



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie

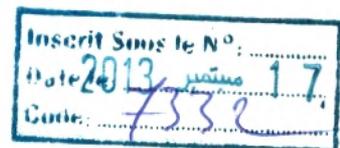
Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique



Mémoire

Master en Biologie LMD
Option : Biochimie Appliquée



Thème

**Evaluation de la résistance des biofilms des
souches de *Candida* spp isolées à partir des
dispositifs médicaux implantés chez des patients
hospitalisés dans le CHU Sidi Bel Abbes**

Présenté par

Melle : BENSEDDIK Bochra-Wafa

Soutenu en Juillet 2013

Devant le jury :

Présidente : Mme Boucherit-Otmani Z.

Professeur

Promoteur : Mr Seddiki S.M.L

Maitre-assistant A

Examinatrice : Mme Hassaïne H.

Maitre de conférences A



Année universitaire : 2012-2013

DÉDICACE



Je dédie ce modeste travail :

A mes chères parents qui étaient toujours auprès de moi, pour son soutien moral et pour son sacrifice, Mille, Mille remercies.

A ma grande famille petite et grande sans exception.

- Surtout à ma tante Sabira BOUAYED DEBBER et son épou Abdeljalil BOUKLI HASSEN.

A ma grand sœur FATIMA-ZOËRA, son mari HICHEM et son fils NAZIME (Hbib-khalto).

A mes chères sœur AMINA, ZINEB et MERJEM (lovelys Angels).

A mes chers frères ISMAIL, MARWANE et TEDJINI.

A tous mes connaissance

A Amô ELHAJ SARI, Amô Kamel, Amô Abdelkrim ACHACHI.

A tout mes camarades du cycle universitaire, surtout ASSIA, IMENE, ZINEB, NARIMEN, FATIMA-ZOËRA.

Dans le cadre du travail je remercie infiniment

- Mr BOUDEFLA AMINE maître assistant, à Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.
- Mr CHENOUFI directeur du musée de Tlemcen ET SA FEMME pour leur aide, assistance et encouragement durant mes études.

A mes inoubliables amis : Sara MESBAH et sa jolie famille, Téma BOUMEDDIENE, Mounia MEZIYANE et Manel BERRANI qui été toujours de mes coté ainsi que Lotfi HOBAYA.

A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin et ceux qui m'aiment et que j'aime.

REMERCIEMEN

Remerciements

Au terme de cette étude, je suis très heureux de pouvoir remercier tous ceux et celles qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de cette année et grâce à qui j'ai pu avancer.

Je tiens à exprimer toutes mes reconnaissances et mes remerciements à M^{me} Boucherit-Otmani Zahia, directrice du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, et Maître de Conférences A à la faculté des Sciences de la Nature et de Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail au sein de son laboratoire, et d'avoir fait l'honneur de présider et de juger ce mémoire. Je voudrais également souligner sa disponibilité sa patience et a fait preuve d'une générosité plus que souhaitée dans les situations de dernières minutes auxquelles je les ai parfois confrontés,

Je remercie infiniment M^r Seddiki Sidi Mohammed Lahbib Maître assistant A au Centre Universitaire de Naama, mon promoteur qui malgré ses multiples occupations a bien voulu superviser ce modeste travail. C'est grâce à ses conseils judicieux, sa sympathie, ses précieuses informations et au soutien qu'elle m'a apportés que mon travail a pu voir le jour et pour m'avoir laissé beaucoup de liberté dans mon travail et pour la confiance et le soutien dont elle me gratifie depuis le début de ce mémoire.

Je remercie particulièrement M^{me} Hassaïne Hafida, Maître conférences A à la faculté des Sciences de la Nature et de Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, avoir accepté d'être un membre de mon jury. Qu'elle trouve dans ce mémoire le témoignage de ma reconnaissance et de mon respect.

Merci à toute l'équipe du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, qui égayent l'atmosphère d'un laboratoire qui m'a chaleureusement accueilli.

LISTE DES ABREVIATIONS

AmB: Amphotéricine B.

ATCC: American Type Culture Collection.

CLSI: Clinical Laboratory Standard institute.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

SCMI: Sessile Concentration Minimale Inhibitrice.

CVP: Cathéter Vasculaire Périphérique.

FLZ: Fluconazole.

IFI: Infections Fongiques Invasives.

MEC: Matrice Extracellulaire.

NNIS: National Nosocomial Infections Surveillance.

PBS: Phosphate Buffered Saline "Tampon Phosphate Salé "

QS: Quorum Sensing.

RPMI: Roswell Park Memorial Institut

USI: Unité de Soins Intensifs.

Liste des figures

Figure N°1: Arbre phylogénétique des principales levures et relation entre les espèces de <i>Candida</i> et <i>Saccharomyces</i>	5
Figure N°2: Différents constituants de la paroi fongique.....	7
Figure N°3: Microscopie électronique à balayage de la souche <i>Candida albicans</i> MIFKT4.....	9
Figure N°4: Morphologie de <i>Candida glabrata</i>	10
Figure N°5: Phases de formation d'un biofilm par <i>Candida albicans</i> sur un cathéter en PVC.....	14
Figure N°6: Microscopie électronique à balayage d'un biofilm formé par <i>C. albicans</i> sur un cathéter vasculaire implanté dans un rat.....	16
Figure N°7: Perçu schématique des mécanismes de résistance des biofilms <i>C. albicans</i>	19
Figure N°8: Structure chimique de l'Amphotéricine B.....	21
Figure N°9: Modélisation tridimensionnelle du pore formé par l'amphotéricine B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique.....	22
Figure N°10: Structure chimique du fluconazole.....	23
Figure N°11: Structure tri-dimensionnelle du stérol 14 α déméthylase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en interaction avec le fluconazole.....	24
Figure N° 12: CMI et SCMI 50 de l'AmB et du FLZ des souches de <i>candida</i> spp.....	33

Liste des tableaux

Tableau N°1: CMI et la SCMI de l'AmB et du fluconazole vis-à-vis des souches de référence et des souches isolées.....	31
--	----

Table des matières

Introduction.....	2
-------------------	---

Première partie : Synthèse bibliographique

1. Généralités.....	4
2. Levure <i>Candida</i> spp.....	5
2.1. Taxinomie.....	5
2.2. Morphologie.....	6
2.3. Pathogénicité.....	7
3. Principaux souches pathogènes de <i>Candida</i> spp.....	8
3.1. <i>Candida albicans</i>	8
3.2. <i>Candida glabrata</i>	10
3.3. <i>Candida parapsilosis</i>	11
4. Infections nosocomiales fongiques.....	11
5. Biofilms de <i>Candida</i> spp.....	11
5.1. Phases de formation des biofilms.....	12
5.2. Architecture des biofilms de <i>candida</i> spp.....	15
5.3. Implication du biofilm candidal dans les infections fongiques	17
5.4. Résistance des biofilms de <i>Candida</i> spp.....	17
6. Mécanisme de résistance des biofilms fongique.....	18
7. Classe des agents antifongiques.....	20
7.1. Polyènes.....	20
7.2. Dérivés azolés.....	22

Deuxième Partie : Matériel et méthodes

1. Repiquage des souches de <i>Candida</i> spp	25
2. Tests de résistance aux agents antifongiques	25
2.1. Préparation des solutions mères des agents antifongiques	25
2.2. Préparation du XTT et du Ménadione.....	26
2.3. Préparation des inocula.....	26
2.4. Détermination des CMI.....	27
2.5. Détermination des SCMI.....	27
2.5.1. Formation des biofilms.....	27
2.5.2. Tests antifongiques.....	27
2.5.3. Test de réduction du tétrazolium.....	28

Troisième Partie : Résultats et discussion

1. Tests antifongiques.....	30
1.1. Détermination des CMI et SCMI.....	30

Quatrième Partie : Conclusion générale

Conclusion	35
------------------	----

Cinquième Partie : Références bibliographiques

Références bibliographiques	37
-----------------------------	----

Sixième Partie : Annexes

Annexes	48
---------	----

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Avec l'augmentation des situations d'immunodéficience, les infections fongiques sont devenues, à travers le monde, une cause importante de mortalité. Ces infections sont déterminées par deux types de micro-organismes fongiques, les champignons filamenteux et les levures ; parmi ces dernières, les levures qui appartiennent au genre *Candida* spp.

Candida albicans demeure l'espèce la plus incriminée dans les infections fongiques, mais les espèces non-*albicans* sont de plus en plus rapportées, en particulier dans les infections disséminées tel que les candidémies. Ces dernières exigent des traitements antifongiques efficaces, doués d'effets fongistatique et/ou fongicide.

Par ailleurs, les infections fongiques sont associées à la formation des biofilms; ces structures présentent une résistance accrue au système immunitaire de l'hôte et aux traitements antifongiques. Parmi ces derniers, l'amphotéricine B et le fluconazole qui sont des agents antifongiques les plus utilisés aux niveaux des hôpitaux algériens.

Dans ce contexte notre recherche s'inscrit, elle consiste à tester l'effet de l'amphotéricine B et du Fluconazole vis-à-vis des souches de levures du genre *Candida* spp. déjà prélevées à partir des dispositifs médicaux implantés chez des patients hospitalisés dans le CHU de Sidi Bel Abbès.

Ces tests consistent à calculer les concentrations minimales inhibitrices (CMIs) et les concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles (SCMIs) de chaque souche et de mettre en évidence les levures qui ont la capacité de former les biofilms.

PREMIÈRE PARTIE

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités

En pathologie humaine, les levures du genre *Candida* sont des agents étiologiques les plus fréquents dans les infections fongiques invasives. *Candida* spp est l'agent commensal de la peau et des muqueuses humaines, habituellement non pathogènes chez l'individu sain, mais profitent des altérations des défenses immunitaires de l'hôte pour proliférer [(Counelle De Pontanel et coll., 1987), (Chabasse et coll., 1999), (Haynes, 2001)].

D'après Senet et ses collaborateurs en 1995, *Candida* spp peut provoquer des infections fongiques gravissimes selon le terrain du patient en association avec certains facteurs de risques ; parmi eux, les facteurs intrinsèques physiologiques ou pathologiques (âges extrêmes de la vie, grossesses, etc..) et les facteurs extrinsèques qui sont essentiellement de nature iatrogène.

Depuis le début des années quatre-vingt, le phénomène de mycoses profondes a connu une augmentation remarquable, principalement chez les patients immunodéprimés (Fournier, 2011).

On connaît deux modes de vie des cellules fongiques dans les conditions naturelles, le mode planctonique où les cellules flottent librement dans le milieu, et le mode biofilm où les cellules sessile sont adhérees à une surface (De chalvet de rochemonteix, 2009).

Les cellules des biofilms présentent des propriétés phénotypiques qui sont radicalement différents de leurs homologues planctoniques, elles sont plus résistantes aux agents antifongiques et aux défenses immunitaires de l'hôte. [(Gilbert et coll, 1997), (Habash et coll, 1999)].

De plus, en 2011, Boucherit-Atmani et ses collaborateurs, ont démontrés que la résistance des biofilms de *C. albicans* augmente au cours des différentes phases de leur formation jusqu'à ce qu'elle atteigne son seuil à la phase de maturation (48heures).

2. *Candida* spp

Les souches de *Candida* spp sont considérées comme étant la principale cause d'infection fongique invasive chez les patients hospitalisés (Taieb et coll., 2010).

C'est une levure ubiquitaire retrouvée comme agent commensal de la peau, du tractus digestif et urinaire (Eggimann et coll; 2003).

2.1. Taxonomie

Candida spp est un organisme eucaryote appartenant au règne des champignons, au phylum des Ascomycètes, au sous-phylum des Saccharomycotina, de la classe des Saccharomycètes, de l'ordre des Saccharomycétales, du groupe des Saccharomycétales mitosporiques et du genre *Candida* (Figure N°1) (Beucher, 2007).

