



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

Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de

l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

en vue de l'obtention du diplôme de

Master

en Biologie Option Biochimie appliquée

Présenté

Par : Mr Terki Mohammed

Thème

**Formation de biofilms et sensibilité de *Candida* sp. isolées du
CHU de Tlemcen à l'amphotéricine B**

Soutenu le : 16 Juin 2015

Devant le jury composé de :

Mme Hassaine Hafida

Professeur

Présidente

Mr Seddiki Sidi Mohammed Lahbib

MCB

Examineur

Mme Boucherit-Otmani Zahia

Professeur

Promoteur

Mr. Seghir Abdelfatteh

Docteur

invité

Année universitaire : 2014-2015

ملخص

الأغشية الحيوية ، هي هياكل حية نشطة تشكل أسلوب الحياة الغالب للكائنات الحية .الأغشية الحيوية التي تشكلتها أنواع مختلفة من *Candida* تتسبب في الإصابات البشرية ولا سيما من خلال استيطان الطيبة مثل القسطرة .هذه العدوى تتميز بسوء التشخيص، كما ان الاغشية في حد ذاتها تمكن *candida sp.* من مقاومة الدفاع المناعي للعضوية وكذلك مضادة للفطريات. في هذا السياق قمنا بها هذه الدراسة، والتي تهدف للتحقق، أولاً، من مدى قدرة سلالات *Candida sp.* على تشكيل الاغشية الحيوية وثانياً، لاختبار مقاومة السلالات المكونة للأغشية على مقاومة Amphotéricine B لاحظنا تنوع كبير في قدرة سلالات *Candidasp.* على تشكيل الأغشية الحيوية في الظروف التجريبية. كما ان اقل تركيز مثبط من Amphotéricine B لأغشية السلالات ذات القدرة العالية على التجمع في هياكل حية تتراوح ما بين 4 و 8 ميكروغرام في الملتر

كلمات البحث: المبيضات، الأغشية الحيوية، والقسطرة، **Amphotéricine B**.

Résumé

Les biofilms sont des structures vivantes, dynamiques qui constituent le mode de vie majoritaire des microorganismes. Le biofilm formé par les différentes espèces de *Candida sp.* est impliqué dans les infections humaines notamment par le biais de la colonisation des dispositifs médicaux comme les cathéters. Ces infections ont un mauvais pronostic avec des candidoses invasives et des candidémies. La formation de biofilms représente une niche où les cellules de *Candida sp.* échappent aux défenses immunitaires de l'hôte ainsi qu'aux traitements antifongiques.

Dans ce contexte nous avons entrepris cette étude, qui consiste à évaluer, d'une part, le pouvoir de souches de *Candida sp.* à former des biofilms. D'autre part, de tester la résistance des souches formatrices vis-à-vis de l'amphotéricine B par détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI).

Les résultats obtenus ont révélé une grande diversité dans la capacité des souches de *Candida sp.* à former les biofilms. Par ailleurs, les trois souches bonnes formatrices de biofilms par la techniques du crystal violet possèdent des SCMI pouvant atteindre jusqu'à 8 fois la CMI pour l'amphotéricine B.

Mots clés : *Candidasp.*, biofilms, cathéters, amphotéricine B.

Summary

Biofilms are its living, dynamic structures that constitute the majority lifestyle microorganisms. The biofilm formed by various species of *Candida sp.* is involved in human infections especially by the bais of the colonization of medical devices such as catheters. These infections have a poor prognosis with invasive candidiasis and candidemia. Biofilm formation represents a niche or cells of *Candida sp.* escape the immune defense of the host as well as antifungal therapy. In this context we undertook this study, which is to verify, first, the power of strains of *Candida sp.* to form biofilms. Second, to test the resistance of the trainers strains to amphotericin B. We observed a great diversity in the ability of strains of *Candida sp.* to form biofilm in the experimental conditions. The three trainers strains show 4 CIMS to 8 mcg/mL Amphotericin B.

Keywords: *Candida* species, biofilms, catheters, amphotericin B.

Dédicaces

C'est avec un énorme plaisir et une immense joie, que je dédie mon travail

À mes très chers parents qui m'ont soutenue tout au long de ma vie ainsi qu'à mon frère et ma sœur

A toute la famille

A toute la promotion du master Biochimie appliquée 2014-2015 avec qui j'ai partagé d'agréables moments

Enfin, à tous ce que j'aime et qui m'aime de prés et de loi.

Mohammed

Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.

Je tiens tout particulièrement à remercier chaleureusement M^{me} Boucherit-Otmani Zahia, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, qui m'a encadré tout au long de ce mémoire, sans elle rien ne serait là aujourd'hui. Je la remercie également pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail, pour ses conseils précieux et ses orientations scientifiques, Je lui adresse ma profonde reconnaissance.

Je voudrais adresser mes remerciements à M^{me} Hassaïne Hafida Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour l'honneur quelle ma fait en acceptant de présider le jury de cette soutenance.

Je remercie vivement M^r Seddiki Sidi mohammed Lahbib Maître de conférences Classe B au Centre Universitaire de Naâma, pour avoir accepté de faire parti de ce jury.

Merci à tous les membres du laboratoire « LapSab » qui ont participé à la réalisation de ce travail. J'exprime ma profonde reconnaissance à Mr. Seghir Abdelfatteh pour son aide et son soutien, qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Liste des abréviations

AmB : Amphotéricine B

CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices

DMSO : Dimethylsulfoxyde

PBS : Phosphate Buffered saline « Tampon Phosphate Salé »

RPMI : Roswell Park Memorial Institut

SCMI : Sessiles Concentrations Minimales Inhibitrices

XTT : 2, 3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl]-2H-tetrazolium-5carboxanilide

Sommaire

Première partie : Synthèse bibliographique.....	1
1. Introduction.....	2
2. Candida et Candidose.....	3
2.1. <i>Candida albicans</i>	3
2.2. <i>Candida glabrata</i>	4
2.3. <i>Candida Parapsilosis</i>	4
3. Pathogénicité de <i>Candida sp</i>	4
4. Formation de biofilm.....	5
5. Architecture d'un biofilm.....	7
6. Quorum sensing.....	9
7. Résistance au sein du biofilm	10
Deuxième partie : Matériel et méthodes.....	12
1. Souches étudiées.....	13
2. Formation de biofilm.....	13
3. Coloration par le crystal violet.....	13
4. Evaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI).....	14
4.1. Test antifongique.....	14
4.2. Test de réduction du tétrazolium.....	15
Troisième partie : Résultats et discussion.....	16
1. Evaluation de la formation de biofilms par la technique du Crystal violet.....	17
2. Test antifongique.....	22
Quatrième partie : Conclusion générale.....	26
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	28

Première partie
Synthèse bibliographique

1. Introduction

L'incidence globale des infections fongiques invasives ainsi que la population des patients à risque (transplantation d'organes, cancer, thérapie immunosuppressive, sida, naissance prématurée, vieillissement, chirurgie lourde...) ont fortement changé au cours de ces dernières décennies. Les levures du genre *Candida* représentent la cause majeure de ces infections et sont responsables de plus de 80% des infections à levures **(Kullberg, 2005)**.

Candida albicans est de loin l'espèce la plus fréquemment isolée, mais l'incidence des *Candida* non *albicans* comme *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis* est croissante dans les prélèvements cliniques **(Pierre, 2011)**.

Par ailleurs, en milieu hospitalier l'utilisation des dispositifs médicaux invasifs est incontournable, au moins à titre provisoire, dans la prise en charge d'un patient, malheureusement, leur présence s'accompagne d'effets indésirables parmi lesquels les complications infectieuses occupent une place prépondérante. En effet, en contact avec le dispositif médical, les levures peuvent adhérer et développer un biofilm qui se propage à l'intérieur du cathéter. Le biofilm est une structure vivante, dynamique, en perpétuel remaniement qui constitue le mode de vie majoritaire des microorganismes par opposition à la phase planctonique **[(Pittet, 2000) ; (Soll, 2008)]**.

