

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

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En Biologie Cellulaire et Biochimie

Option

Substances à visée thérapeutique

Présentée par

Mr. Seghir Abdelfettah

Thème

Recherche de biofilms mixtes sur cathéters veineux périphériques au CHU de Tlemcen

Soutenue le :

Devant le jury composé de :

Président	Pr. Boucherit Kebir	Centre Universitaire d'Ain Temouchent
Directrice de thèse	Pr. Boucherit-Otmani Zahia	Université de Tlemcen
Examineurs	Pr. Hassaine Hafida	Université de Tlemcen
	Pr. Belehcene Miloud	Centre Universitaire d'Ain Temouchent
	Dr. Sari-Belkharroubi Lamia	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2014-2015

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux :

"Louange à Allah à qui appartient tout ce qui est dans les cieux et tout ce qui est sur la terre. Et louange à lui dans l'au-delà. Et c'est lui le Sage, le Parfaitement Connaisseur"

Seigneur, accorde ta prière, ta paix et tes bénédictions, à notre Prophète Mouhammad, ainsi qu'à sa famille et ses compagnons, une prière et une paix permanentes.

ملخص :

تسبب عدوى فطريات المبيضة نسب مرتفعة من الاصابات و الوفيات وهي مرتبطة باستعمال القسطرة الوريدية خاصة لدى المرضى ضعيفي المناعة، هذه الجراثيم يمكنها ان تلتصق بالأدوات الطبية و تنتظم و البكتيريا المحيطة في بناء متعدد الخلايا يسمى أغشية حيوية مختلطة، ذات مقاومة عالية للعوارض الخارجية و المضادات الحيوية. هذه البؤر الجرثومية المختلطة تتطلب تدابير علاج معقدة. إذ علم هذا كان الهدف من هذه الدراسة معرفة توزيع أصناف الفطريات ومدى تواجدها على القساطر الوريدية الطرفية في المستشفى الجامعي بتلمسان ودراسة قدرة الفطريات و البكتيريا على تكوين الأغشية الحيوية المختلطة في المختبر .

النتائج المحصل عليها تبين انه من بين 151 عينة % 11,92 عزلت منها فطريات اغلبها *C.parapsilosis* (60%) و *C. albicans* (20%) و % 23,17 عزلت منها بكتيريا و % 07,28 عزل منها كليهما % 12. من العينات كانت مصدر للعدوى .مدة القسطرة .عمر المرضى و كونهم ذكورا من العوامل المهمة لحصول العدوى

اختبارات الحساسية بينت أن نسبة سلالات *C.parapsilosis* غير الحساسة اتجاه Amphotéricine B كانت مرتفعة بينما جميع الأصناف المعزولة كانت حساسة اتجاه Caspofungine أما فيما يخص البكتيريا فقد تم عزل و تصنيف ثلاث سلالات هي *S.liquefaciens*, *E.cloacae* و *Bordetella sp.* هذا الصنف الأخير كان مقوما لجميع المضادات الحيوية المختبرة . للفطريات و البكتيريا المعزولة القدرة على تكوين أغشية حيوية مختلطة حيث أن كميته و بناءها يتغير حسب السلالة و الصنف و تكوين الوسط الحيوي و درجة حموضته بالإضافة إلى طبيعة السطح الذي تستند إليه .

الكلمات الرئيسية: المبيضة, أغشية حيوية مختلطة(خميرة-بكتيريا), قسطرة وريدية طرفية, العدوى, م.أ.م.

Résumé :

Les infections associées aux soins sont responsables d'une morbi-mortalité élevée notamment chez les patients immunodéprimés. Dans l'environnement, les levures et les bactéries peuvent adhérer aux implants médicaux et s'organiser en structures multicellulaires dite "Biofilms mixtes" plus résistantes aux antimicrobiens. L'objectif de la présente étude est d'établir l'épidémiologie des levures sur cathéters vasculaires périphériques prélevés des services de chirurgie générale et de cardiologie du Centre Hospitalier Universitaire de Tlemcen et de vérifier leur pouvoir à former des biofilms mixtes *in vitro* avec des bactéries isolées des mêmes cathéters qui seront mis en évidence par microscopie électronique à balayage.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 151 prélèvements effectués, 11,92 % sont altérés par les levures, principalement *C. parapsilosis* (60%) et *C. albicans* (20%), 23,17 % par les bactéries et 07,28 % par les deux à la fois. 12% des cathéters positifs représentent une source d'infection, la durée d'implantation, le sexe masculin et l'âge sont les facteurs de risque qui ont accompagné les cas d'infections.

Les tests de sensibilité ont révélé qu'un taux important de *C. parapsilosis* sont insensibles à l'amphotéricine B, tandis que la totalité des isolats sont sensibles la caspofungine. Les trois espèces bactériennes isolées et identifiées sont : *S. liquefaciens*, *E. cloacae* et *Bordetella sp*, cette dernière espèce est résistante à l'ensemble des antibiotiques testés.

Les levures isolées ont le pouvoir de former des biofilms mixtes avec les bactéries. La quantité des biofilms produite et leurs structures varient en fonction des souches, des espèces, de la composition du milieu de culture, de son pH et du support sur lequel les biofilms sont attachés.

Mots-clés: Biofilm mixte (levure-bactérie), *Candida sp.*, Cathéters Vasculaires Périphériques, Infectivité, MEB.

Summary:

Candida infections are responsible for high morbidity and mortality and are frequently associated with the implantation of vascular catheters especially in immunocompromised patients. These microorganisms and bacteria present in the environment can be attached to medical implants and organize into multicellular structures called "mixed Biofilms" more resistant to stress and antimicrobial. These heterogeneous infectious reservoirs require complex strategies for antimicrobial treatment. Knowing this, the objective of this study was to make the epidemiology of yeasts on peripheral vascular catheters at the University Hospital of Tlemcen and check the potential of bacteria and yeast to form mixed biofilm *in vitro*.

The results obtained show that among 151 samples, 11.92% were positive by yeasts, mainly *C. parapsilosis* (60%) and *C. albicans* (20%), 23.17% by bacteria and 07.28% by both at the same time. 12% positive catheters represent a source of infection, duration of implantation, male gender and age are risk factors that accompanied infections.

Susceptibility tests show that a significant rate of *C. parapsilosis* was insensitive to amphotericin B, while all isolates are sensitive to caspofungin. The three isolated and identified bacterial species are: *S. liquefaciens*, *E. cloacae* and *Bordetella spp*, the latter species was resistant to all antibiotics tested. The isolated yeasts have the power to form biofilms mixed with the bacteria, the amount produced biofilms and structure changes depending strains, species, composition of the culture medium, pH and the support where biofilms are attached.

Keywords : mixed biofilm (yeast-bacteria), *Candida sp.* Peripheral Vascular Catheters, Infectivity, SEM

Je dédie ce travail

A mon grand-père

A mes parents et mes sœurs

À toute ma famille

Abdelfatteh

Remerciements

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

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse Madame Boucherit-Otmani Zahia, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd Tlemcen. Directrice du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab) », pour avoir accepté la charge de m'encadrer et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je la remercie pour toutes les heures qu'elle a consacrées pour l'accomplissement de ce travail.

Je tiens à lui exprimer également ma profonde gratitude pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa sympathie et sa gentillesse, qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Boucherit Kebir Professeur au Centre Universitaire d'Ain Temouchent pour avoir consacré du temps pour une relecture enrichissante du manuscrit malgré ses multiples occupations et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Je suis très honoré que Madame Hassaïne Hafida, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd Tlemcen ait accepté d'examiner ce travail.

Ma profonde reconnaissance s'adresse à Madame Sari-Belkharroubi Lamia Maître de conférences Classe A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd Tlemcen pour son aide précieuse, son soutien et sa disponibilité. Je lui exprime ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de siéger parmi les membres de ce jury.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur Belehcene Miloud, Professeur au Centre Universitaire de Ain Temouchent qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury

Mes sincères remerciements à Madame Anselme-Bertrand Isabelle, Ingénieur biologiste, responsable du Centre de Microscopie Electronique Stéphanois pour la réalisation des microphotographies en Microscopie Electronique à Balayage.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu en travaillant au sein du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » et j'en remercie l'ensemble des doctorants ainsi que les techniciens du laboratoire pour leur aide et leur amitié.

Je remercie également la directrice du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen et les chefs des services de cardiologie et de chirurgie A et B ainsi que l'ensemble du personnel pour leur aide et leur collaboration.

Sommaire

Introduction	2
Première partie : Synthèse bibliographique	4
1. Structure des biofilms	7
2. Cycle de vie du biofilm	9
2.1. Attachement réversible	9
2.2. Attachement Irréversible	11
2.3. Maturation du biofilm	11
2.4. Détachement des biofilms	11
3. Quorum sensing	12
4. Interactions des espèces microbiennes au sein du biofilm	13
5. Mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques	18
Deuxième partie : Matériel et méthodes	22
1. Prélèvements et culture quantitative (technique de Brun Buisson)	22
2. Isolement et purification	23
3. Identification des souches	23
4. Antibiogramme	23
5. Tests de sensibilité aux antibactériens	24
6. Tests de sensibilité aux antifongiques	24
7. Evaluation de la capacité des souches isolées à former un biofilm	26
8. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet	26

9. Observation des biofilms multi-espèces au Microscope Electronique à Balayage (MEB).....	27
Troisième partie : Résultats et discussion	29
1. Prélèvements	30
2. Détermination des différents types d'infectivités des cathéters	32
3. Identification et répartition des levures	42
4. Tests de sensibilité aux antifongiques	50
4.1 Tests de sensibilité des levures à l'amphotéricine B	50
4.2 Tests de sensibilité des levures à la caspofungine	54
5. Identification des bactéries et antibiogramme	57
6. Evaluation de la capacité à former des biofilms mixtes	59
6.1. Formation de biofilms mixtes levures - bactéries dans le BHIB	59
6.2. Formation de biofilms mixtes levures - bactéries dans le RPMI 1640	61
7. Variation du pH après la formation du biofilm	63
8. Observation des biofilms mixtes formés <i>in vitro</i> au microscope électronique à balayage.....	66
Quatrième partie : Conclusion générale	78
Cinquième partie : Références bibliographiques	82
Sixième partie : Annexes	105
Septième partie : Publications	111

Liste des tableaux

Tableau N°1 :	Les interactions microbiennes signalées dans des biofilms d'espèces mixtes entre <i>Candida</i> et bactéries	17
Tableau N°2:	Les paramètres des tests de sensibilité par micro-dilution sur microplaque.....	25
Tableau N°3:	Répartition des prélèvements positifs en fonction du service.....	30
Tableau N°4:	Répartition des prélèvements positifs en fonction du sexe.....	30
Tableau N°5:	Différents types d'infectivités microbiennes au CHU de Tlemcen.....	32
Tableau N°6:	Répartition des souches de levures isolées des services de chirurgie et de cardiologie du CHU de Tlemcen.....	43
Tableau N°7 :	Distribution des espèces de levures isolées des services de chirurgie et de cardiologie en fonction des types d'infectivités.....	43
Tableau N°8:	Antibiogramme et test de sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes isolées	58

Liste des figures

Figure N°1 :	Images de microscopie électronique à balayage d'un biofilm bactérien de <i>Listeria monocytogenes</i> et fongique de <i>Candida albicans</i>	7
Figure N°2 :	Etapes de formation des biofilms bactériens et fongiques.....	10
Figure N°3 :	Représentation schématique des mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques.....	20
Figure N°4 :	Différents types d'infectivités en fonction du groupe microbien (levures, bactéries et levures/bactéries).....	34
Figure N°5 :	Différents types d'infectivités microbiennes des cathéters prélevés du CHU de Tlemcen	36
Figure N°6 :	Différents types d'infectivités en fonction du sexe dans les services de cardiologie et de chirurgie générale	38
Figure N°7 :	Différents types d'infectivités en fonction de l'antibiothérapie dans les services de cardiologie et de chirurgie générale	38
Figure N°8 :	Différents types d'infectivités en fonction de l'âge dans les services de cardiologie et de chirurgie générale	40
Figure N°9 :	Différents types d'infectivités en fonction de la durée de pose des cathéters dans les services de cardiologie et de chirurgie générale	40
Figure N°10 :	Effet des interventions chirurgicales sur le type d'infectivité dans les services de cardiologie et de chirurgie générale	40
Figure N°11 :	Répartition des espèces de levures isolées en fonction du type d'infectivités.....	45
Figure N°12 :	Distribution des levures isolées des cathéters prélevés du CHU de Tlemcen.....	45

Figure N°13 :	Distribution des souches de levures isolées des cathéters prélevés du CHU de Tlemcen en fonction du type d'infectivités	46
Figure N°14 :	Concentrations Minimales Inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis de <i>Candida sp.</i>	51
Figure N°15 :	Concentrations Minimales Inhibitrices de la caspofungine vis-à-vis de <i>Candida sp.</i>	55
Figure N°16 :	Biomasse des biofilms mixtes formés sur BHIB par la méthode du crystal violet.....	60
Figure N°17 :	Biomasse des biofilms mixtes formés sur milieu RPMI 1640.....	62
Figure N°18 :	Variation du pH du milieu de culture après la formation des biofilms mixtes et mono-espèces.....	64

Liste des photos

- Photo N°1 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Enterobacter cloacae* sur milieu RPMI 1640 sur fond de puits d'une microplaque 68
- Photo N°2 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Enterobacter cloacae* sur milieu BHIB sur fond de puits d'une microplaque 69
- Photo N°3 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Bordetella sp.* dans le RPMI 1640 sur fond de puits d'une microplaque 71
- Photo N°4 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Bordetella sp.* dans le BHIB sur fond de puits d'une microplaque 72
- Photo N°5 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Serratia liquefaciens* dans le RPMI 1640 sur cathéters vasculaires périphériques 74

Liste des abréviations

AmB	: Amphotéricine B
BHIB	: Brain Heart Infusion Broth
CASFM	: Comité d'Antibiogramme- Société Française de Microbiologie
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CSP	: Caspofungine
DO	: Densité optique
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
MOPS	: 3-(N-morpholino) propan sulfonic acid
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium

Introduction

Introduction

Les communautés poly-microbiennes de bactéries et de *Candida* peuvent être trouvées dans plusieurs environnements et presque sur toutes les parties du corps humain. Les interactions entre ces populations microbiennes peuvent être bénéfiques mais aussi nuisibles **(Peleg et coll., 2010)**.

Les infections mixtes bactériennes-fongiques peuvent avoir une corrélation avec la fréquence accrue ou la gravité de la maladie. *Candida albicans* est la quatrième cause de mortalité due à des infections systémiques, le risque de mortalité peut augmenter lors de la co-infection bactérienne et fongique **(Harriott et Noverr, 2010)**. Ces micro-organismes se trouvent principalement sous forme de biofilms, une communauté pluri-microbiennes qui se fixe aux surfaces vivantes ou inertes, comme les cathéters vasculaires périphériques **(Espinasse et coll., 2010)**. Or, une proportion importante des infections microbiennes humaines sont associées à la formation de biofilm **[(Douglas, 2003) ; (Shirliff et coll., 2009)]**.

La pose d'un cathéter est effectuée chez environ deux tiers des patients hospitalisés **(Grinad, 2012)**. Cependant, la formation d'un biofilm sur ces implants mène à des infections persistantes à long terme car ils peuvent agir comme des réservoirs de pathogènes **(La Fleur et coll., 2006)**. De plus, les biofilms sont dotés d'une résistance accrue à la plupart des antibiotiques disponibles **[(Baillie et Douglas, 2000) ; (Khot et coll., 2006)]**.

Certains auteurs suggèrent que les biofilms mixtes associant des espèces fongiques et bactériennes sont plus «résistants» aux pressions environnementales et moins accessibles aux antibiotiques avec des profils de résistance modifiés **[(El-Azizi et coll., 2004) ; (Wargo et Hogan, 2006)]**. Malheureusement, les interactions au sein des biofilms mixtes constitués de levures et de bactéries, ne sont pas bien élucidées **(Bandara et coll., 2010)**.

En tenant compte de ces données, nous nous sommes fixés pour la présente étude les objectifs suivants :

- Déterminer l'incidence, l'épidémiologie et le degré de sensibilité de *Candida sp* isolées des cathéters veineux périphériques des services de cardiologie et de chirurgie générale du CHU de Tlemcen
- Etudier *in vitro* la capacité de formation de biofilms mixtes entre *Candida sp* et des bactéries isolées des mêmes cathéters vasculaires périphériques.
- Mise en évidence des biofilms mixtes formés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

Première partie

Synthèse bibliographique

Les levures du genre *Candida* cohabitent avec les bactéries dans une variété d'environnements. Ces pathogènes peuvent causer des infections poly-microbiennes et interagir d'une manière synergique ou inhibitrice, cela a un impact sur la pathogénèse et la santé des patients **[(Wargo et Hogan, 2006) ; (Lynch et Robertson, 2008)]**.

Bien que ces germes soient capables d'une vie libre dans un environnement liquide (vie planctonique), l'agglomération dans une structure pluri-microbiennes dite «biofilm» représente leur mode de croissance le plus fréquent dans la nature **[(Kuhn et coll., 2002b) ; (Ramage et coll., 2005)]**. En effet, 80% des infections microbiennes chez l'homme sont liées à la formation de biofilms **(Harriott et Noverr, 2011)**. Il s'agit d'une structure vivante, dynamique, en perpétuel remaniement, fixée à une surface vivante ou inerte, et y est maintenue enchâssée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice **(Espinasse et coll., 2010)**. L'organisation communautaire des biofilms permet aux cellules de coopérer et d'interagir de manière différente que dans un environnement libre. Le passage d'un mode de vie à un autre est un processus dynamique et complexe, régulé par de nombreux facteurs exogènes et endogènes.

