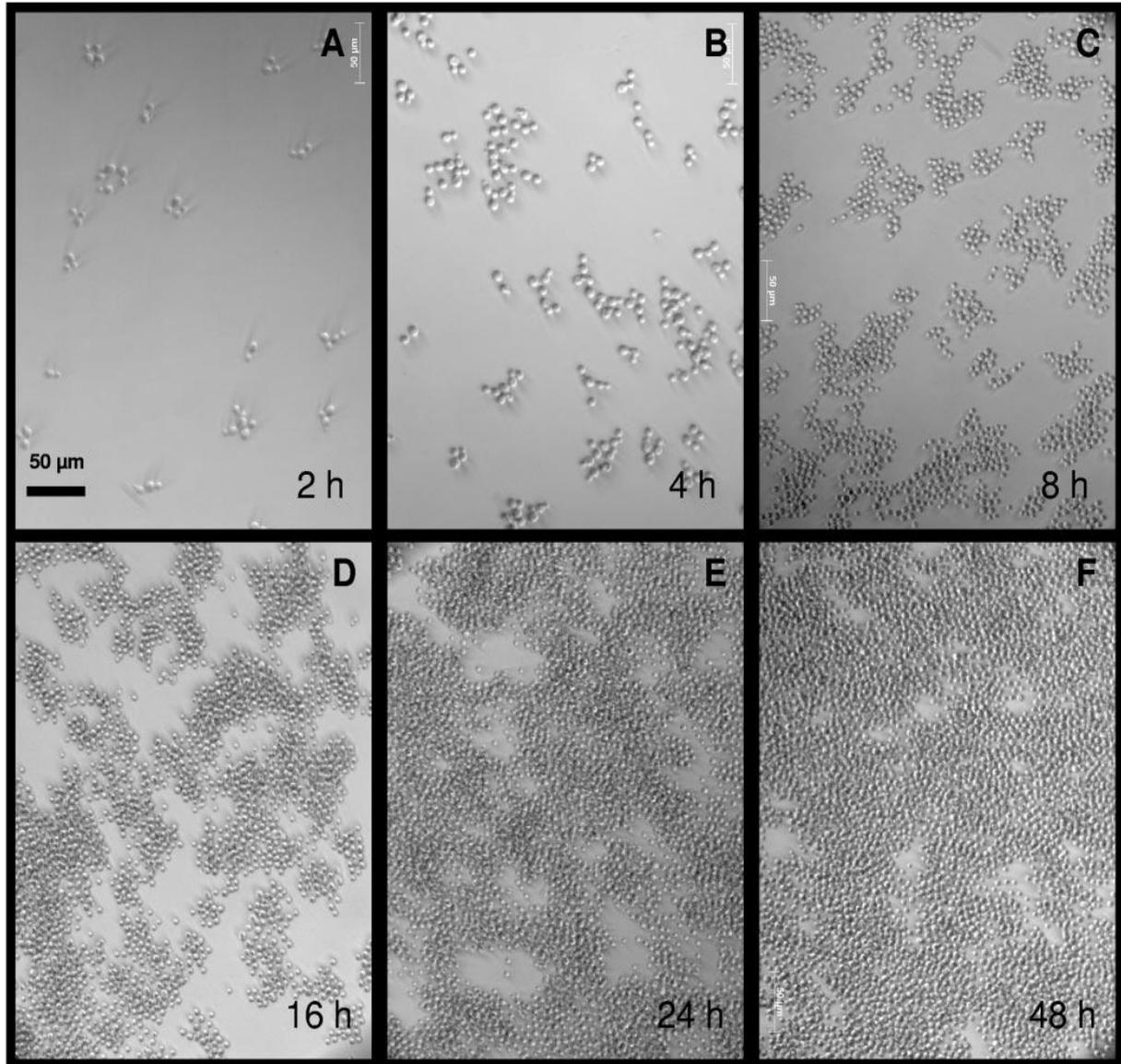


Photo 4 : Microscopie optique du développement du biofilm de *Cryptococcus neoformans* B3501 après lavage puissant par le laveur des microplaques. A et B: phase d'adhésion (2 à 4 h). C et D: phase intermédiaire (8 à 16 h). E et F: phase de maturation (24 à 48 h) **(Martinez et Casadevall, 2005)**.

De plus, les cellules dans le biofilm mature peuvent être détachées ou dispersées lentement d'une façon isolée ou sous forme d'agrégats cellulaires dans l'environnement conduisant à des maladies systémiques **(Martinez, 2006)**.

Ces étapes se déroulent en cycle et le retour des cellules à la phase planctonique complète le cycle de développement du biofilm. **[(Irie et Parsek, 2008); (Monds et O'toole, 2008)]**.

4. Architecture des biofilms

Les biofilms sont hétérogènes d'un point de vue structural. Ils se forment sur des support variés, ont des épaisseurs différentes et sont formés par des espèces variées de microorganismes **(De Rochemonteix, 2009)**.

Un biofilm est constitué d'une fine monocouche de cellules à sa base (fixées à la surface du substrat), surmonté de plusieurs couches épaisses de cellules enfermées dans une matrice et reliées par des canaux aqueux. Il s'agit d'une organisation spatiale stratifiée, permettant des échanges (informations, nutriments...) et une coopération entre microorganismes **[(Tolker-Nielsen et Molin, 2000); (De Rochemonteix, 2009)]**.

L'organisation stratifiée des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments, d'ions... Les nutriments présents dans le milieu extérieur diffusent en plus grande quantité dans les couches superficielles du biofilm. Plus on avance vers les couches profondes du biofilm, moins la diffusion est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont basses. Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différentes des microorganismes **(De Rochemonteix, 2009)**.

Martinez et Casadevall, (2005) rapportent que les biofilms de *Cryptococcus neoformans* ont une architecture très hétérogène, composé de cellules métaboliquement actives entrelacées avec la matrice extracellulaire polysaccharidique, et peuvent être constitués de trois couches distinctes : (Photo 5)

Synthèse bibliographique

- La couche basale poreuse du biofilm de *Cryptococcus neoformans* constituée de cellules entourées de leurs polysaccharides (GXM), ces derniers jouent un rôle important dans l'ancrage du biofilm à la surface du substrat.
- La couche intermédiaire, composée de cellules métaboliquement actives, à l'intérieur de cette couche se trouvent des canaux d'écoulement.
- La couche la plus superficielle du biofilm, composée d'une quantité importante de la matrice extracellulaire.

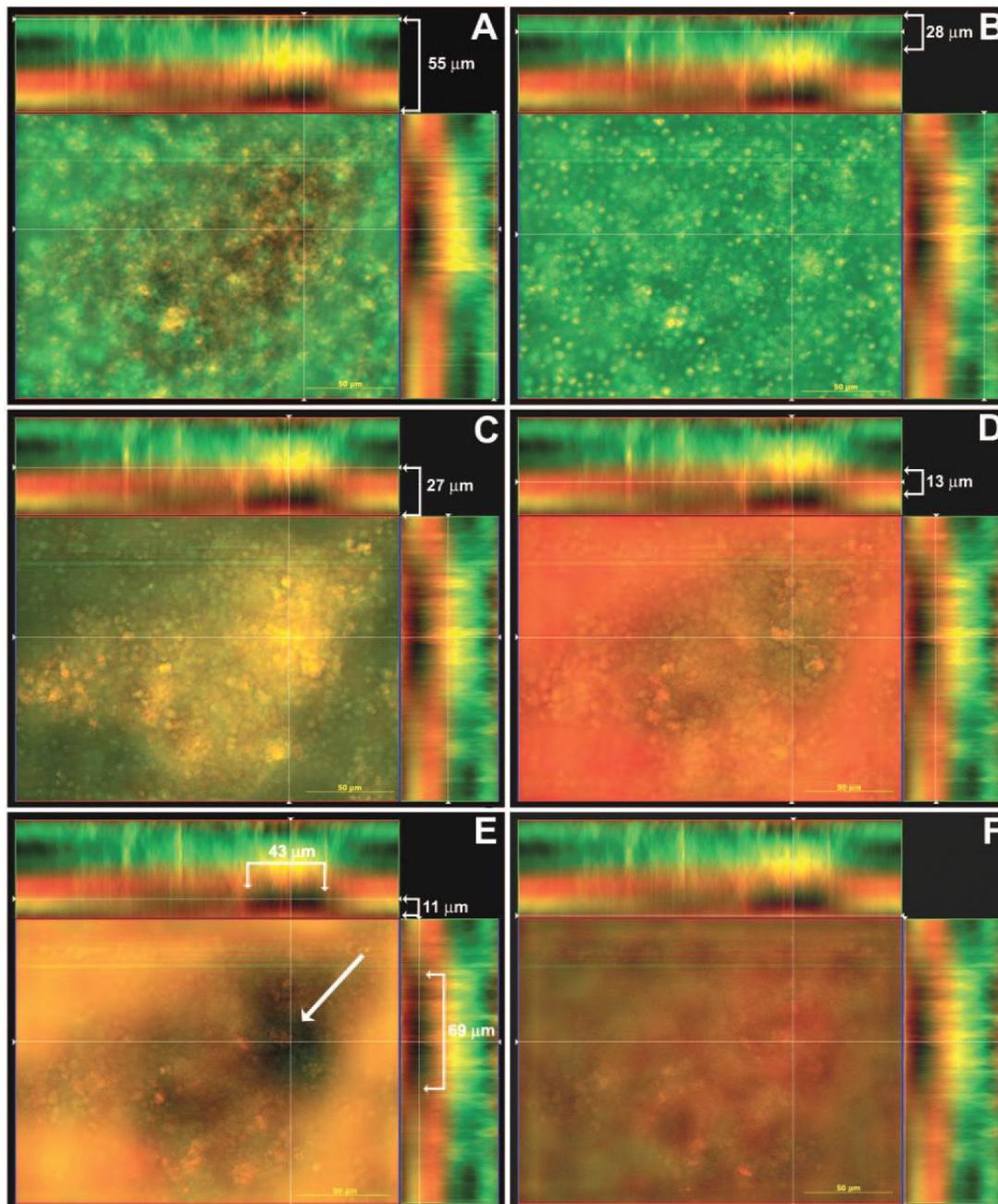


Photo 5 : Microscopie électronique confocale d'un biofilm mature de *Cryptococcus neoformans* formé dans une microplaque en polystyrène montre une architecture complexe. Les zones rouges représentent les cellules métaboliquement actives encastées dans une matrice extracellulaire polysaccharidique colorée en vert. A. le biofilm mature apparaît sous forme de structure complexe contenant une région de cellules métaboliquement actives entrelacées avec la matrice extracellulaire. L'épaisseur du biofilm est de 55 µm. B. les cellules formant le biofilm sont encastées dans une matrice exopolymérique qui fait à peu près 28 µm d'épaisseur. C. la photo représente l'interface qui sépare les cellules de la matrice exopolymérique et qui fait 27 µm d'épaisseur. D. cette photo montre la région des cellules les plus métaboliquement actives et qui mesure 13 µm d'épaisseur. E. un canal d'écoulement apparaît comme une tache sombre à l'intérieur du biofilm, il mesure 69 µm de long et 43 µm de large. La flèche désigne ce canal. F. les cellules de la couche basale poreuse apparaissent en double coloration rouge et verte donnant le jaune, représentant ainsi les levures entourées de leurs polysaccharides. Bar, 50 µm (Martinez et Casadevall, 2005).