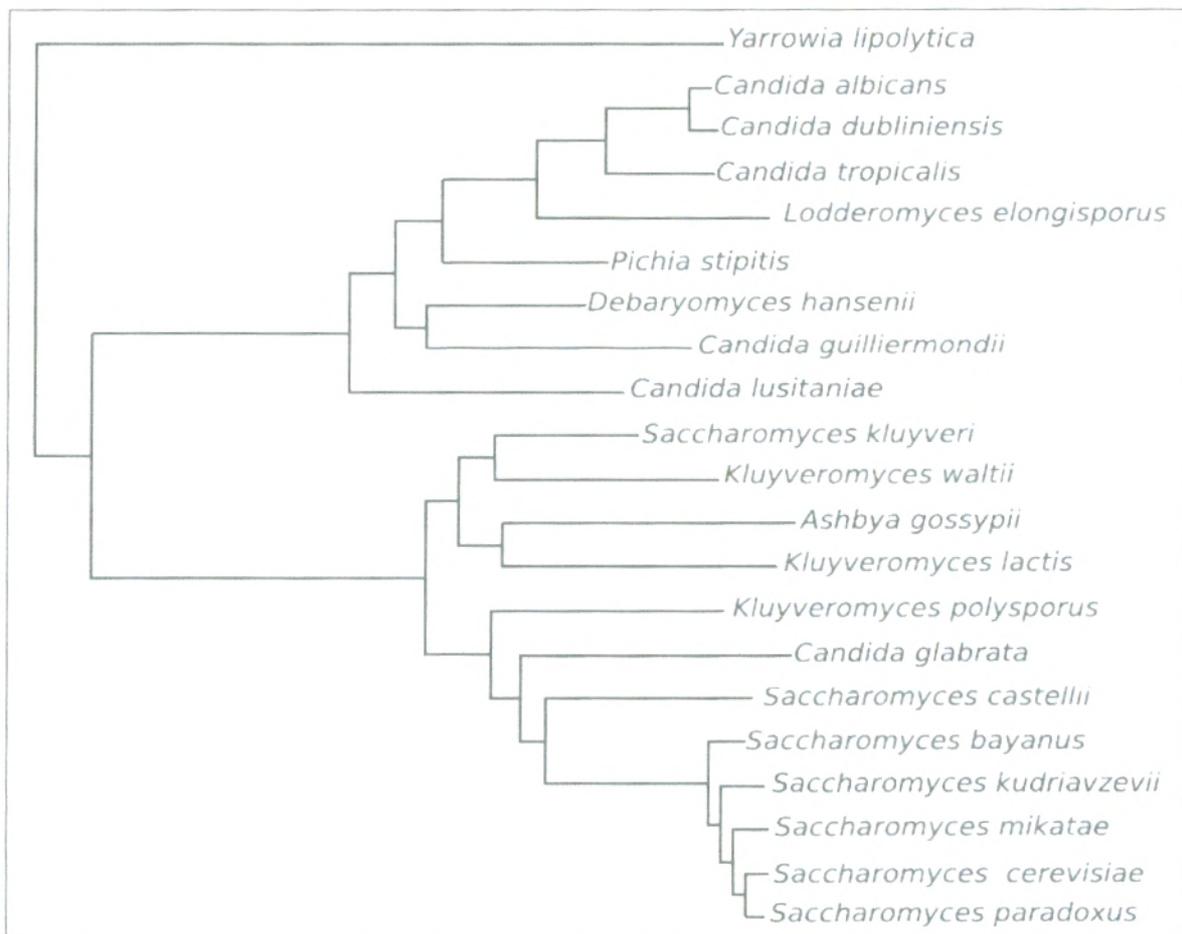


Figure N°1: Arbre phylogénétique des principales levures et relation entre les espèces de *Candida* et *Saccharomyces* (Marcet-Houben et Gabaldon, 2009).

2.2. Morphologie

Candida spp est une levure unicellulaire possédant un seul noyau et se reproduisant soit de façon asexuée par bourgeonnement ou scissiparité, soit par reproduction sexuée en formant des spores. Elle est non pigmentée, non capsulée, à bourgeonnement multilatéral, et productrice ou non de filaments (**Fournier, 2011**).

Cette levure apparait macroscopiquement sous forme de colonies blanches à crémeuses de 1 à 3 mm. Suivant l'espèce, leurs textures peuvent être pâteuse, lisse, brillante, sèche, ridée ou terne ; produisant des blastoconidies, rondes ou allongées (**Develoux et coll., 2005**).

D'après Beucher (2007), les principales formes morphologiques de *Candida* spp sont la blastospore, la forme mycélienne vraie, la forme pseudo-mycélienne, le tube germinatif et enfin le chlamyospore. Ces différentes formes morphologiques peuvent être obtenues par simple modification des paramètres environnementaux.

Selon Clarissa et ses collaborateurs (2003), dans des conditions environnementales limitées en oxygène, certaines espèces de *Candida* forment des chlamyospores, qui se présentent sous forme de grandes cellules épaisses sur les extrémités des cellules attachés aux hyphes et, parfois, aux pseudohyphes. Ces derniers peuvent être longs et ramifiés.

D'autre part, selon Fournier (2011), la membrane fongique de *Candida* spp est riche en lipides dont l'ergostérol, alors que la paroi est composée de sucres, particulièrement les mannanes et les glucanes, de protéines, de phospholipide et de chitine (Figure N° 2).

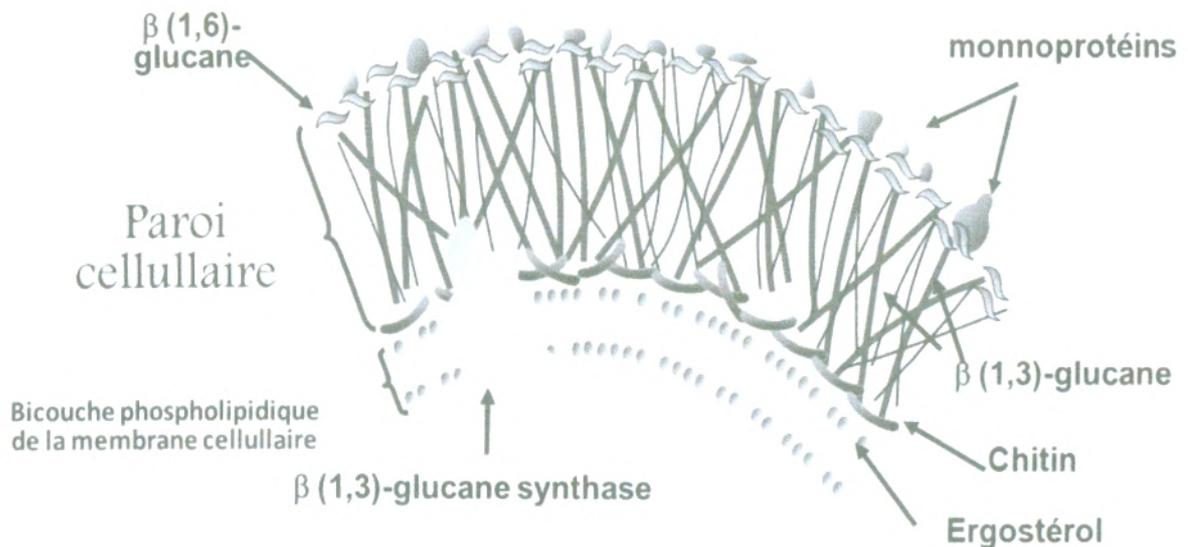


Figure N°2: Différents constituants de la paroi fongique (Diamond, 1999).

2.3. Pathogénicité de *Candida* spp

Selon Russell et ses collaborateurs (1973), *Candida* spp est une levure commensale de l'homme ; la colonisation débute tôt, environ 7,1% des enfants sont colonisés par *Candida* spp ou d'autres levures le jour même de leur naissance, alors que 96% d'entre eux présentent une colonisation buccale au terme du premier mois de leur vie.

Ces levures sont susceptibles de devenir pathogènes et d'envahir les tissus superficiels ou profonds de certains patients immunodéprimés ou qui présentent un déséquilibre endocrinien (diabète, grossesse...), et d'individus âgés ; ou encore ceux traités par chimiothérapie, ou les sujets subissant un traitement antibiotique à large spectre (Beucher, 2007).

Chez l'adulte sain, la colonisation est courante (Gorbach et coll., 1967). En effet, Soll et ses collaborateurs ont montré en 1991 que plusieurs surfaces du corps pouvaient être colonisées chez un patient asymptomatique, notamment la muqueuse buccale et vaginale.

Néanmoins, le maintien de *Candida* spp à son statut commensal implique que l'équilibre hôte - *Candida* ne soit pas perturbé. Si un déséquilibre survient en faveur de cette levure, le plus souvent immunitaire ou suite à une prise d'antibiotiques à large spectre, elle peut se multiplier et devient pathogène opportuniste responsable de candidoses superficielles ou profondes (Soll et coll., 1991).

3. Souches pathogènes de *Candida* spp

Le genre *Candida* comprend environ 200 espèces dont les plus rencontrées en pathologie humaine sont : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* et *C. dubliniensis* [(Lodder, 1970), (Fitzpatrick et coll., 2006)].

Candida albicans est de loin l'espèce la plus fréquemment retrouvée, mais l'incidence des espèces de *Candida* non-*albicans*, comme *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*, est croissante dans les prélèvements cliniques ; cette augmentation est, en partie, la conséquence de la formation des biofilms (Gilfillian et coll., 1998).

3.1. *Candida albicans*

Cette levure est considérée comme un microorganisme commensal, elle est retrouvée dans la flore normale du tractus gastro-intestinal et de la peau chez environ 70% de la population (Runhnke et coll., 2002). Cependant, *Candida albicans* peut devenir pathogène opportuniste et peut subir des transitions morphologiques entre la forme levure et la forme hyphe, jouant un rôle dans la formation de biofilm (Irimés, 2008). Cette levure possède des mécanismes d'adaptation complexes lui permettant de survivre dans diverses conditions environnantes et de causer une grande variété d'infections : superficielles (candidoses mucocutanées) ou profondes (candidoses systémiques), souvent mortelles (Segal, 2005).

Dans certaines conditions de culture, et seulement chez *C. albicans* et *C. dubliniensis*, on peut voir apparaître sur les filaments mycéliens, de grosses spores, rondes ou ovales, à paroi épaisse, de 6 à 12 μm de diamètre : ce sont des chlamydospores, considérées comme des formes de résistance de la levure (Figure N° 4) (Odds, 1979).

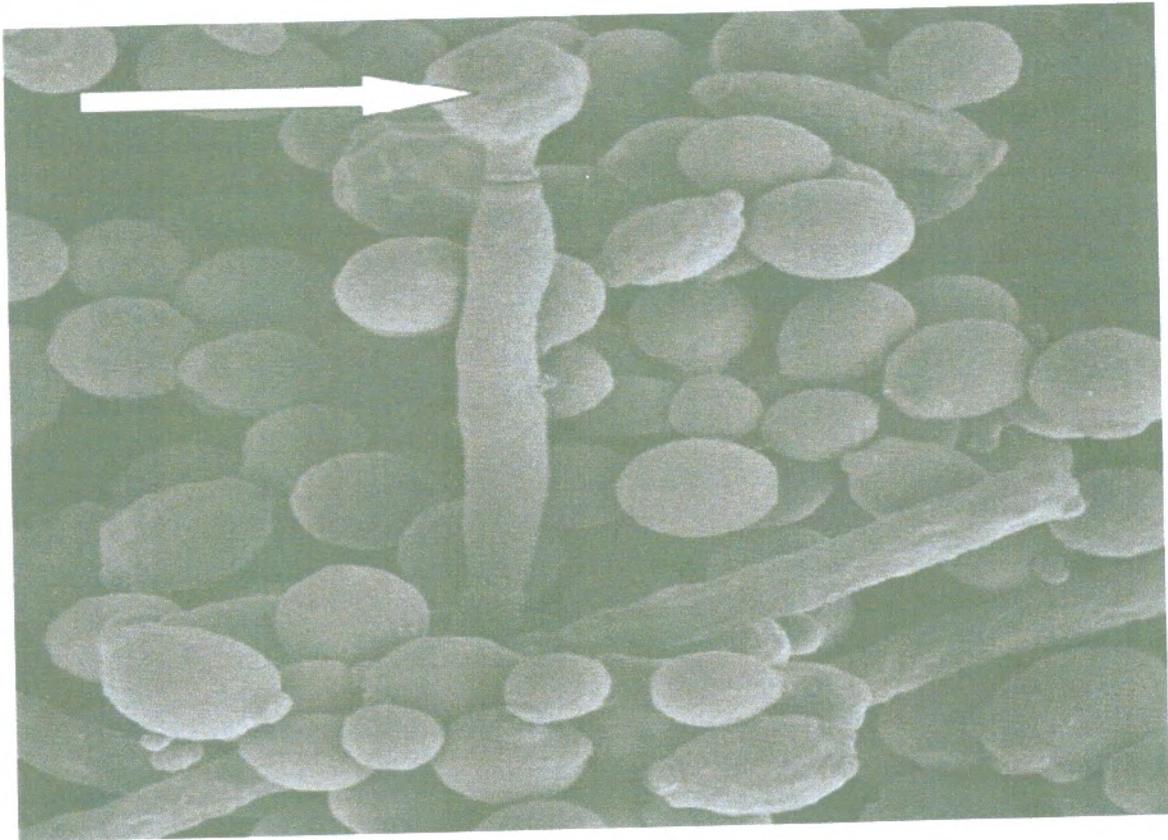


Figure N° 3: Microscopie électronique à balayage de la souche *C. albicans* MIFKT4 isolée après agitation du cathéter au vortex pendant une minute. La flèche indique la chlamydospore (grossissements x 4000) (Boucherit-Atmani et coll., 2011).