Cette structure est caractérisée par un changement radical de phénotype et par l'acquisition de propriétés spécifiques, notamment l'antibio-résistance et l'expression de facteurs de résistance à de nombreux stress environnementaux.

Les biofilms sont à l'origine d'infections contractées en milieu hospitalier, le plus souvent en rapport avec l'utilisation de dispositifs médicaux **[(Burin Des Roziers, 2002) ; (De Chalvet De Rochemonteix, 2009)]**.

Même si les techniques aseptiques sont scrupuleusement respectées, le développement du biofilm est rapide et inéluctable sur la plupart des matériaux utilisés en médecine humaine **(Ebrey et coll., 2004)**.

Le potentiel de servir de réservoir infectieux pour une variété de bactéries et de levures, rend les biofilms difficiles à diagnostiquer et à traiter, nécessitant ainsi des stratégies complexes de traitements poly-chimio-thérapeutiques.

Les biofilms peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme comme les cathéters veineux. Ceci pose un véritable problème de santé publique pour les personnes nécessitant ces implants **(De Chalvet De Rochemonteix, 2009)**.

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. En effet, dans la prise en charge d'un patient, le cathéter veineux périphérique est le dispositif invasif le plus utilisé dans les établissements de santé **[(RAISIN, 2008) ; (CTINILS, 2007)]**.

Selon une enquête de l'Institut de Veille Sanitaire (IVS) en 2006, ce type de cathéters représente 90% des cathéters vasculaires mis en place. Le risque infectieux associé aux cathéters veineux périphériques (CVP) est perçu comme faible comparé à celui associé aux cathéters veineux centraux (CVC) mais probablement sous-estimé par manque de données microbiologiques (cultures du cathéter et/ou du site d'insertion non réalisées), de spécificités des signes locaux (rougeur, douleur, induration ou cordon veineux) à la fois témoignant d'un phénomène irritatif-inflammatoire (phlébite) ou infectieux et une courte durée d'exposition, avec résolution spontanée de l'infection à l'ablation du CVP **[(Maki et coll., 2006) ; (Lolom et coll., 2009)]**.

Les microorganismes responsables de la formation du biofilm proviennent de la flore cutanée du patient, de l'environnement ou de la micro-flore exogène transitoire véhiculée par le personnel hospitalier **(De Chalvet De Rochemonteix, 2009)**. C'est le cas des levures opportunistes appartenant au genre *Candida*, notamment *Candida albicans*, l'espèce la plus virulente de ce genre et de certaines bactéries pathogènes **(Yang, 2003)**.

Les catégories d'individus présentant le plus de risque à développer des infections dues à la présence de biofilms sont les immunodéprimés, tels les patients hospitalisés en réanimation (surtout si leur pathologie est sévère ou la durée de séjour en unité de soins intensifs est prolongée), les grands prématurés, les patients d'hémo-oncologie, les transplantés d'organes, les grands brûlés et les patients

ayant subi une chirurgie lourde, en particulier digestive ou urologique **(Costerton et coll., 1999)**.

Certaines conduites thérapeutiques augmentent ce risque, comme l'antibiothérapie à large spectre et autres traitements médicaux, tels que la corticothérapie, les antagonistes des récepteurs H2, les immunosuppresseurs et les chimiothérapies **(Toubas, 2013)**.

Les infections fongiques causées par *Candida albicans* sont associées à certaines bactéries. En effet, 27 à 56 % des infections nosocomiales sanguines à *Candida albicans* sont poly-microbiennes **[(Pulimood et coll., 2002) ; (Klotz et coll., 2007)]**. Les trois espèces bactériennes souvent co-isolées avec cette levure sont *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus sp.* et *Staphylococcus aureus* **(Klotz et coll., 2007)**.

L'analyse histologique des tissus infectés a montré que *Staphylococcus aureus* est associé à toutes les zones de croissance fongique. Ceci indique que *Candida albicans* pourrait faciliter la croissance de *Staphylococcus aureus* et de l'infection des tissus de l'hôte, et chaque espèce peut influencer l'expression des gènes *in vivo*, entraînant une augmentation de la virulence et de la résistance aux défenses de l'hôte comme cela a été rapporté *in vitro* par **Peters et ses collaborateurs** en 2010.

Dans les infections buccales, une interaction a été observée entre *Candida albicans* et *Streptococcus gordonii* qui est un commensal oral non pathogène, mais qui joue un rôle essentiel dans la formation des plaques dentaires, créant ainsi une surface adhérente prête à la colonisation par d'autres agents pathogènes oraux. De plus, *Streptococcus gordonii* favorise le développement des hyphes de *Candida albicans*, un caractère de pathogénicité de cette levure **(Bamford et coll., 2009)**. Il en est de même dans les infections pulmonaires où les bactéries sont associées à *Candida albicans* **[(Azoulay et coll., 2006) ; (Williamson et coll., 2011)]**.

La colonisation gastro-intestinale à *Candida albicans* a été également associée à la prolifération des bactéries entériques, qui pourraient contribuer à l'altération de la réponse immunitaire **[(Anaissie et Bodey, 1990) ; (Samonis et coll., 1994)]**.

Les infections cutanées sont aussi poly-microbiennes, les champignons les plus impliqués sont les levures du genre *Candida*. La quantification des germes isolés de ces infections montre que les bactéries représentent moins de 50% de la charge microbienne (Leake et coll., 2009).

Il semblerait alors que la levure *Candida* soit généralement associée à des bactéries dans un contexte infectieux, et par conséquent lorsque *Candida albicans* est associée aux espèces bactériennes dans des biofilms poly-microbiens, de nombreuses interactions interspécifiques sont susceptibles d'avoir lieu (Douglas, 2002).

Mais avant de parler des interactions poly-microbiennes dans un biofilm, rappelons tout d'abord la structure de ce dernier, les étapes de sa formation et les différents modes de régulation de cette organisation microbienne.

1. Structure des biofilms :

Le biofilm correspond à un environnement physiquement structuré, composé d'agrégats de micro-organismes, séparés par des espaces libres, dépourvu de micro-organismes. Il est parcouru par des courants aqueux, qui assurent la circulation des fluides permettant à la fois l'apport en nutriments et l'élimination des produits de dégradation (Lawrence et coll., 1991) (Figure N°1).

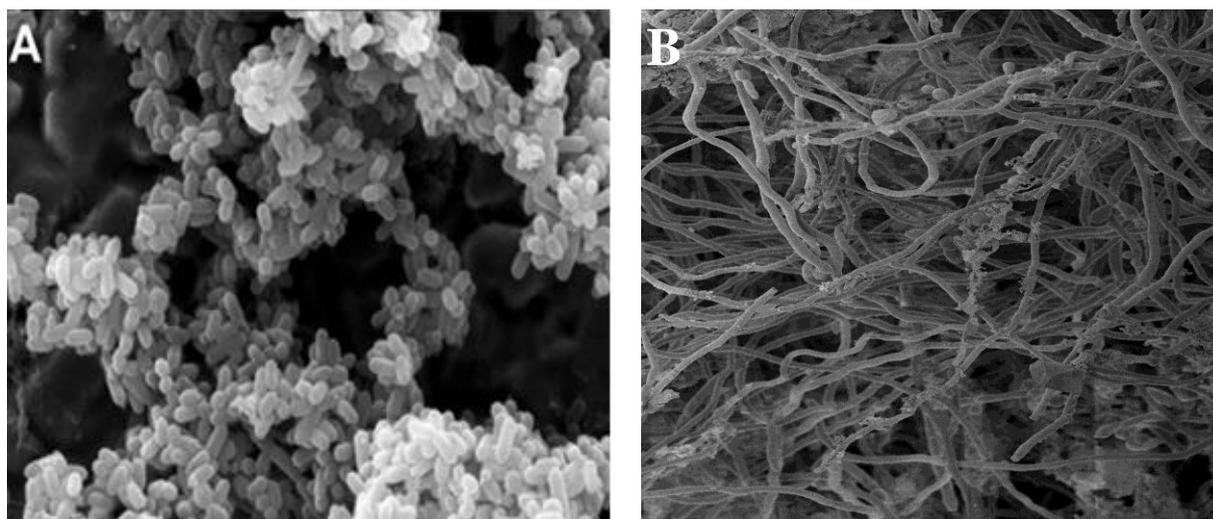


Figure N°1: Images de la microscopie électronique à balayage d'un biofilm bactérien de *Listeria monocytogenes* x6400 (A) et fongique de *Candida albicans* x 1100 (B) [(Saá-Ibusquiza et coll., 2012) ; (Seddiki et coll., 2013)]

Le biofilm n'est pas un milieu homogène, mais un environnement qui présente souvent une architecture complexe, très variable selon les espèces qui le composent et les conditions environnementales [(Stoodley et coll., 1994) ; (Sutherland, 2001)].

Son développement est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les micro-organismes. Cette dernière est composée essentiellement d'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Nous y trouvons également d'autres composants, tels que l'ADN, l'ARN et les lipides (Sutherland, 2001).

La structure du biofilm est fortement influencée par plusieurs paramètres, dont la température et la composition du milieu (Kumamoto, 2002). Ces facteurs affectent plusieurs gènes, qui sont ainsi exprimés différemment lors de la formation du biofilm et de la croissance sous forme planctonique.

L'architecture globale du biofilm peut varier aussi selon le substrat sur lequel il est formé et ses états de croissance [(Chandra et coll., 2001) ; (García-Sánchez et coll., 2004)]. De plus, le développement tridimensionnel du biofilm conduit à la création de gradients physico-chimiques. Les régions au centre des agrégats sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le milieu externe sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (Costerton et coll., 1994).

Il est important de noter que les biofilms qui abritent *Candida albicans* se composent d'un réseau dense de levures et des formes filamenteuses (hyphes et pseudohyphes) [(Chandra et coll., 2001) ; (Ramage et coll., 2001) ; (Seddiki et coll., 2013)]. Les hyphes sont des éléments essentiels pour assurer l'intégrité de la structure et l'architecture multicouche caractéristique de la maturité des biofilms (Baillie et Douglas, 1999).

2. Cycle de vie du biofilm :

La formation d'un biofilm microbien dépend de plusieurs facteurs à savoir, le nombre de cellules présentes, la vitesse du flux du liquide dans lequel se trouve le dispositif et les propriétés physico-chimiques de la surface **(Donlan, 2001)**. Ce phénomène extrêmement complexe, nécessite plusieurs étapes et se déroule selon une séquence bien établie **[(Botto, 2003) ; (Haras, 2005)] (Figure N°2)**. Sur une période de 24 à 48 heures, les micro-organismes adhèrent aux surfaces, par une association réversible, suivie par un attachement irréversible, puis la formation d'un biofilm mature très structuré et interactif **[(O'toole, 2003) ; (Ramage et coll., 2005) ; (Li et coll., 2007)]**.

2.1. Attachement réversible

L'attachement initial est sous le contrôle de plusieurs paramètres, tels que l'hydrophobicité de la surface, les forces électrostatiques, la disponibilité des nutriments, l'hydrodynamique, la communication cellulaire **[(Allison et coll., 1998) ; (Baillie et Douglas, 1998)]** ainsi que certaines conditions physico-chimiques comme la température, le pH, l'osmolarité et le taux d'oxygène **[(Watnick et Kolter, 1999) ; (O'Toole et coll., 2000) ; (Ramage et coll., 2005)]**.

Plusieurs études ont montré que les microorganismes s'attachent plus rapidement à des surfaces hydrophobes (abiotiques), exemple le téflon et les plastiques, que les surfaces hydrophiles (biotiques), verre ou métal **(Bendinger et coll., 1993)**. Sur les surfaces abiotiques, l'attachement est généralement mené par des interactions non spécifiques telles que les liaisons électrostatiques, hydrophobes, ou de Van Der Waals, alors que l'adhérence à la surface biotiques se fait par des mécanismes d'arrimage moléculaire spécifique (lectine ou adhésine) **(Dunne , 2002)**.

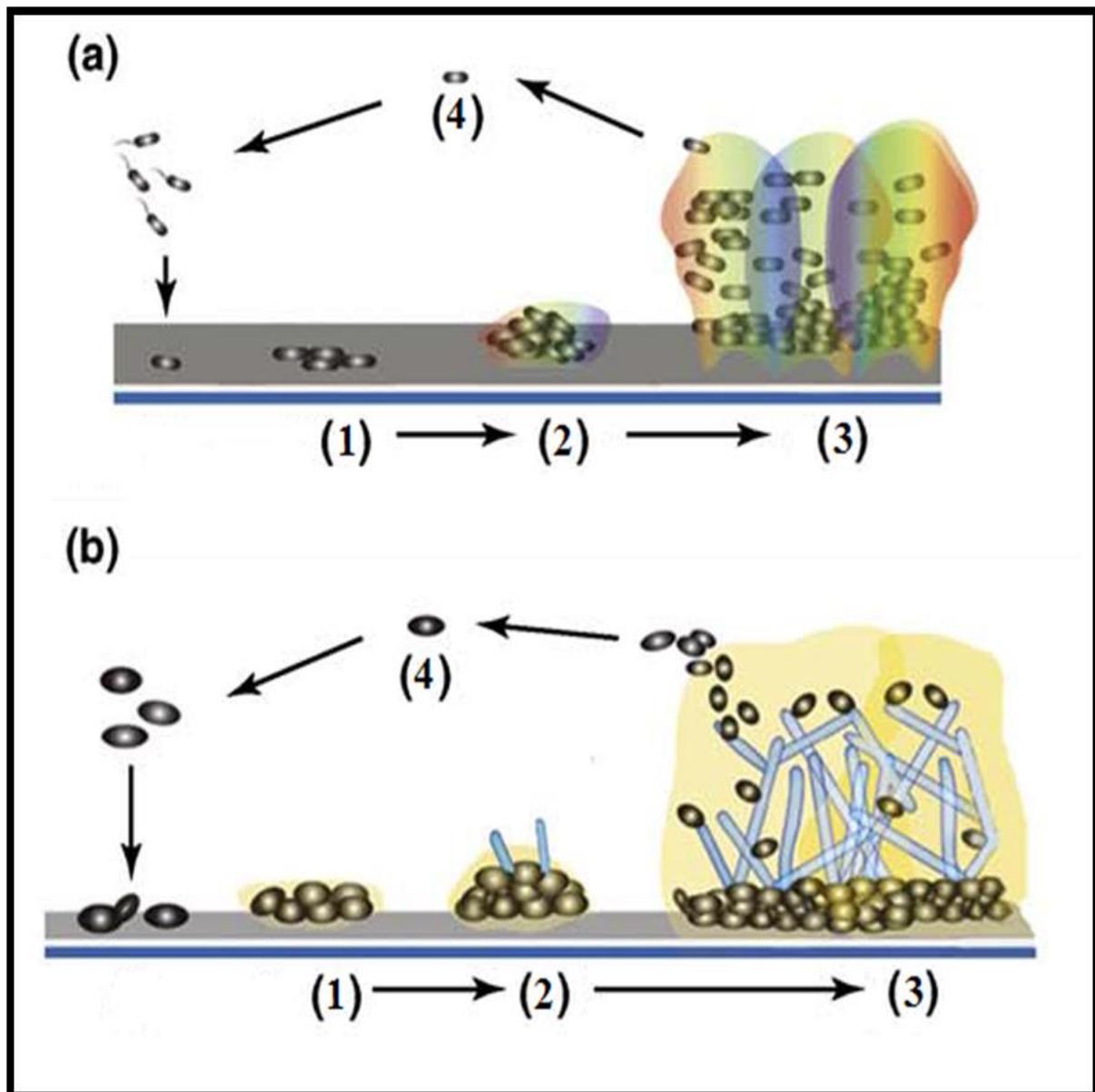


Figure N°2 : Etapes de formation des biofilms : (a) bactériens et (b) fongiques
(1) Attachement réversible, (2) Attachement Irréversible, (3) Maturation, (4) Détachement des Biofilms (Harding et *coll.*, 2009)

2.2. Attachement Irréversible

Cette phase est caractérisée par la production d'une matrice d'exopolysaccharides, la prolifération et l'accumulation des cellules en groupes multicouches **(Baillie et Douglas, 2000)**. La matrice extracellulaire est considérée comme étant essentielle dans la consolidation des cellules au sein du biofilm. Elle permet de piéger et de retenir des nutriments et de protéger ainsi les cellules contre la déshydratation et l'effet des agents anti-microbiens **[(Boyd et Chakrabarty, 1994) ; (Davies et Geesey, 1995)]**.

2.3. Maturation du biofilm

A ce stade les microorganismes commencent à former des micro-colonies soit par croissance clonale (division cellulaire) soit par l'attachement d'autres cellules planctoniques. Les cellules attachées génèrent une grande quantité de composants extracellulaires ce qui renforce la matrice extracellulaire. En 1995, **Costerton et ses collaborateurs** ont suggéré que les micro-colonies sont les unités de base de la croissance du biofilm.

Concernant *Candida albicans*, lorsque la confluence des levures est atteinte, une transition des blastospores vers les formes filamenteuses (hyphes et pseudohyphes) qui forment un réseau complexe emprisonné dans la matrice d'exopolysaccharides **(Kumamoto et Vincles, 2005)**.