Il en résulte la formation d'un biofilm mature, constitué d'un arrangement dense de cellules encastrées dans la matrice extracellulaire et le glucuronoxylomannane (GXM). Cette organisation structurale et la présence des canaux d'écoulement permettent l'échange des nutriments et des gaz, tout en offrant un environnement protégé contre les prédateurs, les cellules immunitaires, les forces de cisaillement et les agents antifongiques **(Martinez et Casadevall, 2005)**.

On connaît la présence dans la matrice extracellulaire du biofilm de *Cryptococcus neoformans* d'autres sucres qui sont absents dans le GXM, comme le glucose, le ribose et le fucose **(Martinez et Casadevall, 2007)**.

De plus, des études ont montré que les souches non capsulées de *Cryptococcus neoformans* ne forment pas de biofilms, même l'utilisation des anticorps anti polysaccharide pour les souches capsulées donne les mêmes résultats, cela montre que le GXM, le composant principal de la capsule est nécessaire dans la formation du biofilm **(Martinez et Casadevall, 2005)**. (Figure 2)

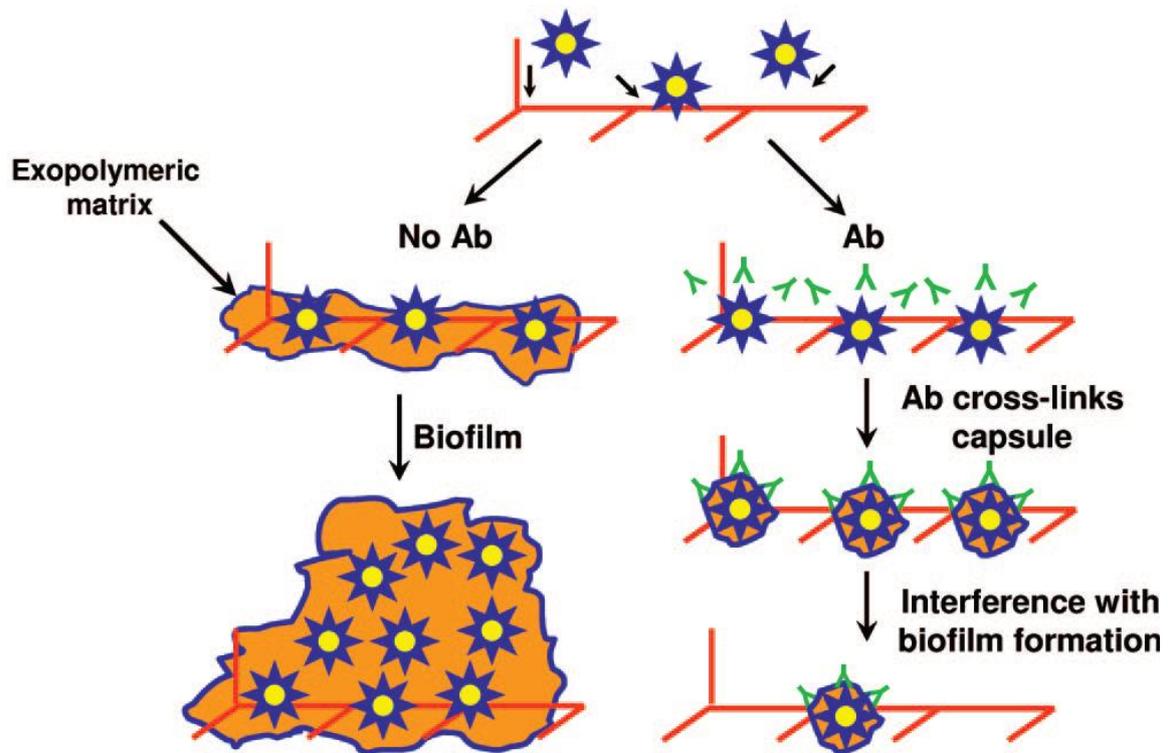


Figure 2 : Model d'inhibition médiée par les anticorps dans la formation du biofilm de *Cryptococcus neoformans*. En absence d'anticorps anti capsule, les cellules libèrent le polysaccharide qui favorise la fixation au substrat. En présence d'anticorps, les immunoglobulines empêchent la libération du polysaccharide, cela bloque l'adhésion des levures au substrat (Martinez et Casadevall, 2005).

La matrice extracellulaire des biofilms peut contenir jusqu'à 98% d'eau, cette forte teneur est due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogènes, permettant de lutter contre la dessiccation de certains biofilms dans le milieu naturel [(Donlan, 2001a); (De Rochemonteix, 2009)].

Parfois, la couche la plus externe de la matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland, 2001).

5. Résistance des biofilms aux antimicrobiens

Les biofilms microbiens sont notoirement résistants à une variété d'agents antimicrobiens, y compris les antibiotiques, antiseptiques et les biocides industriels (Douglas, 2002 et 2003).

Ces biofilms représentent la cause fréquente des infections chroniques des dispositifs médicaux à séjour, comme les cathéters avec un taux de 25% (Martinez, 2006).

Bien que l'activité métabolique diffère entre les cellules planctoniques et sessiles, les biofilms représentent une niche pour les micro-organismes où ils sont protégés à la fois du système immunitaire de l'hôte et de la thérapie antimicrobienne (Andes et coll., 2004); (Peeters et coll., 2008)].

Les infections liées aux biofilms fongiques sont souvent réfractaires aux traitements habituels en raison de la résistance aux agents antimicrobiens [(Bachmann et coll., 2002); (Lafleur et coll., 2006)].

La résistance des biofilms de *Cryptococcus neoformans* aux agents antifongiques et aux défenses immunitaires a été bien illustrée, ces communautés microbiennes sont plus résistantes à l'amphotéricine B et au système immunitaire que les cellules planctoniques (Martinez et Casadevall, 2006a et b).

En effet, en présence d'amphotéricine B à des concentrations finales de 4 et 8 µg/ml, l'activité métabolique du biofilm de *Cryptococcus neoformans* est réduite de 35 et 50% respectivement. Par contre, une concentration finale d'antifongique égale à 0,5 µg/ml suffit pour réduire l'activité métabolique des cellules planctoniques de *Cr. neoformans* d'une façon significative (Martinez et Casadevall, 2006a).

Il est à noter que les cellules sessiles de *Cryptococcus neoformans* ainsi que leurs homologues planctoniques sont totalement résistantes au fluconazole et voriconazole **(Martinez et Casadevall, 2006a)**.

Di Bonaventura et coll., (2006) ainsi que Tre-Hardy et coll., (2008) ont montré que les bactéries et les champignons sont 1000 fois plus résistants à la thérapie antimicrobienne que leur homologues planctoniques dans plusieurs variétés de biofilms *in vivo* et *in vitro*, bien que cette résistance soit mal comprise.

Plusieurs facteurs sont responsables de l'évolution de la résistance des biofilms aux antifongiques, entre autre, la complexité structurale et l'augmentation de la densité cellulaire du biofilm, l'état physiologique des cellules, et l'expression des gènes des biofilms **[(Ramage et coll., 2002a); (Perumal et coll., 2007)]**.

L'architecture des biofilms et la présence du matériel exopolymérique peut réduire la diffusion des médicaments antifongiques **(Ramage et coll., 2010)**.

Le matériel exopolymérique complexe pourrait servir de protecteur contre les cellules phagocytaires et aussi d'échafaudage pour maintenir l'intégrité du biofilm **(Blankenship et Mitchell, 2006)**.

Par ailleurs, la présence des canaux d'écoulement permettent le passage de ces cellules et leurs molécules effectrices sans affecter les cellules du biofilm entourées de leur matrice exopolymérique **(Martinez et Casadevall, 2006b)**.

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

L'augmentation de la résistance aux antifongiques est induite par l'adhésion des cellules aux surfaces, elle est associée à une augmentation concomitante de l'activité métabolique du développement du biofilm **[(Mateus et coll., 2004); (Nett et coll., 2008)]**.

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

Cette résistance pourrait être due, en partie, à la surface induite par la sup-régulation des pompes à efflux (**Jabra-Rizk et coll., 2004**). Ces dernières sont codées par la majorité des gènes qui contribuent à la résistance aux différents traitements antimicrobiens [(**Chandra et coll., 2001a**); (**Douglas, 2002**); (**Harry et coll., 2002**); (**Ramage et coll., 2002a**); (**White et coll., 2002**)].

En effet, les biofilms constituent une barrière physique qui empêchent la pénétration efficace des médicaments antimicrobiens, conférant ainsi à ces communautés, une plus grande résistance vis-à-vis de l'activité antimicrobienne que leurs homologues planctoniques [(**Chandra et coll., 2001a**); (**Hall-Stoodley et coll., 2004**)].

Actuellement, les stratégies pour prévenir la colonisation microbienne des cathéters incluent l'imprégnation de ces matériaux avec des médicaments antimicrobiens, pour modifier la composition chimique du polymère, et changer les propriétés physiques de la surface. Malheureusement, ces approches n'ont pas été efficaces pour réduire la formation des biofilms (**Martinez, 2006**).

Néanmoins, Bachmann et coll.,(2002) et (2003), Kuhn et coll., (2002b) et Ramage et coll., (2002b), ont signalé l'efficacité de quelques agents antifongiques vis-à-vis des biofilms fongiques, particulièrement les formulations liposomales de l'amphotéricine B et les échinocandines. De leur côté, Martinez et coll., (2010) ajoutent que le chitosane peut être utilisé comme un agent antimicrobien pour la prophylaxie et/ou le traitement des cathéters, ou autre implants médicaux, contre leurs infections par les biofilms fongiques.

Pour mettre le point sur ce genre d'infections et, afin d'évaluer la sensibilité des biofilms de *Cryptococcus neoformans* vis-à-vis de l'amphotéricine B, nous avons procédé à l'isolement de souches directement des cathéters veineux périphériques afin de déterminer leurs capacités à former des biofilms et de calculer les CMI et les SCMI «des cellules sessiles» de l'amphotéricine B à l'égard de ces souches.

MATERIEL ET METHODES

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

1. Prélèvements, isolement et identification de *Cryptococcus neoformans*

1.1. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués entre Janvier et Juin 2010 au niveau du service de chirurgie A du CHU de Tlemcen et du service de néonatalogie de l'EHS (hôpital mère et enfant) de Tlemcen (Tableau N°1).