3.2. *Candida glabrata*

Candida glabrata a été décrite pour la première fois en 1895 par Berlese. Cette espèce a été classée en deuxième position en Europe et aux Etats-Unis en termes de fréquence après *C. albicans*, elle est détectée au niveau du tube digestif et des muqueuses humaines. Elle est responsable de candidémies, d'infections du tractus urinaire et de candidoses profondes (Fournie, 1981).

D'un point de vue biologique, l'espèce *C. glabrata* est une levure très petite (1-4 μm) qui est incapable de produire des formes filamenteuses (Figure N° 5) (Vandeputte, 2008).



Figure N° 4 : Morphologie de *Candida glabrata*.

(A) Observation macroscopique des colonies sur milieu de Sabouraud (taille réelle);

(B) Observation en microscopie photonique de blastopores en suspension dans du bleu lactique (grossissement x 1000) (Vandeputte, 2008).

3.3. *Candida Parapsilosis*

Candida parapsilosis est typiquement commensal de la peau humaine ; toutefois, lorsque les défenses immunitaire de l'hôte sont compromissent ou l'équilibre de la microflore normale est perturbée, *C. parapsilosis* se transforme à un agent pathogène opportuniste **(István et coll., 2011)**.

C. prapsilosis est responsable d'infections cutanées, mais aussi d'infections profondes qui peuvent être d'origine endogène ou exogène **[(Husson et lortholary, 2004) ; (Trofa et coll., 2008)]**.

De plus, en 2011, Fournier a montré que la levure *Candida parapsilosis* est connue pour son habilité à former des biofilms sur les implants médicaux.

4. Infections nosocomiales fongiques

Les Infections fongiques opportunistes sont dues à des champignons microscopiques ou micromycètes difficiles à diagnostiquer et à traiter, aboutissant à l'envahissement des organes profonds **[(Edwards, 1991) ; (Scott et william, 1996)]**.

Les infections fongiques acquises à l'hôpital, responsables des infections invasives, augmentent particulièrement dans les unités de soins intensifs et représentent une source importante de morbidité et de mortalité **(Botterel, 2007)**. Cependant, le National Nosocomial Infections Surveillance système (NNIS) a signalé, entre 1980 et 1990, une augmentation constante du taux des infections nosocomial fongiques de 2 à 3.8 ‰ des cas d'admissions à l'hôpital et développant une candidémie **(Beck-Sague et coll., 1993)**.

5. Biofilms de *Candida* spp

Un biofilm fongique est une communauté de micro-organismes adhérant entre eux, fixés à une surface et enrobés dans une matrice polysaccharidiques **(Ramage et coll, 2005a)**.

Les biofilms de *Candida* spp, sont constitués d'un réseau dense de levure adhérant à une surface, ce réseau est recouvert d'une matrice extracellulaire auto-synthétisée. La formation du biofilm est une stratégie de survie, car les biofilms des levures sont plus résistantes aux stress environnementaux et aux agents antifongiques **(Iñigo et coll., 2012)**.

D'après De Chalvet de Rochemonteix (2009), le passage d'un mode de vie planctonique (individuel), à un mode de vie communautaire (sessile), est un processus dynamique et complexe qui est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotypes des micro-organismes.

En 2001, Hornby et ses collaborateurs, ont décrit un composé lipophile qui permettait d'empêcher la transition blastospore-mycélium chez *Candida spp*, ce composé a été identifié comme étant le farnésol ; cet agent a pour but d'inhiber la formation des biofilms et la filamentation (**Oh et coll., 2001**). Par contre le tyrosol qui a été isolé des biofilms de *C. albicans* et qui joue un rôle important en assurant un contrôle positif pour le passage à la forme hyphes, stimule la filamentation dans des conditions permissives pour la formation des tubes germinaux (**Alem et coll., 2006**).

Le farnésol et le tyrosol sont des molécules du quorum sensing des biofilms de *Candida spp*. Le farnésol a des effets similaires sur *C. parapsilosis* en l'inhibant la formation des biofilms et celle des pseudo-hyphes (**Laffey et coll., 2005**). De plus, Kuhn et ses collaborateurs, ont démontrés en 2002b que *C. albicans* forme un biofilm mature bien plus complexe que les espèces, également pathogènes, de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*.

5.1. Phases de formation des biofilms de *Candida spp*

La formation des biofilms fongiques passe par divers phases de développement, l'adhésion, la colonisation, la maturation et la dispersion ; ces différentes phases sont régies par des événements moléculaires complexes (**Ramage et coll., 2009**). Plusieurs processus clés sont susceptibles de jouer un rôle vital au cours de la formation des biofilms, tels que l'adhésion cellule-substrat et cellule-cellule, le développement des hyphes, l'élaboration de la matrice extracellulaire (MEC), le quorum sensing, et la dispersion des cellules [(**Blankenship et coll., 2006**), (**Iñigo et coll., 2012**)].

Selon Jabra-Rizk 2004, la formation du biofilm se déroule en trois phases de développement : phase d'adhésion (de 0 à 11 heures), phase intermédiaire (de 12 à 30 heures) et phase de maturation (de 30 à 72 heures).

5.1.1. Phase d'adhésion

L'adhésion est une étape extrêmement importante dans le processus de formation des biofilms (**Chaffin, 1998**). La surface colonisée est tout d'abord recouverte par un film conditionnant constitué essentiellement de protéines spécifiques souvent désignées comme adhésines (Figure N°5 a) **[(Henriques et coll., 2002), (Douglas, 2003)]**.

Pour certaines souches de *Candida*, la phase d'adhésion est suivie d'une période de formation de tubes germinaux (Figure N°5 b) **[(Baillie et coll., 1999), (Monds et coll., 2008)]**.

Cette première phase se déroule en deux temps successifs, réversibles et irréversibles.

a- Réversible est caractérisée par l'attachement initial à la surface qui est souvent faible, pendant laquelle, la cellule adhérente peut se détacher facilement de la surface et reprendre son statut planctonique libre.

b- Irréversible se caractérise par l'adhésion forte des blastospores à la surface **[(Chandra et coll., 2001a), (Jabra-Risk et coll., 2004)]**.

5.1.2. Phase intermédiaire

Dès que l'attachement à la surface devient irréversible, le biofilm entame la phase de croissance (**Clutterbuck, 2007**). Cette phase se déroule entre 12 et 30 heures après la phase d'adhésion, qui assure la multiplication par bourgeonnement et la formation d'une couche basale de micro-colonies de levures **[(Baillie et coll., 2000), (Watnick et coll., 2000)]**. Une matrice extracellulaire polysaccharidique commence à se produire (à environ 12-14 heures) où les micro-colonies de *Candida* spp sont incluses (Figure N°5 c) **(Al-Fattani et coll., 2006)**.

5.1.3. Phases de maturation

Les biofilms formés par *Candida* spp sont constitués de levures ovoïdes (blastospores) et de filaments (hyphes) organisés en une bicouche, les blastospores constituant la couche basale alors que les hyphes formant la couche supérieure ramifiée plus épaisse (Figures N°5 d) **(Hawser, 1994)**.

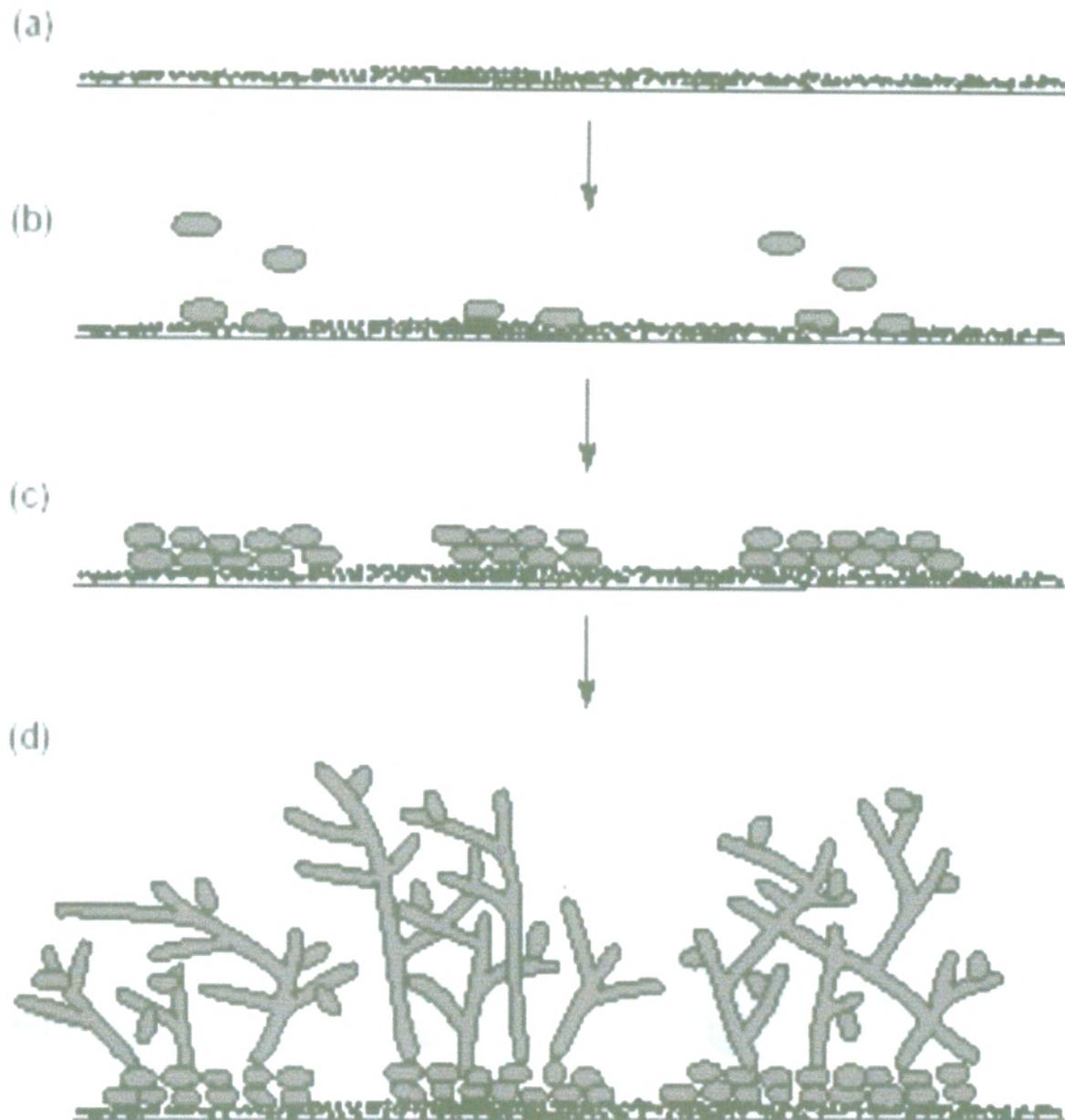


Figure N°5 : phases de formation d'un biofilm par *Candida albicans* sur un cathéter en PVC.

- (a) La surface est recouverte par un film conditionnant de protéines adsorbées.
- (b) Adhésion initiale de la levure sur la surface.
- (c) Formation de la couche basale de microcolonies de levures.
- (d) Formation de la couche supérieure hyphale et développement de la matrice entourant les blastopores et les hyphes (Douglas, 2003).

Selon d'autres auteurs, la formation et le développement du biofilm peuvent être divisés en quatre étapes [(Chandra et coll., 2001a), (Blankenship et coll., 2006)].

- L'adhésion des micro-organismes à une surface.
- La formation de discrètes colonies et l'organisation des cellules
- La sécrétion de la matrice extracellulaire (MEC) et la maturation en une structure en trois dimensions.
- La diffusion de la progéniture des cellules du biofilm.

5.2. Architecture des biofilms candidals

La plupart des biofilms rencontrés sont hétérogènes, alors que la présence d'une espèce de micro-organisme ou d'une autre au sein du biofilm dépend des conditions environnementales (De chalvet de rochemonteix, 2009).

D'après Chandra (2001), l'architecture des biofilms de *Candida* spp dépend du substrat et des conditions de croissance, elle varie également selon les différentes espèces de *Candida* et selon les souches (Li, 2003).

Les biofilms mature de *C. albicans* sont plus complexe que ceux de *C. parapsilosis* et de *C. glabrata*. Ces derniers ne forment en effet que des biofilms composés de levures bourgeonnantes (Guillemot, 2006).

Les biofilms de *C. albicans* sont composés approximativement de 15% de cellules de levures, de pseudohyphes ou encore d'hyphes (Figure N°6) et de 85% d'une matrice extracellulaire. Cette matrice enrobe les cellules et assure la circulation des nutriments nécessaires à leur développement ainsi que les déchets à éliminer (Douglas, 2002). Elle joue, également, un rôle important dans la défense contre les phagocytes et dans la diminution des concentrations des agents antifongiques (Hawser 1998).