2.4. Détachement du biofilm

Les biofilms éliminent les cellules et les composants par deux processus :

- Le détachement direct des amas de cellules, et de la matrice qui les enveloppent, sous pression des forces environnantes qui surmontent la résistance des biofilms. Ce phénomène pourrait être à l'origine de la diffusion des fragments de biofilms dans l'organisme **(Rupp et coll., 2005)**.
- Le détachement programmé des cellules planctoniques du biofilm est beaucoup plus complexe. En effet, les cellules sessiles doivent retrouver le phénotype planctonique et se dégager de la matrice avant de pouvoir quitter la communauté **(Purevdorj-Gage et coll., 2005)**. Ce processus doit inclure un signal qui déclenche la synthèse et la libération d'enzymes qui catalysent la dégradation des polymères de

la matrice extracellulaire, ainsi que la conversion des cellules du phénotype sessile vers le phénotype planctonique **(Boyd et Chakrabarty, 1994)**. Cette stratégie de détachement est invoquée dans les biofilms qui souffrent d'une stagnation, lorsque les nutriments sont épuisés et les déchets accumulés. La libération des cellules semble être systématique puisqu'elle commence tôt après la formation du biofilm.

3. Quorum sensing

Le quorum sensing est un mécanisme de communication intercellulaire qui permet de coordonner le comportement des cellules. Il est impliqué dans la régulation des différentes étapes du développement du biofilm. Cette stratégie de communication empêche la surpopulation inutile et contrôle la compétition pour les nutriments en plus des implications dans le processus infectieux, en particulier pour la diffusion et la création de nouveaux sites d'infection **(Hornby et coll., 2001)**.

À ce jour, plusieurs types de systèmes de quorum sensing sont connus pour les bactéries :

- Un premier système pour les bactéries à gram-positif qui s'appuie sur des polypeptides **[(Waters et Bassler, 2005) ; (Abraham, 2006)]**.
- Un deuxième pour les bactéries à gram-négatif médié par le dérivé N-acylhomosérine lactone (AHL) **[(Eberhard et coll., 1981) ; (Nasser et Reverchon, 2007)]**.
- Un troisième système appelé le AI-2 est proposé comme étant un système de signalisation commun à toutes les bactéries **[(Winans et Bassler, 2002) ; (Waters et Bassler, 2005)]**.

Certaines bactéries ne sont pas capables de produire leurs propres molécules de signalisation mais peuvent répondre aux molécules inductrices exogènes. Lors de la formation du biofilm, ces systèmes de quorum sensing, s'impliquent pour contrôler l'adhérence des bactéries, leurs motilités ainsi que la maturation et la dispersion des biofilms.

Concernant les levures plusieurs molécules auto inductrices ont été décrites. Il s'agit du Morphogenic Auto Regulatory Substance (MARS) un composé produit et sécrété *in vitro* par *Candida albicans*, qui permet la répression de la germination

sans toutefois inhiber la croissance des blastospores. Ce facteur est produit lorsque la densité cellulaire est élevée (2×10^8 cellules/mL) **(Hazen et Cutler, 1979 et 1983)**. Une autre molécule produite dans la voie du mévalonate, plus précisément de la biosynthèse de l'ergostérol appelé « Farnésol » **(Hornby et coll., 2003)**, joue un rôle majeur dans un biofilm, comme la résistance aux antifongiques, l'intégrité de la paroi cellulaire, l'inhibition de la formation d'hyphes et la colonisation des surfaces **[(Sato et coll., 2004) ; (Ramage et coll., 2005) ; (Weber et coll., 2008) ; (Nett et coll., 2009) ; (Williams et Cámara, 2009)]**. La formation des hyphes étant essentielle lors de la formation des biofilms, leur inhibition devrait en partie diminuer la production de ces derniers **(Blankenship et Mitchell, 2006)**.

D'autres molécules semblent contrôler la perception du quorum sensing chez *Candida albicans*. En effet, le dodécanol semble avoir un effet similaire à la molécule de farnésol **(Davis-Hanna et coll., 2008)**.

Le tyrosol joue un rôle antagoniste à celui du farnésol en accélérant la formation des tubes de germination **(Chen et coll., 2004)**. Or, aucune inhibition de la formation du biofilm n'est observée, lors de l'ajout de cette molécule comparativement à l'addition de farnésol. La synthèse du farnésol et du tyrosol diffère selon les phases du développement des biofilms, et la réponse cellulaire au quorum sensing s'accorde avec l'accumulation de l'un ou de l'autre durant la phase correspondante **[(Irie et Parsek, 2008) ; (Monds et O'toole, 2008)]**.

4. Interactions des espèces microbiennes au sein du biofilm

Deux types d'interactions de base en communautés microbiennes sont mis en évidence, à savoir, la synergie et l'antagonisme **[(McLean et coll., 2004) ; (Molin et coll., 2004)]**.

Dans un biofilm, les distances intercellulaires sont souvent extrêmement petites. Par conséquent, les conditions pour des rapports commensaux peuvent être répandues, alors qu'en même temps, la concurrence joue également un rôle significatif entre les groupes d'organismes antagoniques **(Thein et coll., 2005)**. La formation et le maintien d'un biofilm multi espèces comme une organisation dynamique sont basés sur de multiples interactions peu connues entre les co-colonisateurs. Les interactions synergiques favorisent généralement la formation

d'un biofilm multi-espèces. Les interactions les mieux connues de ce genre sont physiques de co-agrégation et co-adhésion. Plusieurs études ont montré que l'adhésion de *Candida albicans* aux surfaces est renforcée par certaines bactéries comme le cas d'*Escherichia coli* qui améliore l'adhérence de la levure à la muqueuse vésicale dans le contexte des infections des voies urinaires (**Levison et Pitsakis, 1987**). Selon **El-Azizi et ses collaborateurs (2004)** la protéinase staphylococcique renforce l'adhérence de *Candida albicans* à la muqueuse buccale. Les germes peuvent aussi adhérer les uns aux autres, exemple de *Candida albicans* qui adhère soit aux principaux constituants microbiens de la plaque dentaire, tels que les streptocoques et les *Actinomyces naeslundii*, soit aux colonisateurs ultérieurs comme *Fusobacterium nucleatum* [(**Holmes et coll., 1996**) ; (**Grimaudo et Nesbitt, 1997**) ; (**Jabra-Rizk et coll., 1999**)].

Cette capacité de *Candida albicans* d'adhérer aux organismes pré-assemblés est un avantage évident si elle n'est pas présente en nombre suffisamment élevé, ou n'a pas l'affinité nécessaire pour les sites d'adhésion pour rivaliser avec les colonisateurs primaires (**O'Sullivan et coll., 2000**).

De même, certaines bactéries ont de l'affinité pour les levures du genre *Candida*. En effet, *Pseudomonas aeruginosa* se fixe préférentiellement sur les hyphes, mais pas sur la forme levure (**Hogan et Kolter, 2002**), contrairement à *Staphylococcus epidermidis* qui se fixe à la fois sur les deux formes (**Harriott et Noverr, 2009 et 2010**).

Il a été montré également que *Candida albicans* peut stimuler *in vivo* l'infection pour un certain nombre de bactéries. L'effet amplificateur de *Candida albicans* sur la virulence de *Staphylococcus aureus* n'est pas clair. Il est cependant concevable que le processus d'infection à *Candida* implique des dommages physiques aux tissus d'organes, permettant à d'autres micro-organismes de pénétrer plus facilement. D'autre part, il est également possible que *Candida albicans* stimule directement la croissance de *Staphylococcus aureus*, comme cela a été montré *in vitro* (**Carlson, 1983 a et b**).

Par ailleurs, la synergie peut être métabolique comme le cas de la capacité des levures à métaboliser le glucose disponible, ce qui module le pH du milieu et le rend favorable à certaines bactéries (**Romano et Kolter, 2005**). Les *streptocoques* par

exemple, excrètent le lactate qui peut agir en tant que source de carbone pour la croissance de la levure **(Holmes et coll., 2006)**.

Des études antérieures ont montré également une modulation de la résistance aux agents antimicrobiens comme le cas de *Staphylococcus epidermidis* qui améliore la résistance de *Candida albicans* au fluconazole **(Adam et coll., 2002)**. De plus, *Staphylococcus aureus* attaché aux hyphes de *Candida albicans* forme un biofilm mixte plus résistant à la vancomycine **(Harriott et Noverr, 2009 et 2010)**. Des observations similaires faites avec les biofilms de streptocoques oraux et *Candida albicans* sur les prothèses acryliques ont suggéré que les cellules fongiques peuvent moduler l'action des agents antibactériens et les staphylocoques peuvent affecter l'activité des agents antifongiques dans ces biofilms **[(Adam et coll., 2002) ; (Jenkinson et Douglas, 2002)]**.

Cependant, la synergie n'est pas la seule forme d'interaction entre ces germes. Plusieurs études ont révélé un antagonisme entre certaines bactéries et levures du genre *Candida*, notamment entre *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa*, malgré qu'un biofilm mixte formé de ces deux pathogènes comporte toutes les formes morphologiques de *Candida*, intimement liées avec *Pseudomonas aeruginosa* **(Thein et coll., 2009)**.

Une multitude de données bibliographiques montrent que la colonisation de *Candida albicans* et de *Pseudomonas aeruginosa* peut être modifiée à différents niveaux. Il s'agit d'une compétition pour les sites d'adhérence sur des fragments de la muqueuse qui sera suivie de la formation par la flore normale d'une couche dense sur la muqueuse qui bloque l'adhésion de *Candida* **(Kennedy et Volz, 1985)**. *Pseudomonas aeruginosa* forme un biofilm dense sur les hyphes de *Candida albicans* ce qui les élimine. En revanche, les bactéries sont incapables de se lier et de « tuer » la forme levure de *Candida albicans*, l'élimination des hyphes se produit seulement après le début de la formation du biofilm **(Hogan et Kolter, 2002)**.

Des tests *in vitro* ont révélé la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à sécréter des agents inhibiteurs de la croissance de *Candida* tels que la Pyocyanine et le 1-Hydroxyphenazine. Ces composés ont un pouvoir antifongique, avec des CMI comparables à celles de l'amphotéricine B et du fluconazole envers *Candida albicans* **(Kerr et coll., 1999)**.

La morphologie de *Candida albicans* est significativement affectée par la présence de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, la filamentation de *Candida albicans* est inhibée lors de son exposition à une molécule de quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa* le 3-oxo-C12 homosérine lactone [(Hogan et coll., 2004) ; (Williams et Cámara, 2009)].

Cette production de composés antifongiques par *Pseudomonas aeruginosa* pourrait être intéressante dans le cas de ressources limitées dans l'environnement du biofilm. L'une des hypothèses proposées est que *Pseudomonas aeruginosa* utilise des filaments de *Candida albicans* en tant que source de nutriments. De plus, plusieurs interactions antagonistes et/ou compétitives ont été étudiées. Nous pouvons citer les interactions antagonistes entre *Candida albicans* et *Acinetobacter baumannii* et entre *Candida albicans* et *Escherichia coli* qui empêchent la croissance de *Candida albicans* quand elles coexistent en tant que biofilms mixtes (Thein et coll., 2007).

Par conséquent, *Candida albicans* a développé un mécanisme pour survivre à l'antagonisme des autres germes en particulier dans le contexte du biofilm. Il s'agit de la production du farnésol qui inhibe non seulement la pyocyanine produite par *Pseudomonas aeruginosa*, mais aussi la motilité empêchant ainsi l'agrégation de *Pseudomonas aeruginosa* [(McAlester et coll., 2008) ;(Williams et Cámara, 2009)]. De même, le Farnésol est capable d'inhiber la croissance d'*Acinetobacter baumannii* (Peleg et coll., 2008) et de perturber l'intégrité de la membrane de *Staphylococcus aureus* la rendant plus sensible aux antibiotiques (Cugini et coll., 2007).

Les données disponibles sur les interactions montrent qu'afin de former un biofilm mixte les microorganismes doivent maintenir un équilibre rigoureux qui bascule de la synergie à l'antagonisme selon les conditions environnantes. Les mécanismes par lesquels les espèces bactériennes et levuriennes coexistent en harmonie dans les biofilms mixtes sont mal compris. Les études menées jusqu'à présent sont limitées à quelques espèces de bactéries et de *Candida*. Actuellement, il y a un vaste intérêt pour l'étude des interactions bactérie-*Candida*, car il est évident que le modèle du biofilm mono-espèce formé aux laboratoires ne représente pas les communautés microbiennes rencontrées dans le contexte clinique (Thein et coll., 2009) (Tableau N°1).

Tableau N°1 : Les interactions microbiennes signalées dans des biofilms d'espèces mixtes entre *Candida sp.* et bactéries

Espèces de <i>Candida</i>	Bactéries ou d'autres espèces de <i>Candida</i>	Nature des interactions	Références
<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	Antagonisme	Kirkpatrick et coll., 2000
<i>C. albicans</i> et <i>C. tropicalis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> B, <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>L. lactiscremoris</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. casei</i> Shirota, <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	Antagonisme	Van der Mei et coll., 2000
<i>C. albicans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Synergie	Adam et coll., 2002
<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Antagonisme	Hogan et Kolter, 2002
<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Torulopsis glabrata</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i>	Synergie et antagonisme	El-Azizi et coll., 2004
<i>C. albicans</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>Prevotella nigrescens</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Antagonisme	Thein et coll., 2006
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Synergie	Van Merode et coll., 2007
<i>C. albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	Synergie et antagonisme	Thein et coll., 2007

5. Mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques

Les biofilms peuvent présenter une résistance aux antibiotiques supérieure de trois fois ou plus à celle affichée par des cellules planctoniques de la même souche (**Ceri et coll., 1999**). Après exposition aux antibiotiques, une petite population survivante peut immédiatement repeupler la surface et devenir plus résistante à un traitement antimicrobien. Alors qu'une fois dispersée du biofilm, les cellules microbiennes reviennent à une forme généralement sensible aux antibiotiques (**Costerton et coll., 1987**).

La diminution de la sensibilité aux antibiotiques n'est pas liée à un seul mécanisme de résistance, mais à une synergie de plusieurs mécanismes (**Ross, 2010**). Un certain nombre d'entre eux ont été identifiés, les uns sont exprimés par les levures et les autres par les bactéries, d'autres sont communs aux deux (**Figure N°3**). Citons :

- **Le ralentissement de la pénétration des antibiotiques par la matrice exopolysaccharidique** : La matrice polysaccharidique du biofilm a le potentiel de réduire la pénétration des antibiotiques soit en les ralentissant physiquement soit en réagissant chimiquement avec eux (**Walters et coll., 2003**).
- **Le ralentissement du rythme de croissance des cellules dans le biofilm** : En raison de la limitation en nutriments, les cellules du biofilm ont un taux de croissance lent ce qui réduit leur sensibilité aux antimicrobiens (**Mah et O'Toole, 2001**).
- **L'augmentation du transfert génétique dans le biofilm** : Les bactéries peuvent acquérir une résistance aux antibiotiques, soit par transfert horizontal de gènes soit par mutations chromosomiques (**Ghigo, 2001**).
- **L'expression des gènes de résistance dans le biofilm** : Des études génétiques ont montré qu'en général, le nombre de gènes exprimés dans les biofilms est supérieur à celui des cultures planctoniques. Ces gènes contrôlent plusieurs fonctions qui restent mal connues (**Davies et Geesey, 1995**). Les antibiotiques peuvent exercer une sélection génétique en faveur des cellules les plus résistantes dans le biofilm (**Oliver et coll., 2000**).

- **La nature multicellulaire des biofilms** : Le comportement multicellulaire permet aux cellules au sein du biofilm d'utiliser efficacement les ressources pour la croissance cellulaire et de fournir une défense collective contre le système immunitaire de l'hôte et les antibiotiques (**Marrie et coll., 1982**).
- **La multi-résistance médiée par les pompes à efflux** : la surexpression des pompes à efflux, qui sont des transporteurs membranaires entraîne une excrétion de molécules toxiques (**Borges-Walmsley et coll., 2003**).
- **La composition en stéroïdes membranaires** : Plusieurs études ont montré que le niveau des stéroïdes est modulé pendant la formation du biofilm de *Candida albicans*. Cette modulation peut contribuer à la résistance aux médicaments puisque les stéroïdes sont essentiels pour l'action des antifongiques (**Mukherjee et Chandra, 2004**).
- **Les cellules persistantes** : Ces cellules seraient dans un état de dormance, où leur métabolisme serait considérablement réduit, diminuant de ce fait l'action des antibiotiques (**Lewis, 2001**). Ces cellules persistantes ne sont pas des mutants et ont la capacité de rétablir la population avec les mêmes caractéristiques que les cellules originales à la suite du traitement (**Lewis, 2007**).