Ces prélèvements ont été réalisés à partir des cathéters veineux périphériques en chlorure de polyvinyle (PVC) placés depuis 48 heures et plus, selon les recommandations de Quinet, (2006).

Les cathéters sont pris directement des patients et mis dans le milieu sabouraud liquide. Afin d'éviter toute contamination, les tubes sont ouverts devant une torche, flambés puis vite refermés après coupure des extrémités distales des cathéters à l'aide de ciseaux stériles. Les tubes sont, ensuite, agités au vortex pendant une minute, selon la technique décrite par Brun-Buisson et coll., (1987).

Les tubes contenant les échantillons sont marqués et incubés à l'étuve à 37°C pendant 24 heures à 21 jours.

Tableau N°1 : Répartition des prélèvements entre les deux services.

Service	Nombre de prélèvements	Taux de prélèvements (%)
Chirurgie A	144	51,25
Néonatalogie	137	48,75
Total	281	100

1.2. Isolement et purification

À partir des tubes présentant un trouble, des boîtes de pétri préalablement coulées avec la gélose sabouraud sontensemencées par stries, puis incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Ensuite, une colonie est prélevée de la gélose, repiquée dans le milieu sabouraud liquide stérile et incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures. Chaque souche pure estensemencée sur gélose sabouraud inclinée en tube puis incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures et conservée à 4°C.

1.3. Identification

L'identification des souches isolées à partir des cathéters veineux périphériques est réalisée selon les tests macroscopiques, microscopiques et biochimiques

1.3.1 Culture sur gélose maltosée de sabouraud

On ensemence par stries une boîte de gélose de sabouraud, par une colonie qui présente à l'état frais, l'aspect de la levure *Cryptococcus*, les colonies sur ce milieu deviennent humides et coulantes (**Segretain et coll., 1979**).

1.3.2 Technique d'encre de chine

Dans un tube à hémolyse, on dilue une goutte d'encre de chine au 1/3. Ensuite on ajoute une petite colonie qui présente l'aspect du *Cryptococcus*. On prélève une goutte de cette suspension et on observe sous microscope au grossissement 10x40. Sur un fond noir les Cryptocoques présentent une capsule qui ne se colore pas par l'encre de chine (**Drouhet et Vieu, 1957**).

1.3.3 Identification biochimique (Api Candida)

API Candida est un système standardisé pour l'identification en 18-24 heures des levures notamment les plus rencontrées en microbiologie clinique.

La galerie API Candida comporte 10 tubes contenant des substrats déshydratés, pour réaliser 12 tests d'identification : acidification de cinq sucres [glucose (GLU), galactose (GAL), saccharose (SAC), trehalose (TRE) et raffinose (RAF)] et sept réactions enzymatiques [β -maltosidase (β -MAL), α -amylase (α -AMY), β -xylosidase

Matériel et Méthodes

(β -XYL), β -glucuronidase (β -GUR), hydrolyse de l'urée (URE), N-acetyl- β -glucosaminidase (β -NAG) et β -galactosidase (β -GAL)].

À partir d'une culture jeune sur boîte de pétri de 18 à 24 heures, on prélève une ou plusieurs colonies identiques bien isolées et on réalise dans le NaCl à 0,85% une suspension d'opacité égale à celle de l'étalon de 3 McFarland (Annexe 1). La suspension de levures est ensuite répartie dans les tubes en évitant de faire des bulles, les cinq premiers tests des sucres plus celui de l'hydrolyse de l'urée sont recouverts par l'huile de paraffine.

Dans une boîte d'incubation, on dépose 5 ml d'eau [distillée, déminéralisée ou toute autre eau sans additif ou substance chimique susceptible de libérer des gaz (Cl_2 , CO_2 ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, puis on met dans cette boîte notre galerie API Candida et l'incubation se fait à $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 heures.

La lecture se fait visuellement en se reportant au tableau de la notice technique et les noter sous forme de + ou – sur la fiche de résultats. Il faut savoir que, les tubes 8 et 9 sont bifonctionnels et permettent la réalisation de 2 réactions dans le même tube : tube 8 : β XYL (test n° 8) / β NAG (test n° 11), tube 9 : β GUR (test n° 9) / β GAL (test n° 12).

L'identification se fait par codage des réactions en un profil numérique composé de quatre chiffres qui seront comparés avec ceux figurant dans la liste des profils, ou bien, par utilisation d'un logiciel d'identification « **apiweb**TM ».

La méthode d'identification api candida utilisée est celle décrite dans la notice du Kit de la plaque commercialisée (**bioMérieux® SA, REF 10 500, 08159H - FR - 2006/02**)

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

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

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

Seules les cellules adhérentes aux parois forment des biofilms, celles qui n'ont pas la capacité de les former vont être éradiquées suite au lavage. L'activité antifongique de l'amphotéricine B est testée sur des souches isolées des deux services cités précédemment.

2.1. Détermination des CMI et des SCMI

2.1.1 Détermination des CMI

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

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

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

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

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

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

La solution mère du ménadione (10 mM) a été préparée en dissolvant 0,017 g de ménadione dans 10 ml d'acétone. Juste avant utilisation, 10 ml de la solution mère du XTT est décongelée et additionnée de 1 μl de ménadione. Dans chaque puits de la microplaque (contrôles inclus), 100 μl de la solution XTT/ménadione sont ajoutés.

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

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

2.1.3 Détermination des SCMI

Pour les cellules sessiles (des biofilms), les SCMI des différentes souches sont déterminées selon la méthode de microdilution décrite par Ramage et coll., (2001). Il s'agit d'une méthode standard *in vitro* pour tester la susceptibilité antifongique des biofilms de *Cryptococcus neoformans*.

a. Préparation des souches

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

Les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 minutes puis lavées deux fois avec du tampon phosphate stérile (PBS) 10 mM, pH 7,4 additionnée de 2,7 mM de chlorure de potassium (KCl) et 137 mM de chlorure de sodium (NaCl). (Annexe 2)

Dans le milieu RPMI 1640 (Annexe 3) additionné de 2 % de glucose, les cellules sont réensemencées à une concentration cellulaire de départ égale à 10^6 cellules/ml dénombrées sur cellule de Thoma.

b. Formation des biofilms

Des microplaques de polystyrène pré-stérilisées sont utilisées pour la mise en évidence de la formation des biofilms. 100 μ l de la suspension de levure est placée dans chaque puits. Les microplaques sont, par la suite, convenablement recouvertes à l'aide du papier aluminium stérile. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 h. Cette opération est réalisée tout de suite après l'ajustement de la concentration cellulaire de départ de 10^6 cellules/ml.

c. Test antifongique

Après la formation du biofilm, le surnageant est aspiré et les cellules non adhérentes sont soigneusement enlevées par trois lavages successifs avec du PBS stérile. A cette fin, 100 µl du PBS sont ajoutés puis ré-aspirés. Le liquide résiduel du PBS est retiré en utilisant du papier buvard stérile.

L'aspiration du surnageant doit être effectuée avec soin pour éviter la destruction des biofilms.

Après avoir ajouté dans chaque puits de la microplaque 100 µl du milieu RPMI 1640 additionné de 2 % de glucose, nous avons incorporé la solution d'amphotéricine B. Pour ce faire, 100 µl d'une solution mère d'antifongique à une concentration de 128 µg/ml sont ajoutés au premier puits. Après homogénéisation du contenu du puits à l'aide d'une micropipette, nous avons prélevé 100 µl que nous avons ajouté au deuxième puits et ainsi de suite jusqu'au dernier où le volume récupéré est écarté.

Un témoin négatif et un témoin positif sont préparés en parallèle avec les échantillons. Le témoin négatif correspond à une incubation de l'amphotéricine B dans le milieu de culture en absence de levures. Par contre, le témoin positif consiste à incuber les levures en absence d'amphotéricine B.

Les microplaques ainsi préparées sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 48 h.

Les SCMI ont été déterminées en utilisant le test de réduction du tétrazolium décrit précédemment.

Pour chaque souche, nous avons répété l'expérience 3 fois.

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

En 2008, Seneviratne et ses collaborateurs, ont montré que la méthode de détermination des CMI décrite par le NCCLS ne suffit pas pour obtenir une vision globale de la sensibilité antifongique, en particulier lorsque les organismes sont en mode biofilm. Par conséquent, il est important de déterminer les CMI des agents antifongiques à une plus grande densité de cellules planctoniques et de biofilm.

De plus, selon Perumal et coll., (2007) une concentration cellulaire de départ égale à 10^8 cellules/ml influe sur la résistance des biofilms de *Candida albicans*. C'est pourquoi, nous avons voulu étudier l'effet de l'amphotéricine B sur les biofilms formés par les souches isolées de *Cryptococcus neoformans* à une concentration cellulaire de départ égale à 10^8 cellules/ml.

Il est à noter que pour ces expériences, nous avons suivi le protocole de Ramage et coll., (2001)

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

Selon Mateus et coll. (2004) et Peeters et coll. (2008), les biofilms fongiques ont été étudiés essentiellement en phase mature. Par conséquent, peu d'informations sont disponibles quant au comportement des cellules fongiques dans les premiers stades de formation du biofilm. Pour ce faire, nous avons testé l'effet de l'amphotéricine B sur la sensibilité des cellules sessiles durant les différentes phases de la formation des biofilms à savoir :

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

La méthode utilisée est celle décrite par Ramage et coll., (2001)

2.4. Effet du renouvellement du milieu de culture sur les SCMI

Pour étudier l'effet du renouvellement du milieu de culture sur les concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles après maturation des biofilms, nous avons effectué des expériences sur ces dernières en renouvelant le milieu de culture après 48 heures d'incubation à 37°C.

Nous avons testé les deux concentrations cellulaires de départ, 10^6 et 10^8 cellules/ml.

Après 48 heures d'incubation à 37°C, le surnageant est aspiré, les puits sont lavés avec le PBS 10 mM pH 7,4 et 100 µl du milieu RPMI 1640 additionné de 2 % de glucose sont incorporés aux différents puits de la microplaque. Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

La sensibilité des cellules à l'amphotéricine B est suivie selon le protocole décrit précédemment.

***RESULTATS ET
DISCUSSION***

La cryptococcose est une infection fongique qui affecte principalement les patients immunodéprimés, elle est causée par la levure *Cryptococcus neoformans*. Les poumons et le système nerveux central sont les sites les plus courants de cette infections, de plus, des fongémies et des lésions cutanées ont été décrites [(Leite et coll., 2004); (Pasqualotto et coll., 2004)].

Les cas de fongémie cryptococcique liées aux cathéters sont très rares à trouver. Par ailleurs, la colonisation des voies veineuses centrales par *Cryptococcus* a probablement été trouvée dans plusieurs hôpitaux mais sans publication (Tuon et coll., 2009).