Une fois formé, le biofilm est difficile à éradiquer et a tendance à s'étendre en raison en partie à l'émergence d'un phénotype persistant chez les levures immobilisées ce qui rend difficile voire impossible l'efficacité des antifongiques **(Christopher et coll., 2008)**.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés d'une part, à évaluer le potentiel d'une collection de souches de *Candida sp.*, isolée de cathéters veineux périphériques du CHU de Tlemcen à former des biofilms. D'autre part, à déterminer les SCMI (Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles) d'un antifongique de référence, l'amphotéricine B vis-à-vis des souches étudiées.

2. Candida et Candidose

Les candidoses sont des mycoses cosmopolites de fréquences croissantes dues à des levures du genre *Candida* (**Essendoubi, 2007**). Ces levures appartiennent au phylum des ascomycètes à la classe des saccharomycètes, à l'ordre des saccharomycetales et au groupe des saccharomycètes mitosporiques (**Aurore, 2010**).

Il s'agit de levures de petites tailles de 2 à 5µm , globulaires, ovoïdes ou cylindriques selon l'espèce, non pigmentées, non capsulées à bourgeonnement multilatérale productrices ou non de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture (**Fitzpatrick et coll., 2006**).

Il est à noter que le cytoplasme des levures du genre *Candida* contient les organites retrouvés chez les cellules eucaryotes et une enveloppe fongique constituée d'une paroi et d'une membrane.

Selon **Williams et ses collaborateurs (2011)**, ce genre comprend environ 350 espèces. Toutefois, seules quelques unes sont rencontrées en pathologie humaine, il s'agit essentiellement de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* (**Odds, 2010**). Malgré la dominance de *Candida albicans*, les espèces non *albicans*, notamment *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis*, sont très fréquentes dans les isolats cliniques (**Silva et coll., 2009**).

2.1. *Candida albicans*

C'est une levure commensale des muqueuses digestives et vaginales. 50 à 70% des individus en bonne santé seraient porteurs de cette levure. Son caractère dimorphique tenace qui correspond à sa capacité de changer de forme (transitions morphologiques entre la forme levure et la forme hyphe) lui confère la particularité d'être l'espèce la plus virulente en provoquant des mycoses superficielles et systémiques graves [(**Samaranayake et coll., 2005**) ; (**Irimes et coll., 2008**)].

2.2. *Candida glabrata*

Elle a été décrite pour la première fois en 1895 par Berlese sous le nom de *Torulopsis glabrata*. C'est une levure saprophyte de la flore normale de l'homme. Malgré qu'elle soit incapable de produire des formes filamenteuses, elle est considérée comme agent opportuniste responsable de candidémies, d'infections de l'appareil urinaire et de candidoses profondes [(Vandeputte et coll., 2008) ; (Ahmed et coll., 2014)].

2.3. *Candida parapsilosis*

C'est une levure typiquement commensale de la peau humaine ; toutefois, lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont compromises ou l'équilibre de la microflore normale est perturbé, elle se transforme en un agent pathogène opportuniste (István et coll., 2011).

3. Pathogénicité de *Candida sp.*

Le passage de l'état saprophyte à l'état pathogène chez les levures du genre *Candida* dépend de la balance entre les capacités de colonisation de la levure, l'expression de facteurs de virulence et le contrôle par les défenses du système immunitaire (El kirat Chatel, 2010).

La pathogénicité de *Candida sp.* résulte de l'association des facteurs de virulence cités ci-dessus. Une des caractéristiques principales de son pouvoir pathogène est sa capacité d'adaptation aux conditions environnementales liées à sa variabilité structurale et antigénique, l'expression des molécules impliquées dans l'adhérence aux cellules de l'hôte et aux supports abiotiques, la formation de biofilm, ainsi que la sécrétion d'enzymes hydrolytiques telles que les aspartyl protéases (Sap), les phospholipases et les lipases (Trofa et coll., 2008).

L'adhérence aux tissus de l'hôte est essentielle pour initier et maintenir l'interaction spécifique hôte/levure avec les mannoprotéines de la paroi de la levure. Nous parlons d'adhésines, telles que celles appartenant à la famille Als1 (Gaur, et coll., 1999).

De plus, le passage de la forme levure à la forme plus ou moins filamenteuse augmente l'adhérence aux cellules épithéliales et favorise la colonisation **(Hoyer et coll., 1998)**.

La sécrétion d'enzymes hydrolytiques au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires **(Schaller et coll., 2005)**.

Les lipases sont caractérisées par leur capacité à catalyser l'hydrolyse des liaisons ester des mono, di et triacylglycérols et même des phospholipides **(Hube, 2000)**.

Les phospholipase jouent également un rôle important dans la pathogenèse de *candida* car elle est capable d'hydrolyser une ou plusieurs liaisons ester des glycérophospholipides **(Trofa et coll., 2008)**.

4. Formation de biofilm

Les biofilms sont définis comme étant des communautés plurimicrobiennes structurées, fortement attachées à une surface de manière irréversible et encadrées 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)]**.

Selon **Ghannoum et O'tool (2004)**, le biofilm est la forme d'existence microbienne la plus répandue dans la nature. Il peut être causé par une seule espèce microbienne ou par un mélange d'espèces bactériennes et/ou fongiques **(Douglass, 2003)**. Il représente par conséquent, une source potentielle de diffusion de micro-organismes **(Ramage et coll., 2014)**.

Si les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation d'un biofilm diffèrent d'un organisme à un autre, les étapes de leur développement semblent être conservées au sein d'un large éventail de microorganismes **(O'toole, 2003)**.

Selon plusieurs auteurs, la formation de biofilms est un phénomène dynamique extrêmement complexe qui se déroule en trois phases principales selon une séquence bien établie qui comprend une phase d'adhésion, une

phase intermédiaire et une phase de maturation [(Haras, 2005) ; (Nett et Andes, 2006)] (Figure N°1).