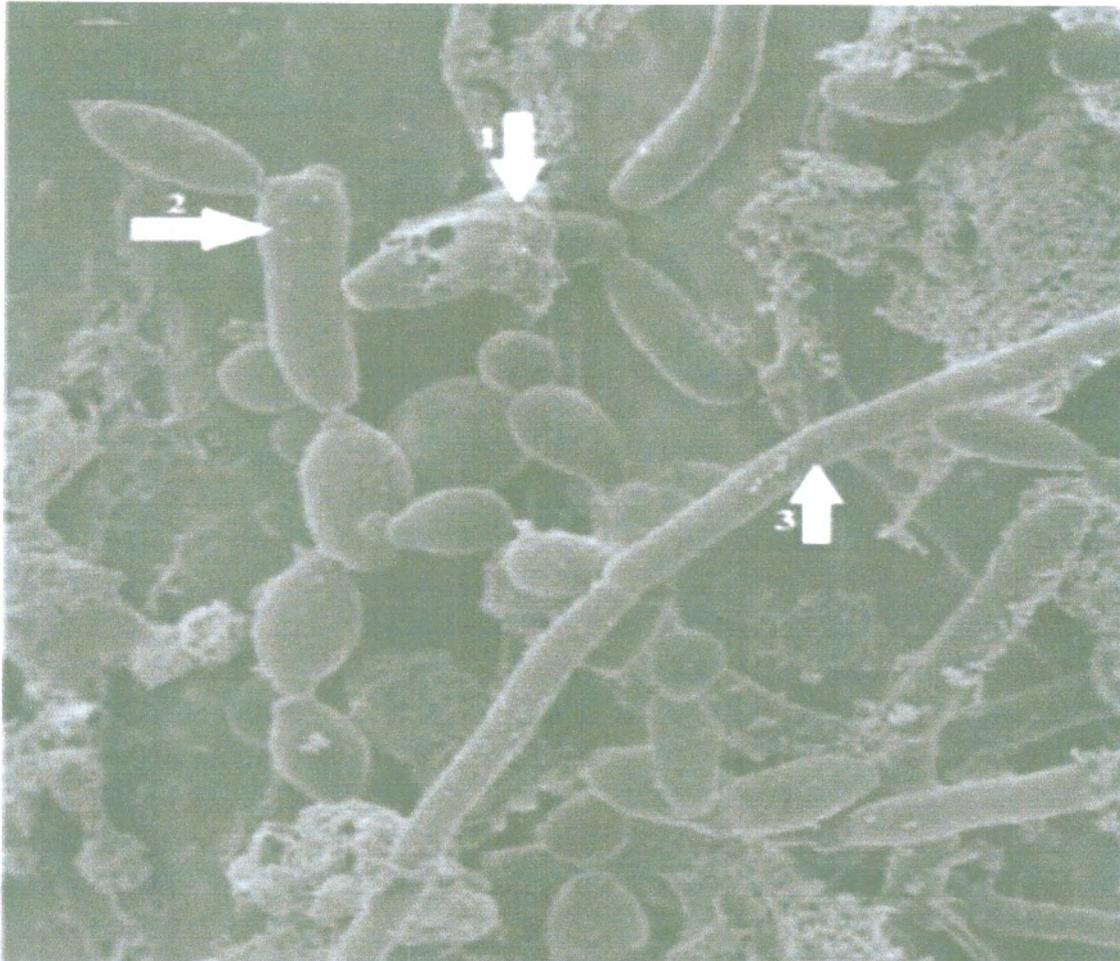


Figure N°6: Microscopie électronique à balayage d'un mélange de formes morphologiques de biofilm de *Candida albicans* développé sur la surface intérieure de la CVC. Grossissement $\times 4500$ (Seddiki et coll, 2013).

5.2. Implication du biofilm candidal dans les infections fongiques

Il devient de plus en plus certain qu'une importante proportion d'infections microbiennes chez l'homme implique la formation de biofilms (**Costerton et coll., 1987**).

D'après Khardori et Yassien en 1995, il a été estimé qu'environ 65% de toutes les infections microbiennes de l'homme impliquent des biofilms, alors que, *Candida* est le genre le plus fréquemment retrouvé au cours des infections fongiques, qui sont généralement classés en quatrième place des infections hématogènes (**Montravers et coll., 2010**).

De plus, il a été montré que la plupart des dispositifs médicaux invasifs comme les cathéters sont propices à la colonisation et à la formation de biofilm par les levures du genre *Candida*. En servant de réservoir, la formation d'un biofilm sur un matériel médical peut être la source d'une future infection, à savoir, pour le genre *Candida*, une future candidémie (**Kojic, et coll., 2004**).

La présence de biofilm sur le matériel médical peut également être la cause d'un échec de fonctionnement du matériel. De plus, les biofilms de *Candida* spp présentent, généralement, une résistance accrue aux thérapeutiques antifongiques et au système immunitaire de l'hôte (**Douglas, 2002**).

5.4. Résistance des biofilms de *Candida* spp

L'une des caractéristiques déterminantes des biofilms de *Candida* spp est leur résistance aux agents antifongiques. La résistance du biofilm de *Candida* spp par rapport à sa forme planctonique a été mise en évidence dès 1995 par Hawser et ses collaborateurs. Ces biofilms ont une plus haute résistance à la thérapie antifongique, tels que l'amphotéricine B, et une grande capacité à résister aux défenses immunitaires de l'hôte [(**Douglas, 2003**), (**Coogan et coll., 2006**)].

Différents mécanismes pourraient être responsables de cette résistance comme la plus forte densité de cellules au sein du biofilm, l'effet de la matrice extracellulaire, la présence de cellules persistantes ou encore la surexpression de gènes de résistance (**Kuhn et coll., 2004**).

En effet, la résistance du biofilm est un phénomène multifactoriel, elle constitue un large spectre de défense qui soit efficace contre de nombreux types d'agents antifongiques. [(Ramage et coll., 2001a et 2005a), (Al-Dhaheiri et coll., 2008)]

6. Mécanismes de résistance des biofilms

Le développement de nouveaux agents antifongiques demeure nécessaire étant donné que les biofilms de *Candida* spp développent leurs mécanismes de résistance. Les travaux de Koudhi et ses collaborateurs (2010), démontrent que la résistance repose notamment sur la modification de la perméabilité membranaire, c'est-à-dire, la diminution de l'influx et l'augmentation de l'efflux.

Par ailleurs, il existe différents mécanismes qui peuvent être responsables de la résistance intrinsèque des biofilms de *Candida* spp, il s'agit notamment de :

- Les effets de la matrice du biofilm sur la pénétration des agents antifongiques.
- Diminution du taux de croissance.
- L'expression des gènes de résistance.
- La présence des cellules persistantes [(Baillie et coll., 2000); (Lewis, 2001)].

L'existence des cellules dites persistantes favorise le processus de résistance ; en fait, cette population particulière survit à des concentrations élevées en agent antifongique et peut reformer, par la suite, un nouveau biofilm. Ce type de cellules est reconnu dans les biofilms de *C. albicans*, *C. krusei* et *C. parapsilosis*, mais pas dans les biofilms de *C. glabrata* ce qui suggère que les cellules persistantes ne sont pas les seules responsables de la résistance aux agents antifongiques chez les biofilms de *Candida* spp [(Al-Dhaheiri et coll., 2008) ; (Lewis, 2010)].

Toutefois, la résistance du biofilm est un phénomène complexe qui ne peut être expliqué par un seul mécanisme, mais plutôt, il est multifactorielle et peut impliquer différents mécanismes moléculaires de résistance par rapport à celles visualisées chez les cellules planctoniques [(Douglas, 2002) ; (Ramage et coll., 2005b)].

Les différents facteurs qui déterminent la résistance antifongique au sein du biofilm comprennent la densité, le stress, les cellules persistantes, la matrice extracellulaire, l'efflux, les produits surexprimés et la physiologie générale du biofilm (Figure N°7) (Ramage et coll., 2012).

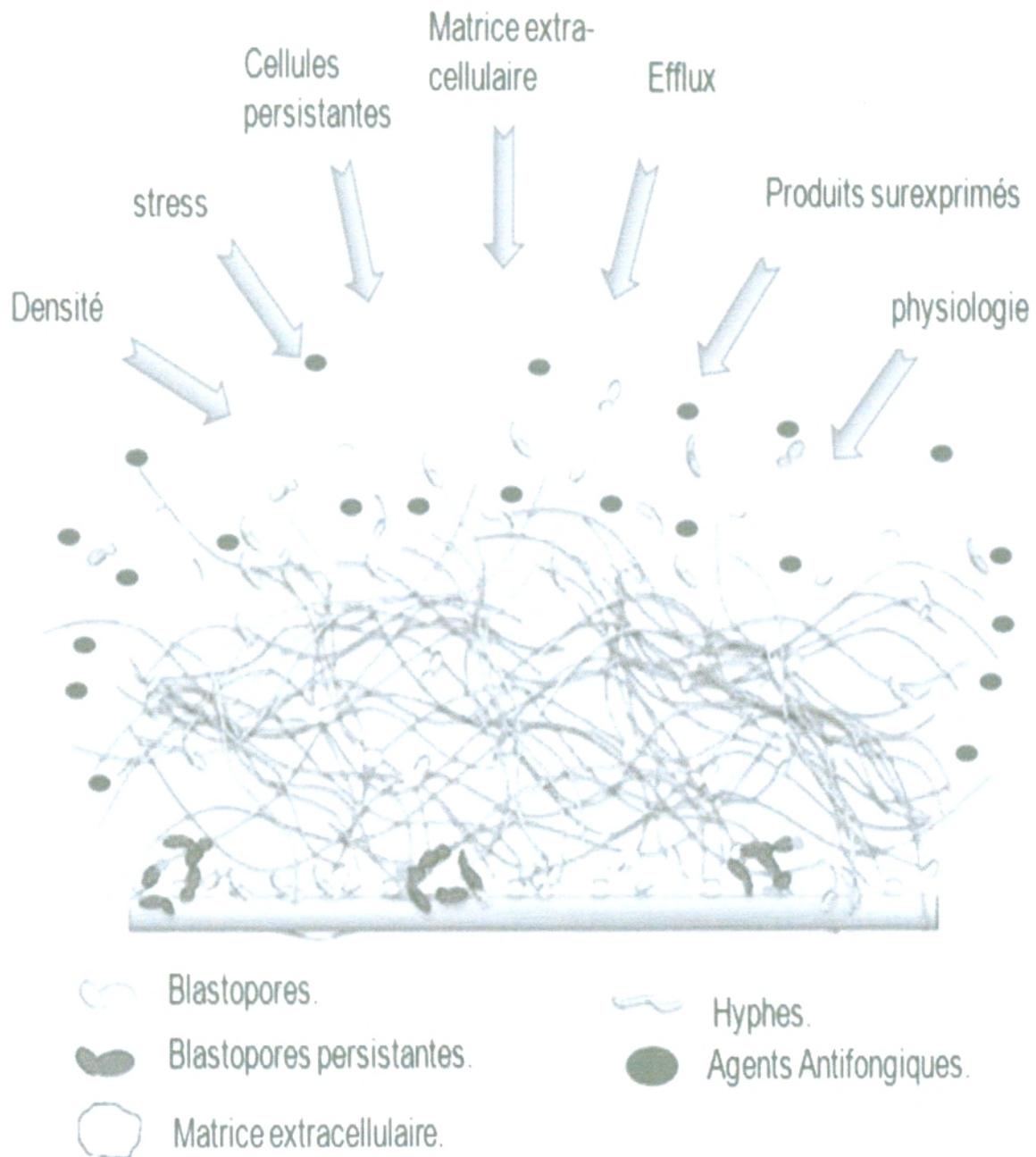


Figure N°7: Aperçu schématique des mécanismes de résistance des biofilms fongiques (Ramage et coll., 2012).

Le principale mécanisme de résistance au fluconazole est lié à des altérations de la voie de biosynthèse de l'ergostérol par une surexpression du gène **ERG11** qui code pour l'enzyme 14 α -déméthylase ou par une altération des enzymes cibles qui mène à une affinité réduite pour cet agent antifongique [(White, et coll., 1998), (Kelly et coll., 1999), (Lamb et coll., 2000)]. Plus les gènes codant pour les pompes à efflux sont surexprimés, plus l'efflux d'antifongique est important (Prasad et coll., 1995). La réduction de l'accumulation intracellulaire des agents antifongiques, due à un efflux rapide, est un autre mécanisme prédominant de la résistance des biofilms de *Candida* spp (Morschhauser, 2002).

7. Classes des agents antifongiques

Il existe, actuellement, plusieurs agents antifongiques systémiques appartenant à quatre classes pharmacologiques, chacune d'elles possédant un mode d'action particulier.

- 1- Les polyènes, agissent en se fixant sur l'ergostérol, ce qui conduit à la formation de pores dans la membrane;
- 2- Les azolés, inhibent la synthèse de l'ergostérol ;
- 3- La 5-fluorocytosine, inhibe la synthèse d'ADN et la synthèse protéique ;
- 4- Les échinocandines inhibent la synthèse des 1-3-beta-glucanes de la paroi (Sanglard, et coll., 2002).