Dans un cas étudié, l'auteur a affirmé que la colonisation du cathéter pourrait provenir de la peau ou pendant une fongémie. *Cryptococcus neoformans* est une levure qui se trouve fortement dans l'environnement, mais certains cas ont été signalés dans la section nosocomiale (Tuon et coll., 2009).

Partant de ces données, nous avons entrepris cette étude qui consiste à isoler des levures de *Cryptococcus neoformans* à partir des cathéters veineux périphériques usés au niveau du service de chirurgie A du CHU de Tlemcen et de service de néonatalogie de l'EHS de Tlemcen.

1. Prélèvements, isolement et identification de *Cryptococcus neoformans*

Le tableau N° 2 regroupe le nombre de prélèvements effectués au niveau des services de chirurgie A et néonatalogie ainsi que le nombre de souches de *Cryptococcus neoformans* isolées.

281 prélèvements ont été effectués au niveau des deux services, soit 144 au service de chirurgie A et 137 au service de néonatalogie.

4 souches de *Cryptococcus neoformans* ont été isolées, (Annexe 4) représentant 1,42 % de l'ensemble des prélèvements. Elles se répartissent dans les deux services comme suit : 1 souche du service de Chirurgie A et 3 souches du service de néonatalogie.

Tableau N° 2 : Nombre de prélèvements et de souches de *Cryptococcus neoformans* isolées dans chaque service.

Service	Nombre de prélèvements	Nombre de souches	Taux (%)
Chirurgie A	144	1	0,69
Néonatalogie	137	3	2,19
Total	281	4	1,42

En calculant le taux de souches isolées de *Cryptococcus neoformans* selon le nombre de prélèvements dans les deux services, nous remarquons que le taux dans le service de néonatalogie avec 2,19 % est plus élevé que celui de chirurgie A avec 0,69 %.

D'après ces mêmes résultats, nous constatons que le service le moins concerné par les contaminations des cathéters veineux périphériques par la levure *Cryptococcus neoformans*, selon le nombre de prélèvements, est le service de chirurgie A avec un taux très faible.

Ces résultats sont en accord avec les données de Tuon et coll., (2009), qui ont signalé la rareté de l'incidence des fongémies cryptococciques, de plus, et d'après les mêmes auteurs, les cas de colonisation des voies veineuses centrales trouvés dans certains hôpitaux n'ont pas été publiés, ce qui montre probablement une certaine ignorance vis-à-vis de ces infections.

En 1996, Hennequin a montré dans des travaux menés au sein d'un centre hospitalo-universitaire parisien que l'infection à *Cryptococcus neoformans* est très limitée : 14 cas en 3 ans dont 11 chez des patients atteints par le VIH et 3 chez des patients transplantés rénaux.

Hoang et coll., (2004) signalent que sur une période de cinq ans entre 1997 et 2002 à l'hôpital de Vancouver et le centre des sciences de la santé, 18 souches de *Cryptococcus neoformans* ont été isolées dont 10 à partir des patients HIV positifs, ce qui montre que l'immunodépression est un facteur important dans la dissémination de ces infections, sinon le taux reste toujours faible.

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

Selon Ramage et coll. (2001), l'accroissement des CMI chez les levures par rapport à la méthode du NCCLS M27-A témoigne de leur capacité à former des biofilms. C'est pourquoi, nous avons entrepris de déterminer les CMI des souches que nous avons isolé suivant les deux méthodes citées, celle du NCCLS M27-A et celle de Ramage et coll., (2001). L'ensemble des résultats de tous les tests de sensibilité à l'amphotéricine B des souches de références et des souches isolées sont regroupés dans l'annexe 5.

N'ayant pas de données concernant le *Cryptococcus neoformans* nous n'avons pu comparer nos résultats qu'avec ceux publiés sur la levure *Candida albicans*.

2.1. Détermination des CMI et des SCMI

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

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

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

Résultats et discussion

Pour les 4 souches isolées, les CMI de l'amphotéricine B sont toutes identiques et égale à 0,5 µg/ml. Cependant, ces CMI restent dans l'intervalle des CMI établies par Martinez et Casadevall, (2006a).

Tableau N° 3 : Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* selon le protocole du NCCLS M27-A.

Les souches	CMI (µg/ml) d'AmB « NCCLS M27-A »
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,5
<i>Candida albicans</i> 444 IP	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i> CH 67	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i> N 86	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i> N 137	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i> N 78	0,5

2.1.2 Détermination des CMI par la méthode de Ramage et coll., (2001)

Le tableau N° 4 regroupe les résultats des CMI de l'AmB, selon la méthode de Ramage et coll., (2001) des souches de références (*Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* 444 IP) et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans*.

Tableau N° 4 : CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* selon les protocoles de NCCLS M27-A et de Ramage et coll., (2001).

Les souches	CMI d'AmB (µg/ml) « NCCLS M27-A »	CMI d'AmB (µg/ml) « Ramage et coll., 2001 »
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	2
<i>C. albicans</i> 444 IP	0,5	4
<i>Cr. neoformans</i> CH 67	0,5	16
<i>Cr. neoformans</i> N 86	0,5	8
<i>Cr. neoformans</i> N 137	0,5	4
<i>Cr. neoformans</i> N 78	0,5	4

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

Toutes les souches de *Cryptococcus neoformans* isolées ont des CMI qui varient entre 4 et 16 µg/ml, ces valeurs sont nettement supérieures à celles obtenues par la méthode du NCCLS M27-A.

Résultats et discussion

Selon Ramage et coll., (2001), l'accroissement des CMI des souches de références et des 4 souches isolées témoigne de leur capacité à former des biofilms, dans ce cas, nous parlons de SCMI (CMI des cellules sessiles). (Annexe 5)

Contrairement à nos résultats, Martinez et Casadevall, (2006a) ont trouvé que les CMI de l'amphotéricine B de 3 souches de *Cryptococcus neoformans* sont égales à 0,5 µg/ml, alors que leurs SCMI sont de 2 µg/ml, c'est-à-dire que les souches forment le biofilm mais les valeurs des SCMI sont basses.

L'amphotéricine B réduit significativement l'activité métabolique des cellules de *Cryptococcus neoformans* à cause de ses propriétés fongicides **(Martinez et Casadevall, 2006a)**.

Nous remarquons dans notre étude que les SCMI des deux souches N 137 et N 78 restent dans les limites physiologiques, alors que ceux de CH 67 et N 86 dépassent les niveaux réalisables *in vivo*.

De plus, les biofilms de *Cryptococcus neoformans* sont plus résistants au fluconazole et au voriconazole **(Martinez et Casadevall, 2006a)**.

Les résultats que nous avons obtenus témoignent des difficultés thérapeutiques rencontrées dans les traitements antifongiques, ce qui pose un problème socio-économique majeur en santé publique.

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

Il paraît donc, que les biofilms de *Cryptococcus neoformans* sont très résistants à l'amphotéricine B.

Les biofilms constituent une barrière physique qui empêche la pénétration efficace des médicaments antifongiques et qui confèrent aux microorganismes formant les biofilms des niveaux plus élevés de résistance que ceux de leurs homologues planctoniques **[(Chandra et coll., 2001a); (Al-Fattani et Douglas, 2004)]**.

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

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

Tableau N° 5 : CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* à une concentration cellulaire de départ de 10^8 cellules/ml.

Les souches	CMI d'AmB ($\mu\text{g/ml}$) « NCCLS M27-A »	CMI d'AmB ($\mu\text{g/ml}$) « Ramage et coll., 2001 »
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	32	32
<i>C. albicans</i> 444 IP	16	64
<i>Cr. neoformans</i> CH 67	8	32
<i>Cr. neoformans</i> N 86	8	16
<i>Cr. neoformans</i> N 137	8	16
<i>Cr. neoformans</i> N 78	2	16

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

Les deux souches isolées N 86 et N 137 ont des CMI de 8 $\mu\text{g/ml}$ et des SCMI de 16 $\mu\text{g/ml}$ alors que la souche CH 67 a une CMI de 8 $\mu\text{g/ml}$ et une SCMI de 32 $\mu\text{g/ml}$. D'autre part, uniquement la souche N 78 présente des CMI et SCMI de 2 $\mu\text{g/ml}$ et 16 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

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

Par contre, selon Seneviratne et coll., (2008), l'augmentation de la concentration cellulaire de départ de 10^6 à 10^8 cellules/ml n'induit pas une augmentation significative de la CMI (elle passe de 0,23 µg/ml à 0,93 µg/ml) de *Candida albicans*. Toutefois, les SCMI, avec la même densité cellulaire au sein des biofilms de cette levure étaient plus élevées (15 µg/ml et 30 µg/ml).

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

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

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

Résultats et discussion

Tableau N° 6 : SCMI de l'AmB vis-à-vis des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* durant la formation des biofilms à une concentration cellulaire de départ de 10^6 cellules/ml.

Les souches	SCMI ($\mu\text{g/ml}$) de l'AmB			
	4 h	24 h	48 h	72 h
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	1	2	8
<i>C. albicans</i> 444 IP	0,5	1	4	4
<i>Cr. neoformans</i> CH 67	1	4	16	16
<i>Cr. neoformans</i> N 86	1	2	8	8
<i>Cr. neoformans</i> N 137	1	2	4	4
<i>Cr. neoformans</i> N 78	0,5	1	4	4

Les SCMI de la souche de *Candida albicans* ATCC 10231 sont de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ et 8 $\mu\text{g/ml}$ après 4, 24, 48 et 72 heures respectivement.

Les SCMI de la souche de *Candida albicans* 444 IP sont de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$ et 4 $\mu\text{g/ml}$ après 4, 24, 48 et 72 heures respectivement.

La souche isolée N 78 a une SCMI de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ pendant la première phase (4 heures) de formation des biofilms, alors que celles des 3 autres souches CH 67, N 86 et N 137 sont de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Durant la phase intermédiaire (24 heures), la souche N 78 a une SCMI de 1 $\mu\text{g/ml}$, les deux souches N 86 et N 137 ont des SCMI de 2 $\mu\text{g/ml}$ et la souche CH 67 a une SCMI de 4 $\mu\text{g/ml}$.

Résultats et discussion

Durant la phase de maturation (48 heures), les deux souches N 78 et N 137 ont des SCMI de 4 $\mu\text{g/ml}$, la souche N 86 avec 8 $\mu\text{g/ml}$ et la souche CH 67 avec 16 $\mu\text{g/ml}$. Pour la phase de 72 heures, toutes les SCMI des souches isolées sont comparables avec celles de la phase de maturation.

Sur la figure 3 sont illustrés les résultats des tests de sensibilité à l'amphotéricine B des souches de références et des souches isolées au cours de la formation des biofilms.

Durant la phase d'adhésion, nous observons que les SCMI (0,5 à 1 $\mu\text{g/ml}$) sont proches des CMI calculées précédemment.