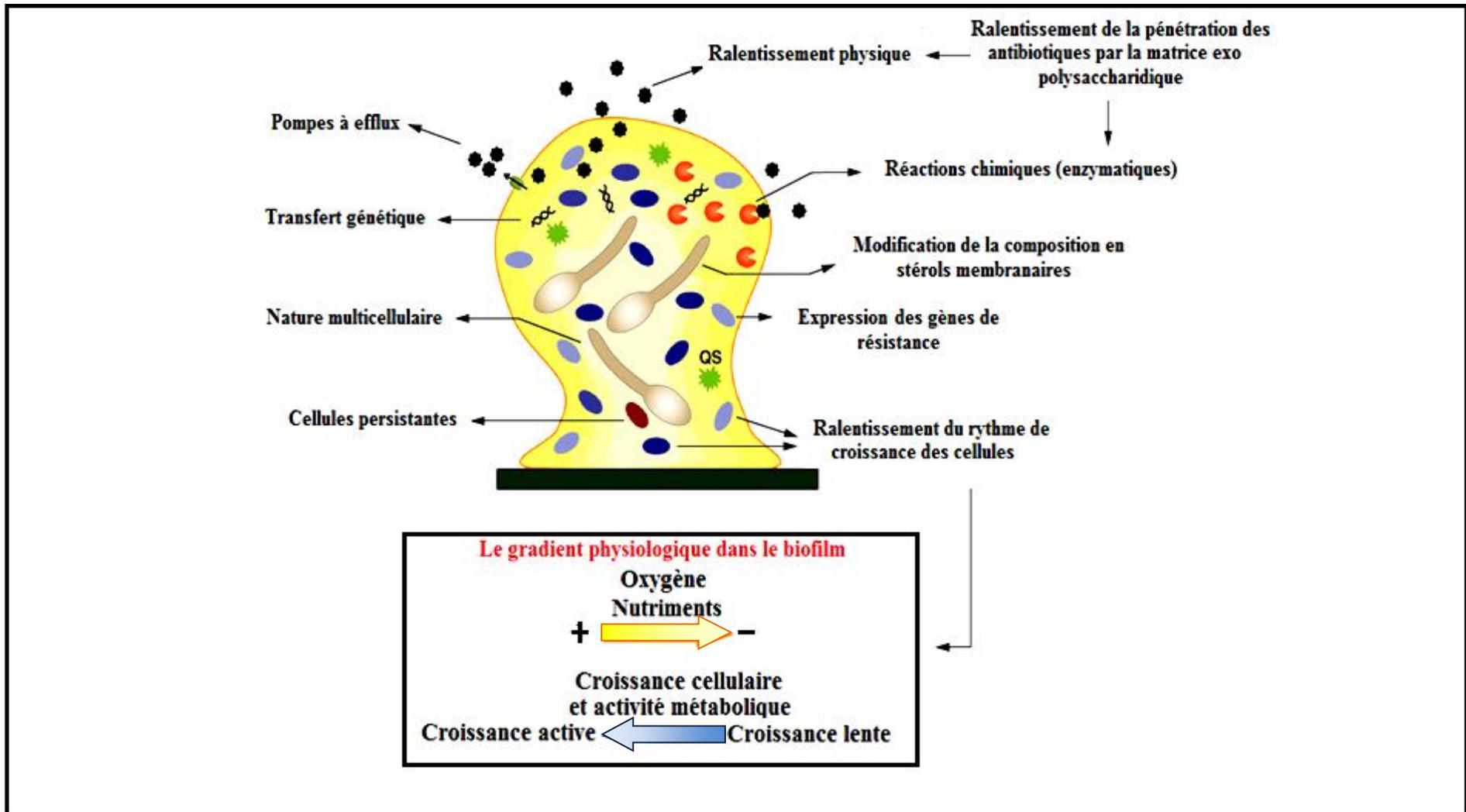


Figure N° 3 : Représentation schématique des mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques [(Lewis, 2007) ; (De la Fuente-Nunez et coll., 2013)]

Deuxième partie

Matériel et méthodes

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

1. Prélèvements et Cultures quantitatives (technique de Brun Buisson)

Les prélèvements ont été effectués entre février et août 2012 des services de chirurgie générale (A et B) et de cardiologie du CHU de Tlemcen.

Ces prélèvements ont été réalisés à partir des cathéters implantés pendant 48 heures et plus.

Une fois prélevés, les cathéters sont recueillis immédiatement dans des tubes secs stériles auxquels 1mL d'eau physiologique est ajouté. Les tubes sont agités au vortex pendant 2 minutes.

Dans un premier temps, 10 μ L de chaque échantillon sont prélevés et mis en culture sur gélose au sang pendant 48 heures à 37°C afin de rechercher les différents types d'infectivités, qui selon Brun-Buisson et *coll.*, (1987) sont définies en fonction du nombre de colonies formées sur milieu gélosé. Nous distinguons :

- **La Contamination** : culture positive non significative ($<10^3$ UFC/mL) en l'absence de signes d'infection locaux ou généraux.
- **La Colonisation** : culture positive significative ($\geq 10^3$ UFC/mL) en l'absence de signes d'infection locaux ou généraux.
- **L'Infection** : culture positive significative ($\geq 10^3$ UFC/mL) en présence de signes d'infection locaux ou généraux.

Dans un deuxième temps, 200 μ L sont prélevés et répartis à volume égale dans deux tubes différents. L'un destiné à la recherche des levures et auquel sont ajoutés 900 μ L de milieu Sabouraud liquide, l'autre destiné à la recherche des bactéries et auquel sont ajoutés 900 μ L de bouillon nutritif.

Les travaux de Boucherit-Atmani et *coll.*, (2011) ont montré que l'agitation du cathéter au vortex pendant une minute, ne permet pas de détacher la totalité des levures, c'est pourquoi, l'eau physiologique restante dans le tube initial est remplacée par du milieu Sabouraud liquide et les tubes sont ensuite placés dans une étuve pendant 24 à 48 heures voir 72 heures à 37 °C.

2. Isolement et purification

À partir des échantillons présentant un trouble, des boîtes de Pétri préalablement coulées avec la gélose Sabouraud destinées à l'isolement des levures ou la gélose nutritive pour l'isolement des bactéries, sontensemencées par stries, puis incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Ensuite, une colonie est prélevée de la gélose, repiquée dans le milieu liquide stérile et incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Chaque souche pure estensemencée sur gélose inclinée en tube puis incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures et conservée à +4 °C.

3. Identification des souches

L'identification des souches isolées est réalisée par le candida chrome agar (Sigma) et les plaques Api[®] candida (Biomerieux) pour les levures. L'identification des bactéries est réalisée par les plaques Api 20E[®] (Biomerieux).

Il est important de noter que seules les bactéries qui coexistaient sur les mêmes prélèvements que les levures ont été identifiées et retenues pour la suite de cette étude.

4. Antibiogramme

Les tests d'antibiogrammes sont réalisés par la technique de diffusion sur gélose selon le protocole du Comité d'Antibiogramme- Société Française de Microbiologie- **(CASFM, 2010)** qui consiste à déposer les disques imprégnés de concentrations déterminées d'antibiotiques à la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose Muller-Hinton préalablementensemencée par un inoculum de 10⁶ UFC/mL de la souche à tester. L'inoculum provient d'une préculture de 24h, réalisée dans le BHIB ajustée à 10⁸ UFC/mL par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm. Cette dernière doit être comprise entre 0,08-0,1.

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition aux valeurs critiques permet de classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

5. Tests de sensibilité aux antibactériens

Les tests de sensibilité sont réalisés par la technique de micro-dilution sur microplaque selon le protocole du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CASFM, 2010**).

100 µL de milieu de culture Mueller-Hinton sont déposés dans les 96 puits d'une microplaque stérile. Les solutions mères d'antibiotiques sont préparées par la solubilisation de la gentamicine, la céfotaxime et l'ampicilline dans l'eau distillée stérile, 100 µL de la solution mère de chaque antibiotique à tester sont déposés dans le premier puits de chaque colonne. Des dilutions de ½ sont réalisées par le transfert de 100 µL d'un puits à l'autre à partir du premier. Les concentrations finales en antibiotiques sont comprises entre 1 et 512 µg/mL.

100 µL de l'inoculum à 10⁸cellules/mL sont ajoutés dans chaque puits (concentration finale 10⁶cellules/mL). Après 24 heures d'incubation à 37°C, les CMI sont déterminées à l'œil nu. Elles correspondent à la plus faible concentration d'antibiotique ou aucune croissance n'est visible dans les puits.

6. Tests de sensibilité aux antifongiques

Les tests de sensibilité aux antifongiques sont réalisés par la technique de micro-dilution sur microplaque selon le protocole standard de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) publié en 2008 dans le document M27A3 (**Tableau N°2**). Le milieu utilisé est le Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (sigma) tamponné à pH 7 par l'acide morpholinepropanesulfonic (MOPS) (sigma). L'inoculum est utilisé à une concentration finale allant de 0,5x10³ à 2,5x10³ cellules/mL. 100 µL de l'inoculum sont ajoutés dans chaque puits. Les solutions mères d'antifongiques sont préparées en solubilisant l'amphotéricine B dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et la caspofungine dans l'eau distillée stérile. Les concentrations finales en antifongique dans chaque puits sont comprises entre 0,03 et 16 µg/mL pour l'amphotéricine B et entre 0,015 et 8 µg/mL pour la caspofungine.

Tableau N°2: Les paramètres des tests de sensibilité par micro-dilution sur microplaque (CLSI 2008: documents M27-A3 et M27-S3)

Milieu de culture	RPML-1640, avec glutamine, sans bicarbonate et avec indicateur de pH
pH du Milieu	6,9-7,1
Tampon du milieu	3-(W-morpholino) propanesulfonic acid a une concentration de 0,165 moles/L (34,53 g/L)
Volume final	200 µL (100 µL de l'inoculum) et (100 µL de la solution d'antifongique)
Concentration de l'inoculum	$0,5 \times 10^3$ à $2,5 \times 10^3$ UFC/mL
Température et durée d'incubation	Amphotéricine B 24 et 48 h à 35°C Caspofungine 24 h à 35°C
Les concentrations à tester	Amphotéricine B : 16 à 0,03 µg/ mL, Caspofungine : 8 à 0,015 µg /mL
Lecture des résultats	Amphotéricine B : la plus faible concentration d'antifongique qui empêche toute croissance. Caspofungine : la plus faible concentration de drogues qui produit une réduction importante de la croissance (> 50%) par rapport au contrôle de la croissance
Break points	AmB: pas de définition, CSP : Sensible < 2 µg/mL

7. Evaluation de la capacité des souches isolées à former un biofilm

20 mL de précultures dans le milieu Sabouraud liquide sont réalisées à partir des souches de levures isolées des cathéters prélevés. Après 16 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes, la suspension est centrifugée à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec du PBS (tampon phosphate salé) à pH 7,4 0,1M, puis resuspendu dans le milieu de culture choisi pour former le biofilm multi espèces (RPMI 1640 tamponné à pH 7,4 avec du MOPS à 0,165 moles/L ou le BHIB à pH 7,4) à raison de 10^6 cellules/mL.

Les précultures bactériennes des souches isolées des mêmes cathéters que *Candida albicans* sont réalisées dans 20 mL de BHIB. Après 16 heures d'incubation à 37°C sous agitation continue à 130 tours/minutes, la suspension est centrifugée à 1000 g pendant 15 minutes, le culot est lavé deux fois avec du PBS (pH 7,4 0,1M) puis resuspendu dans le milieu de culture choisi pour former le biofilm multi-espèces (RPMI 1640 tamponné à pH 7,4 avec du MOPS à 0,165 moles/L ou BHIB à pH 7,4) à raison de 10^7 cellules/mL.

Dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, 50 µL de la suspension levurienne sont additionnés à 50 µL d'une suspension bactérienne, la plaque est scellée puis mise à incuber à 37°C pendant 48 heures. La même durée d'incubation et les mêmes proportions des volumes sont versées dans un tube à vis qui contient la partie intra-vasculaire d'un cathéter stérile, le volume total des deux suspensions est de 3 mL.

8. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au 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, tels que les molécules de la surface cellulaire ou les polysaccharides de la matrice exopolymérique des biofilms (**Li et coll., 2003**). Après la formation de biofilms, le milieu est aspiré et les puits sont lavés 3 fois avec du PBS (pH 7,4 0,1M) stérile pour écarter les cellules planctoniques et/ou les cellules non adhérentes.

Pour la fixation du biofilm, 100 µL de méthanol absolu sont ajoutés aux différents puits de la microplaque. Après une incubation de 15 minutes à température

ambiante, les puits sont lavés et 100 μ L d'une solution de crystal violet sont ajoutés. Les microplaques sont laissées pendant 20 minutes à température ambiante. Le crystal violet lié est libéré par l'addition de 150 μ L d'acide acétique (33%). La densité optique est ensuite lue à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioTek FLx800).

9. Observation des biofilms multi-espèces au Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Pour mettre en évidence la formation des biofilms sur les implants médicaux et observer leurs structures, des biofilms multi-espèces formés *in vitro* sur cathéters et sur microplaque sont envoyés au Centre de Microscopie Electronique à la Faculté de Médecine de Saint-Etienne (France).

La préparation des échantillons pour les observations aux MEB consiste à fixer dans un premier temps, les souches par le glutaraldéhyde.

Les biofilms sont rincés avec du PBS pH 7,4 0,1 M et une solution de glutaraldéhyde (50 %) est ajoutée dans les puits de la microplaque ou dans les tubes contenant les cathéters pour avoir une concentration finale de 2,5 % (v/v). Les échantillons sont ensuite envoyés au Centre de Microscopie Electronique de Saint-Etienne (France).

Troisième partie

Résultats et discussion

Les infections invasives sont responsables d'une importante mortalité parmi les patients hospitalisés dont le système immunitaire est diminué par des traitements ou des maladies immunodépressives.

L'usage des cathéters intraveineux constitue un facteur de risque important. Ces dispositifs médicaux représentent un support idéal pour les pathogènes opportunistes, notamment ceux appartenant au genre *Candida* **(Decousser, 2008)**. Malgré les mesures de précaution, l'ampleur des infections fongiques profondes ne cesse d'augmenter, cela est dû d'une part à l'émergence de nouvelles espèces pathogènes. D'autre part à la résistance accrue de certains microorganismes aux traitements habituels **[(Kibber, 2007) ; (Pfaller et coll., 2008)]**. Par ailleurs, les bactéries présentes dans le même milieu que les levures peuvent interagir avec elles pour former des biofilms mixtes **Pruitt et coll., 1998**). Ces biofilms constituent un réservoir infectieux pour un éventail de micro-organismes pathogènes, ce qui nécessite des stratégies complexes de traitements antimicrobiens.

En effet, l'épidémiologie de ces infections a connu une évolution au cours de ces dernières années. C'est pourquoi, nous avons entrepris cette étude aux services de chirurgie générale et de cardiologie du Centre Hospitalo Universitaire de Tlemcen qui consiste à :

- Evaluer le taux d'infections fongiques et bactériennes sur les cathéters veineux périphériques
- Vérifier le potentiel des levures isolées à former des biofilms mixtes avec certaines bactéries isolées des mêmes cathéters
- Mettre en évidence la structure des biofilms mixtes (levures/bactéries) par microscopie électronique à balayage

1. Prélèvements

Durant la période allant de février à août 2012, nous avons prélevé 151 cathéters veineux périphériques du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen, dont 110 du service de chirurgie générale (A et B) et 41 du service de cardiologie.

Rappelons que seuls les cathéters implantés pendant 48 heures et plus sont prélevés. Les résultats obtenus sont regroupés dans les **tableaux N°3 et 4**

Tableau N° 3 : Répartition des prélèvements positifs en fonction du service

	Altération par les bactéries	Altération par les levures	Altération Mixte (levures/bactéries)
Chirurgie A et B (%) n=110	26 (23,63%)	10 (09,09 %)	8 (07,27%)
Cardiologie (%) n=41	10 (24,39%)	8 (19,51 %)	3 (07,31%)
Total (%) n=151	35 (23,17 %)	18 (11,92 %)	11(07,28 %)

Tableau N° 4 : Répartition des prélèvements positifs en fonction du sexe

	Altération par les levures	Altération par les bactéries	Altération Mixte (levures/bactéries)
Hommes (%) n=76	6 (07,89 %)	22 (28,94 %)	6 (07,89 %)
Femmes (%) n=75	12 (16,00 %)	13 (17,33 %)	5 (06,66 %)

Nous remarquons que sur les 151 prélèvements, 35 sont altérés par les bactéries, 18 par les levures et 11 par les deux microorganismes à la fois soit des taux respectifs de 23,17 %, 11,92 % et 07,28%. Les taux de prélèvements positifs dans le service de cardiologie et de chirurgie (A et B) sont comparables sauf pour les levures, qui sont plus présentes sur les cathéters prélevés du service de cardiologie.

Nous remarquons également que l'altération fongique est observée beaucoup plus sur les cathéters prélevés des femmes hospitalisées que ceux prélevés des hommes hospitalisés avec des taux respectifs de 16,00 % et 7,89 %. En revanche, l'altération bactérienne est plus fréquente chez les hommes (28,94 % pour les hommes contre 17,33% pour les femmes). Les hommes sont légèrement plus exposés aux altérations mixtes que les femmes (7,89 % pour les hommes contre 6,66 % pour les femmes).

Ces résultats montrent que le taux d'altération des cathéters vasculaires périphériques par les bactéries est supérieur à celui des levures, cela est en accord avec les données du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) publiées en 2008 qui montrent que pour les infections associées aux cathéters vasculaires à émergence cutanée, les bactéries sont les micro-organismes les plus fréquents.

Nous constatons aussi que le taux de cathéters altérés par les bactéries est supérieur chez les hommes contrairement au taux d'altération par les levures qui est plus élevé chez les femmes. Certains auteurs affirment que le sexe est un facteur de risque pour les infections associées aux cathéters vasculaires **[(Safdar et coll., 2002) ; (Maki et coll., 2006)]**. Le taux de prélèvements positifs dépend également de l'état immunitaire des patients ainsi que de la durée et des conditions de pose des cathéters **[(Mahfouz et Anaissie, 2003) ; (Decusser, 2008)]**.

Le taux de prélèvements positifs est comparable entre les deux services. Il est à noter que selon **Blignaut et ses collaborateurs (2002)**, le risque est plus important en chirurgie.

2. Détermination des différents types d'infectivités des cathéters

Les résultats relatifs à la détermination des différents types d'infectivités des cathéters veineux périphériques prélevés des services de chirurgie générale et de cardiologie du CHU de Tlemcen sont regroupés sur le **tableau N°5**.