Parmi les agents antifongiques les plus utilisés au sien des hôpitaux, l'amphotéricine B (Polyène) et le fluconazole (Azolé).

7.1. Polyènes

Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, principal composant de la membrane plasmique des champignons, leur caractère amphotère leur permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores. Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes sont connues, cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotericine B (AmB), la nystatine et la natamycine (Beucher, 2007).

a- Amphotéricine B (AmB, Fungizone®)

Découverte en 1957 à partir d'une culture de *Streptomyces nodosus*, il représente le premier agent antifongique fongicide d'administration intraveineuse, [(Patel, 1998) ; (Chabasse et coll., 1999)] l'amphotéricine B a été le traitement de prédilection pendant les 30 dernières années pour soigner les candidémies ; il agit en se fixant sur l'ergostérol et déstabilise les fonctions de la membrane de la cellule (Beucher, 2007).

D'après Andrés et ses collaborateurs en 2001, l'amphotéricine B est une molécule de petite taille (< 25 nm) qui est insoluble dans l'eau. (Figure N° 8)

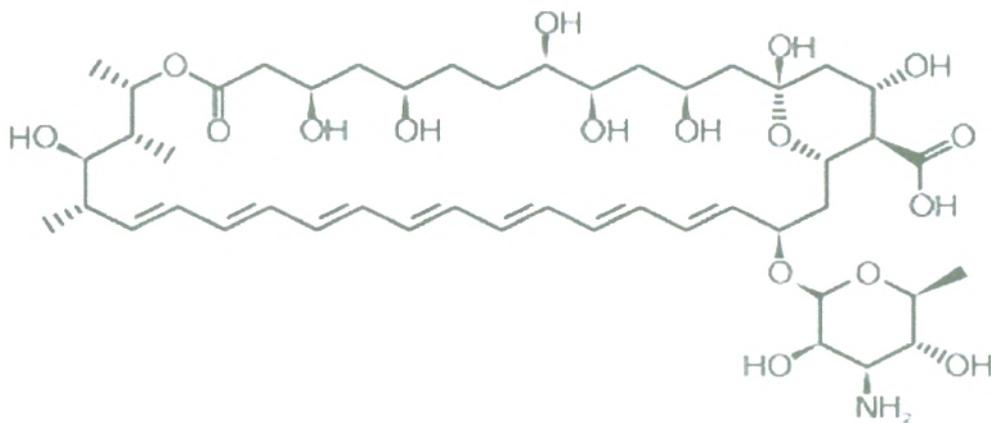


Figure N°8 : Structure chimique de l'amphotéricine B (Lemke et coll., 2005).

Etant très peu hydrosoluble, et donc très peu absorbée au niveau de la muqueuse gastro-intestinale, l'amphotéricine B est de loin l'agent antifongique polyénique de choix pour traiter les infections systémiques (Lemke et coll., 2005).

Par rapport au mode de vie planctonique, les études de Uppuluri et ses collaborateurs (2011), révèlent que l'AmB a un pouvoir d'inhibition moindre vis-à-vis des biofilms de *Candida* spp. Néanmoins, les doses élevées de cet agent antifongique exposent les patients à une toxicité rénale (Ito et coll., 2005).

a- Mode d'action de l'AmB

Les données de résonance magnétique nucléaire indiquent que 8 molécules d'AmB s'associent à 8 molécules d'ergostérol par leurs parties polyéniques tandis que les faces hydrophiles ménagent un canal central de 70 à 100 nm de diamètre (Figure N°9).

La formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique tandis que le canal permet la fuite des composants intracellulaires, notamment les ions K^+ , provoquant la lyse cellulaire (Lemke et coll., 2005).

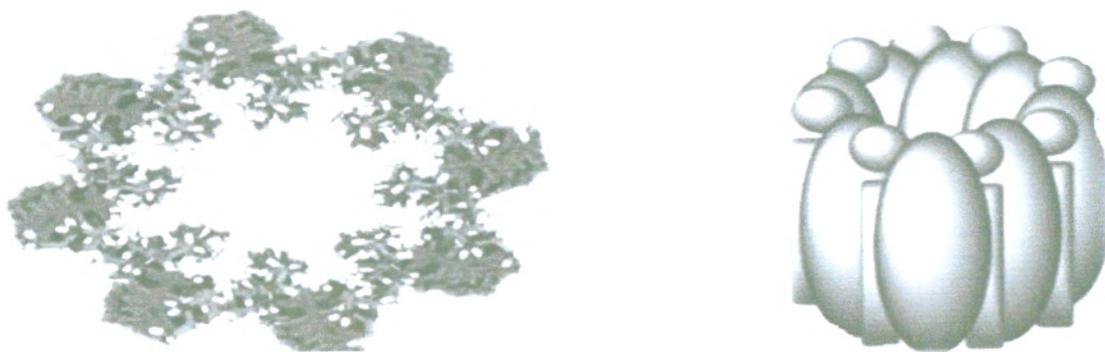


Figure N°9: Modélisation tridimensionnelle du pore formé par l'amphotéricine B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique.

Blanc: Hydrogène, **Vert:** Carbone, **Rouge:** Oxygène, **Bleu:** azote, **Mauve:** ergostérol (Baginski et coll., 1997).

7.2. Dérivés azolés

Les dérivés azolés, exemple le fluconazole, sont des agents antifongiques souvent utilisés en clinique, se sont des molécules cycliques contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé (imidazoles) ou trois atomes (triazolés) (Maertens, 2004).

a- Fluconazole (triazolés)

C'est un agent antifongique fongistatique, synthétisé en 1990, utilisée dans les cas de candidoses profondes vu sa faible toxicité et son large spectre (Kettani et coll., 2006).

Le fluconazole est le traitement de référence pour les candidémies car cet agent est actif sur la plupart des *Candida* spp en inhibant le cytochrome P450 14 α -lanostérol déméthylase de la cellule (Beucher, 2007).

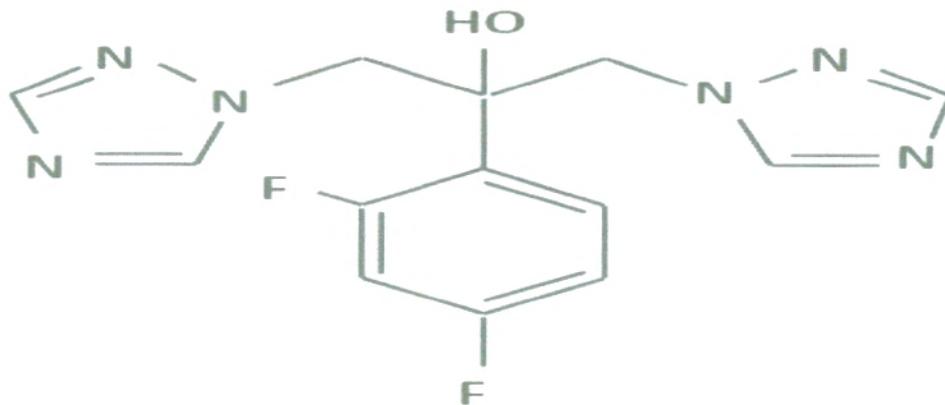


Figure 10: Structure chimique du fluconazole (Vandeputte, 2008).

De ce fait, l'utilisation généralisée du fluconazole pour traiter les infections à *Candida* spp peut être attribuée à sa grande biodisponibilité, son coût réduit et à la possibilité de l'administrer par voie orale ou intraveineuse [(Martin, 1999), (Spellberg et coll., 2006)].

Cependant, le fluconazole est peu efficace contre *C. glabrata* et inactif contre *Candida krusei* (Beucher, 2007).

a- Mode d'action du fluconazole

Les agents antifongiques azolés ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane fongique, ils inhibent spécifiquement lanostérol 14 α -déméthylase à cytochrome P450, codée par le gène *ERG11*. Cette inhibition se fait par la liaison de l'atome d'azote libre du cycle imidazole ou thiazole à l'atome de fer de l'hème de l'enzyme (Figure N°8), et a, pour conséquence, l'accumulation de dérivés 14 α méthyles, dont leur métabolisme produit des dérivés toxiques, incapables de remplacer l'ergostérol (Carrillo-Muñoz et coll., 2006).

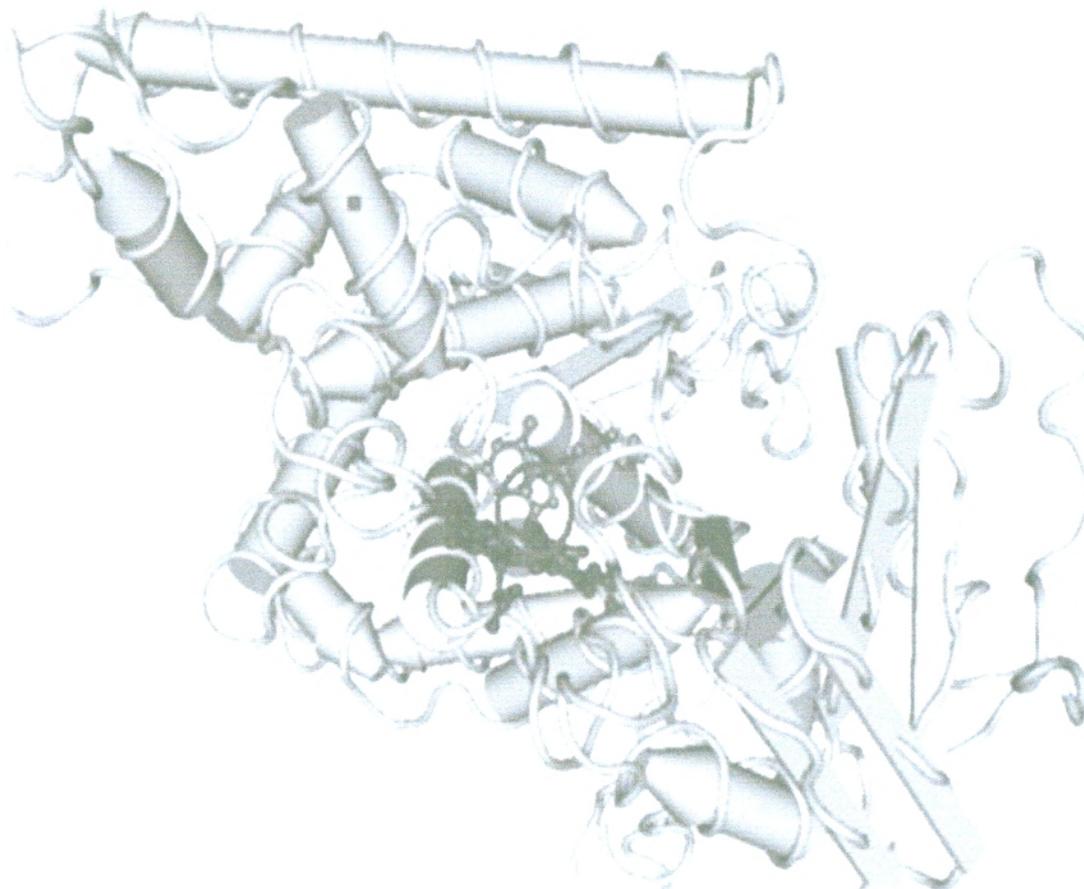


Figure N°11: Structure tri-dimensionnelle du stérol 14 α -déméthylase de *Mycobacterium tuberculosis* en interaction avec le fluconazole (Podust et coll., 2001).

Gris : ERG11p, **Marron:** fluconazole, **Bleu:** hème, **Rouge:** liaison entre l'azote libre du fluconazole et le fer de l'hème.

DEUXIÈME PARTIE :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Treize souches pures de *Candida* spp sont utilisées dans notre étude ; trois souches de référence et dix souches isolées à partir des dispositifs médicaux implantées chez des patients hospitalisés au CHU de Sidi Bel Abbes (Annexe N°1).

1. Repiquage des souches de *Candida* spp

Afin d'avoir des cultures jeunes pour réaliser les tests antifongiques, les souches d'étude sont repiquées sur gélose sabouraud (Annexe N°2) inclinées en tubes.

Pour réaliser les tests antifongiques vis-à-vis de l'amphotéricine B et le fluconazole, trois souches de référence sont utilisées, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 26790 et *Candida albicans* IP 444.

Les souches isolées se répartissent comme suite : trois souches de *C. albicans*, six souches de *C. glabrata*, et une souche de *C. parapsilosis*.

À partir de cette collection, quelques colonies sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, ensemencées dans un tube à hémolyse contenant du sabouraud liquide (Annexe N°3).

Après 24 heures d'incubation à 30°C, les géloses sabouraud inclinées dans des tubes à vis sont réensemencées par stries puis incubées, de nouveau, à 30°C pendant 24 heures.

2. Tests de résistance aux agents antifongiques

Vu leur large utilisation dans les hôpitaux algériens, deux agents antifongiques sont choisis pour cette étude, l'amphotéricine B et le fluconazole.