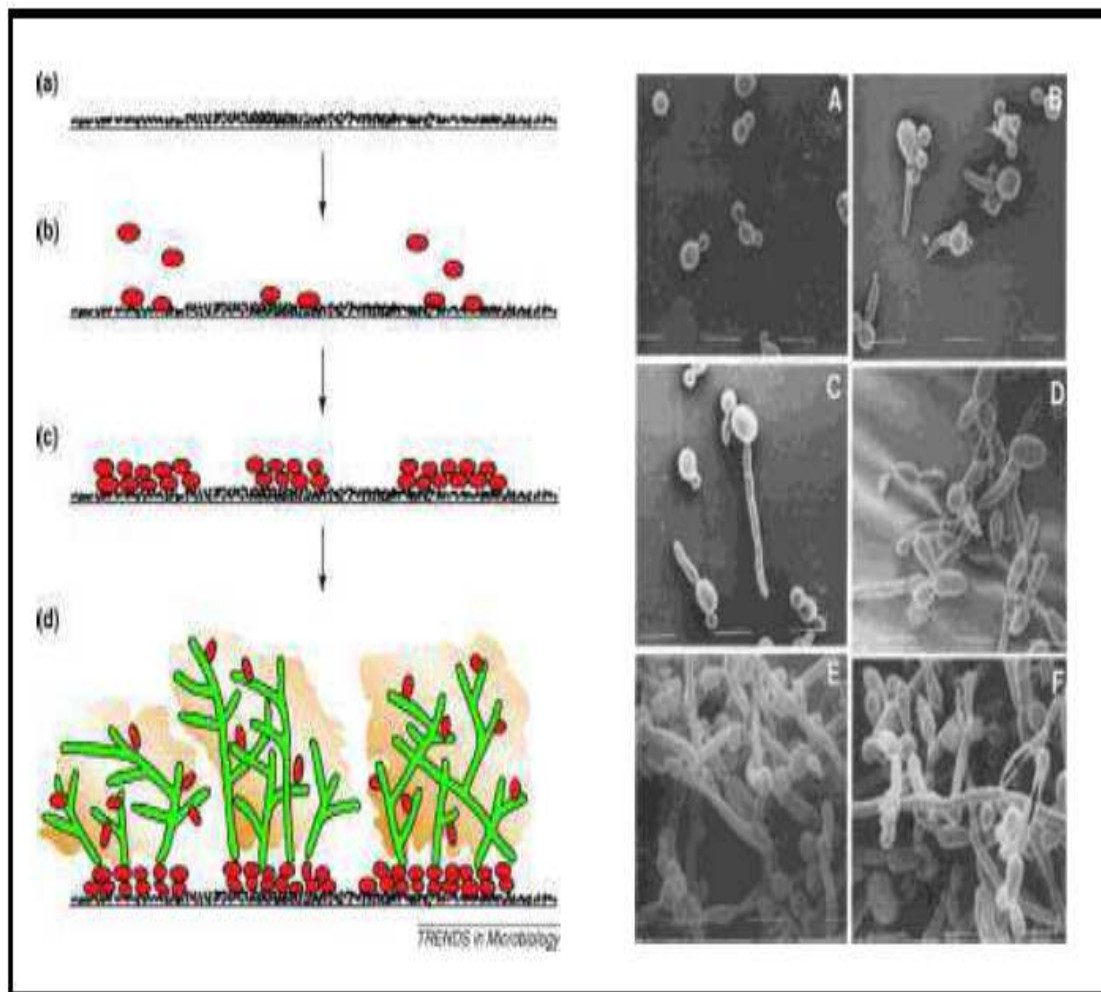


Figure N° 1: Les différentes étapes de la formation d'un biofilm par *Candida albicans* à la surface d'un cathéter. A gauche : Schéma des étapes aboutissant à la formation d'un biofilm (Douglas, 2003).

a : colonisation de la surface du cathéter par des protéines de l'hôte.
 b: Adhésion initiale des levures de *C. albicans*, c : Formation de microcolonies formées par des levures constituant la première couche du biofilm. d: formation d'un réseau constitué de filaments mycéliens, sur lesquels se fixent les levures constituant la seconde couche du biofilm englobée dans une matrice extracellulaire.

A droite : Images obtenues par balayage électronique (Hawser and Douglas, 1994) Au temps 1h (A), 3h (B), 6h (C), 18 (D), 24h (E) et 48h (F).

-La phase d'adhésion : elle comprend deux étapes successives, une première réversible et une deuxième irréversible.

- Adhésion réversible : L'attachement initial à la surface est souvent faible. La blastopore adhéree peut être facilement détachable de la surface et reprend son statut planctonique libre **(Baillie et Douglas, 1999)**.
- Adhésion irréversible : La blastopore adhère fortement à la surface sans se détacher **(Jabra-Rizk et coll., 2004)**.

-Phase intermédiaire : Elle est caractérisée par la formation d'une couche basale de micro-colonies, la production et l'émergence de la matrice extracellulaire qui apparait comme un voile couvrant les micro-colonies de *Candida* **[(Baillie et Douglas, 2000) ; (Al- Fattani et Douglas 2006)]**.

-phase de maturation : au cours de cette phase la quantité du matériel extracellulaire augmente avec le temps d'incubation, jusqu'à ce que la levure soit complètement enfermée dans la matrice extracellulaire **(Chandra et coll., 2001)**. En plus des trois phases précédentes, il existe une quatrième phase qui correspond à la dispersion et la diffusion des cellules filles de biofilms **(Pace et coll., 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'tool, 2008)]**.

5. Architecture d'un biofilm

D'un point de vue structural, les biofilms sont hétérogènes et se forment sur des supports variés. Ils ont des épaisseurs différentes et sont formés par des espèces variées de microorganismes. De cette diversité, nous pouvons néanmoins dégager quelques caractéristiques structurales communes à tous les biofilms. En effet, un biofilm est constitué d'une fine monocouche de cellules à sa base surmontée 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 micro-organismes **[(Stoodley, 1997) ; (Tolker-Nielsen, 2000)]**.

-La couche la plus profonde du biofilm est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier. Ces cellules sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente.

-La couche superficielle du biofilm est constituée de grandes cellules en aérobiose et à croissance rapide. Entre ces deux couches, se trouvent des cellules en microaérobiose **(Clutterbuck, 2007)**.

Cette architecture stratifiée des biofilms s'explique par l'existence d'un gradient de nutriments et d'ions. Il faut signaler que les nutriments présents dans le milieu extérieur diffusent en plus grande quantité dans les couches superficielles du biofilm. En effet, 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 différentes zones de croissance des micro-organismes **(Chalvet de Rochemonteix, 2009)**.

Durant le développement du biofilm candidal, les cellules libèrent des substances polymériques, la matrice exopolysaccharidique joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert de barrière protectrice contre la dessiccation **[(Clutterbuck, 2007) ; (Kokar et coll., 2009)]**

Figure N°2.

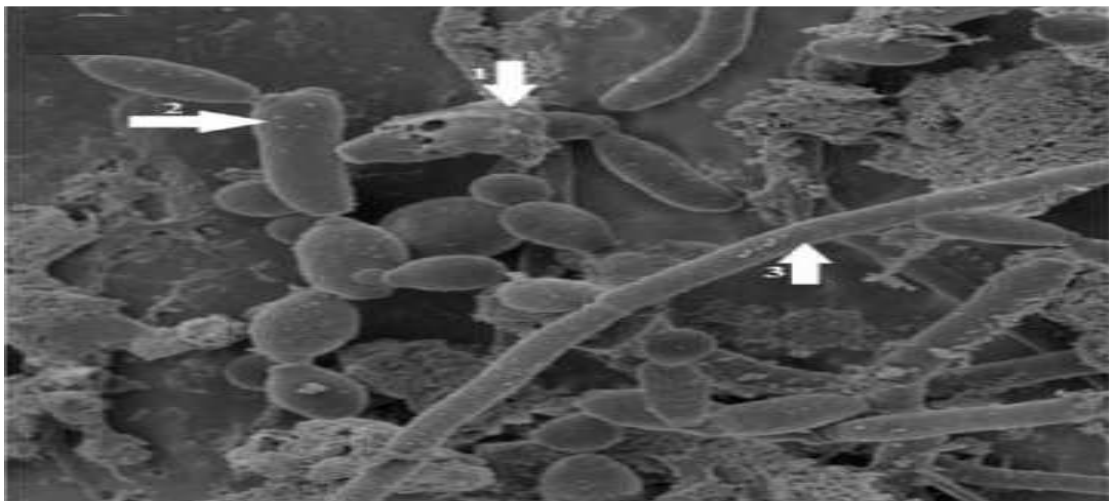


Figure N°2 : Microscopie électronique à balayage d'un mélange de formes morphologiques de biofilm de *Candida albicans* développé sur la surface interne d'un cathéter vasculaire périphérique. Grossissement $\times 4500$ **(Seddiki et coll., 2013)**.

6. Quorum sensing

Beaucoup de microorganismes sécrètent et utilisent, pour leur communication intracellulaire, des molécules capables de transférer le signal qui peut être auto reconnue. C'est un système de signalisation cellulaire sophistiqué et fondamental pour la formation de biofilms microbiens appelé Quorum sensing **[(Soll, 2008), (Walther et Wendland, 2008)]**.

Ce mode de communication permet de réguler la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population au sein du biofilm en prenant en considération les conditions environnementales. Il initie les phénomènes de dispersion et d'essaimage des microorganismes planctoniques à partir du biofilm.

Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, tels que les facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases. Les molécules du quorum sensing jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires **[(Clutterbuck, 2007) ; (Irie, 2008)]**.

Deux molécules sont impliquées dans le quorum sensing chez *Candida albicans*, il s'agit du tyrosol et du farnésol.

Le farnésol assure son contrôle négatif et fonctionne comme un signal entre les cellules en inhibant la formation d'hyphes et la colonisation des surfaces. Quant au tyrosol, il agit sur la croissance et la morphogenèse de *Candida albicans* en assurant un contrôle positif pour le passage à la forme hyphe **[(Ramage et coll., 2005) ; (Hogan, 2006) ; (Williams et Camara, 2009)]**.

7. Résistance au sein du biofilm

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

La résistance du biofilm est un phénomène multifactoriel qui constitue un large spectre de défense qui soit efficace contre de nombreux types d'agents antifongiques **(Al-Dhaheer et coll., 2008)**.

Différents facteurs contrôlent la résistance aux antifongiques au sein du biofilm, parmi lesquels nous pouvons citer :

-L'architecture du biofilm et la présence du matériel exopolymérique peut réduire la diffusion des antifongiques ce qui laisse le temps aux cellules d'adopter une protection physiologique **(Ramage et coll., 2009)**. En effet, 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)**. 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)]**.

-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 et du développement du biofilm **[(Mateus et coll., 2004) ; (Nett et coll., 2008)]**.

-La densité cellulaire élevée d'un biofilm explique partiellement la résistance accrue des cellules sessiles par rapport à leurs homologues planctoniques **[(Senviratne et coll., 2008) ; (Ramage et coll., 2012)]**.

-L'expression des gènes CDR (Candida Drug Resistance) et MDR1 (Multi Drug Resistance) et aussi les gènes codant pour les pompes à efflux dans les trois étapes du développement du biofilm **(Mukherjee et Chandra, 2004)**.

-L'existence des cellules dites persistantes favorise le processus de résistance. Cette population particulière survit à des concentrations élevées en antifongique et peut reformer un nouveau biofilm (**Lafleur et coll., 2006**).

-La réduction de la teneur en ergostérol dans la membrane des cellules pourrait conduire à des changements dans les propriétés de celle-ci, telle que la perméabilité aux antifongiques ce qui amplifie la résistance [(**Mokherjee et Chandra, 2004**) ; (**Kumamoto et Vines, 2005**)] **Figure N°3**.

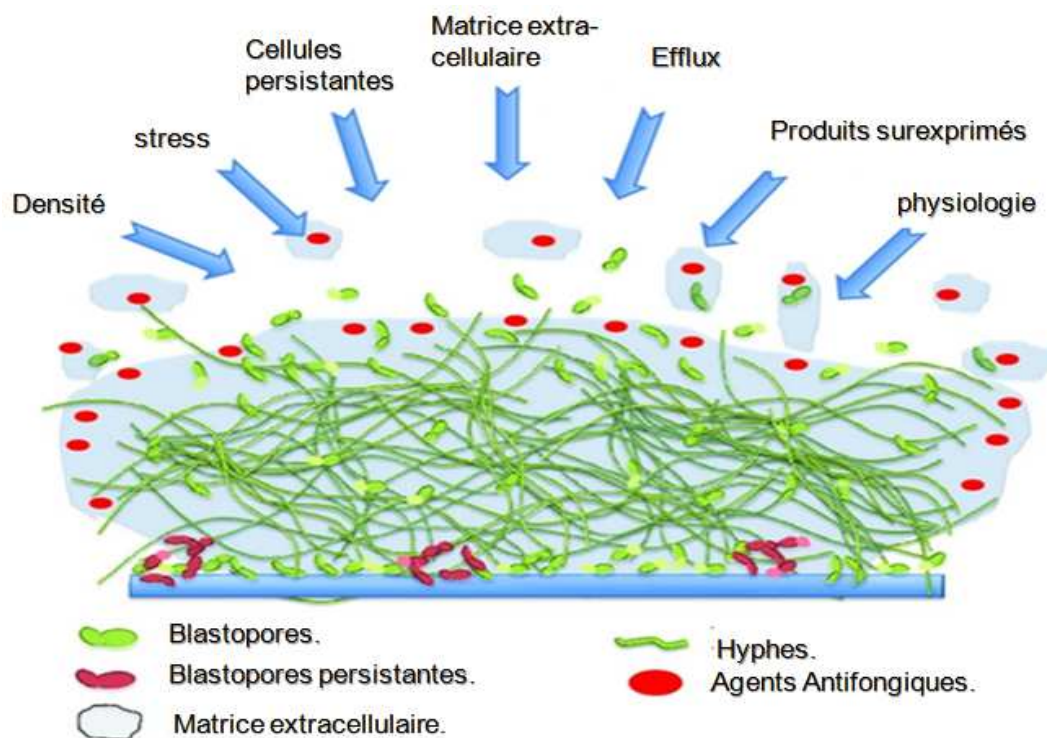


Figure N° 3: Mécanismes de résistance des biofilms fongiques (**Ramage et coll., 2012**).

Deuxième partie
Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen

1. Souches étudiées

Nous avons utilisé une collection de souches de *Candida sp.* isolée du service de Cardiologie et de Chirurgie générale du CHU de Tlemcen. Il s'agit de 34 souches de *Candida sp.* réparties comme suit, 06 *Candida albicans*, 21 *Candida parapsilosis*, 05 *Candida glabrata* et 02 *Candida famata*.

2. Formation de biofilm

A partir de souches conservées à 4°C sur gélose Sabouraud, nous avons préparé une préculture dans 20 mL de milieu sabouraud liquide. Après incubation à 30°C pendant 24 heures, la suspension est centrifugée à 3000 g pendant 5 minutes à 4 °C. Le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate salé (PBS) (10 mM pH 7,4) puis resuspendu dans le RPMI 1640 tamponné a pH 7,4 avec du MOPS (0,165 mol/L). La concentration cellulaire de départ est fixée à 10^6 cellules/mL par dénombrement des levures sur cellule de Thoma. 100 µL de cette suspension levurienne sont déposés dans chaque puits d'une microplaque 96 puits. La plaque est ensuite scellée puis placée dans une étuve à 37 °C pendant 48 heures.

3. Coloration par le Crystal violet

La technique de coloration au Crystal violet mesure la quantité de biomasse à l'intérieur du biofilm (**Christensen et coll., 1985**). Le Crystal violet se lie aux molécules extracellulaires chargées négativement, tel que les molécules de la surface cellulaire ou les polysaccharides de la matrice exopolymérique des biofilms (**Li et coll., 2003**). Après la formation du biofilm, le milieu est aspiré et les puits sont lavés 03 fois avec du PBS stérile (10 mM pH 7,4) pour éliminer les cellules planctoniques et /ou les cellules non adhérentes.

Pour la fixation du biofilm, 100 µL de méthanol (99%) sont ajoutés. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, les puits sont lavés et remplis par 100 µL d'une solution de Crystal violet (2,5%). Les plaques sont incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Le Crystal violet lié au

biofilms est libéré par addition de 150 µL d'acide acétique (33%). La densité optique est ensuite lue à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biotek, ELx800).

4. Evaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI)

Nous avons utilisés le protocole, décrit par **Pierce et ses collaborateurs (2008)**, qui permet de mesurer l'activité métabolique des cellules sessiles après leur exposition aux agents antifongiques. Cette méthode, précise et reproductible, est basée sur la réduction du tétrazolium.

Le XTT est converti en formazane par une enzyme (déshydrogénase mitochondriale des levures) qui est un produit de couleur orange soluble dans l'eau. Le formazane peut être quantifié par un lecteur de microplaque. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de cellules viables **[(Ernst et Rogers, 2005) ; (Pierce et coll., 2008)]**.

L'évaluation des SCMI se déroule en trois étapes successives, la formation des biofilms, le test antifongique et le test de réduction du tétrazolium.