Rappelons que selon **Brun-Buisson et coll., (1987)**, la contamination se définit par une culture positive non significative de l'extrémité distale du cathéter, en l'absence de signes locaux ou généraux d'infection, alors que dans le cas d'une colonisation, il s'agit d'une culture significativement positive de l'extrémité distale du cathéter, en l'absence des signes d'infection. En revanche, l'infection liée au cathéter est définie par la présence d'un syndrome septique et d'une culture significativement positive de l'extrémité distale du cathéter. Le seuil de signification est $\geq 10^3$ cellules/mL en culture quantitative.

Tableau N°5 : Différents types d'infectivités microbiennes au CHU de Tlemcen

	Contamination	Colonisation	Infection
Chirurgie (n=44)	25 (56,81%)	15 (34,09%)	04 (09,09%)
Cardiologie (n=21)	10 (47,61%)	07 (33,33%)	04 (19,04%)
Total (n=65)	35 (53,84%)	22 (33,84%)	08 (12,30%)

Il ressort de ce tableau que sur 65 cathéters positifs (bactéries, levures et mixtes) prélevés des services de chirurgie générale et de cardiologie du CHU de Tlemcen, 35 sont contaminés soit un taux de 54%, 22 sont colonisés (34%) et 8 sont infectés soit un taux de 12,5%.

Le taux de contaminations est le plus élevé suivi des colonisations. Ces dernières peuvent être des étapes qui précèdent l'infection. En effet, selon **Stephan et coll., (2002)**, la souche colonisante est dans la plupart des cas une souche infectante. **Quinet** en 2006, a révélé que la colonisation du cathéter n'aboutit à une infection que dans 20 % des cas chez l'adulte et dans 8 % des cas chez l'enfant.

Alors qu'en 2007, **Gallien et ses collaborateurs** ont montré que l'infection du cathéter survient secondairement à une fongémie et le cathéter infecté constitue par la suite un réservoir qui entretient l'infection.

De plus, en terme d'infection des cathéters, le service de cardiologie occupe la première place avec un taux de 19,04%. Ce dernier est seulement de 9,09% au service de chirurgie.

En ce qui concerne les contaminations et les colonisations des cathéters, le service de chirurgie générale est le plus concerné par ces deux types d'infectivités avec des taux respectifs de 56,81% et de 34,09%. Le service de cardiologie vient en deuxième position avec un taux de 47,61% pour les contaminations et 33,33% pour les colonisations.

Nous avons remarqué également que les trois types d'infectivités sont observés dans les deux services étudiés.

Nous avons également déterminé les différents types d'infectivités par groupe microbien, fongiques, bactériens et mixtes (bactéries-levures) des cathéters prélevés du CHU de Tlemcen.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure N°4**.

Nous remarquons que les contaminations des cathéters par les bactéries occupent la première place avec un taux de 47% suivies des colonisations avec un taux de 42%. Les infections arrivent en dernier avec un taux de 11%. Concernant les levures seules, elles sont à l'origine de 89% de contaminations, 11% de colonisations, en revanche, aucune infection fongique seule des cathéters n'est enregistrée. L'évaluation de l'infectivité des cathéters vasculaires périphériques par les bactéries et les levures ensemble (mixtes) a montré que ce sont les colonisations qui arrivent en première position avec un taux de 46% suivies des infections à 36%. Le taux de contaminations ne représente que 18%.

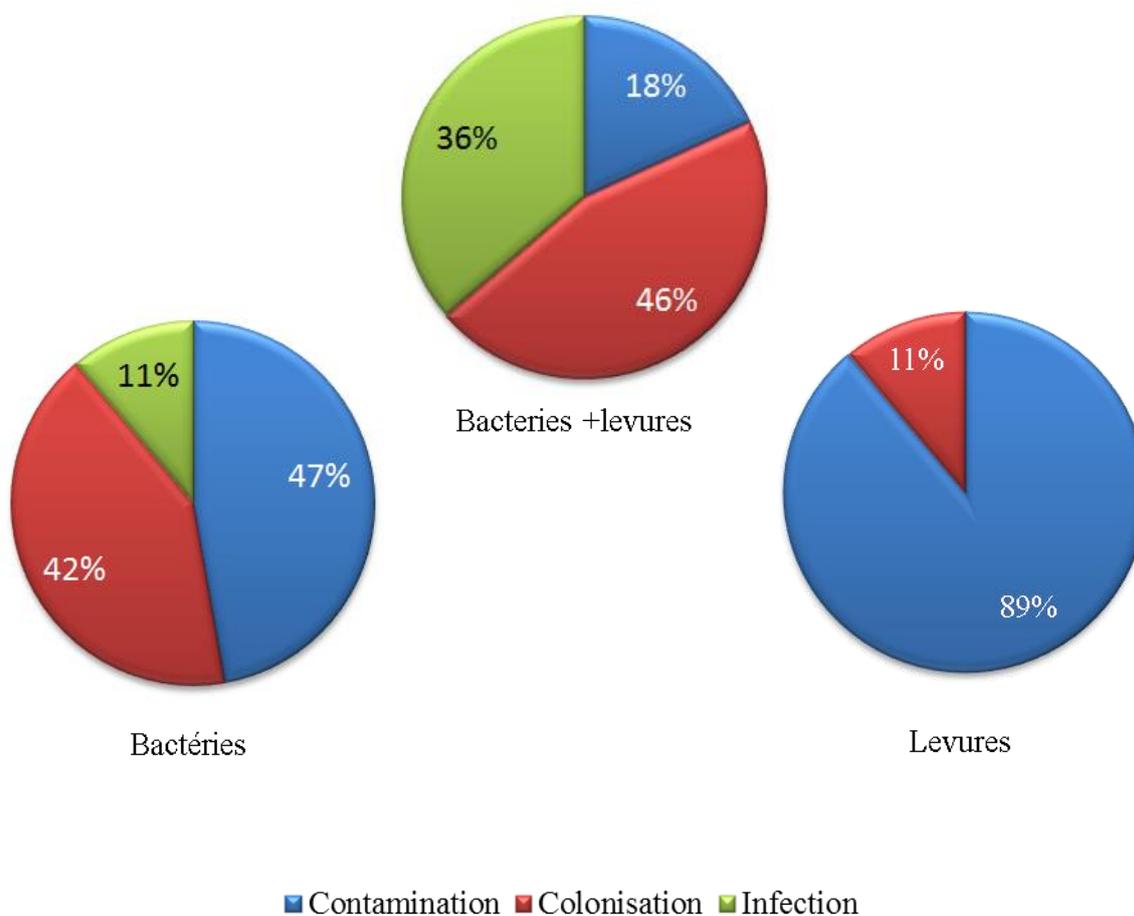


Figure N°4 : Différents types d'infectivités en fonction du groupe microbien (levures, bactéries et levures/bactéries)

Nous avons également évalué les différents types d'infectivités fongiques, bactériennes et mixtes des cathéters au service de cardiologie et de chirurgie du CHU de Tlemcen.

Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure N°5**. Nous remarquons qu'au niveau du service de chirurgie générale (**Figure N°5 B**), les contaminations sont causées essentiellement par les bactéries et les levures séparément avec des taux respectifs de 53% et 40%, alors que les contaminations mixtes ne représentent que 8%. Les colonisations sont à 70% d'origine bactérienne et 33% d'origine mixte. Quant aux infections, elles sont dues à 65% aux bactéries seules et 40% aux bactéries et levures ensembles (infections mixtes).

Il est important de signaler que les levures seules ne sont responsables ni de colonisation ni d'infection au service de chirurgie. En ce qui concerne le service de cardiologie (**Figure N°5 C**), les bactéries sont à l'origine des contaminations, des colonisations et des infections avec des taux respectifs de 40%, 70% et 30%. Les levures seules sont responsables uniquement des contaminations (60%) et des colonisations (28%). Cependant, le taux d'infections mixtes est de 70% au service de cardiologie.

Ces résultats montrent d'une part que les bactéries seules, causent plus d'infections que les levures dans les deux services que nous avons étudiés, ce résultat est en accord avec les données rapportées par le **RAISIN (2008)** qui ont montré que le taux d'infections bactériennes est plus important que celui des infections fongiques. D'autre part, les levures sont impliquées dans 50% des infections enregistrées dans les services de cardiologie et de chirurgie du CHU de Tlemcen en association avec des bactéries. Ce résultat va dans le même sens que celui de **Levison et Pitsakis** qui en 1987, ont signalé l'implication des bactéries à côté des levures dans les infections. Cette association aggrave l'ampleur et la virulence de ces pathogènes. Les contaminations fongiques (46%) sont comparables aux contaminations bactériennes (48%) puisque, les levures colonisent la peau et peuvent par conséquent contaminer les cathéters. De plus, certaines levures, notamment celles appartenant au genre *Candida*, sont des agents pathogènes opportunistes, cela peut expliquer le faible taux de contaminations qui a évolué en infections (**Perlroth et coll., 2007**).

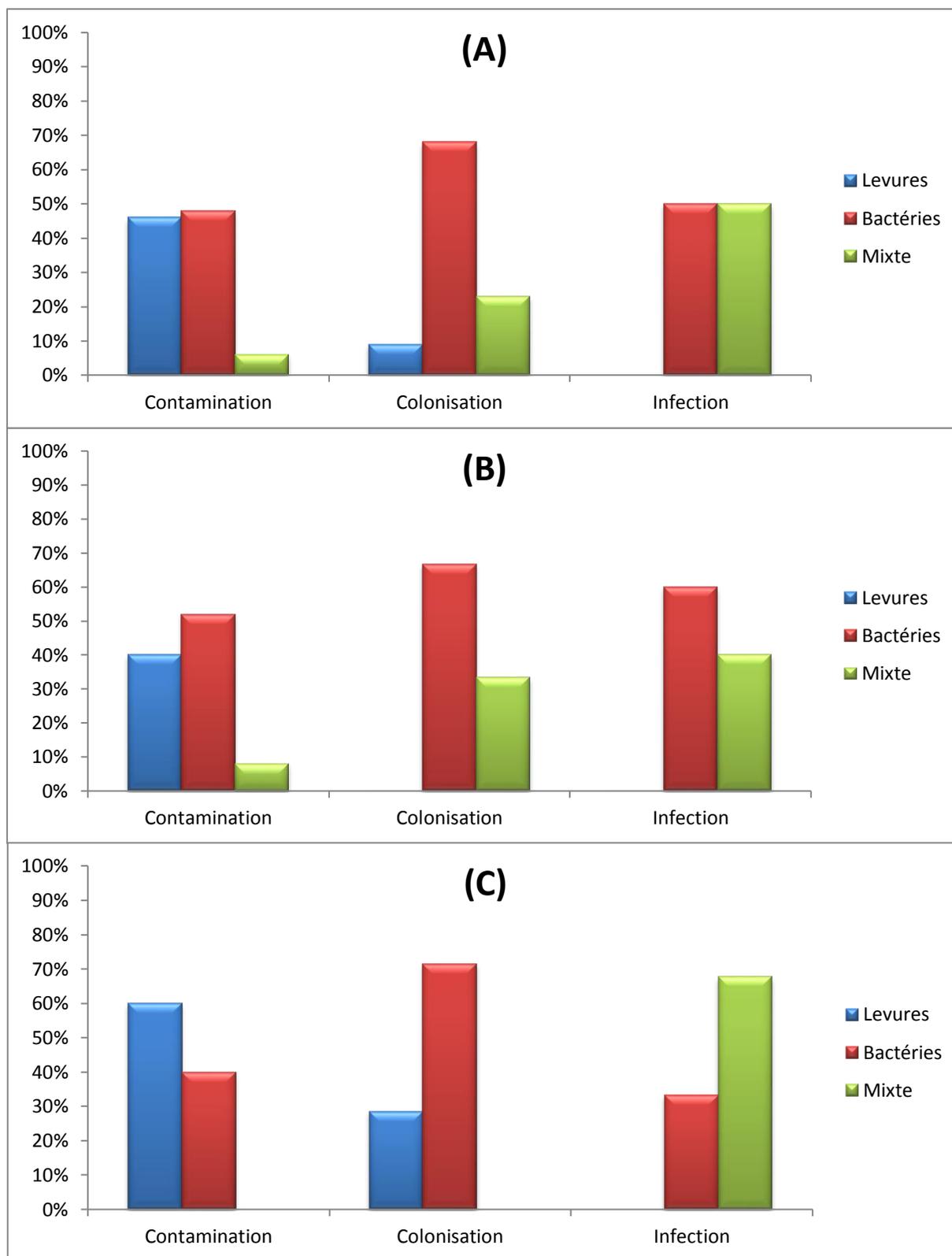


Figure N°5 : Différents types d'infectivités microbiennes des cathéters prélevés du CHU de Tlemcen (A : Total, B : Chirurgie générale (A et B), C : Cardiologie)

Selon **Wenzel et Gennings (2005)**, définir les facteurs de risques des infections invasives permet de sélectionner les patients à haut risque et ainsi recourir rapidement à un traitement antibiotique préventif afin de réduire la mortalité de ces patients. C'est pourquoi, un questionnaire est renseigné pour chaque patient inclus dans cette étude (annexe 1), il permet de recenser les autres facteurs de risques qui peuvent également être à l'origine des infectivités à savoir le sexe, l'âge, la durée de pose des cathéters, l'antibiothérapie et les interventions chirurgicales.

- **Répartition des types infectivités selon le sexe :**

Les résultats de la répartition des différents types d'infectivités en fonction du sexe des patients sont regroupés sur la **figure N°6**.

Nous remarquons que le sexe influe moyennement sur le taux de contaminations et de colonisations. La différence entre le taux de contamination chez les deux sexes est de 2,85% alors qu'elle est de 9,09 % quand il s'agit des colonisations. Cependant, la différence du taux d'infections est importante puisqu'environ 90% des hommes sont concernés par les infections.

- **Répartition des types infectivités selon l'antibiothérapie administrée :**

Les résultats relatifs à la répartition des différents types d'infectivité en fonction du traitement antibiotique sont regroupés sur la **figure N°7**.

Nous constatons que dans la majorité des cas, les contaminations sont accompagnées d'un traitement antibiotique (88,75%). Quant aux colonisations et aux infections, l'antibiothérapie accompagne ces deux types d'infectivités à part égale (environ 63%).

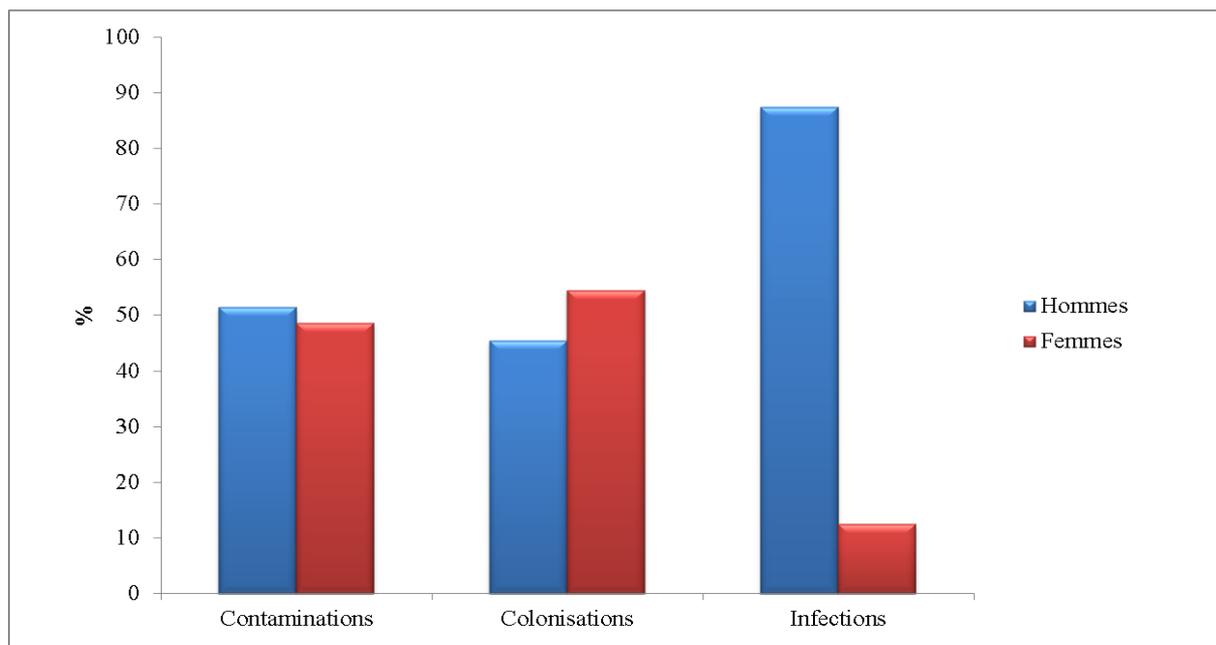


Figure N°6 : Différents types d'infectivités en fonction du sexe dans les services de cardiologie et de chirurgie générale.