Les techniques suivies pour la réalisation des tests antifongiques sont ceux du CLSI, (2008) et de Pierce, (2008).

2.1. Préparation des solutions mères des agents antifongiques

L'amphotéricine B pure (sigma) est solubilisé dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) (sigma) à la concentration de 1mg/ml puis stockée à 4°C. À partir de cette solution, une deuxième solution, de concentration de 128 µg/ml, est préparée pour réaliser les tests antifongiques.

Pour le fluconazole, à partir d'un stocke pure (Hekma), de concentration de 2mg/ml, une solution de concentration de 1,024 µg/ml est préparée.

La stérilisation est réalisée en faisant passer les solutions préparées à travers des filtres dont les diamètres des pores sont de 0,22 µm.

2.2. Préparation du XTT et du Ménadione

Le tétrazolium (XTT) est un réactif sensible à la lumière, il est utilisé pour la détermination des SCMI; de se faite les tests s'effectues en extemporanément et à l'obscurité.

La solution mère du XTT (2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium 5-carboxanilide) est préparée en dissolvant 4mg de XTT dans 1 ml de PBS puis stérilisée par filtration à travers un filtre dont les diamètres des pores sont de 0.22µm.

La solution est mise dans des tubes stériles qui sont ensuite stockées à -20°C.

Le ménadione (sigma) joue un rôle de catalyseur et accélère la réaction. La solution mère du ménadione (10mM) est préparée en dissolvant 0.017g de celui-ci dans 10ml d'acétone, puis filtrée et stockée à -20°C.

2.3. Préparation des inocula

Les cellules de levures sont initialementensemencées dans 20ml du milieu sabouraud et incubées à 30°C pendant une nuit sous agitation continue (180 tours/min).

Les cellules sont récupérées par centrifugation à 3600g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé puis le culot est rincé à l'aide du tampon PBS stérile (Annexe N°4). Cette opération est répétée deux fois et les cellules récoltées sont ajoutées à 20 ml du milieu RPMI 1640. (Annexe 5)

A l'aide des cellules de Thoma, deux suspensions de levures sont préparées : La première, à la concentration de $2,5 \times 10^3$ cellules/ml, sert comme inoculum pour la détermination des CMI; la deuxième, à la concentration cellulaire de 10^6 cellules/ml pour les SCMI.

2.4. Détermination des CMIs

La détermination des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et du fluconazole, vis-à-vis des cellules planctoniques, est effectuée selon le protocole décrit par le *Clinical Laboratory Standard institute* (CLSI M27 A3, 2008).

Pour cela, les microplaques stériles en polystyrène à 96 puits sont utilisées. À l'aide d'une micropipette, 100 µl du milieu RPMI 1640 sont misent dans les puits des microplaques. Par la suite, 100 µl des agents antifongiques, AmB (128 µg/ml) et FLU (1,024 µg/ml), sont ajoutés et homogénéisés dans le premier puits ; à partir de ce dernier, une série de dilution est réalisée de puits en puits jusqu'au dernier.

Par la suite, 100µl de l'inoculum ($2,5 \times 10^3$ cellules/ml) sont répartis, dans tous les puits des microplaques ; l'incubation de celles-ci se fait à 37°C pendant 24 heures, puis l'évaluation des CMIs est effectuée à l'œil nue.

2.5. Détermination des SCMI

La détermination des SCMI vis-à-vis des différentes souches est effectuée suivant la méthode de micro-dilution de Pierce et coll, (2008). Celle-ci repose sur une méthode colorimétrique qui permet de mesurer l'activité métabolique des cellules sessiles après leur exposition aux agents antifongiques, elle est basée sur la réduction du tétrazolium XTT: 2.3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium-5 carboxanilide, qui est un indicateur de viabilité des cellules.

2.5.1. Formation des biofilms

Les biofilms sont cultivés dans les puits des microplaques stériles. A cette fin, 100µl de l'inoculum, de concentration cellulaire de 10^6 cellules/ml, sont distribués dans les puits à l'aide d'une micropipette. Les microplaques sont par la suite recouverte par le papier aluminium stérile et incubées à 37°C pendant 24 heures.

2.5.2. Tests antifongiques

Afin de ne pas détacher les biofilms formés dans les puits, le surnageant est d'abord aspiré soigneusement à l'aide d'une micropipette. Les puits sont ensuite rincés deux fois par le PBS stérile ; pour cela, 100 µl du PBS sont ajoutés puis réaspirés pour éliminer les cellules non-adhérentes aux surfaces ; le liquide résiduel du PBS est ensuite retiré en utilisant du papier buvard stérile.

100 µl du milieu RPMI 1640 sont ensuite ajoutés dans chaque puits de la

microplaque ; et par la suite, 100 µl de l'agent antifongique sont misent dans le premier puits, homogénéisés à l'aide d'une micropipette, puis une série de dilution est effectuée de puits en puits. Pour ceci, 100µl du contenu sont prélevés et misent ensuite dans le deuxième puits, et ainsi de suite 'jusqu'au 11^{ème} puits, où le volume récupéré est écarté.

Deux témoins sont réalisés, le témoin négatif correspond à une incubation de l'agent antifongique dans le milieu de culture en absence de levures, alors que le témoin positif consiste à incuber les levures en absence d'agent antifongique.

Les microplaques sont, ensuite, recouvertes avec du papier aluminium stérile et incubées pendant 24h à 37°C.

Tous les tests antifongiques sont répétés deux fois pour chaque souche.

2.1.1. Test de réduction du tétrazolium

Ce test est basé sur la capacité des cellules sessiles, métaboliquement actives, à réduire le sel de tétrazolium en formazane qui est de couleur orange. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de cellules viables. **(Pierce et coll., 2008)**

Avant d'effectuer les tests d'évaluation de la résistance, 1 µl de la solution de ménadione est ajoutée à 10 ml de la solution XTT.

Comme décrit précédemment, les puits des microplaques sont rincés avec du PBS stérile et 100 µl du mélange XTT/ ménadione sont, ensuite, ajoutés dans chaque puits des microplaques ; ces dernières sont, par la suite, recouvertes du papier aluminium stérile et placée à l'étuve à 37°C pendant 3 à 4 heures.

Après l'incubation, 75 µl du surnageant sont transférés, depuis chaque puits, vers une nouvelle microplaque.

L'évaluation du taux de viabilité des cellules sessiles se fait à l'aide d'un lecteur de microplaque à 490 nm, celui ci fourni des valeurs de densité optique pour chaque puits. En comparant les valeurs obtenues par rapport aux valeurs des témoins positifs, les SCMI50 sont calculées pour chaque souche.

Ces SCMI correspondent aux concentrations minimales pour inhiber 50% de la population du biofilm, elles sont obtenues grâce à la formule suivante :

$$\text{SCMI} = [1 - (\text{DO}_x / \text{DO}_{c+})] \times 100 \quad \text{(Cateau et coll., 2008)}.$$

DO_x : densité optique de l'échantillon. DO_{c+} : densité optique du contrôle positif.

TROISIÈME PARTIE :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette étude vise à évaluer la résistance *in vitro* des biofilms de *Candida* spp et de leurs homologues planctoniques vis-à-vis des agents antifongiques les plus utilisés dans les hôpitaux algériennes.

1. Tests antifongiques

1.1. Détermination des CMI et SCMI

Le tableau N°1 regroupe les résultats des CMI et des SCMI de l'AmB et du FLZ selon les protocoles de CLSI M27-A3, (2008) et de Pierce et coll, (2008) respectivement.

Les résultats obtenus montrent que les CMI de l'AmB vis-à-vis des deux souches de références (*C. albicans* ATCC10231 et *C. albicans* 444IP) sont égales à 0,5µg/ml; ces résultats sont similaires à ceux de Boucherit et coll., (2011) et du CLSI M27-A3, (2008). Cette valeur (0,5 µg/ml) est observée aussi pour les souches de *Candida glabrata* 2, 3, 5 et 6.

Les CMI de *Candida albicans* ATCC26790, des trois souches isolées de *C. albicans* et de *C. parapsilosis* sont égales à 1 µg/ml. En revanche, la CMI de l'AmB vis-à-vis de *C. glabrata* 4 est égale à 2µg/ml (tableau N°1).

Selon ce même tableau, seule *C. glabrata* 6 a une CMI du fluconazole égale à 0,128µg/ml, alors qu'elle est de 0,256 µg/ml pour toutes les autres souches (tableau N°1).

Tableau N°1: CMI et la SCMI 50 de l'AmB et du fluconazole vis-à-vis des souches de référence et des souches isolées.

	AmB ($\mu\text{g/ml}$)		FLZ ($\mu\text{g/ml}$)	
	CMI	SCMI 50	CMI	SCMI 50
<i>C. albicans</i> ATCC 10321	0.5	4	0.256	0.256
<i>C. albicans</i> IP 444	0.5	8	0.256	0.512
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	1	4	0.256	0.512
<i>C. albicans</i> 1	1	2	0.256	0.512
<i>C. albicans</i> 2	1	4	0.256	0.512
<i>C. albicans</i> 3	1	8	0.256	0.512
<i>C. glabrata</i> 1	1	2	0.256	0.256
<i>C. glabrata</i> 2	0.5	1	0.256	0.512
<i>C. glabrata</i> 3	0.5	1	0.256	0.512
<i>C. glabrata</i> 4	2	2	0.256	0.512
<i>C. glabrata</i> 5	0.5	0.125	0.256	0.005
<i>C. glabrata</i> 6	0.5	0.125	0.128	0.001
<i>C. parapsilosis</i>	1	0.125	0.256	0.001

D'après ce tableau, les valeurs des SCMI50 de l'AmB sont nettement supérieures aux valeurs des CMI vis-à-vis des souches de références, des trois souches isolées de *Candida albicans* et des souches isolées de *C. glabrata* 1, 2, 3 et 4; les SCMI50 des trois souches de référence sont comprises entre 4 et 8 µg/ml, alors que pour le reste des souches, les SCMI50 varie entre 1 µg/ml et 8 µg/ml.

Pour le FLZ, les SCMI50 vis-à-vis des souches isolées sont supérieurs aux CMI, alors que la CMI et la SCMI50 de *C. albicans* ATCC10231 sont identiques.

D'autre part, les SCMI50 de l'AmB obtenues vis-à-vis des souches *C. glabrata* 5, *C. glabrata* 6 et *C. parapsilosis* (0,125 µg/ml) sont inférieures que les CMI vis-à-vis de leurs homologues planctoniques (0,5 à 1 µg/ml), alors que le même résultat est observé pour le FLZ (Tableau N°1).

Selon Baillie et Douglas, (1999) et Miao et coll., (2007), la formation des biofilms augmente de manière significative les niveaux de résistance aux agents antifongiques classiques, cette augmentation est une caractéristique stable et inhérente des souches de *Candida spp*; de plus, les biofilms de *Candida spp* sont résistants aux dérivés azolés, notamment au fluconazole.

Les biofilms de *Candida spp* sont moins sensibles à de nombreux agents antifongiques [(Kuhn et coll., 2002a), (Perumal et coll., 2007), (Coogan et coll., 2006), (Al-Dhaheri et coll., 2008)]. En effet, l'amphotéricine B a un effet inhibiteur sur les cellules sessile de *Candida spp* mais à des concentrations plus élevées de sa marge thérapeutique [(Pierce et coll., 2008), (Douglas, 2002), (Ramage et coll., 2002a), (Blankenship et Mitchell, 2006)].

Par rapport aux CMI, les SCMI50 de l'AmB et du FLZ sont plus importantes pour la majorité des souches étudiées (Figure N°12).

En se référant à Ramage et coll., (2001b), l'accroissement des SCMI par rapport aux CMI des souches de références et des souches isolées témoigne de leur capacité à former des biofilms. De ce fait, les souches de références, et les souches isolées : *C. albicans* 1, 2 et 3, et *C. glabrata* 1, 2, 3 et 4 forment les biofilms. En revanche, *C. glabrata* 5 et 6 et *C. parapsilosis*, n'ont pas la capacité de former des biofilms ou les formes modérément. (Figure N° 12).