Alors que les SCMI de ces 4 souches augmentent entre 24 heures et 48 heures.

Après la maturation des biofilms, les SCMI des 4 souches isolées ne changent pas entre 48 heures et 72 heures.

Les cellules sessiles des souches de références sont nettement plus résistantes à l'amphotéricine B par rapport aux cellules planctoniques, d'autant plus lorsque les biofilms sont matures.

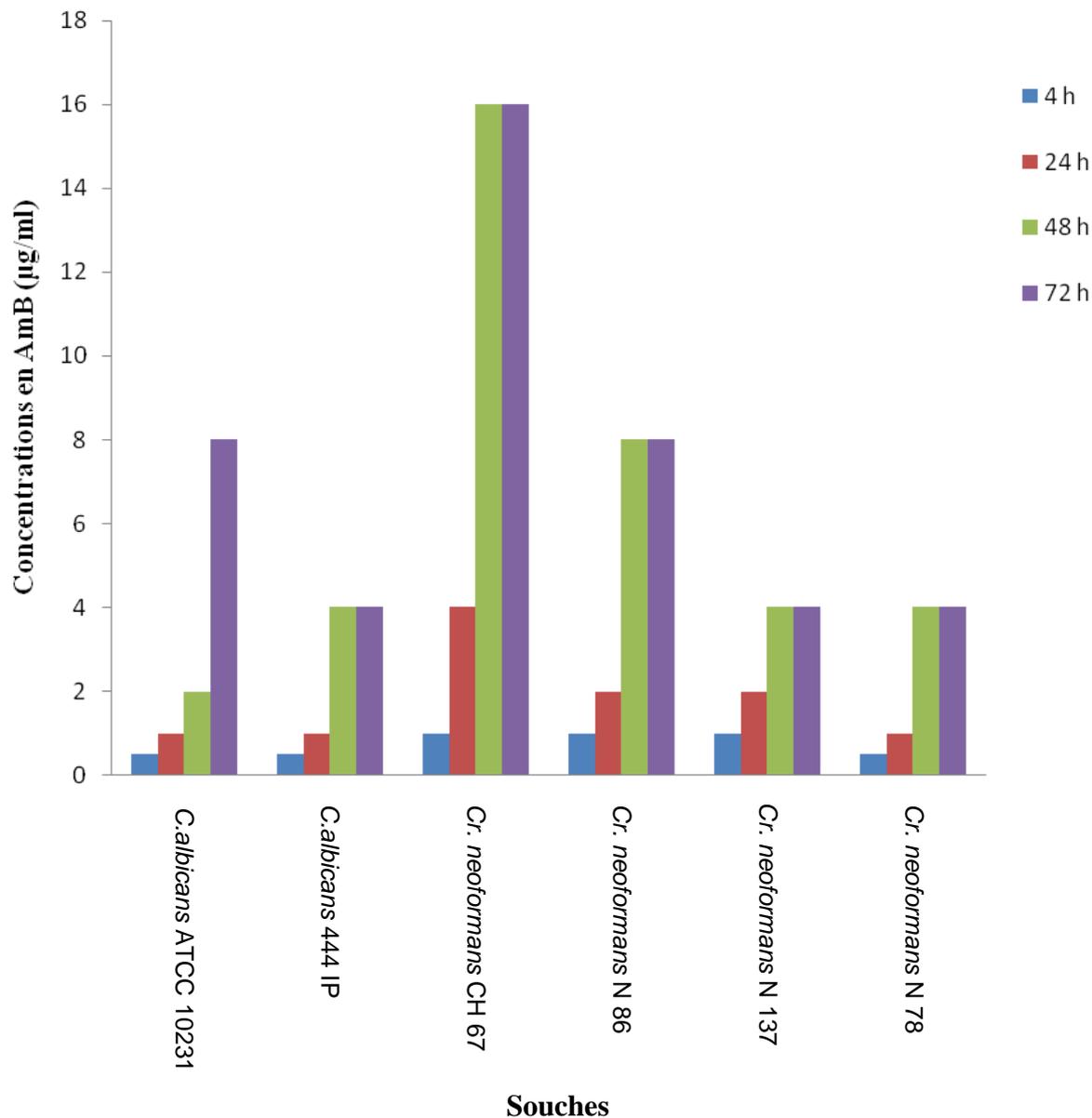


Figure 3 : Détermination des SCMI de l'AmB des souches de références de *C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* 444 IP et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* durant les différentes phases de formation des biofilms.

Résultats et discussion

Les résultats que nous avons obtenus sont comparables à ceux de Lamfon et coll., (2004) qui ont observé que la sensibilité de *Candida albicans* aux antifongiques est modifiée tout au long des différentes phases de développement du biofilm. Ce dernier, devient plus résistant après la maturation (plus de 24h). Ceci peut être du, en partie, à la formation de la matrice exopolymérique, qui selon Martinez et Casadevall, (2006a) et Martinez et Fries, (2010) contribue significativement à la résistance des biofilms fongiques aux médicaments en jouant le rôle de barrière physique qui empêche la pénétration de ces antifongiques.

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

Pour illustrer l'évolution de la résistance des souches isolées, nous avons calculé les moyennes des résultats des tests antifongiques des souches isolées regroupés sur le tableau N° 6. Ces moyennes sont calculées pour chaque phase du développement des biofilms.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure 4.

La résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B augmente conjointement avec la formation du biofilm de *Cryptococcus neoformans*, mais après la phase de maturation (48 heures), le seuil maximum de résistance de ces communautés microbiennes est atteint.

Les résultats que nous avons obtenus vont dans le même sens que ceux de Chandra et coll., (2001a et b) qui ont montré que la résistance, aux différents agents antifongiques, augmente au cours des diverses étapes de la formation des biofilms de *Candida albicans*.

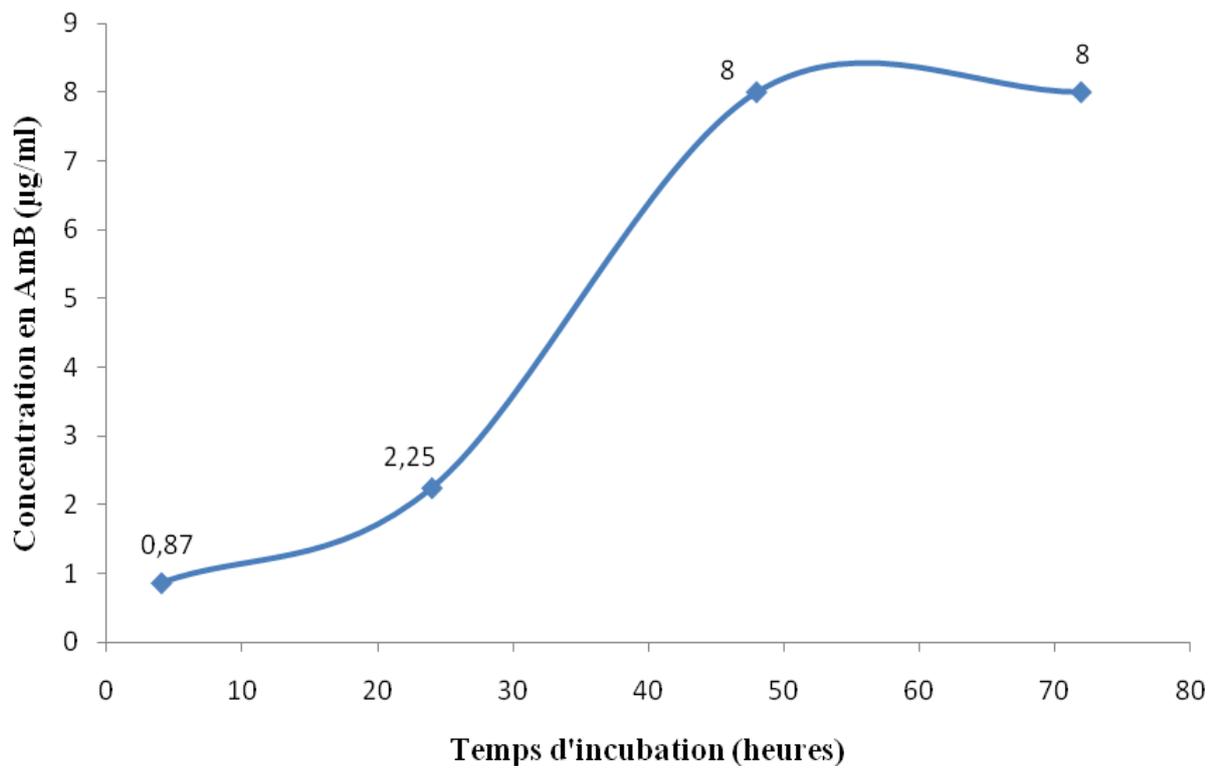


Figure 4 : Evolution de la résistance du biofilm de *Cryptococcus neoformans* au cours des différentes phases de sa formation vis-à-vis de l'AmB.

2.4. Effet du renouvellement du milieu de culture sur les SCMI

Les résultats des tests antifongiques en milieu de culture renouvelé sont regroupés sur le tableau N° 7.

Tableau N° 7 : CMI de l'AmB vis-à-vis des cellules sessiles des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Cryptococcus neoformans* avec des milieux de culture renouvelés à des concentrations cellulaires de départ de 10^6 et 10^8 cellules/ml.

Les souches	SCMI ($\mu\text{g/ml}$) de l'AmB	
	Concentrations de l'inoculum 10^6 cellules/ml	Concentrations de l'inoculum 10^8 cellules/ml
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4	64
<i>C. albicans</i> 444 IP	8	64
<i>Cr. neoformans</i> CH 67	32	64
<i>Cr. neoformans</i> N 86	16	32
<i>Cr. neoformans</i> N 137	8	32
<i>Cr. neoformans</i> N 78	8	32

Le renouvellement du milieu de culture provoque une augmentation des SCMI de l'amphotéricine B pour les souches de références.

En effet, pour *Candida albicans* ATCC 10231, la SCMI passe de 2 à 4 $\mu\text{g/ml}$ pour l'inoculum 10^6 cellules/ml et de 32 à 64 $\mu\text{g/ml}$ pour l'inoculum 10^8 cellules/ml. Pour *Candida albicans* 444 IP, la SCMI passe de 4 $\mu\text{g/ml}$ à 8 $\mu\text{g/ml}$ pour l'inoculum 10^6 cellules/ml et reste inchangée pour l'inoculum 10^8 cellules/ml.

Résultats et discussion

Les SCMI calculées pour les biofilms des souches isolées et incubées pendant 48 heures dans des milieux de cultures renouvelés, passent, pour les deux souches N 78 et N 137, de 8 µg/ml pour l'inoculum 10^6 cellules/ml à 32 µg/ml pour l'inoculum 10^8 cellules/ml. L'augmentation des SCMI varie entre 16 à 32 µg/ml pour la souche N 86 et 32 à 64 µg/ml pour la souche CH 67. Ces souches présentent toutes des SCMI nettement plus élevées lorsque nous renouvelons le milieu de culture.