Les biofilms sont cultivés dans les puits des microplaques stériles, l'ensemencement des puits est réalisé après ajustement de la concentration cellulaire de départ à 10^6 cellules/mL.

Après addition de 100 µL de l'inoculum dans chaque puits, la microplaque est scellée puis placée dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

4.1. Test antifongique

A l'aide d'une micropipette multicanal, le surnagent est aspiré soigneusement des puits pour éviter la destruction des biofilms formés.

Les puits sont ensuite rincés deux fois avec 200 µL de PBS stérile afin d'éliminer les cellules planctoniques et les cellules non adhérentes aux surfaces des puits.

Un égouttage de la microplaque est réalisé en l'inversant. Le liquide résiduel du PBS est écarté en la tamponnant sur des serviettes stériles en papier buvard.

100 µL du milieu RPMI 1640 sont ajoutées dans chaque puits de la microplaque. 100 µL d'antifongique à une concentration finale de 32 µg/mL sont incorporés dans le premier puits.

Après homogénéisation, une série de dilution de puits en puits est effectuée jusqu'au dernier puits.

Les tests antifongiques sont réalisés en triplicata pour chaque souche. En parallèle, un témoin négatif et un témoin positif sont préparés. Le témoin négatif correspond à une incubation de l'agent antifongique dans le milieu de culture en l'absence de levures, alors que le témoin positif consiste à incuber les levures en l'absence d'agent antifongique.

Les microplaques sont convenablement scellées et incubées pendant 24h à 37°C. Après incubation, un lavage des puits à l'aide du PBS est réalisé comme décrit précédemment et la microplaque est prête au test de réduction du tétrazolium.

4.2. Test de réduction du tétrazolium

Avant d'effectuer les tests de viabilité des cellules, 1 µL de la solution de ménadione est ajoutée à 10 mL de la solution XTT pour avoir une concentration finale de 1 mM de ménadione.

Les puits sont rincés avec du PBS stérile et 100 µL du mélange XTT/ménadione sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque (y compris le contrôle positif).

Les microplaques sont ensuite scellées et placée dans une étuve à 37°C pendant 2 à 3 heures. À ce stade, le tétrazolium est converti en formazane par les cellules viables. Après l'incubation des microplaques, 75 µL du contenu de chaque puits sont transférés dans une nouvelle microplaque stérile. Celle-ci est placée dans un lecteur de microplaques (Biotek, ELx800) pour mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 490 nm.

Les SCMI sont calculées en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante:

$$\text{SCMI} = 100 [1 - (A_{490\text{nm}} \text{ des biofilms} / A_{490\text{nm}} \text{ du contrôle positif})]$$

A_{490} : Densité optique à 490 nm (**Dalleau et coll., 2008**).

Cette formule permet de calculer les SCMI de l'antifongique pour chaque puits de la microplaque.

Troisième partie
Résultats et discussion

L'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2013**) estime qu'entre 5 et 12% des patients hospitalisés dans le monde développent une infection hospitalière dont plus de 60% sont associées à l'implantation d'un dispositif médical ou chirurgical. En effet, selon le Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) et le Comité Technique des Infections Nosocomiales et des Infections Liées aux Soins (CTINILS), les cathéters vasculaires périphériques (CVP) sont des dispositifs invasifs incontournables, au moins à titre provisoire **[(CTINILS, 2007) ; (RAISIN, 2008)]**.

Par ailleurs, l'augmentation des infections à candida au cours des dernières décennies est presque parallèle à celle de l'utilisation généralisée d'une large gamme de dispositifs médicaux implantés (sondes, prothèses, cathéters...) **[(Léone et coll., 2000) ; (Ramage et coll., 2005)]**.

De plus, il est à noter que les candidoses acquises, lors de l'implantation de dispositifs médicaux, sont associées à la formation de biofilms qui constituent un problème majeur de santé publique par leurs résistances aux doses cliniques usuelles **(Lafleur et coll., 2006)**.

Partant de ces données, nous avons entrepris cette étude qui a porté sur l'évaluation du potentiel de formation de biofilms par des souches de *Candida* sp. isolées de cathéters veineux périphériques des services de Cardiologie et de Chirurgie générale du CHU de Tlemcen.

1- Evaluation de la formation de biofilms par la technique du Crystal violet

Notre travail a porté sur une collection de souches de *Candida sp.* isolées de cathéters veineux périphériques des services de cardiologie et de chirurgie générale du CHU de Tlemcen.

En effet, nous avons étudié 34 souches appartenant toutes au genre *Candida*. Il s'agit de 06 *Candida albicans*, 21 *Candida parapsilosis*, 05 *Candida glabrata* et 02 *Candida famata*.

Nous avons évalué dans un premier temps, le potentiel de ces souches à former les biofilms par la technique quantitative du Crystal violet. Il s'agit d'une méthode colorimétrique qui permet la quantification de la biomasse des cellules au sein du biofilm par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 570 nm (**Nuryastuti et coll., 2009**).

Les résultats relatifs à la formation de biofilms par les souches de *Candida sp.* sont regroupés sur la figure N°4.