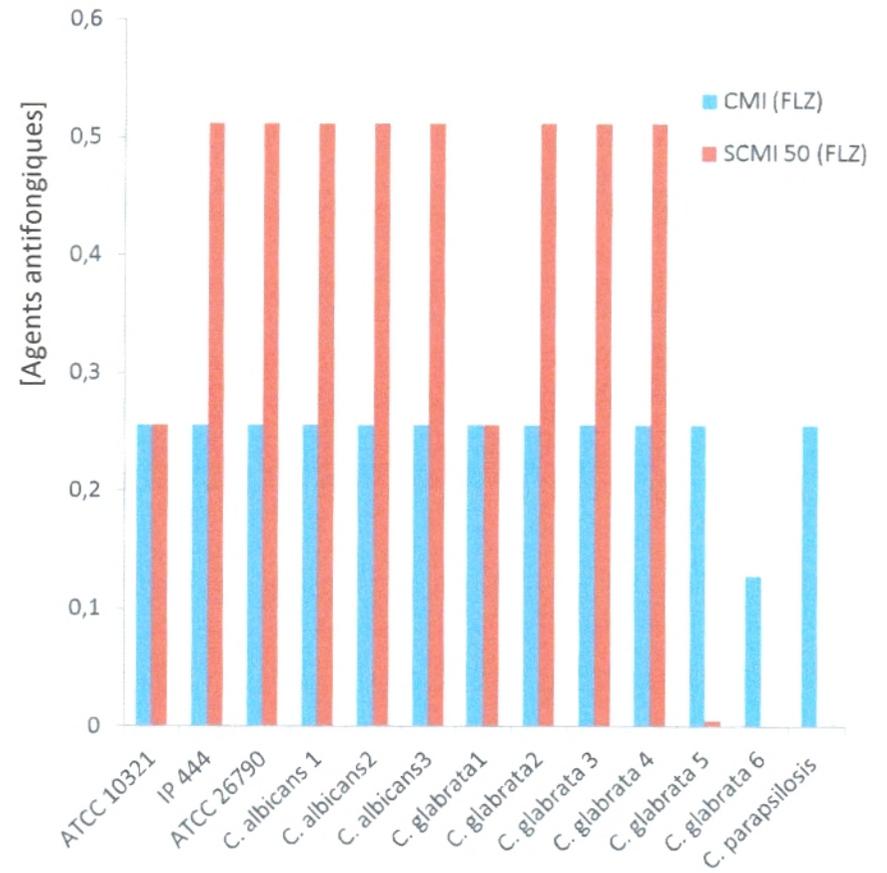
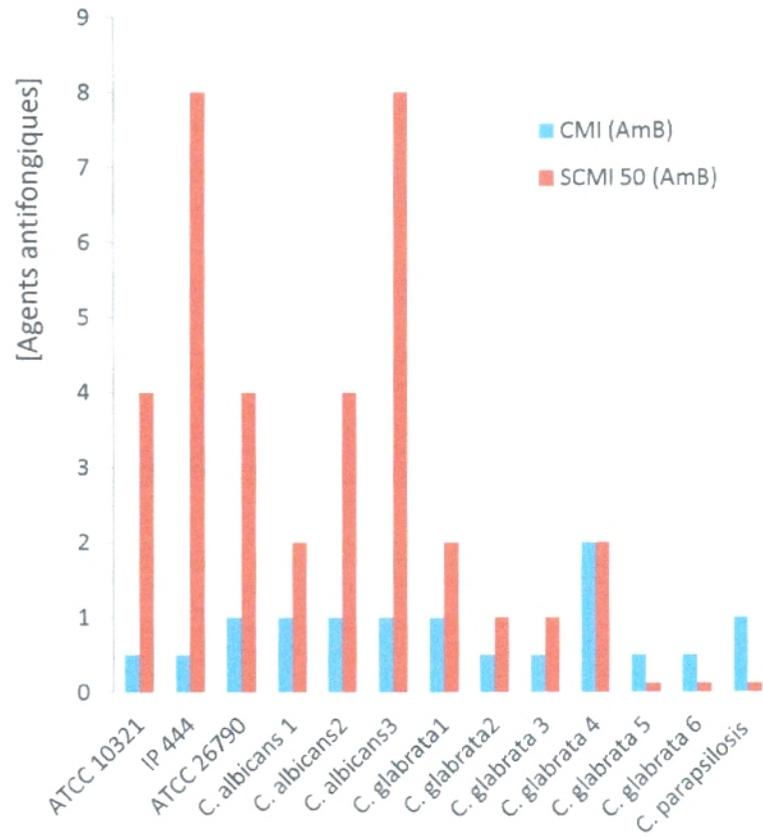


Figure N° 12: CMI et SCMI 50 de l'AmB et du FLZ des souches de *Candida* spp

QUATRIÈME PARTIE :

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les infections nosocomiales d'origine fongique, notamment celles causées par *Candida* spp, sont devenues un axe de recherche plus important qu'auparavant vu leur augmentation accrue signalée dans la plus part des hôpitaux. *Candida* spp peut se convertir d'un profile saprophyte à un profile pathogène capable de contaminer les implants médicaux, lui conférant une surface idéale pour former des biofilms.

Par conséquent, la résistance aux agents antifongiques, tel que l'amphotéricine B et le fluconazole, s'accroît avec la formation des biofilms candidals.

Dans cette étude treize souches de *Candida* spp sont utilisées pour tester leur résistance à l'AmB et au FLZ et pour évaluer leur capacité à former des biofilms.

En effet, parmi ces treize souches, sept ont la capacité à formé les biofilms à des concentrations élevées en amphotéricine B et le fluconazole de 4 µg/ml à 8 µg/ml et de 0,256 µg/ml et 0,512 µg/ml respectivement; par contre trois n'ont pas formées des biofilms ou les formes modérément, vu leurs SCMI vis-à-vis l'amphotéricine B est de 0,125 µg/ml et pour le fluconazole, elle est de (0,001 µg/ml et 0,005 µg/ml).

Comme la population des individus immunodéprimés augmente (accessoirement à l'augmentation de la prévalence du cancer, chimiothérapie, transplantation d'organes et les maladies auto-immunes), l'incidence des maladies fongiques apparaissent aussi.

Candida spp est une affection fréquente pour la population sensible, pour laquelle le taux de mortalité est élevé,

Pour éviter que le développement mycélien ne devienne extensif comme prévention on peut citer :

- Pour empêcher la formation du biofilm le Retrait du cathéter dès qu'il n'est plus indispensable et recommandé.
- Evité la surconsommation des antibiotiques.

CINQUIÈME PARTIE

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Akpan A., and R. Morgan,** (2002); Oral candidiasis. *Postgrad Med J*; **78**:455-9.
2. **Al- Dhaheri R.S., and Douglas L.J,** (2008); Absence of amphotericin B-Tolerant Persister Cells in Biofilms of Some *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1884 - 7.
3. **Alem M.A, Oteef M.D, Flowers T.H., and Douglas L.J,** (2006); Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell* **5**: 1770-9.
4. **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.
5. **Andrès E, M. Tiphine, V. Letscher-Bru., and R Herbrecht,** (2001) ; Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. Revue de la littérature. *La Revue de Médecine* 141–150, Vol: 22.

B

6. **Baginski M, H. Resat., and J.A McCammon,** (1997); Molecular properties of amphotericin B membrane channel a molecular dynamics simulation. *Mol Pharmacol* **52**:560–570.
7. **Baillie G.S., and Douglas L.J,** (1999); *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol* **310**: 644–656.
8. **Baillie G.S., and Douglas L.J,** (2000); Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* **46**: 397–403
9. **Beck-sague C., and Jarvis W.R,** (1993); Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980–1990. National nosocomial infections surveillance system. *J Infect Dis* **167**: 1247–51.
10. **Beucher Bertrand,** (2007); Spécificité antigénique de l'Als3p de *Candida albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte, Thèse de Doctorat, Spécialité Microbiologie, Université d'Angers, France ; N° 839.
11. **Blankenship J.R., and Mitchell A.P,** (2006); How to build a biofilm: a fungal perspective **9**(6):588-594.

12. **Botterel F.**, (2007) ; Démarche diagnostique et prise en charge des infections fongiques chez les patients immunodéprimés **ANTIBIOTIQUES 9** : 34-43.
13. **Boucherit-Otmani Z, Seddiki S.M.L, Boucherit K, Sari-Belkharoubi L., and Kunkel, Dennis**, (2011); *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *Journal de Mycologie Médicale* **21**:182-7.

C

14. **Carrillo-Muñoz, A.J, G. Giusiano, P.A Ezkurra., and G. Quindós**, (2006); Antifungal agents: mode of action in yeast cells **19**:130-9.
15. **Cateau Estelle, Marie-Hélène Rodier., and Christine Imbert**, (2008); In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **62**, 153–155.
16. **Chabasse D, Guiguen C.I., and Contet-Audonnea N**, (1999) ; Mycologie médicale. Vol: 336.
17. **Chaffin W.L, López-Ribot J.L, Casanova M, Gozalbo D., and Martinez J.P**, (1998); Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 130–180.
18. **Chandra J , kuhn D.M, P.K mukherjee , Hoyer I.I, mccormick T., and Ghannoum M.A**, (2001) ; La formation du biofilm par le champignon pathogène *Candida albicans*: le développement, l'architecture et la résistance aux médicaments. *J Bacteriol* **183** (18): 5385-94.
19. **Chandra J, Mukherjee P.K, Leidich S.D, Faddoul F.F, Hoyer L.L, Douglas L.J., and Ghannoum M.A**, (2001a); Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent Res* **80**: 903–8.
20. **Clarissa J. Nobile, Vincent M. Bruno, Mathias L. Richard, Dana A. Davis., and Aaron P. Mitchell**, (2003); Genetic control of chlamyospore formation in *Candida albicans* **149**: 3629–37.
21. **CLSI M 27 A3** ; Clinical Laboratory Standard institute, (2008); **vol 23, N° 14**.
22. **Clutterbuck A.L, Woods E.J, Knottenbelt D.C, Clegg P.D, Cochrane C.A., and Percival S.L**, (2007); Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol* **121** (1-2): 1-17.

23. **Coogan M.M, Fidel P.L, Jr Komesu M.C., Maeda N., and Samaranayake L.P,** (2006); *Candida* and Mycotic infections. *Adv Dent Res* **19**: 130-8.
24. **Costerton J.W, Cheng K.J, Geesey G.G, Ladd TI, Nickel J.C, Dasgupta M., and Marrie T.J,** (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**: 435–464.
23. **Counelle de Ponyanel H, Loraux N, Deborne B, Dubois F., and Perret-Bonin F,** (1987) ; Collection les soins infirmiers : les maladies infectieuses, Paris, les éditions FOUCHER.

D

24. **De chalvet de rochemonteix Alice,** (2009); les biofilms et la peau. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, vol: 160.
25. **Develoux M., and Bretagne S,** (2005) Candidoses et levures diverses; EMC-Maladies infectieuses 8-602-A-10, 15.
26. **Diamond R,** (1999); Atlas of fungal Infections. **67**(9): 4732–4736.
27. **Douglas LJ,** (2002); Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* **19**: 139–143.
28. **Douglas LJ,** (2003); *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**(1): 30–36.

E

29. **Edwards J.E. Jr,** (1991); Invasive *Candida* infections__evolution of a fungal pathogen.N. Engl.j. Med. **24**:1060-62.
30. **Eggimann P, Garbino J., and Pittet D,** (2003); Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect* **3**: 685-702.

F

31. **Fitzpatrick D.A, M.E Logue, J.E Stajich., and G Butler,** (2006); A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from super tree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* **6**:99.

32. **Fournier Pierre**, (2011); Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida* spp. Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble. Thèse de Doctorat, UFR de Pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier, France. N° 90-810

G

33. **Guillemot Gaëlle**, (2006); Compréhension des mécanismes à l'origine de l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* sur acier inoxydable vol: 310.
34. **Gilbert P, Das J., and Foley I**, (1997); Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**: 160–167.
35. **Gilfillian D, Sullivan J, Haynes K, Parkinson T, Coleman C., and Gow R**, (1998); *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* **144**, 829–838.
36. **Gorbach S.L, Nahas L, Lerner., and P.I Weinstein L**, (1967); Studies of intestinal microflora. Effects of diet, age, and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man. *Gastroenterology* **53**:845–55.

H

37. **Habash M., and Reid G**, (1999); Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *J Clin Pharmol* **39**: 887–898:
38. **Hawser S.P., and Douglas.L.J**, (1994); Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun* **62**: 915–921.
39. **Hawser S.P., and Douglas. L.J**, (1995); Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2128-31.
40. **Hawser S.P, Baillie. GS., and Douglas. LJ**, (1998); Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* **47**: 253–6.
41. **Haynes K**, (2001); Virulence in *Candida* species. *TRENDS in Microbiology*; **9**(12): 591-6.
42. **Henriques M, Gasparetto K, Azeredo J., and Oliveira R**, (2002); "Experimental methodology to quantify; *Candida albicans* cell surface hydrophobicity". *Biotechnology Letters* **24**(13): 1111-5.

43. **Hornby J.M, E.C Jensen, A.D Lisec, J.J Tasto, B Jahnke. R Shoemaker, P Dussault., and K.W Nickerson,** (2001); *Quorum* sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2982-92.
44. **Husson Marie Caroline., and Lortholary Olivier,** (2004); *Condidoses et aspergilloses invasives*. Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament. Vol: 25.