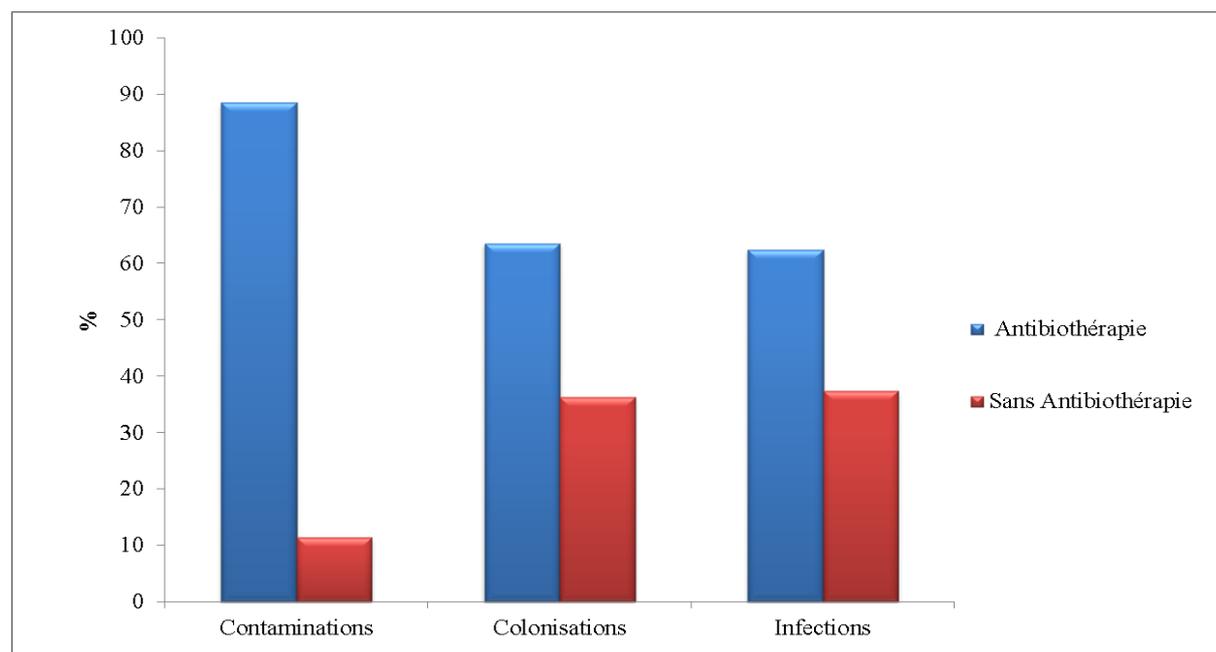


Figure N°7 : Différents types d'infectivités en fonction de l'antibiothérapie dans les services de cardiologie et de chirurgie générale.

- **Répartition des types infectivités selon l'âge :**

Sur la **figure N°8** qui regroupe la répartition des différents types d'infectivités en fonction de l'âge des patients, nous remarquons que les patients âgés de moins de 60 ans sont les plus concernés par les contaminations, les colonisations et les infections avec des taux respectifs de 68,57%, 68,18% et 75%.

- **Répartition des types infectivités selon la durée de pose des cathéters :**

La **figure N°9** regroupe les résultats relatifs à la répartition des différents types d'infectivités en fonction de la durée de pose des cathéters.

Nous constatons que 60% des contaminations concernent les cathéters implantés pendant moins de 3 jours. Le taux de colonisation est le même pour les cathéters mis en place pendant moins de trois jours et ceux restés en place plus longtemps (jusqu'à 7 jours). Cependant, la majorité des infections (75%) sont apparues lorsque la durée de pose est égale ou dépasse 3 jours.

- **Répartition des types infectivités en fonction des interventions chirurgicales :**

Les résultats relatifs à la répartition des différents types d'infectivités en fonction des interventions chirurgicales sont regroupés sur la **figure N°10**.

Nous remarquons que les interventions chirurgicales semblent favoriser les contaminations et les colonisations puisqu'environ 70% de ces manifestations touchent les cathéters retirés de patients ayant subi une intervention chirurgicale récente. Par contre, ce facteur ne semble pas influencer les infections dont le taux reste le même chez les patients opérés ou pas.

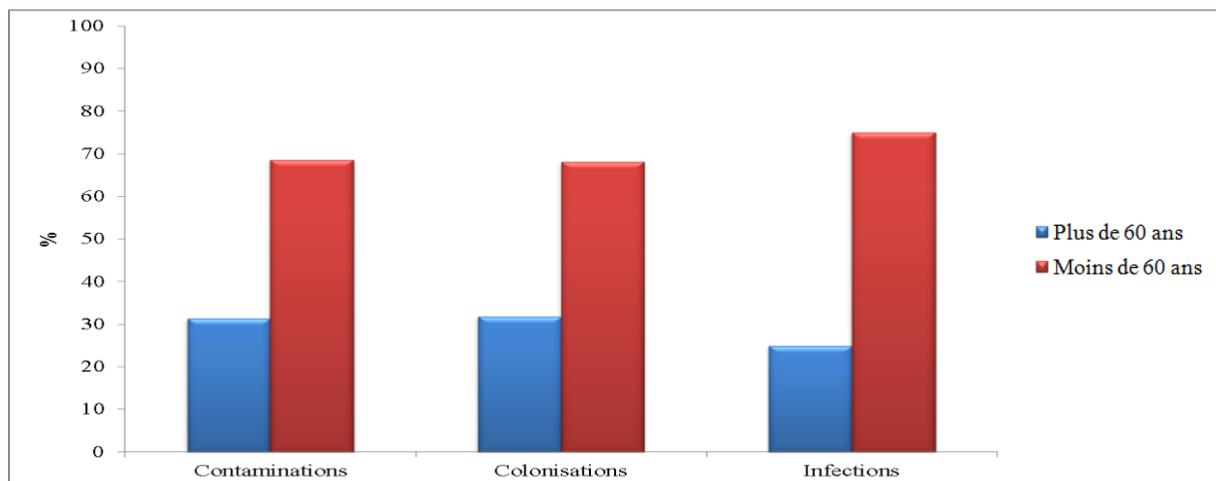


Figure N°8 : Différents types d'infectivités en fonction de l'âge dans les services de cardiologie et de chirurgie générale.

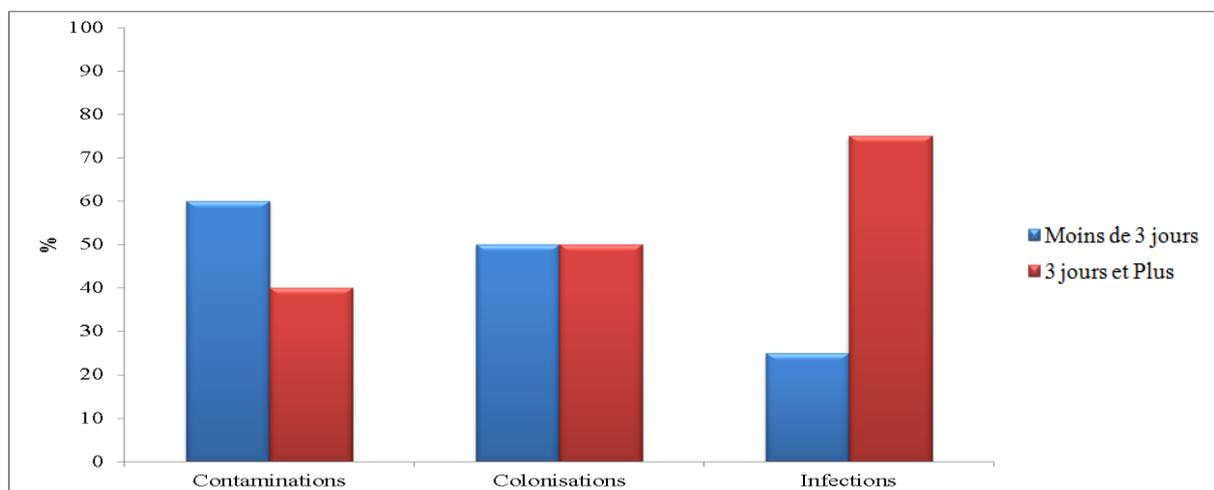


Figure N°9 : Différents types d'infectivités en fonction de la durée de pose des cathéters dans les services de cardiologie et de chirurgie générale.

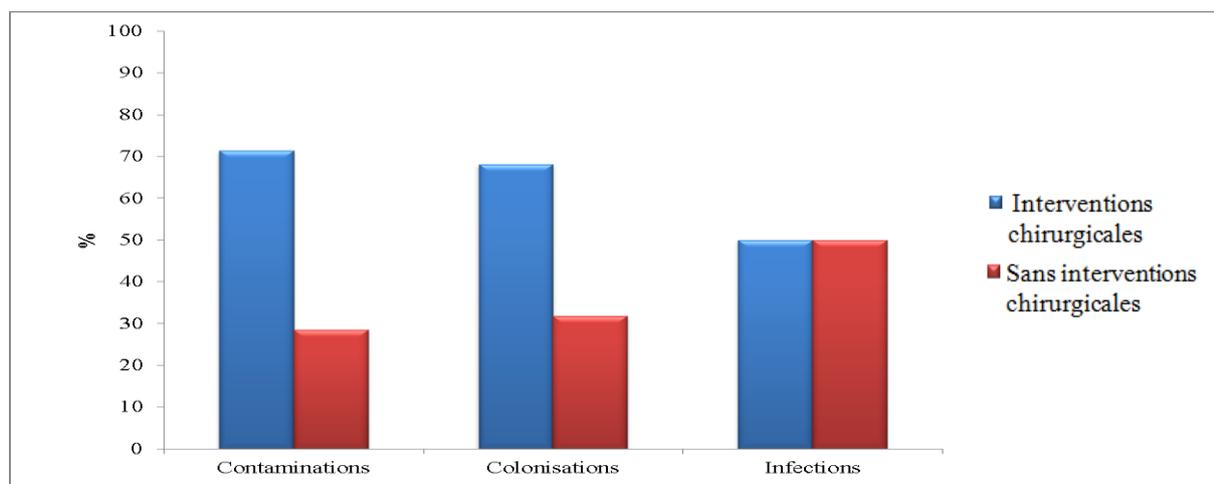


Figure N°10 : Effet des interventions chirurgicales sur le type d'infectivité dans les services de cardiologie et de chirurgie générale.

Discussion

Il ressort de cette partie que les contaminations et les colonisations surviennent principalement lors de la pose des cathéters. Cela pourrait être dû selon **Goldmann et Pier, (1993)** aux microorganismes présents sur le site d'insertion cutané. Les résultats que nous avons obtenus ont montré que les facteurs de risques habituels (sexe, âge, durée d'implantation, antibiothérapie, ...) ont un effet limité sur la survenue de ces manifestations microbiennes.

L'antibiothérapie a le rôle le plus important. Ceci est en accord avec les travaux de **Raad et Bodey (1992)** qui ont révélé que les germes doivent dans un premier temps résister aux antibiotiques.

Nos résultats ont montré également que le taux de colonisation est élevé chez les patients sous antibiothérapie. Cela peut être lié d'une part à la résistance des bactéries aux traitements habituels, d'autre part, au taux de colonisation qui inclut également les levures. L'intervention chirurgicale peut être considérée également comme facteur de risque par le fait que cette pratique clinique est susceptible d'affaiblir le système immunitaire, sachant que les germes colonisateurs doivent échapper à la phagocytose (**Peters et coll., 1982**).

Le passage de la colonisation à l'infection dépend du niveau d'immunodépression du patient et concerne ceux qui présentent des facteurs de risques (**Mermel et coll., 1991**). Selon nos résultats les facteurs de risques qui semblent avoir le plus d'impact sur la survenue des infections sont le sexe, l'âge et la durée de pose du cathéter. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui citent la durée du cathétérisme comme l'un des principaux facteurs de risques spécifiques des infections liées aux cathéters (**Espinasse et coll., 2010**). Il en est de même pour le sexe, ou les hommes sont les plus touchés par les infections [(**Maki et coll., 2006**) ; (**Safdar et coll., 2002**)].

Par ailleurs, les patients âgés de moins de 60 ans sont les plus exposés au risque infectieux avec un taux de 70%. Ce résultat ne va pas dans le même sens que les travaux de **Timsit et ses collaborateurs (1996)** et **(1999)** qui ont montré que se sont les patients âgés de moins d'un an et les plus de 60 ans qui sont les plus exposés. De plus, selon nos résultats, l'antibiothérapie favorise la survenue des infections ce

qui corrobore les travaux de **Mimoz et coll., (2001)** qui cite l'utilisation des antibiotiques comme risque important des infections.

Enfin, l'intervention chirurgicale qui est connue comme facteur de risque (**Espinasse et coll., 2010**), ne semble pas avoir selon nos résultats un effet important dans la l'apparition des infections.

3. Identification et répartition des levures

A partir des 29 cathéters altérés par des levures, 35 souches sont isolées et identifiées en utilisant le milieu de culture chrome agar et les plaques Api candida®. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau N°6**.

Nous remarquons que quatre espèces appartenant toutes au genre *Candida* sont isolées des services de chirurgie générale et de cardiologie du CHU de Tlemcen. Il s'agit de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida famata*.

L'espèce *Candida parapsilosis* occupe la première place avec un taux de 60%, suivie de *Candida albicans* (20%) puis de *Candida glabrata* avec un taux de 14,28% et enfin *Candida famata* (5,71%). Il est à noter que *Candida parapsilosis* est l'espèce dominante. Elle fait partie des espèces émergentes de *Candida*.

Le **tableau N° 7** regroupe les résultats de l'infectivité dans les services de chirurgie générale et de cardiologie du CHU de Tlemcen en fonction des levures en cause. Les résultats obtenus montrent que *Candida parapsilosis* est la seule espèce impliquée dans les trois types d'infectivité (contamination, colonisation et infection) dans les deux services étudiés. *Candida albicans* est présente dans les deux services causant des infections notamment en cardiologie. *Candida famata* est isolée uniquement du service de cardiologie alors que *Candida glabrata* est isolée principalement du service de chirurgie.

Tableau N° 6 : Répartition des souches de levures isolées des services de chirurgie et de cardiologie du CHU de Tlemcen

Espèce	Nombre d'isolats (%) n=35
<i>Candida parapsilosis</i>	21 (60%)
<i>Candida albicans</i>	7 (20%)
<i>Candida glabrata</i>	5 (14,28%)
<i>Candida famata</i>	2 (05,71%)

Tableau N° 7 : Distribution des espèces de levures isolées des services de chirurgie et de cardiologie en fonction des types d'infectivités

Souches	Service de Chirurgie générale			Service de Cardiologie		
	Contamination (%) n=13	Colonisation (%) n=8	Infection (%) n=2	Contamination (%) n=7	Colonisation (%) n=3	Infection (%) n=3
<i>C. parapsilosis</i>	9 (69,23%)	4 (50%)	1(50%)	5 (71,42%)	2(66,66%)	1(33,33%)
<i>C. albicans</i>	-	4 (50%)	1(50%)	-	-	2 (66,66%)
<i>C. glabrata</i>	4 (30,76%)	-	-	1 (14,28%)	-	-
<i>C. famata</i>	-	-	-	1 (14,28%)	1(33,33%)	-

La **figure N°11** regroupe la répartition des espèces de levures isolées en fonction du type d'infectivité.

Nous remarquons que *Candida parapsilosis* est l'espèce dominante dans nos isolats. Elle est présente dans les deux stades qui précèdent l'infection. La majorité des contaminations (68,42 %) sont dues à l'espèce *Candida parapsilosis*, et plus de la moitié (54,54%) des souches colonisant les cathéters appartiennent à cette espèce. Cependant, l'espèce *Candida parapsilosis* n'est isolée que dans 25 % des infections qui sont causées majoritairement par l'espèce *Candida albicans* (75%). En revanche, *Candida albicans*, n'est pas isolée des contaminations mais elle est responsable d'environ 36,36% des colonisations. Quant à *Candida glabrata* elle représente seulement une souche contaminante. *Candida famata* est la souche la moins isolée. Elle est responsable des contaminations et des colonisations.

Nous avons également isolées deux types de levures d'un même cathéter. Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure N°12**.

Nous constatons que sur les 29 cathéters positifs, 6 abritent deux espèces différentes soit un taux de 21%. En effet, *Candida parapsilosis* cohabite avec *Candida albicans* dans 14% des cathéters positifs et avec *Candida famata* dans 7% de cathéters. Nous avons noté également que dans tous nos isolats, *Candida glabrata* est présente seule sur les cathéters contrairement à *Candida famata* qui était toujours présente avec *Candida parapsilosis*.

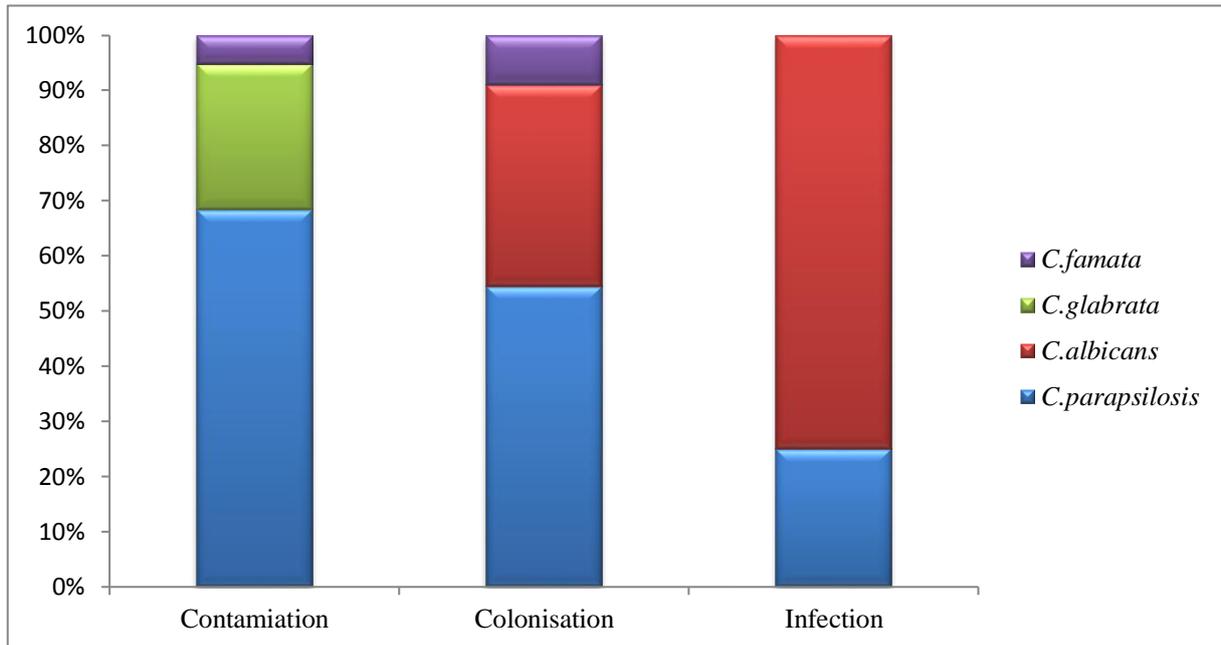


Figure N°11 : Répartition des espèces de levures isolées en fonction du type d'infectivités.