En comparant les résultats obtenus en milieux de cultures renouvelés avec les résultats précédents en milieux non renouvelés (Annexe 2), les SCMI ont augmenté de façon exponentielle quand il s'agit de biofilms matures (48 heures), ce qui va dans le même sens que les travaux de Al-Fattani et Douglas, (2006) et Lafleur et coll., (2006), qui montrent que les biofilms de *Candida albicans* cultivés en flux continu sont beaucoup plus résistants aux traitements antifongiques que ceux cultivés dans des conditions statiques.

Nos résultats sont également en accord avec ceux de Donlan, (2001b) et Kumamota, (2002) qui montrent que les conditions de renouvellement favorisent le développement de vastes biofilms une fois que les cellules adhèrent de façon irréversible à la surface.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Les infections nosocomiales d'origine fongique liées aux implants médicaux, notamment les cathéters veineux périphériques sont très mal connues d'où le manque d'études dans ce domaine laissant dans l'ombre ce type d'infections fongiques, parmi elles celles causées par la levure *Cr. neoformans*.

Pour ce faire, nous avons entrepris ce travail au centre hospitalo-universitaire et l'hôpital mère et enfant de Tlemcen qui avait pour but l'évaluation du taux de contaminations des cathéters veineux périphériques en chlorure de polyvinyle (PVC) par la levure *Cr. neoformans*, de vérifier son pouvoir à former des biofilms et de tester sa résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B, l'antifongique le plus utilisé en milieu clinique.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que, sur 281 prélèvements effectués, 4 souches de *Cr. neoformans* ont été isolées, soit un taux de 1,42 %, avec 1 souche isolée du service de chirurgie A et 3 souches du service de néonatalogie, cela nous montre un taux très faible de cathéters en PVC colonisés par ces levures et le risque infectieux que présente ces germes est beaucoup moins important en comparaison avec d'autres microorganismes.

Chez les 4 souches de *Cr. neoformans* isolées, le pouvoir de la formation des biofilms est considéré comme positif, le risque de contamination des cathéters étudiés présenté par ces levures est accentué par une résistance importante vis-à-vis de l'amphotéricine B. En effet, les cellules sessiles de *Cr. neoformans* sont plus résistantes que leurs homologues planctoniques (4 µg/ml pour les premières contre 0,5 µg/ml pour les secondes).

Cette résistance augmente significativement avec :

- L'augmentation de la concentration cellulaire de départ (2,5 plus élevée en passant de la densité cellulaire 10^6 à 10^8 cellules/ml).
- Les différentes phases de développement des biofilms (de 0,87 µg/ml « phase d'adhésion » à 8 µg/ml « phase de maturation »).
- Le renouvellement du milieu de culture.

Conclusion générale

Malgré le taux faible de souches de *Cr. neoformans* isolées, il ne faut pas ignorer le problème que présente ces infections liées aux dispositifs médicaux prélevés, des mesures de prévention strictes doivent être prise afin d'en limiter les cas :

- Lavage soigneux des mains (simple, antiseptique ou hygiénique, chirurgicale).
- L'application des protocoles standards bien enseignés des différentes manipulations médicales.
- Sensibilisation de l'ensemble du personnel médical aux règles d'hygiène et aux protocoles de soins.

La recommandation la plus importante, met au point la nécessité de réduire au maximum la durée du cathétérisme, tout en respectant en même temps un ensemble de règles de manipulations de ces implants médicaux.

Depuis 1988, tous les établissements de santé publics ou privés participant au service public hospitalier doivent disposer d'un comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN), ce dernier est constitué des instances pluridisciplinaires qui ont pour mission d'élaborer la politique de lutte contre les infections nosocomiales **(Brucker, 1998)**.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Etendre l'étude chez les patients immunodéprimés (VIH, cancéreux, diabétiques...).
- Evaluer le taux de colonisation d'autres implants médicaux comme les cathéters centraux, les sondes...
- Tester de nouvelles molécules antifongiques (Echinocandines).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- 1- Al-Dhaheri R. S. and Douglas L. J. (2008) Absence of Ambphotericin B-Tolerant Persister Cells in Biofilms of Some *Candida* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 52 (5) : 1884 – 1887.
- 2- Al-Fattani M. A. and Douglas L. J. (2004) Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 48 : 3291 – 3297.
- 3- Al-Fattani M. A. and Douglas L. J. (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance, *Journal of Medical Microbiology* ; 55 : 999 – 1008.
- 4- Andes D., Nett J., Oschel P., Albrecht R., Marchillo K. and Pitula A. (2004) Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. *Infection and Immunity* ; 72 (10) : 6023 – 6031.
- 5- Bachmann S. P., VandeWalle K., Ramage G., Patterson T. F., Wikes B. L., Graybill J. R and López-Ribot J. L. (2002) In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 46 : 3591 – 3596.
- 6- Bachmann S. P., Ramage G., VandeWalle K., Patterson T. F. Wikes B. L. and López-Ribot J. L. (2003) Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* ; 47 : 3657 – 3659.
- 7- Baillie G. S. Douglas L. J. (1999) Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol* ; 48 : 671 – 679.
- 8- Banerjee U., Gupta K. and Venugopal P. (1997) A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol* ; 35 : 139 – 141.
- 9- Beaucaire G. (1997) Infections nosocomiales. Epidémiologie, critères du diagnostic, prévention, principe de traitement. *La revue du praticien* ; 47 : 201 – 209. (NosoBase n° 3734).
- 10- Bell M. (2001) Biofilms: A Clinical perspective. *Current Infections Disease Reports* ; 3 : 483 – 486.

Références bibliographiques

- 11- Beloin C., Roux A. and Ghigo M. J. (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* ; 322 : 249 – 289.
- 12- Blankenship J. R. and Mitchel A. P. (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* ; 9 : 588 – 594.
- 13- Bohme A. and Karthaus M. (1999) Systemic fungal infections in patients with hematologic malignancies : indications and limitations of the antifungal armamentarium. *Chemotherapy* ; 45 (5) : 315 – 324.
- 14- Boo T. W., O'Reilly B., O'Leary J. and Cryan B. (2005) Candidaemia in an Irish tertiary referral hospital : Epidemiology and prognostic factors. *Mycoses* ; 48 : 251 – 259.
- 15- Botto H. (2003) Infections urinaires nosocomiales de l'adulte, Texte long. *Médecine et maladies infectieuses* ; 33 : 223 – 244.
- 16- Braun D. K., Janssen D. A., Marcus J. R. and Kauffman C. A. (1994) Cryptococcal infection of a prosthetic dialysis fistula. *Am. J. Kidney Dis* ; 24 : 864 – 867.
- 17- Brown J. M. (2004) Fungal infections in bone marrow transplant patients. *Curr. Opin. Infect. Dis* ; 17 (4) : 347 – 352.
- 18- Brucker G. (1998) Infections nosocomiales et environnement hospitalier. *Flammarion Médecine-science*, Paris.
- 19- Brun-Buisson C., Abrouk F., Legrand P., Huet Y., Larabi S. and Rapin M. (1987) Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip culture. *Arch Intern Med* ; 147 : 873 – 877.
- 20- Bullitt R. and Makowski L. (1995) Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature* ; 373 : 164 – 167.
- 21- Casadevall A. and Perfect J. R. (1998) *Cryptococcus neoformans*. ASM press, Washington, DC.

Références bibliographiques

- 22- Chandra J., Patel J. D., Li J., Zhou G., Mukherjee P. K., McCormick T. S., Anderson J. M. and Ghannoum M. A. (2005) Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* ; 71 (12) : 8795 – 8801.
- 23- Chandra J. Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T. and Ghannoum M. A. (2001a) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology* ; 183 (18) : 5385 – 5394.
- 24- Chandra J., Mukherjee P. K., Leidich S. D., Faddoul F. F., Hoyer L. L, Douglas L. J. and Ghannoum M. A. (2001b) Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* ; 80 : 903 – 908.
- 25- Chariyalertsak S., Sirisanthana T., Saengwonloey O. and Nelson K. E. (2001) Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994-1998: regional variation and temporal trends. *Clin. Infect. Dis* ; 32 (6) : 955 – 962.
- 26- Davey M. E., Caiazza N. C. and O'toole G. A. (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa*. *PAO1. J. Bacteriol* ; 185 : 1027 – 1036.
- 27- Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W. and Greenberg E. P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* ; 280 : 295 – 298.
- 28- De Rochemonteix A. D. (2009) Les biofilms et la peau. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort ; page : 19.
- 29- Di Bonaventura G., Pompilio A., Picciani C., Iezzi M. , D'Antonio D. and Piccolomini R. (2006) Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii* : development, architecture and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* ; 50 : 3269 – 3276.

Références bibliographiques

- 30- Digiovine B., Chenoweth C., Watts C. and Higgins M. (1999) The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* ; 160 : 976 – 981.
- 31- Donlan R. M. (2001a) Biofilm Formation : A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infections Diseases* ; 33 : 1387 – 1392.
- 32- Donlan R. M. (2001b) Biofilms and Device-Associated Infections, *Emerging Infectious Diseases Journal* ; 7 (2) : 277 – 281.
- 33- Donlan R. M. and Costerton J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* ; 15 (2) : 167 – 193.
- 34- Douglas L. J. (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* ; 19 : 139 – 143.
- 35- Douglas L. J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* ; 11 (1) : 30 – 36.
- 36- Dromer F. et Lortholary O. (2004) Cryptococcose. *EMC-Maladie Infectieuses* ; 1 : 21 – 37.
- 37- Drouhet E. and Vieu M. (1957) Biology of *Candida* infections. I. Laboratory diagnosis; study of 342 strains of *Candida* isolated from pathological specimens. *Sem Hop* ; 33 (13/2) : 793 – 807.
- 38- Eggimann P. et Pittet D. (2002) Candidoses en réanimation. *Réanimation* ; 11 : 209 – 221.
- 39- Ernst E. J. and Rogers P. D. (2005) Methods in Molecular Medicine. Antifungal Agents: Methods and Protocols. Totowa, New Jersey, *Humana Press* ; 1543 - 1894.
- 40- Figueroa-Damián R., Ortiz-Ibarra F. J. and Arredondo-Garcia J. L. (1994) Nosocomial infections of gynecologic-obstetrical origin at a perinatal care hospital. *Salud Publica Mex* ; 36 (1) : 10 – 16.
- 41- Goldmann D. A. and Pier G. B. (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin. Microbiol. Rev* ; 6 : 176 – 192.