I

45. **Iñigo.M, Pemán.J., and Del Pozo.J.L,** (2012); Antifungal activity against *Candida* biofilm; *Int J Artif Organs* **35**(10):780-91.
46. **Irimes C, Séguin J, Roy S., and Barbeau J,** (2008); Investigations on farnesol lowres ponsiveness in *Candida albicans*: Influence of CO₂, temperature and expression of selected genes. *Am.Soc.Micro., New-York*, vol: 195.
47. **István Nagy, Kata Filkor, Tibor Németh, Zsuzsanna Hamari, Csaba Vágvölgyi., and Attila Gácsér,** (2011); *In vitro* interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiology* **11**:122 doi: 10.1186/1471-2180-11-122.
48. **Ito JI., and Hooshmand-Rad R,** (2005); Treatment of *Candida* infections with amphotericin B lipid complex. *Clin Infect Dis; 40 Suppl 6*: S384-91.

J

49. **Jabra-Rizk M.A, Falkler W.A., and Meiller T.F,** (2004); Fungal biofilms and drug resistance **10**(1):14-9.

K

50. **Kelly S.L, D.C Lamb, J Loeffler, H Einsele., and D.E Kelly,** (1999); The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem Biophys Res Commun* **262**:174-9.
51. **Kettani A, Belkhadir Z.H, Mosadik A, Faroudy A, Ababou A, Lazreq A., and Sbihi A,** (2006); Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de Mycologie médicale* **16** :16-25.

52. **Khadori N., and Yassien M,** (1995) Biofilms in device-related infections. *J Ind Microbiol* 15: 141–7.
53. **Kojic E.M., and R.O Darouiche,** (2004); "Candida infections of medical devices." *Clin Microbiol Rev* 17(2): 255-67.
54. **Kouidhi B, M Ben Gaied, L Mhadhebi, A Bakhrouf., and A Bouraoui,** (2010); The efflux pumps in medical mycology: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Journal of Medical Mycology* 4:304–314, Vol: 20.
55. **Kuhn D.M., George T., Chandra J., Mukherjee P.K., and Ghannoum M.A,** (2002a); Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (6): 1773 - 1780. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1773–1780.2002.
56. **Kuhn D.M, J Chandra, P.K Mukherjee., and M.A Ghannoum,** (2002b); Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity* 70 (2), 878-888.
57. **Kuhn D.M., and M.A Ghannoum.,** (2004); *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr Opin Investig Drugs* 5(2):186-197.

L

58. **Laffey S.F., and G Butler,** (2005); Phenotype switching affects biofilms formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151:1073-81.
59. **Lamb D.C, D.E. Kelly, T.C White., and S.L Kelly,** (2000); The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob Agents Chemother* 44:63-7.
60. **Lemke A, Kiderlen A.F., and O Kayser,** (2005); Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:151-162.
61. **Lewis K,** (2001); Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 999–1007.
62. **Lewis K,** (2010); Persister cells. *Annual Review of Microbiology* 64: 357-372.
63. **Li X, Z Yan., and J. Xu,** (2003); Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 149(2):353-362.

64. **Lodder J**, (1970); *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 2nd edn. North-Holland: Amsterdam, p 1385.

M

65. **Maertens J.A**, (2004); History of the development of azole derivatives. *Clin. Microbiol. Infect* **10**:1-10.
66. **Marcet-Houben M., and Gabaldon T**, (2009); The tree versus the forest: the fungal tree of life and the topological diversity within the yeast phylome. *PLoS One* **4**: e4357.
67. **Martin M.V**, (1999); The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J Antimicrob Chemother* **44**:429-37.
68. **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. doi; 10.1016/j.tim.2008.11.001.
69. **Montravers P, M Desmard., and G Dufour**, (2010); Département d'Anesthésie-Réanimation Chirurgicale, Centre Hospitalier Universitaire Bichat-Claude Bernard, Université Paris VII Denis Diderot, Paris, France **14** : 2-10.
70. **Morschhauser J**, (2002); The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1587**:240-8.

O

71. **Odds F. C**, (1979); *Candida and Candidosis*, Leicester University Press ed, London, p 382.
72. **Oh K. B, H. Miyazawa, T. Naito., and H. Matsuoka**, (2001); Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *C. albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:4664-8.

P

73. **Patel R**, (1998); Antifungal agents. Part I. Amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo Clin Proc* **73** (12): 1205-25.
74. **Perumal P., Mekala S., Chaffin W.L**, (2007); Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (7) : 2454 – 2463. DOI: 10.1128/AAC.01237-06.

75. **Pierce C. G., Uppuluri P., Tristan A. R., Wormley F.L. Jr, Mowat E., Ramage G. and Lopez-Ribot J.L.**, (2008); A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing, *Nature Protocols* ; 3 (9) : 1494 - 1500. DOI : 10.1038/nprot.2008.141.
76. **Podust L. M, T. L. Poulos., and M. R. Waterman**, (2001); Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 3068-73.
77. **Prasad R, P. De Wergifosse, A. Goffeau., and E. Balzi**, (1995); Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* **27**:320-9.

R

78. **Ramage G, Wickes BL., and López-Ribot JL**, (2001a); Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab* **20**: 42–44.
79. **Ramage G., Vande Walle K., Wickes B. L., and Lopez-Ribot J.L.**, (2001b) Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; **45** (9) : 2475 - 2479. DOI: 10.1128/AAC.45.9.2475–2479.2001.
80. **Ramage G, Saville SP, Thomas DP., and López-Ribot JL**, (2005a); *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* **4**: 633–638.
81. **Ramage G., and López-Ribot JL**, (2005b); Les techniques de tests de sensibilité aux antifongiques des biofilms de *Candida albicans* **118**: 71-9.
82. **Ramage Gordon, Eilidh Mowat, Brian Jones, Craig Williams., and Jose Lopez-Ribot**, (2009); Our Current Understanding of Fungal Biofilms, Vol: 35, **4**:340-355.
83. **Ramage G, Rajendran R, Sherry L., and Williams C**, (2012); Fungal biofilm resistance: **528521**. doi: 10.1155/2012/528521.
84. **Russell C., and Lay KM**, (1973); Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. *Arch. Oral Biol* **18**:957–62.

85. Runhnke, M., and G. Maschmeyer, (2002); Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer-review of the litterature. *EUR.J.Med.Res* 7:227-35.

S

86. Sanglard D., and Odds F.C, (2002); Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2(2): 73-85.
87. Scott K. Fridkin., and William R. JARVIS, (1996); Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections 495-511.
88. Seddiki S.M, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Bads-Amir S, Taleb M, Kunkel D, (2013); Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *Int J Gen Med*: 6:1-7. doi: 10.2147/IJGM.S38065. Epub 2013 Jan 9.
89. Senet JM., and Robert R, (1995); Physiopathology of candidosis. *J. Mycol. Med* 5:145-166.
90. Segal E, (2005); *Candida*, still number one--what do we know and where are we going from there? *Mycoses* 48 Suppl 1: 3-11.
91. Soll DR, Galask R, Schmid J, Hanna C, Mac K., and Morrow B, (1991); Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. *J. Clin. Microbiol* 29:1702-10.
92. Spellberg B.J, Filler S.G., and Edwards J.E, (2006); Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 42(2):244-51.

T

93. Taieb F, Mécha F, Lefort A, Lanternier F, Bougnoux M.E., and Lortholary O, (2010); Management of Candidemia and invasive candidiasis. *La Revue de Médecine Interne* Vol: 32, 173-18.
94. Trofa David, Attila Gácsér., and Joshua D. Nosanchuk, (2008); *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen; *Clin Microbiol Rev* 21(4): 606-625.

U

95. Uppuluri P, Srinivasan A, Ramasubramanian A., and Lopez-Ribot JL. (2011); Effects of Antimicrob Agents Chemother. doi: 10.1128/AAC.01701-10. Epub. 55 (7):3591-3.

V

96. **Vandeputte Patrick**, (2008); mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *candida glabrata*, Vol: 168; **5**:14-21.

W

97. **Watnick P., and Kolter R**, (2000); Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol* **182**: 2675–2679.
98. **WhiteT. C, K. A. Marr., and R. A. Bowden**, (1998); Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**:382-402.

SIXIÈME PARTIES

ANNEXES

Annexe N°1: Tableau de la collection des souches de *Candida* sp

Souches	Référence
C. albicans	PHKT2
C. albicans	HFKT1
C. albicans	EFKT3
C. parapsilosis	PHKT1
C. glabrata	RFST1
C. glabrata	CCISD1
C. glabrata	CHSD1
C. glabrata	NHKT1
C. glabrata	RFKT1
C. albicans	ATCC 10231
C. albicans	IP 444
C. albicans	ATCC 26970

Annexe N°2 : Gélose sabouraud

Pour préparer 1000ml du milieu de culture gélose sabouraud de pH=5.6

Casein peptone.....	5g
Meat peptone.....	5g
Glucose.....	40g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Autoclavé à 120°C pendant 20minute et conserver à la température ambiante.

Annexe N°3: Sabouraud liquide

Pour préparer 1000ml du milieu de culture liquide sabouraud de pH= 5.6

Casein peptone.....5g

Meat peptone.....5g

Glucose.....20g

Eau distillée.....1000ml

Autoclaver à 120°C pendant 20minute et conserver à la température ambiante.

Annexe N°4: PBS (phosphate Bufferd Saline)

Nacl.....137mM

Kcl.....2.7mM

Na₂HPO₄.....10mM

NaH₂PO₄.....1.76mM

Compléter le volume à 1l et ajuster le pH= 7.45, puis autoclaver à 120°C pendant 20 minutes et conserver à la température ambiante.

Annexe N° 5: 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

الملخص:

تعد الخمائر من نوع *Candida spp*, من اغلب الخمائر المعيشة و التي تعيش بصفة هادئة داخل غشاء للفم و الجهاز الهضمي في حين انها تنتهز ضعف الجهاز المناعي في نموها.

السلالة *C. albicans* تعد من الانواع المعزولة في غالب الاحيان علي مستوى مخاط الجهاز الهضمي و التناسلي في حين ان *C. glabrata* اصبحت اليوم وفقا لعدة دراسات الثاني او الثالث نوع ممرض انتهازى, تليها *C. parapsilosis*, *C. krusei*, ..

C. kefir

هذه الانواع تميل و بصفة عامة الى تشكيل الاغشية الحيوية على السطح الداخلي للقسطرة؛و المساحات الحيوية، فهذه الأغشية الحيوية توضح مقاومة زائدة تجاه المضادات الحيوية، كما يعد الأمفو تريسين ب و الفلوكونازول من الأكثر مضادات استخداما على مستوى المستشفيات.

حساسية هذه الاختبارات تجاه هذه المضادات الحيوية داخل الغشاء الحيوي و هي الاكثر مقاومة من نضيرتها (الخلايا الحرة) الامفو تريسين ب له تاثير على الخلايا داخل الغشاء الحيوي لكن بتركيزات سامة و جد عالية في حين أن الفلوكونازول ليس بسام كما يعد أقل فعالية.

الكلمات المفتاحية: *Candida spp*, الاغشية الحيوية، مقاومة، فلوكونازول , امفو تريسين ب.

RESUME:

Les levures du genre *Candida spp* sont, pour la majorité, commensales, vivant de façon silencieuse au sein des muqueuses buccales et digestives, mais tirent profit du déficit immunitaire de l'hôte pour proliférer.

Candida albicans est l'espèce la plus fréquemment isolée, elle est naturellement présente dans la flore intestinal humaine, principalement dans les muqueuses digestives et génitales ; alors que *C. glabrata* est devenue aujourd'hui, selon plusieurs études, la deuxième ou troisième espèce pathogène opportuniste, suivi par *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefir* ... ect.

Ces espèces ont tendance à former des biofilms qui sont des formes de virulence, notamment lors de la colonisation de surfaces biotiques et/ou abiotique.

Ces biofilms présentent une résistance accrue vis-à-vis des agents antifongiques, dont les plus utilisés au sein des hôpitaux sont l'amphotéricine B « AmB » et le fluconazole. Les tests de sensibilités vis-à-vis de ces derniers montre que les cellules sessiles (formant les biofilms) sont beaucoup plus résistantes que leur homologue planctoniques ; l'AmB a un effet sur les biofilms mais à des concentrations toxiques alors que le fluconazole, qui n'est pas toxique, reste moins efficace.

Mots clés : *Candida spp*, Biofilms, Résistance, Amphotéricine B, Fluconazole.

Summary:

Candida spp are commensal yeast, living silently in the oral and digestive mucosa, but takes advantage of immune deficiency to proliferate.

Candida albicans is the most frequently isolated specie; it is naturally present in the human intestinal flora, mainly in the digestive and genital mucosa; on the other hand, according to several studies, *C. glabrata* is the second or third opportunistic pathogen specie, followed by *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefir* ... etc.

These species are apt to form biofilms that are particular forms of virulence during surfaces colonization. These biofilms have increased resistance at the most antifungal agents used in hospitals like amphotericin B "AmB" and fluconazole. The antifungal susceptibility testing shows that sessile cells (biofilms) are much more resistant than their planktonic counterpart; AmB has an effect on biofilms at the toxic concentrations; however, fluconazole, which is not toxic, is less effective.

Keywords: *Candida spp*, Biofilms, Resistance, Amphotericin B, Fluconazole.