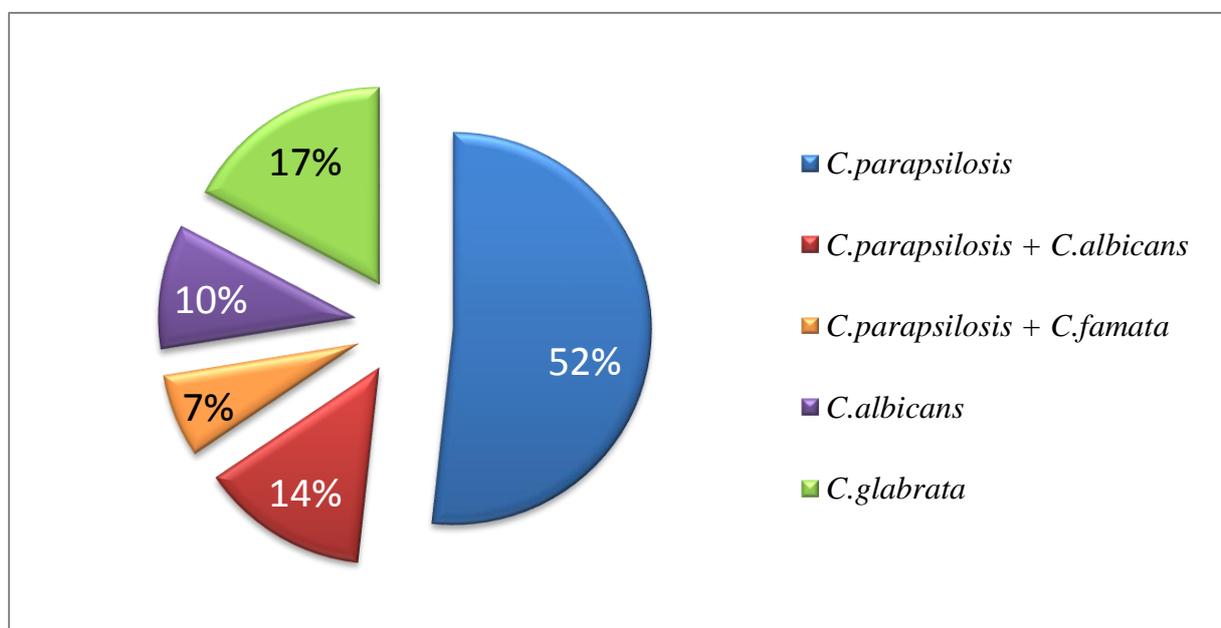


Figure N°12 : Distribution des levures isolées des cathéters prélevés du CHU de Tlemcen

La **figure N°13** représente la distribution des 35 levures isolées sur les 29 cathéters en fonction du type d'infectivités.

Ces résultats montrent qu'une part importante (25%) des infections est liée à la coexistence de deux souches de levures (*Candida albicans* et *Candida parapsilosis*) qui ont également co-colonisées environ 40% des cathéters. Cependant, la co-existence de *Candida parapsilosis* et *Candida famata* est observée dans les contaminations et les colonisations.

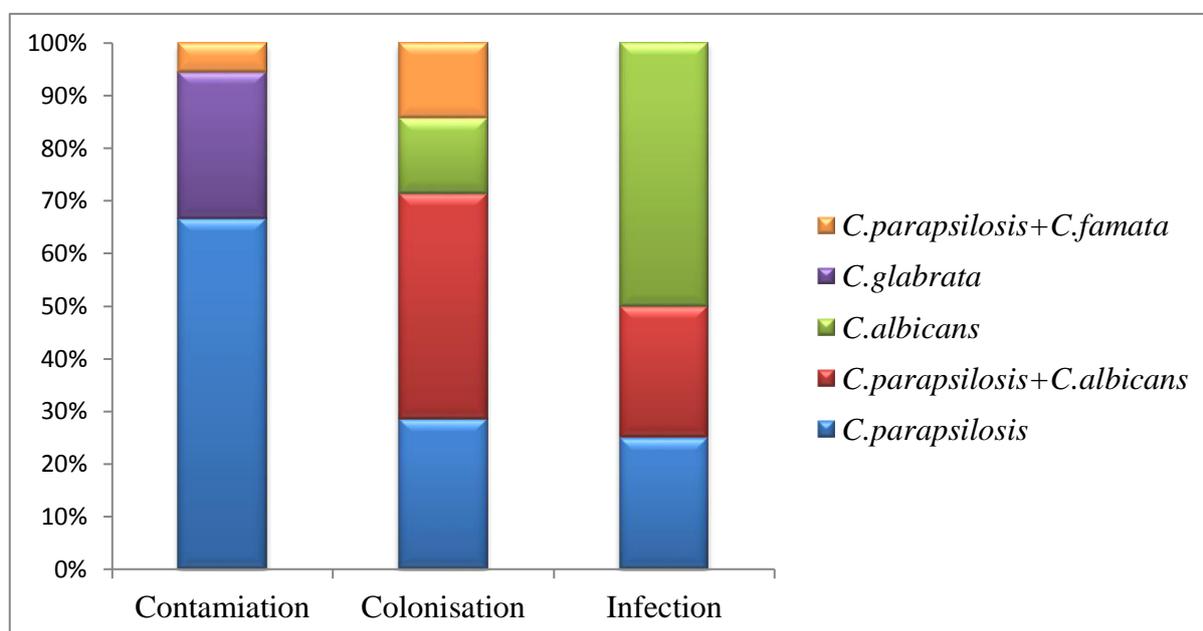


Figure N°13 : Distribution des souches de levures isolées des cathéters prélevés du CHU de Tlemcen en fonction du type d'infectivités.

Discussion

Sur la base de ces résultats, nous constatons que toutes les souches isolées appartiennent au genre *Candida*. Selon **Toubas (2013)**, les levures de ce genre sont les champignons les plus impliqués dans les mycoses invasives. Ce genre de levures occupe le quatrième rang des agents infectieux responsables de septicémies nosocomiales en terme de fréquence, et le premier en terme de mortalité (**Edmond et coll., 1999**).

Candida sp. comprend environ 200 espèces. La principale espèce pathogène est *Candida albicans* (**Arendrup et coll., 2011**). Dans notre étude cette espèce ne représente que 20% des isolats cliniques et arrive au deuxième rang derrière *Candida parapsilosis*. Il est important de noter que *Candida albicans* est responsable de la majorité des infections.

La plupart des études épidémiologiques soulignent l'émergence des espèces *non-albicans* durant les deux dernières décennies (**Arendrup et coll., 2011**). Cela reflète, au moins partiellement, une pression antifongique, visant à éliminer prioritairement *Candida albicans* (**Silva et coll., 2012**). *Candida parapsilosis* est l'espèce dominante parmi nos isolats avec un taux de 60%. Ce taux est trop élevé comparé aux données disponibles car malgré la régression signalée de *Candida albicans*, cette espèce garde toujours une faible dominance [(**Viscoli et coll., 1999**) ; (**Tortorano et coll., 2004**)]. Selon de nombreuses études, le taux de *Candida parapsilosis* dans les candidémies varie, mais ne dépasse pas 40% [(**Pfaller et coll., 1999 et 2011**) ; (**Arendrup et coll., 2011**) ; (**Ortega, 2011**) ; (**Pemán et coll., 2012**) ; (**Quindós, 2014**)]. Cela est en accord avec les résultats que nous avons obtenus puisque le taux important de colonisation et de contamination liés à *Candida parapsilosis* n'est pas traduit par un taux d'infection équivalent (25% seulement). Cette importante proportion de *Candida parapsilosis* isolée peut être expliquée par le fait que notre étude concerne uniquement les cathéters vasculaires périphériques, et qu'à l'inverse de *Candida albicans* qui ne se trouve que rarement sur la peau saine (**Develoux et Bretagne, 2005**), *Candida parapsilosis* s'y trouve fréquemment (**Toubas, 2013**) sachant que le cathéter traverse la peau lors de sa mise en place (**Almirante et coll., 2006**). De plus, grâce à sa capacité à générer des biofilms *Candida parapsilosis* adhère aux

substances inertes tels les cathéters [(Kuhn et coll., 2004) ; (Bonassoli et coll., 2005)]. Cela fait de *Candida parapsilosis* l'une des principales causes d'infections fongiques des cathéters [(Diekema et coll., 1997) ; (Kaitwatcharachai, 2002)]. La proportion des souches de *Candida parapsilosis* qui passe de la colonisation à l'infection est moins importante et dépend de sa virulence. *Candida albicans* demeure l'espèce la plus virulente [(Wingard et coll., 1991) ; (Abi-Said et coll., 1997)].

Nos résultats montrent également que *Candida glabrata* représente 14,28% des souches isolées. Cette espèce est cliniquement importante et fait partie des espèces de *Candida* les plus impliquées dans les infections fongiques (Toubas, 2013). Selon, les données bibliographiques *Candida glabrata* se situe au premier rang en terme de fréquence et de gravité parmi les *Candida non-albicans* malgré l'absence de diploïdie et de filamentation qui sont des attributs contribuant au caractère pathogène de *Candida albicans* [(Poulain, 2013) ; (Seddiki, 2014)]. Concernant notre étude, cette espèce occupe la deuxième place parmi les souches émergentes de *Candida*. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés au CHU d'Oran (travaux en cours). Aussi, l'écologie de *Candida glabrata* est proche de celle de *Candida albicans*, cela peut expliquer le fait qu'elle soit classée derrière *Candida parapsilosis* (Develoux et Bretagne, 2005). De plus, il existe d'importantes variations dans la répartition des espèces de *Candida* responsables de candidémies d'un pays à l'autre et d'une population étudiée à une autre (Toubas, 2013).

Parmi les espèces *non-albicans* que nous avons isolées, *Candida famata* occupe la dernière place avec un taux de 5,71% seulement. Cette espèce est une cause rare de candidoses car c'est un saprophyte retrouvé dans les produits laitier et l'environnement, notamment l'air [(Gardini et coll., 2001) ; (Kam et Xu, 2002) ; (Develoux et Bretagne, 2005)]. Les études épidémiologiques montrent que sa présence dans le contexte des infections varie de 0,2% à 2% des cas [(Pfaller et coll., 2003) ; (Pfaller et coll., 2010)], dans notre travail, cette espèce ne semble pas être impliqué dans les infections.

Par ailleurs, nous avons constaté que 25% des infections sont liées à la présence de deux espèces différentes sur le même cathéter (*Candida albicans*-*Candida parapsilosis*), ce qui constitue un éventuel risque d'une fongémie mixte.

Ces infections sont rares par rapport à l'ensemble des fongémies, leur incidence varie de 2 à 10 % [(Jensen et coll., 2007) ; (Klotz et coll., 2007) ; (Nace et coll., 2009)].

Cette incidence serait sous-estimée particulièrement quand les hémocultures sont repiquées sur des milieux usuels tels que le Sabouraud sur lequel les espèces du genre *Candida* sont difficiles à distinguer. C'est pourquoi, l'utilisation de moyens plus sensibles dans la détection des associations de différentes espèces de *Candida* comme les milieux chromogènes et la PCR nichée a permis de révéler des fréquences relativement plus élevées [(Ahmad et coll., 2002) ; (Yera et coll., 2004) ; (Alam et coll., 2007)].

Selon, certains auteurs, le traitement antifongique en monothérapie serait insuffisant pour une prise en charge optimale et serait associé à un taux de mortalité plus élevé chez les patients atteints de fongémie mixte (Boktour et coll., 2004).

Les fongémies mixtes surviennent principalement chez des patients avec des moyens de défense très amoindris et une co-morbidité particulièrement sévère comparés à ceux développant des fongémies monomicrobiennes et principalement à *Candida albicans* prises souvent comme groupe de contrôle [(Pulimood et coll., 2002) ; (Boktour et coll., 2004)].

Aussi, selon les données de la littérature, *Candida albicans* est retrouvée dans la majorité des fongémies mixtes. L'association la plus fréquente étant *Candida albicans-Candida glabrata* suivie de *Candida albicans-Candida tropicalis* et de *Candida albicans-Candida parapsilosis* [(Boktour et coll., 2004) ; (Jensen et coll., 2007) ; (Klotz et coll., 2007) ; (Nace et coll., 2009)]. Rappelons que c'est cette dernière association qui a été retrouvée dans notre étude.

4. Tests de sensibilité aux antifongiques

4.1 Tests de sensibilité des levures à l'amphotéricine B

L'amphotéricine B est un polyène macrocyclique qui se fixe sur l'ergostérol membranaire en formant des pores transmembranaires conduisant à une fuite des électrolytes cytoplasmiques à l'extérieur de la cellule (**Barker et Rogers, 2006**). Durant 40 ans, cet antifongique était le traitement de première ligne des mycoses profondes (**O'Shaughnessy et coll., 2009**). Il est active vis-à-vis de la majorité des pathogènes fongiques chez l'homme.

Les résultats relatifs aux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches isolées après 24 heures et 48 heures d'incubation sont représentés sur la **figure N°14**. La Concentration Minimale Inhibitrice de l'amphotéricine B vis-à-vis de la souche de référence *Candida albicans* IP444 est de 0,5 µg/mL.

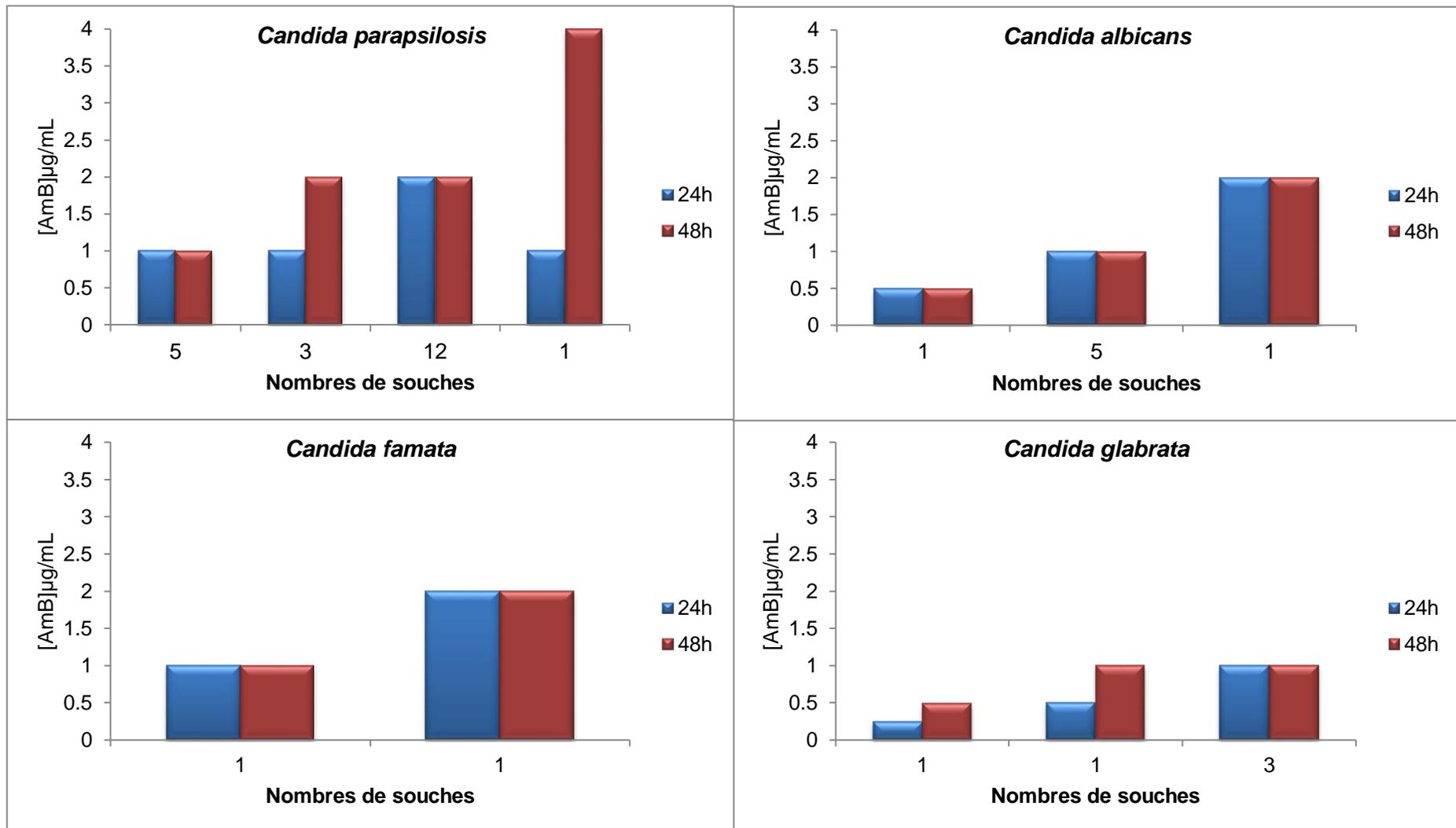


Figure N°14 : Concentrations Minimales Inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida sp.*

Nous remarquons qu'après un temps d'incubation de 24 heures à 35°C, 12 souches de *Candida parapsilosis* ont une CMI égale à 2 µg/mL, 5 souches ont une CMI de 1 µg/mL. Ces CMI restent inchangées lorsque le temps d'incubation est de 48 heures à 35°C. En revanche, quatre souches affichent un changement de CMI entre les deux temps d'incubation, qui passent de 1 à 2 µg/mL pour 3 souches et de 1 à 4 µg/mL pour une seule souche quand le temps d'incubation passe de 24 à 48 heures à 35°C.