Références bibliographiques

- 42- Goldman D. L., Khine H., Abadi J., Lindenberg D. J., Pirofski L-A., Niang R. and Casadevall A. (2001) Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics*; 107: e66.
- 43- Hakim J. G., Gangaidzo I. T., Heyderman R. S., Mielke J., Mushangi E., Taziwa A., Robertson V. J., Musvaire P. and Mason P. R. (2000) Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. *AIDS* ; 14 (10) : 1401 – 1407.
- 44- Hall-Stoodley L., Costerton J. W. and Stoodley P. (2004) Bacterial Biofilms: from the natural environment to infection diseases. *Nat Rev Microbiol* ; 2 : 95 – 108.
- 45- Haras D. (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux et Techniques* ; 93 : 27 – 41.
- 46- Harry J. B., Song J. L., Lyons C. N. and White T. C. (2002) Transcription initiation of genes associated with azole resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* ; 40 : 73 – 81.
- 47- Helbok R., Pongpakdee S., Yenjun S., Dent W., Beer R., Lackner P., Bunyaratvej P., Prasert B ., Vejjajiva A. and Shmutzhard E. (2005) Chronic Meningitis in Thailand. *Neuroepidemiology* ; 26 (1) : 37 – 44.
- 48- Hennequin C. (1996) Epidémiologie des mycoses invasives. L'expérience d'un centre hospitalo-universitaire parisien. *Rev Med Interne*; 17: 754 – 760.
- 49- Hoang L. M. N., Maguire J. A., Doyle P., Fyfe M. and Roscoe D. L. (2004) *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *Journal of Medical Microbiology* ; 53 : 935 – 940.
- 50- Holmes C. B., Losina E., Walensky R. P., Yazdanpanah Y. and Freedberg K. A. (2003) Review of human immunodeficiency virus type 1-related opportunistic infections in sub-Saharan Africa. *Clin. Infect. Dis*; 36 (5): 652 – 662.
- 51- Hot A., Mittaine B. and Dupont B. (2007) Infections fongiques invasives du grand prématuré. *Journal de Mycologie Médicale* ; 17 : 33 – 41.

Références bibliographiques

- 52- Irie Y. and Parsek M. R. (2008) Quorum Sensing and Microbiol Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; 322 : 67 – 84.
- 53- Jabra-Rizk M. A., Falkler W. A. and Meiller T. F. (2004) Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases* ; 10 (1) : 14 – 19.
- 54- Kaltenbach G., Vogel T., Noblet-Dick M., Heitz D., Berthel M. et Kuntzmann F. (2002) les candidémies chez le sujet agé : à propos de quatre cas. *Rev Méd Interne* ; 23 : 328 – 331.
- 55- Kibbler C. (2007) Evolution de l'épidémiologie des candidoses et aspergilloses invasives. *Médecine et maladies infectieuses* ; 37 : 2 – 4.
- 56- Kokar C. R., Chakraborty S., Khopade A. N. and Mahadik K. R. (2009) Biofilm: importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology* ; 8 : 159 – 168.
- 57- Kohno S. (2005) Variety in cryptococcal pathogenesis. In: the 6 th International conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, Boston, MA, Boston University School of Medicine.
- 58- Kuhn D. M., Chandra J., Mukherjee P. K. and Ghannoum M. A. (2002a) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun* ; 70 : 878 – 888.
- 59- Kuhn D. M., George T., Chandra J., Mukherjee P. K. and Ghannoum M. A. (2002b) Antifungal Susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of Amphotericin B lipid formulations and Echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 46 (6) : 1773 – 1780.
- 60- Kumamoto C. A. (2002) *Candida* biofilms, *Current Opinion in Microbiology* ; 5 : 608 – 611.
- 61- Kumarasamy N., Vallabhaneni S., Flanigan T. P., Mayer K. H. and Solomon S. (2005) Clinical profile of HIV in India. *Indian J. Med. Res* ; 121 (4) : 377 – 394.
- 62- Kwon-Chung K. J. and Varma A. (2006) Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeasts Res* ; 6 (4) : 574 – 587.

Références bibliographiques

- 63- Lafleur M. D., Kumamoto C. A. and Lewis K., (2006) *Candida albicans* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 50 (11) : 3839 – 3846.
- 64- Lamfon H., Porter S. R., McCullough M. and Pattern J. (2004) Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 53 : 383 – 385.
- 65- Lederle F. A., Parenti C. M., Berskow L. C. and Ellingson K. J. (1992) The idle intravenous catheter. *Ann Intern Med* ; 116 : 737 – 738.
- 66- Leite A. V., Vidal J. E., Bonasser F. F., Nogueira R. S. and Oliveira A. C. (2004) Cerebral infraction related to cryptococcal meningitis in an HIV-infected patient: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* ; 8 : 175 – 179.
- 67- Le Minore L. et Veron M. (1990) Bactériologie médicale, 2^{ème} édition *Médecine Sciences Flammarion*.
- 68- López-Ribot J. L., (2005) *Candida albicans* biofilms : More than Filamentation, *Current Biology* ; 15 (12) : 453 – 455.
- 69- Lin X. and Heitman J. (2006) The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol* ; 60 : 69 – 105.
- 70- Martinez L. R. and Casadevall A. (2005) Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effects correlates with protective efficacy. *Infect. Immun* ; 73 : 6350 – 6362.
- 71- Martinez L. R. and Casadevall A. (2006a) Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 50 : 1021 – 1033.
- 72- Martinez L. R. and Casadevall A. (2006b) *Cryptococcus neoformans* cells in biobilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect. Immun* ; 74 : 6118 – 6123.

Références bibliographiques

- 73- Martinez L. R. (2006) Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*: effect of specific antibody and consequence for drug therapy and immune responses. The Sue Golding Graduate Division of Medical Sciences. Albert Einstein College of Medicine. Yeshiva University. New York ; Page : 16.
- 74- Martinez L. R. and Casadevall A. (2007) *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold and UV light. *Appl. Environ. Microbiol* ; 73 : 4592 – 4601.
- 75- Martinez L. R. and Fries B. C. (2010) Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Curr Fungal Infect Rep* ; 4 : 266 – 275.
- 76- Martinez L. R. Mihu M. R., Han G., Frases S., Cordero R. J. B., Casadevall A., Friedman A. J., Friedman J. M. and Nosanchuk J. D. (2010) The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials* ; 31 : 669 – 679.
- 77- Mateus C., Crow S. A., Jr. and Ahearn D. G. (2004) Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 48 (9) : 3358 – 3366.
- 78- Mermel L. A., Farr B. M., Sherertz R. J., Raad I. I., O'Grady N., Harris J. S. et Craven D. E. (2001) Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* ; 32 : 1249 – 1272.
- 79- Miao H., Minquan D., Mingwen F. and Zhuan B. (2007) In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* ; 163 : 137 – 143.
- 80- Mitchell T. G. and Perfect J. R. (1995) Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cr. Neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev* ; 8 : 515 – 548.
- 81- Monds R. D. and O'toole G. A. (2008) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology* ; 17 (2) : 73 – 87.
- 82- Mukherjee P. K., Chandra J., Kuhn D. M. and Ghannoum M. A. (2003) Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols. *Infection and Immunity* ; 71 (8) : 4333 – 4340.

Références bibliographiques

- 83- Mukherjee P. K. and Chandra J. (2004) *Candida* Biofilm resistance. *Drug Resistance Updates* ; 7 : 301 – 309.
- 84- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standards. NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- 85- Nett J., Lincoln L., Marchillo K. and Andes D. (2007) β -1,3 Glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *The Journal of Infectious Diseases* ; 195 : 1705 – 1712.
- 86- Nett J. E., Guite K. M., Ringeisen A., Holoyda K. A. and Andes D. R. (2008) Reduced Biocide Susceptibility in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 52 (2) : 3411 – 3413.
- 87- O'toole G. A. (2003) To build a biofilm, *Journal of Bacteriology* ; 185 (9) : 2687 – 2689.
- 88- Otto M. (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* ; 322 : 207 – 228.
- 89- Pasqualotto A. C., Bittencourt S. C., de Mattos O. F. and Severo L. C. (2004) Cryptococemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent. *Rev Iberoam Micol* ; 21 : 143 – 146.
- 90- Peeters E., Nelis H. J. and Coenye T. (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* ; 72 : 157 – 165.
- 91- Penk A. and Pittrow L. (1999) Role of fluconazole in the long-term suppressive therapy of fungal infections in patients with artificial implants. *Mycoses* ; 42 (suppl.2) : 91 – 96.
- 92- Perumal P., Mekala S. and Chaffin W. L. (2007) Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemother* ; 51 (7) : 2454 – 2463.

Références bibliographiques

- 93- Pujol M., Hornero A., Saballs M., Argerich M. J., Verdaguer R., Cissal M., Pena C., Ariza J. and Gudiol F. (2007) Clinical epidemiology and outcomes of peripheral venous catheter-related bloodstream infections at a university-affiliated hospital. *J Hosp Infect* ; 67 : 22 – 29.
- 94- Quinet B. (2006) Abord veineux de longue durée : épidémiologie, diagnostic, prévention et traitement des complications infectieuses. Session : Abord veineux de longue durée. *Archives de Pédiatrie* ; 13 : 714 – 720.
- 95- Ramage G., Vande Walle K., Wikes B. L. and López-Ribot J. L. (2001) Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 45 (9) : 2475 – 2479.
- 96- Ramage G., Bachmann S., Patterson T. F., Wikes B. L. and López-Ribot J. L. (2002a) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* ; 49 : 973 – 980.
- 97- Ramage G., Vande Walle K., Bachmann S. P., Wikes B. L. and López-Ribot J. L. (2002b) In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrobial Agents Chemother* ; 46 : 3634 – 3636.
- 98- Ramage G., Saville S. P., Thomas D. P. and López-Ribot J. L. (2005) *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot. Cell* ; 4 : 633 – 638.
- 99- Ramage G., Mowat E., Williams C. and López-Ribot J. L. (2010) Yeast Biofilms. *H. R. Ashbee and E. M. Bignells* (eds), Pathogenic Yeasts, The Yeast Handbook.
- 100- Rapp R. P. (2004) Changing strategies for the management of invasive fungal infections. *Pharmacotherapy* ; 24 (2) : 4 – 28.
- 101- Robertson E. J. and Casadevall A. (2009) Antibody-Mediated Immobilization of *Cryptococcus neoformans* Promotes Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology* ; 75 : 2528 – 2533.
- 102- Saidi S., Luitaud C. and Rouabhia M. (2006) In vitro synergistic effect of farnesol and human gingival cells against *Candida albicans*. *Yeast* ; 23 : 673 – 687.