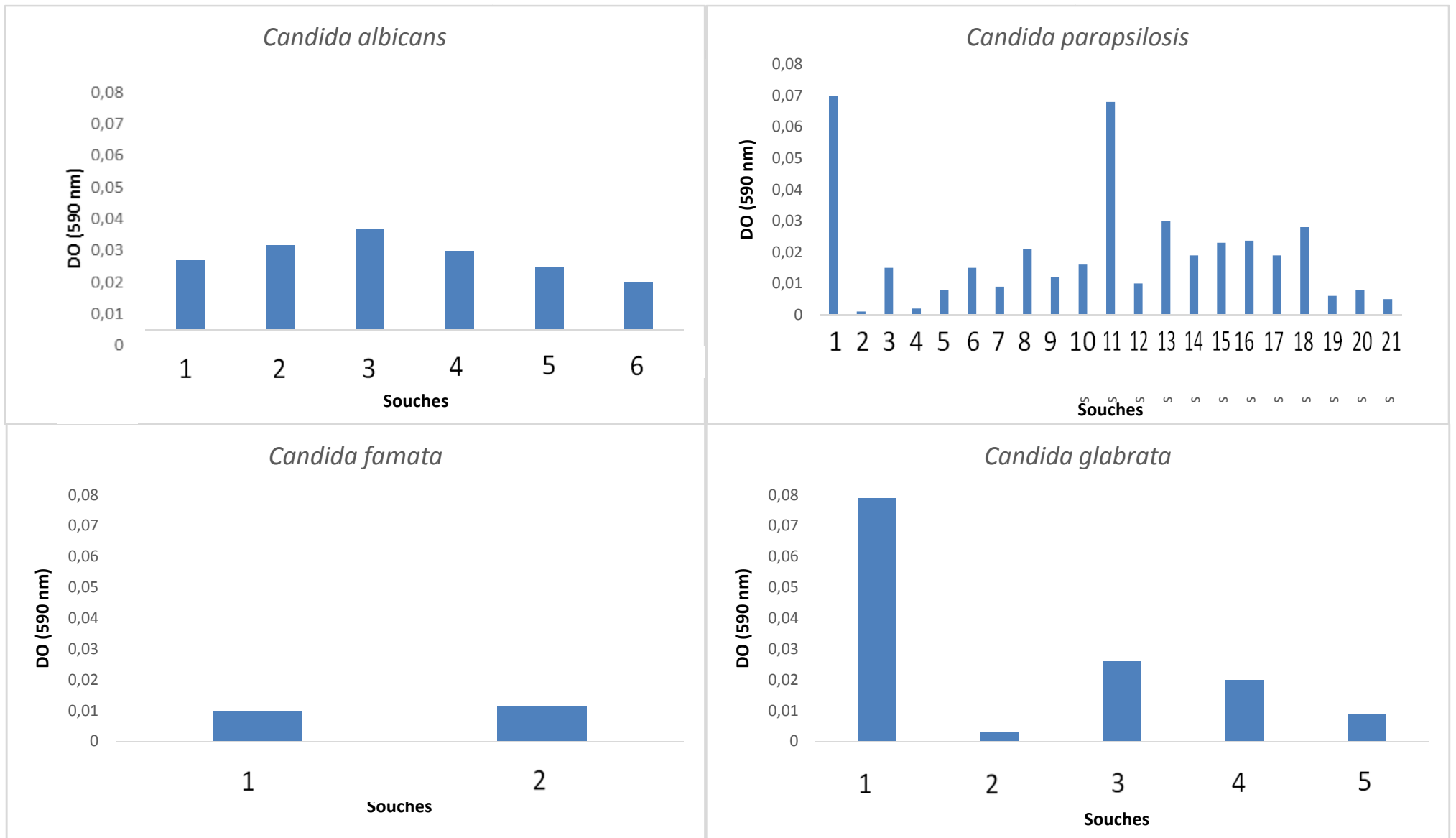


Figure N°4 : Biomasse des biofilms de *Candida sp.* formés sur milieu RPMI 1640

Nous remarquons que toutes les souches de *Candida* sp. que nous avons testées ont formé les biofilms. Néanmoins, la biomasse des biofilms formés varie entre les espèces et aussi entre les souches de la même espèce. En effet, *Candida parapsilosis* 1, 11 et *Candida glabrata* 1 possèdent un potentiel relativement élevé pour former des biofilms avec une densité optique d'environ 0,07. Par ailleurs, *Candida albicans* 1, 2, 3, 4, 5, 6, *Candida parapsilosis* 3, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, *Candida famata* 2 et *Candida glabrata* 3 et 4 ont présenté un potentiel de formation de biofilms moyen avec des absorbances comprises entre 0,01 et 0,04. En revanche, *Candida parapsilosis* 4, 5, 7, 12, 19, 20, 21, *Candida famata* 1 ainsi que *Candida glabrata* 2 et 5 ont montré un faible potentiel de formation de biofilms avec des absorbances qui n'ont pas dépassées 0,01.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Cuellar-Cruz et ses collaborateurs (2012)** ainsi que ceux de l'équipe de **Ferreira (2013)** qui ont montré que 100% des isolats cliniques de *Candida* sp. forment les biofilms sur tous les dispositifs médicaux implantés chez l'homme.

Des études antérieures ont révélé que la formation et la structure des biofilms de *Candida* dépend de plusieurs facteurs tels que la nature de la surface, les conditions environnementales et les espèces de *Candida* **[(Kuhn et coll., 2002a) ; (Li et coll., 2003) ; (Kojic et Darouiche, 2004)]**.

Par ailleurs, les travaux de **Kumamoto en 2002**, ont montré que *C. parapsilosis* est capable de former des biofilms, et leur présence lors de l'infection est associée à des taux de mortalité plus élevés par rapport aux cellules planctoniques.

Les biofilms de *C. parapsilosis* se composent exclusivement de blastopores (structure simple) avec un minimum de matrice extracellulaire **(Blankenship et Mitchell, 2006)**. Ce qui explique que *C. parapsilosis* produit qualitativement et quantitativement moins de biofilms **(Kuhn et coll., 2002 a)**.

Plusieurs auteurs indiquent que la formation de biofilms dépend de la méthode d'étude **[(Shin et coll., 2002) ; (Hasan et coll., 2009)]**.

Selon **Krom et coll., (2007)** le biofilm formé sur milieu RPMI 1640 montre une biomasse fongique importante, ce qui explique la formation des biofilms par toutes les souches testées.

D'après l'étude de **Hawser et Douglas, (1994)** et **Hasan et ses collaborateurs (2009)**, *C. parapsilosis* affiche un taux important de formation de biofilms sur PVC et Teflon, ce qui n'est pas notre cas, vu que nous avons utilisé des microplaques en polystyrène. Il est important de noter que la formation des biofilms par chaque espèce de *Candida* dépend du support utilisé.

Il est connu que les cathéters à base de polymères synthétiques sont plus exposés aux micro-organismes (**Delorme et coll., 1992**), car ils favorisent la rétention des protéines (protéines d'albumine et de coagulation) sur leurs surfaces, ce qui augmente l'adhérence et la prolifération microbienne **[(Kojic et Darouiche, 2004) ; (Cappelli et coll., 2005)]**.

L'étude de **Hawser et ses collaborateurs en 1998** a montré que l'intensité de la formation d'un biofilm après 24 h d'incubation est plus élevée qu'à 48 heures. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ces résultats : l'épuisement du milieu après 24 heures du à une croissance importante de levures aboutirait à une moindre viabilité du biofilm formé à 48 heures. Une autre explication possible est la saturation du biofilm dans sa formation par manque de surface colonisable dans les puits. Il pourrait être envisagé un lavage des puits à 24 heures puis le rajout du milieu de culture pour les 24 heures suivantes (**Hornby et coll., 2001**).

La formation de biofilms matures et la production ultérieure de la matrice extracellulaire est fortement dépendante de l'espèce et les conditions environnementales tel que le pH la composition du milieu et de l'oxygène et le pH optimal pour la formation d'un biofilm de *Candida* sp. est de 7 (**Grinan, 2012**), ce qui est en accord avec le pH utilisée durant l'incubation de nos souches.

Il a été montré que 86% de *C. parapsilosis* isolés du sang étaient capables de former des biofilms, comparativement à 47% des isolats provenant d'autres

sites du corps (**Shin et coll., 2002**). Une autre étude a révélé que 59% des isolats de sang produisent des biofilms, contre 39% des isolats de la peau (**Ruzicka et coll., 2007**). En revanche, d'autres travaux ont montré que seulement 21,8% des isolats sanguins étaient capables de former des biofilms (**Tumbarello et coll., 2007**).

2. Test antifongique

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida sp.* par le protocole de **Pierce et ses collaborateurs 2008**.

Ces résultats nous permettent de vérifier les résultats que nous avons obtenus dans la première partie. Pour cela, nous avons choisi trois souches qui ont montré un potentiel de formation de biofilms élevé à savoir *Candida parapsilosis* 1 et 11 et *Candida glabrata* 1 et trois autres possédant un potentiel très faible à former le biofilm (2,4 et 2).

Le tableau N°1 regroupe les résultats des SCMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références (*Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* IP 444) et des souches isolées.

Tableau N°1 : Concentration Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références de *Candida albicans* et des souches isolées de *Candida* sp.

Souches isolées	CMI (µg/mL)	SCMI ₅₀ (µg/mL)	SCMI ₈₀ (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> 10231	0,5	2	4
<i>Candida albicans</i> IP 444	0,5	1	8
<i>C. parapsilosis</i> N° 1	1	4	8
<i>C. parapsilosis</i> N°11	2	4	8
<i>C. glabrata</i> N°1	1	2	4
<i>C. parapsilosis</i> N°2	2	1	2
<i>C. parapsilosis</i> N°4	2	1	2
<i>C. glabrata</i> N°2	0,5	0,5	1

Nous constatons que :

- Les CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références et des souches isolées, varient de 0,5 à 2 µg/mL. Ces dernières restent dans l'intervalle des CMI établies par Hammond en 1977. Il est à noter que selon les recommandations de CLSI (2008), les souches de *Candida* sp. sont résistantes à l'amphotéricine B si leurs CMI sont supérieures à 2 µg/mL.

-Les SCMI₅₀ de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de levures ayant montré un faible potentiel de formation de biofilms par la méthode au Crystal violet à savoir *Candida parapsilosis* 2, 4 et de *Candida glabrata* 1, sont comprises entre 0,5 et 1 µg/mL. Les SCMI₈₀, quant à elles, varient de 1 à 2µg/mL.

-En revanche, les SCMI₅₀ de l'amphotéricine B envers les souches de *Candida parapsilosis* 1, 11 et *Candida glabrata* 1 dont le potentiel de formation de biofilms déterminé par la technique au Crystal violet est élevé sont comprises entre 2 et 4µg/mL. Les SCMI₈₀ varient 4 et 8 µg/mL. Nous remarquons que les SCMI₈₀ pour sont multipliées par un facteur de 4 par rapport aux CMI. Selon **Ramage et coll. (2001b)**, l'accroissement des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles par rapport à leurs homologues planctoniques témoigne de leur capacité à former des biofilms. De plus, **D'Enfert (2006)** a montré que les biofilms de *Candida* sp. sont plus résistants que leurs homologues planctoniques. De ce fait, les deux souches de références sont capables de former les biofilms.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Rawya et ses collaborateurs (2008)** qui ont montré que les biofilms de *Candida parapsilosis* étaient beaucoup plus résistantes à l'amphotéricine B que les cellules planctoniques. Aussi, selon **Seddiki et ses collaborateurs 2013**, *C. glabrata* en mode biofilm est plus résistance à l'amphotéricine B avec des SCMI qui n'ont pas dépassé 4µg/mL.

Aussi, selon **Seneviratne et coll., 2008 et Hasan et coll., 2009** la formation de biofilms augmente de manière significative les niveaux de résistance des

levures aux agents antifongiques. Cette augmentation est une caractéristique stable et inhérente des souches de *Candida* sp.

Les biofilms de *Candida* sp. sont moins sensibles à de nombreux agents antifongiques [(Perumal et coll., 2007) ; (Coogan et coll., 2006) ; (Al-Dhaheiri et coll., 2008)]. En effet, l'amphotéricine B a un effet inhibiteur sur les cellules sessiles de *Candida* sp mais à des concentrations plus élevées des marges thérapeutiques [(Blankenship et Mitchell, 2006) ; (Pierce et coll., 2008)].

Quelques mécanismes ont été proposés pour expliquer cette résistance, tels que les changements phénotypiques résultant d'un taux de croissance diminué, l'expression des gènes dépendant du contact, l'interaction avec la matrice polymérique extracellulaire [(Douglas, 2003) ; (Kumamoto, 2002)] , et une faible pénétration à travers la matrice extracellulaire de biofilm (Samaranayake et coll., 2005).

Les deux souches 1 et 11 de *Candida parapsiiosis* et la souche de *Candida glabrata* 1 deviennent relativement résistantes après la formation de biofilms. Ceci peut être lié au fait que dans un biofilm mature, les microorganismes forment une communauté fonctionnelle, organisée et coopérative (Donlan, 2002).

En ce qui concerne l'amphotéricine B, il a été rapporté que la formation de biofilms diminue le niveau d'ergostérol des cellules. Ce qui expliquerait en partie la résistance des biofilms à l'amphotéricine B, dont le mécanisme d'action est de se lier à l'ergostérol membranaire de la cellule fongique (Mukhejee et coll., 2003).

Les résultats que nous avons obtenus ont montré également que la technique au Crystal violet suffit pour nous renseigner sur le potentiel des souches à former les biofilms. C'est une technique simple, fiable et facile à mettre en œuvre.

Quatrième partie
Conclusion générale

L'objectif que nous nous sommes fixé pour cette étude est d'évaluer dans un premier temps le potentiel d'une collection de souche de *Candida* sp. à former des biofilms par la technique du Crystal violet et déterminer, dans un deuxième temps, leur résistance à un antifongique de référence l'amphotéricine B.

Il ressort de cette étude que la capacité des souches testées à former les biofilms par la technique au Crystal violet varie d'une souche à une autre. En effet toutes les souches de *Candida* sp. testées ont formées un biofilm, mais les plus intéressantes sont *Candida parapsilosis* 1, 11 et *Candida glabrata*¹.

Par ailleurs, les souches qui possèdent un potentiel élevé pour former des biofilms sont plus résistantes à l'amphotéricine B. Les CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules sessiles sont jusqu'à 8 fois plus élevées par rapport à leurs homologues planctoniques.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Elargir l'étude épidémiologique qui regroupe différentes levures pour couvrir d'autres établissements de santé et d'autres dispositifs médicaux.
- Evaluer le pouvoir de formation de biofilm sur d'autres supports par différentes espèces de *Candida*, dans différentes conditions physico-chimiques.
- Tester la sensibilité vis-à-vis d'autres antifongiques.

Cinquième partie
Références bibliographiques

1. **Ahmad K.M., Kokosar J., Guo X., Gu Z., Ishchuk O.P., Piskur J. (2014)** Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*, 1-7.
2. **Al-Fattani M.A., 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.
3. **Al-Dhaheri R.S., Douglas L.J. (2008)** Absence of Amphotericin B-Tolerant Persister cell in Biofilms of some *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5), 1884-1887.
4. **Aurore S. (2010)** Les glycannes pariétaux de levures et leurs implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Thèse de Doctorat. Université Lille 2.
5. **Baillie G.S., Douglas L. J. (1999)** Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 48, 671-679.
6. **Blankenship J.R., Mitchell A.P. (2006)** How to build a biofilm : a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 588-594.
7. **Cappelli G., Tetta C., Canaud B. (2005)** is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. *Nephrol. Dial. Transp.* 20:266-270.
8. **Christensen G. D., Simpson W. A., Younger J.J., Baddour L M., Barrett F. F., Melton D. M.(1985)** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates ! a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol*, 22 :996-1006.
9. **Christopher G.P., Priya U., Amanda R.T., Floyd L.J., Eilidh M., Gordon R., Jose 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), 1494-1495.
10. **Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A. (2001)** Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5385-5394.

11. **Chalvet de Rochemonteix A. (2009)** les biofilms et la peau. Thèse de Doctorat. Faculté de Médecine de Creil. Ecole Nationale Vétérinaire.
12. **Cuéllar-Cruz M., Vega-González A., Mendoza-Novelo B., López-Romero E., Ruiz-Baca E., Quintanar-Escorza M., Villagómez-Castro J.C. (2012)** The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J. Clin. Microbiol Infect Dis*, 31:2513-2527.
13. **Clutterbuck A.L., Woods E.J. (2007)** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*;121(1-2), 1-17.
14. **Coogan M.M, Fidel P.L, Jr Komesu M.C., Maeda N., Samaranayake L.P. (2006)** *Candida* and Mycotic infections. *Adv. Dent. Res.* 19: 130-8.
15. **Delorme J.M., Guidoin R., Canizales S., Charara J., How T., Marois Y., Batt M., Hallade P., Ricci M., Picetti C. (1992)** Vascular access for hemodialysis: pathologic features of surgically excised ePTFE grafts. *Ann. Vasc. Surg.*, 6:517-524.
16. **D'enfert C. (2006)** Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr. Drug Targets*, 7: 465-470.
17. **Douglas L. J. (2003)** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30-36.
18. **Donlan R.M. (2002)** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 881–890.
19. **Éloy O., Blanc V., Pina P., Gaudart A., Bressolle M.-L., Plainvert C., Decousser J.-W., Pangon B., Allouch P.-Y. et le Collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH). (2006)** Épidémiologie des fongémies dans les hôpitaux français non universitaires en 2004 : enquête multicentrique ColBVH. *Pathologie Biologie*, 54 : 523 - 530.
20. **El Kirat Chatel S. (2010)** Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions *Candida*-phagocytes; Application à la caractérisation du gene OLE2 codant une désaturase chez *Candida lusitaniae*. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 2.
21. **Essendoubi M. (2007)** Identification et typage par microspectroscopie IRTF des levures du genre *Candida* d'origine clinique. Thèse de Doctorat. Université de Reims champagne-Ardenne.