Références bibliographiques

- 103- Saiman L., Ludington E., Dawson J. D., Petterson J. E., Rangel-Frausto S., Wiblin R. T., Blumberg H. M., Pfaller M., Rinaldi M., Edwards J. E., Wenzel R. P. and Jarvis W. (2001) Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* ; 20 : 1119 – 1124.
- 104- Segretain E. G., Drouhet E. et Maria F. (1979) Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale, Edition *Maloine*, 3^{ème} édition.
- 105- Seneviratne C. J., Jin L. J., Samaranayake Y. H. and Samaranayake L. P. (2008) Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 52 (9) : 3259 – 3266.
- 106- Soll D. R. (2008) *Candida* Biofilms: is Adhesion sexy? *Current Biology* ; 18 (16) : 717 – 720.
- 107- Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley L., Boyle J. D., Lappin-Scott H. M. and Costerton J. W. (2001) Growth detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* ; 67 :5608 – 5613.
- 108- Sutherland I. (2001) Biofilm exopolysaccharide: a strong and sticky framework. *Microbiology* ; 147 : 3 – 9.
- 109- Tolker-Nielson T. and Molin S. (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol* ; 40 : 75 – 84.
- 110- Tre-Hardy M., Vanderbist F., Traore H. and Devleeschouwer M. J. (2008) In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *Int J Antimicrob Agents* ; 31 : 329 – 336.
- 111- Tuon F. F., Morales H. M. P., Penteado-Filho S. R., da-Silva M. M., de Quadros I. and El Hamoui A.(2009) Central Venous Catheter-Related Bloodstream Infection and *Cryptococcus neoformans*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* ; 13 (4) : 317 – 318.
- 112- Vecchiarelli A. (2000) Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol* ; 38 : 407 – 417.

Références bibliographiques

- 113- Veyssier P., Domart Y. et Liebbe A. M. (1998) Infections nosocomiales, *Masson* 2^{ème} édition. Paris.
- 114- Walsh T. J., Schlegel R., Moody M. M., Costerton J. W. and Salzman M. (1986) Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. *Neurosurgery* ; 18 : 373 – 375.
- 115- White T. C., Holleman S., Dy F., Mirels L. and Stevens D. A. (2002) Resistance Mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans* . *Antimicrobial Agents Chemother* ; 46 : 1704 – 1713.
- 116- Zingg W. and Pittet D. (2009) Peripheral venous catheters : an under-evaluated problem. *International Journal of Antimicrobial Agents* ; 34S : S38 – S42.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Etalon de 3 McFarland

Chlorure de barium, solution de 0,048 M.....3,0 ml

Acide sulfurique, solution de 0,18 M.....97,0 ml

DO à 625 nm au spectrophotomètre.....0,48 – 0,6

Annexes

Annexe 2 : préparation de la solution PBS, pH = 7,4.

PBS = Phosphate Buffered Saline « Tampon Phosphate Saline » (10 mM tampon phosphate, 2,7 mM chlorure de potassium, 137 mM chlorure de sodium)

- NaCl : 137 mM
- KCl : 2,7 mM
- Na₂HPO₄ : 10 mM (di-sodium hydrogénophosphate)
- KH₂PO₄ : 1,76 mM (di-hydrogénophosphate)

Compléter à 1l et ajuster pH = 7,4, puis autoclaver à 120 °C pendant 20 minutes et conserver à la température ambiante.

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

Annexes

Annexe 3 : milieu RPMI-1640 « Roswell Park Memorial Institut »

Sels Inorganiques (g/litre)

Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.10000
MgSO₄ (anhydre) 0.04884
KCl 0.40000
NaHCO₃ 1.50000
NaCl 6.00000
Na₂HPO₄ (anhydrous) 0.80000

Amino Acides (g/litre)

L-Arginine (free base) 0.20000
L-Asparagine·H₂O 0.05682
L-Aspartic Acid 0.02000
L-Cystine·2HCl 0.06520
L-Glutamic Acid 0.02000
L-Glutamine 0.30000
Glycine 0.01000
L-Histidine (free base) 0.01500
Hydroxy-L-Proline 0.02000
L-Isoleucine 0.05000
L-Leucine 0.05000
L-Lysine·HCl 0.04000
L-Methionine 0.01500
L-Phenylalanine 0.01500
L-Proline 0.02000
L-Serine 0.03000
L-Threonine 0.02000
L-Tryptophan 0.00500
L-Tyrosine·2Na·2H₂O 0.02883
L-Valine 0.02000

Vitamines (g/litre)

D-Biotine 0.00020
Choline Chloride 0.00300
Acide Folique 0.00100
myo-Inositol 0.03500
Nicotinamide 0.00100
Acide p-Amino Benzoique 0.00100
Acide D-Pantothenique 0.00025
(hemicalcium)
Pyridoxine·HCl 0.00100
Riboflavine 0.00020
Thiamine·HCl 0.00100
Vitamine B-12 0.000005

Autres (g/litre)

D-Glucose 4.50000
Glutathione (reduit) 0.00100
HEPES 2.38300
Rouge de Phénol, Sel Sodium 0.00500
Sodium Pyruvate 0.11000

AMERICANE TYPE CULTURE

COLLECTION

Catalog No. 30-2001

Annexes

Annexe 4 : souches de *Cryptococcus neoformans* identifiées par les plaques Api Candida et selon la méthode microscopique et macroscopique

	Identification biochimique (Api Candida)												Identification microscopique et macroscopique			Souches	
	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β -MAL	α -AMY	β -XYL	β -GUR	URE	β -NAG	β -GAL	Codes	Encre de chine	Gélose maltosée		Sensibilité à l'actidione
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4					
1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	7011	+	+	+	CH 67
2	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	7641	+	+	+	N 86
3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	7001	+	+	+	N 137
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	7001	+	+	+	N 78

CH : chirurgie A

N : néonatalogie

Annexes

Annexe 5 : résultats des tests antifongiques de l'AmB vis-à-vis des souches de références et des souches isolées

		CMI selon Ramage et coll., (2001)								
		CMI selon NCCLS M27-A		Milieu de culture non renouvelé				Milieu de culture renouvelé		
Inoculum (cellules/ml)		2,5×10 ³	1×10 ⁸	1×10 ⁶				1×10 ⁸	1×10 ⁶	1×10 ⁸
Phase du biofilm (heures)		-	-	4	24	48	72	48	48	48
1	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	32	0,5	1	2	8	32	4	64
2	<i>C. albicans</i> 444IP	0,5	16	0,5	1	4	4	64	8	64
3	<i>Cr. neoformans</i> CH 67	0,5	8	1	4	16	16	32	32	64
4	<i>Cr. neoformans</i> N 86	0,5	8	1	2	8	8	16	16	32
5	<i>Cr. neoformans</i> N 137	0,5	8	1	2	4	4	16	8	32
6	<i>Cr. neoformans</i> N 78	0,5	2	0,5	1	4	4	16	8	32

ملخص

عرفت السنوات الأخيرة انتشارا واسعا للأمراض الفطرية و التي أصبحت تشكل في وقتنا الحاضر مضاعفات خطيرة للمرضى في المصالح الإستشفائية. تعتبر الخميرة *Cryptococcus neoformans* واحدة من هذه الإصابات الجرثومية القادرة على أن تسبب حالات من العدوى المكتسبة في المستشفيات. يمكن لهذه الخمائر أن تنمو ملامسة لبعض الأجهزة الطبية الحديثة مثل القسطرات الوريدية الطرفية مشكلة الأغشية الحيوية و التي تتميز بخاصية مقاومة للمضادات الفطرية.

في هذا السياق، قمنا بإجراء دراسة عزلنا من خلاله 4 سلالات للخميرة *Cryptococcus neoformans* من القسطرات الوريدية الطرفية المصنوعة من مادة polyvinyl chlorure مباشرة بعد نزعها من المرضى، ثم تحققنا من قدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية، و أجرينا اختبار على مدى مقاومتها للمضاد الحيوي الأومفوترسين ب (AmB)، الدواء الأكثر استعمالا في علاج الأمراض الفطرية الجهازية.

من 281 عينة، 4 سلالات ل *Cryptococcus neoformans* تم عزلها، و قد أظهرت الدراسة الخاصة بالأومفوترسين ب بأن هذه الخلايا في شكل أغشية حيوية هي أكثر مقاومة لهذا المضاد من نظرائهن العوالق. بالإضافة إلى ذلك، وجدنا أن المقاومة مرتبطة بالتركيز الخلوي الابتدائي، بتجديد الوسط، و أيضا تتأثر بمختلف مراحل نمو هذه الأغشية.

الكلمات المفاتيح: *Cryptococcus neoformans*، القسطرة الوريدية الطرفية، الأغشية الحيوية، أومفوترسين ب.

RESUME

Les infections fongiques ont considérablement augmenté ces dernières années et sont devenues aujourd'hui parmi les complications des sujets à haut risque hospitalisé. *Cryptococcus neoformans* soit l'un des pathogènes identifiés lors de ces infections qui peut entraîner des cas de mycoses nosocomiales.

En effet, ces levures se développent en adhérant à des implants médicaux, tels que les cathéters veineux périphériques conduisant à la formation des biofilms qui leur confèrent des propriétés de résistances aux antifongiques.

Dans ce contexte nous avons entrepris ce travail qui consiste à isoler des souches de *Cryptococcus neoformans* à partir des cathéters veineux périphériques en chlorure de polyvinyle (PVC) usés directement après leurs excisions des patients, de vérifier leur capacité à former des biofilms et de tester leur résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B, traitement de première ligne des mycoses systémiques ou généralisées.

Sur 281 prélèvements, 4 souches de *Cryptococcus neoformans* ont été isolées. Il ressort de cette étude que les test antifongiques vis-à-vis de l'amphotéricine B montrent que les cellules sessiles formantes des biofilms de *Cryptococcus neoformans* sont nettement plus résistantes que leurs homologues planctoniques. De plus, la résistance de ces biofilms à l'amphotéricine B dépend de la concentration cellulaire de départ, du renouvellement du milieu et des différentes phases de formation des biofilms.

Mots clés : *Cryptococcus neoformans*, cathéter veineux périphérique, biofilms, amphotéricine B.

SUMMARY

Fungal infections have dramatically increased in recent years and have now become among the complications of high-risk patients hospitalized. *Cryptococcus neoformans* is one of the pathogens identified in these diseases which can causes nosocomial fungal infections.

In fact, these yeasts grow by adhering to medical devices, such as peripheral venous catheters leading to the formation of biofilms that confer properties of resistance to antifungal agents.

In this context we undertook this work which is to isolate strains of *Cryptococcus neoformans* from polyvinyl chlorure (PVC) peripheral venous catheters worn directly after excision from patients, to check their powers to form biofilms and to test their resistance against amphotericine B.

From 281 samples, 4 strains of *Cryptococcus neoformans* were isolated. It appears from this study that the antifungal tests against AmB show that sessile cells of *Cryptococcus neoformans* are much more resistant than their planktonic counterparts. Moreover, resistance of biofilm to AmB depends on the concentration of the starting inoculum, the renewal of culture medium and different stages of biofilm formation.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, peripheral venous catheters, biofilms, amphotericin B.