22. **Ferreira A.V., Prado C.G., Carvalho K.S., Dias A.L.T. (2013)** *Candida albicans* and Non-*C. albicans* *Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Mycopathologia*, 175: 265–272
23. **Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E., Butler G. (2006)** a fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from super tree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.*, 6, 99.
24. **Ghannoum M.A. O'toole G.A. (2004)** *Microbial biofilms*, D.C. ASM Press, Washington.
25. **Guarro J., Gené J., Stchigel A.M. (1999)** Developments in Fungal Taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 454-500.
26. **Hammond S.M. (1977)** Biological activity of polyene antibiotics. *Prog. Med. Chem* ; 14 : 105 - 283
27. **Haras D. (2005)** Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques*, 93, 27-41.
28. **Hawer S.P., and Douglase L.j. (1994)** biofilm formation by *candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun.* 62, 915-921.
29. **Hasan F., Xess I., Wang X., Jain N., Fries B.C. (2009)** Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection*, 11: 753 – 761
30. **Hornby J.M., Kebaara B.W., Nickerson K.W. (2001)** Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47: 2366–2369.
31. **Hoyer L.L., Payne T.L., Bell M., Myers A.M., Scherer S. (1998)** *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr. Genet.*, 33, 451-459.
32. **Hogan D.A. (2006a)** Quorum Sensing: Alcohols in a Social Situation. *Curent Biology*, 16, 457-458.
33. **Hube B. (2000)** Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contrib. Microbiol.* 5, 126-137.

34. Irimés C., Séguin J., Roy S., Barbeau J. (2008) Investigations on farnesol lower sponsiveness in *Candida albicans*: Influence of CO₂, temperature and expression of selected genes. Abstract Number: B50, 9th Conference on *Candida* and Candidiasis. *ASM Conferences*, 17-130. New-York.
35. Irie Y., Parsek M.R. (2008) Quorum Sensing and Microbial Biofilms. *Topcis in microbiology and Immunology*, 322, 67-84.
36. Istivàn S., Filkor K., Németh T., Hamari Z., Vágvölgyi C., Gácsér A., (2011) *In vitro* interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiology*, 11, 122.
37. Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A., Meiller T.F. (2004) Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 14-19.
38. Kojic E.M., Darouiche R.O. (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin. Microbial. Rev.* 17(2), 255-67.
39. Kokar C.R., Chakraborty S., Khopade A.N., Mahadik K.R. (2009) Biofilm importance and applications. *India Journal of biotechnology*, 8, 159-168.
40. Kullberg B.J. (2005) Traitement actuel des candidémies. *Hématologie*, 11(2), 24-30.
41. Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2002a) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.*, 70: 878 - 888.
42. Kumamoto C.A. (2002) *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 608 - 611.
43. Kumamoto C.A., Vines M.D. (2005) Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 113-33.
44. Krom B.P., Cohen J.B., Feser G.E.M., Cihlar R.L. (2007) Optimized candidal biofilm microtiter assay. *J Microbiol Methods*, 68:421-432.
45. Lafleur M.D., Kumamoto C.A., Lewis K. (2006) *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3839-3846.

46. Léone M., Arnaud S., Boisson C., Blanc-Bimar M.C., Artin C. (2000) infections urinaire nosocomiales sur sonde en réanimation : physiopathologie, épidémiologie et prophylaxie. *Ann Fr Anesth. Réanim.*, 1 : 23-34.
47. Li X., Yan Z., Xu J. (2003) Quantitative variation of biofilm among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiologie*, 149 :353-62.
48. Mateus C., Crow S.A., Ahearn D.G. (2004) Adherence of *Candida albicans* to Silicone Induce Immediate Enhanced Tolerance to fluconazole. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 48(9), 3358-3366.
49. Monds R.D and O'Toole G.A. (2008) The developmental model of microbial biofilm: ten year of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73-87.
50. Mukherjee P.K., Chandra J. (2004) *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*, 7, 301-309.
51. Nett J. and Andes D. (2006) *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 340-345.
52. Nett J.E., Guite K. M., Ringeisen A., Holoyda K.A., Andes D.R. (2008) Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(9), 3411-3413.
53. Nuryastuti T., Van der Mei H.C. (2009) Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied et Environmental Microbiology*, 75:6850-6855.
54. Odds F.C. (2010) Molecular phylogenetic and epidemiology of *Candida*. *Future Microbiol*, 5, 67-79.
55. O'Toole G.A. (2003) To Build a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 185, 2687-2689.
56. Pace J. L., Rupp M. E., Finch R.G. (2006) Biofilms, infection, and antimicrobial therapy, *CRC Press Taylor Francis Group. Boca Raton*.
57. Rawya S., Al-Dhaheeri., Julia Douglas L. (2008) Absence of Amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* Species. *Antimicrob. Agents Chemoter*, 52, 1884-1887.

58. Ramage G., Vande K., Wickes B.L., Lopez J.L. (2001) Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2475 - 2479
59. Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., Lopez-Ribot J.L. (2005) *Candida* biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*, 4, 633-638.
60. Ramage G., Mowat E., Jones B., Williams C., Lopez-Ribot J. (2009) Our current understanding of fungal biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35, 340–355.
61. Ramage G., Rajendran R., Sherry L., Williams C. (2012) Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, Article ID 528521.
62. Ramage G., Robertson S.N., Williams C. (2014) Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *International Journal of Antimicrobial agents*, 43, 114-120.
63. 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.
64. Pierre F. (2011) Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida* sp. Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fournier.
65. Pittet D. (2010) Candidémie et candidose généralisée. *Encycl. Med. Chir. Anesthésie Réanimation*; 36 : 983-996.
66. Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr, Mowat E., Ramage G. and Lopez-Ribot J.L. (2008) A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing, *Nature Protocols*; 3: 1494-1500.
67. Samaranayake Y.H., Ye J., Yau J.Y.Y., Cheung B.P.K., Samaranayake L.P. (2005) In Vitro Method to Study Antifungal Perfusion in *Candida* Biofilms. *J. Clin. Microbiol*, 43, 818–825.

68. Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., Hube, B. (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48,365-377.
69. Seneviratne C.J., Jin L.J., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. (2008) Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 3259-3266.
70. Seddiki S.M.L., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Badsı-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.
71. Shin J.H., Kee S.J., Shin M.G., Kim S.H., Shin D.H., Lee S.K., Suh S.P. and Ryang D.W. (2002) Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1244 - 1248.
72. Soll D.R. (2008) *Candida* biofilms: Is adhesion sexy? *Current Biology*, 18, 717-720.
73. Silva S., Henriques M., Martins A., Oliveira R., Williams D., Azeredo J. (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*, 47, 681-689.
74. Stoodley P., Boyle J.D., Dodds I. (1997) *Biofilms : community interactions and control*, 1-9.
75. Tolker-Nielsen T., Molin S. (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol.*, 40, 75-84.
76. Trofa D., Gacser A., Nosanchuk J.D. (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 45, 1843-50.
77. Tumbarello M., Posteraro B., Trecarichi E.M., Fiori B., Rossi M., Porta R., Donati K.G., La Sorda M., Spanu T., Fadda G., Cauda R., Sanguinetti M. (2007) Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1843 - 1850.

78. Vandeputte P., Pineau L., Larcher G., Noel T., Brèthes D., Chabasse D., Bouchara J.P. (2008) Molecular Mechanisms of Resistance to 5-fluorocytosine in Laboratory Mutants of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, 171, 11-21.
79. Walther A., Wendland J. (2008) Hyphal Growth and Virulence in *Candida albicans*, Human and Animal Relationships; 2nd Edition, The Mycota VI.
80. Williams P., Camara M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Option in Microbiology*, 12, 1-10.
81. Williams D.W., Kuriyama T., Silva S., Malic S., Lewis M.A. (2011) *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol 2000*, 55, 250-265.