Selon **Ostrosky-Zeichner et coll., 2003**, les souches de *Candida parapsilosis* qui ont des CMI supérieures ou égales à 1 µg/mL sont résistantes à l'amphotéricine B. De ce fait, sur les 21 souches de *Candida parapsilosis* que nous avons isolées, 16 sont résistantes à l'amphotéricine B après un temps d'incubation de 48 heures. Les résultats des tests de sensibilité des souches isolées de *Candida albicans* à l'amphotéricine B montrent que les CMI sont de 2 µg/mL pour 1 souche, 1 µg/mL pour 5 souches et 0,5 µg/mL pour une souche après 24 heures d'incubation à 35°C. Ces CMI restent inchangées après 48 heures d'incubation et se trouvent dans l'intervalle établi par **Hammond** en 1977 et les normes du **CLSI (2008)**.

Toutes les souches de *Candida glabrata* isolées des deux services sont sensibles à l'amphotéricine B avec des CMI qui n'ont pas dépassé 1 µg/mL. En effet, pour trois souches, la CMI est de 1 µg/mL après 24 et 48 heures d'incubation. Pour deux souches les CMI passent de 0,25 à 0,5 µg/mL et de 0,5 et 1 µg/mL pour des temps d'incubation respectifs de 24 et 48 heures.

Pour les deux souches de *Candida famata*, les CMI sont identiques après 24 et 48 heures d'incubation. Elles sont de 1 µg/mL pour une souche et de 2 µg/mL pour l'autre. Ces deux souches sont sensibles à l'amphotéricine B selon les normes du **CLSI (2008)**.

Discussion

Les résultats de cette partie de notre travail montrent que seize (16) souches de *Candida parapsilosis* isolées sont insensibles à l'amphotéricine B. Ce résultat ne concorde pas avec les travaux de l'équipe d'**Ostrosky-Zeichner (2003)** qui ont montré que le taux de résistance de cette espèce à cet antifongique est rare et ne dépasse pas 2 à 3%. Cette différence peut être expliquée, d'une part, par la différence de la zone géographique, d'autre part, par le fait que *Candida parapsilosis* abrite trois génotypes différents à savoir *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis* (**Tavanti et coll., 2005**). Les deux derniers génotypes présentent des CMI un peu élevées, par rapport aux souches habituellement isolées (**Diekema et coll., 2009**).

En ce qui concerne les isolats de *Candida albicans*, ils sont tous sensibles à l'amphotéricine B. Il est important de signaler qu'à partir d'un prélèvement sanguin de deux patients atteints de leucémie, **Nolte et ses collaborateurs** ont isolé, en 1997, une souche de *Candida albicans* résistante à l'amphotéricine B. Cette dernière présente un déficit en ergostérol membranaire, ce qui peut être à l'origine de sa résistance. Selon **Dick et coll., 1980**, la résistance à l'amphotéricine B est plus fréquente parmi les espèces de *Candida non- albicans*.

Les CMI des souches de *Candida glabrata* sont inférieures à 2 µg/mL. Ces souches sont par conséquent sensibles à l'amphotéricine B. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Rex et ses collaborateurs (2000)** qui ont montré que le taux d'isolats de *Candida glabrata* résistant à cet antifongique est très faible (CMI \geq 2 µg/ mL). De plus, **Pfaller et ses collaborateurs (2004)** ont révélé que les souches de *Candida glabrata* avec des CMI \geq 2µg/mL représentent moins de 1% des isolats cliniques aux Etats Unis et environ 4,4% en Europe.

Nous avons constaté également que les CMI des souches de *Candida glabrata* vis-à-vis de l'amphotéricine B restent inchangées lorsque le temps d'incubation passe de 24 à 48 heures. Il est important de signaler que même si une modification est observée, elle n'affecte pas le statut de sensibilité de la souche.

En 2000, **Arthington-Skaggs et ses collaborateurs** ont proposé de ne prendre en considération que la lecture de 24 heures car certains isolats montrent une

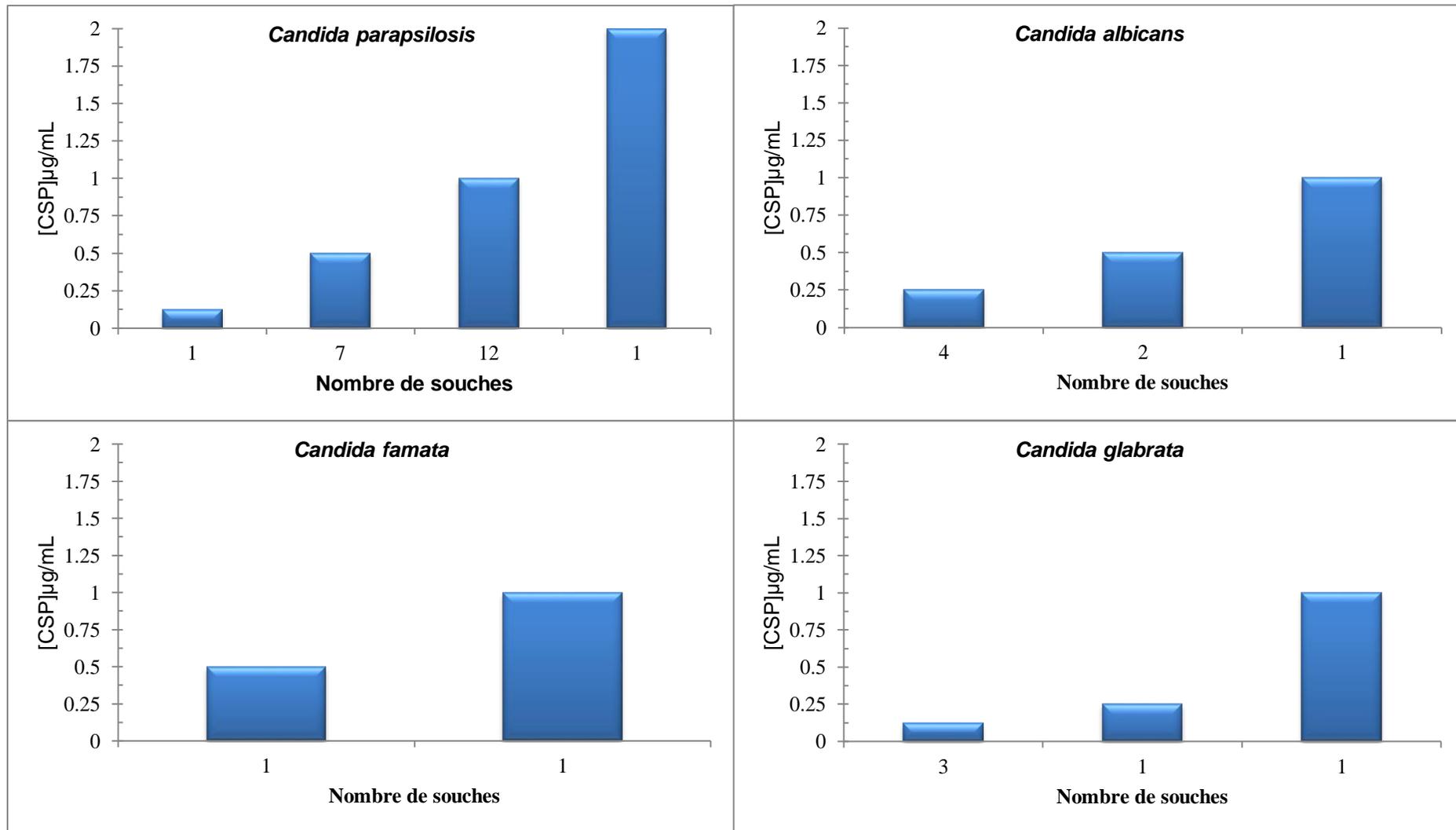
augmentation importante de CMI entre 24 et 48 heures. Cette augmentation induit une modification du statut de sensibilité des souches. Ce phénomène a été observé avec quatre souches de nos isolats cliniques de *Candida parapsilosis*. C'est pourquoi, ils ont conclu que dans ce cas, les souches sont considérées comme sensibles et la CMI lue à 24 h est plus significative en clinique (**Arthington-Skaggs et coll., 2000**).

Le mécanisme en cause d'une résistance à l'amphotéricine B pourrait être lié à une déplétion en ergostérol membranaire, la cible principale de cet antifongique. Cette disparition d'ergostérol peut être la conséquence d'un blocage de la voie de sa biosynthèse par mutation d'un gène qui doit s'accompagner de la mise en place d'une voie métabolique accessoire permettant la synthèse d'autres stérols membranaires indispensables à la survie de la cellule fongique (**Dannaoui, 2013**).

4.2 Tests de sensibilité des levures à la caspofungine

L'acétate de caspofungine (Cancidas[®]) est un lipopeptide cyclique synthétisé à partir d'un produit de la fermentation d'un champignon, *Glarea lozoyensis* qui appartient à la classe des échinocandines qui inhibent de façon non compétitive la (1,3)- β -D-glucane synthétase, enzyme qui rentre dans la formation de la paroi fongique. La caspofungine possède un large spectre d'action avec une activité fongicide envers l'ensemble des levures appartenant au genre *Candida*. Elle agit également sur les souches d'*Aspergillus* (**Lanternier et Lortholary, 2010**). La **figure N°15** regroupe les résultats relatifs aux CMI de la caspofungine vis-à-vis des souches isolées après 24 heures d'incubation à 35°C. La Concentration Minimale Inhibitrice de la caspofungine vis-à-vis de la souche de référence *Candida albicans* IP444 est de 0,125 μ g/mL.

Nous constatons que les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de la caspofungine envers les souches de *Candida parapsilosis* sont de 0,125 μ g/mL pour une souche, 0,5 μ g/mL pour sept (7) souches, 1 μ g/mL pour douze (12) souches et 2 μ g/mL pour une souche. Selon les normes du **CLSI (2008)**, les isolats de *Candida parapsilosis* sont sensibles à la caspofungine à l'exception de celle qui a une CMI de 2 μ g/mL

Figure N°15 : Concentrations Minimales Inhibitrices de la caspofungine vis-à-vis de *Candida* sp.

Nous constatons que toutes les souches de *Candida albicans* que nous avons isolées sont sensibles à la caspofungine. Les CMI ne dépassent pas 1 µg/mL. Quatre souches *Candida albicans* ont des CMI de 0,25 µg/mL, 2 souches ont des CMI de 0,5 µg/mL et une souche a une CMI de 1 µg/mL.

En ce qui concerne les CMI de la caspofungine envers *Candida glabrata*, nous remarquons que les CMI varient de 0,125 à 1 µg/mL.

Les tests de sensibilité des deux souches de *Candida famata* envers la caspofungine montrent que l'une possède une CMI de 0,5 µg/mL et l'autre 1 µg/mL.

Selon les normes du **CLSI (2008)**, le seuil de sensibilité à la caspofungine est de 2 µg/mL. Cela signifie que la totalité de nos isolats sont sensibles à cet antifongique. En 2008, **Pfaller et ses collaborateurs** ont montré que *Candida parapsilosis* possède des CMI relativement élevées estimées à 2 µg/mL par rapport aux autres espèces (**Pfaller et coll., 2008**). Ces CMI naturellement élevées de cette espèce sont probablement liées à la présence d'un polymorphisme sur le gène FKS1 qui code pour une des sous-unités de la β (1-3) glucane synthase. Parmi les 21 souches de *Candida parapsilosis*, une seule possède une CMI de 2 µg/mL, les autres souches ont des CMI comparables à celles des autres espèces de *Candida sp.* que nous avons isolées.

La caspofungine est un antifongique très efficace vis-à-vis des levures du genre *Candida*, notamment *Candida albicans* et *Candida glabrata*. Néanmoins, il est à l'origine d'une proportion importante de souches avec des CMI élevées, comme le cas de *Candida parapsilosis* (**Fournier, 2011**).

5. Identification des bactéries et antibiogramme

Pour la formation des biofilms mixtes (levures-bactéries) *in vitro*, nous avons procédé à l'identification uniquement des bactéries qui coexistaient avec les levures sur les mêmes cathéters.

Pour ce faire, nous avons identifié trois espèces bactériennes, il s'agit de *Serratia liquefaciens*, *Bordetella sp.* et *Enterobacter cloacae*.

Serratia liquefaciens et *Enterobacter cloacae* appartiennent aux entérobactéries qui forment une vaste famille de bactéries à Gram négatif (**Mirabaud, 2003**). Il s'agit de pathogènes opportunistes qui selon le Center for Disease Control and Prevention (CDC) des Etats-Unis, sont à l'origine de 8,6 % des infections nosocomiales [(**Pagotto et coll., 2003**) ; (**Boyce et coll., 2004**) ; (**Hart, 2006**)].

Les bactéries du genre *Bordetella sp.* sont des petits bacilles à Gram négatif, susceptibles de provoquer des infections nosocomiales en milieu hospitalier. Les infections dues à ce micro-organisme peuvent être particulièrement graves et potentiellement mortelles chez le nourrisson ou le jeune enfant. Lorsque cette espèce est rencontrée dans le contexte clinique, elle est toujours considérée comme pathogène (**Marcon, 1997**).

Nous avons évalué la sensibilité de ces trois souches à la gentamicine, la céfotaxime et à l'ampicilline par la méthode des disques (antibiogramme) et la détermination de la CMI en milieu liquide. Les résultats obtenus sont regroupés sur le **tableau N°8**

Nous pouvons dire que les trois souches sont résistantes à la cefotaxime et à l'ampicilline. *Bordetella sp.* a montré une résistance aux trois antibiotiques testés avec une CMI de 16 µg/mL pour la gentamicine. Les CMI des deux autres antibiotiques (céfotaxime, ampicilline) varient de 8 à 32 µg/mL vis-à-vis *Serratia liquefaciens* et *Bordetella sp.* respectivement. Les CMI les plus importantes (64 µg/mL) sont enregistrées pour la céfotaxime et l'ampicilline vis-à-vis *Enterobacter cloacae*.

Tableau N°8 : Antibiogramme et test de sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes isolées.

	Gentamicine		Céfotaxime		Ampicilline	
	Profil de résistance (10 µg)	CMI (µg/mL)	Profil de résistance (30 µg)	CMI (µg/mL)	Profil de résistance (10 µg)	CMI (µg/mL)
<i>S. liquefaciens</i>	S	-	R	8	R	32
<i>Bordetella sp.</i>	R	16	R	32	R	16
<i>E. cloacae</i>	S	-	R	64	R	64

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les souches sont résistantes aux antibiotiques. La multi-résistance aux antibiotiques concerne principalement les bactéries à Gram négatif (**Frasca et coll., 2008**). Selon **Tremblay (2007)**, en milieu hospitalier, l'utilisation accrue des antibiotiques est souvent associée à une augmentation de la résistance (**Tremblay, 2007**).

Les niveaux de résistances bactériennes varient selon la zone géographique et à travers le temps. La connaissance de l'évolution est nécessaire pour le choix de l'antibiothérapie de première intention (**El Bakkouri et coll., 2009**).

La confirmation du caractère résistant des souches testées pour la détermination des CMI permet de connaître le niveau de cette dernière. L'augmentation des CMI a toujours été corrélée aux échecs thérapeutiques, mais une concentration minimale inhibitrice faible n'est pas toujours synonyme de sensibilité. Ainsi, actuellement EUCAST préconise de placer une souche dans la classe des sensibles, lorsqu'elle a une CMI < 0,06 µg/mL (**EUCAST, 2010**).

6. Evaluation du potentiel des souches isolées à former les biofilms mixtes

La gravité des infections microbiennes ne réside pas seulement dans le taux d'incidence ou l'évolution de leur épidémiologie, ni dans leur sensibilité aux antibiotiques mais aussi dans leur pouvoir de former les biofilms qui est un obstacle majeur devant la réussite des soins. Le cathéter est un dispositif médical qui offre un support idéal pour la formation des biofilms en contact avec l'efflux sanguin. Le but de cette partie de l'étude est de vérifier le potentiel des levures et des bactéries isolées d'un même cathéter à former des biofilms mixtes et de mettre en évidence leur structure par microscopie électronique à balayage (MEB).

Pour la formation des biofilms *in vitro*, nous avons utilisé deux milieux de culture différents (annexe 2) :

-Le Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) un milieu riche en sels inorganiques, en acides-aminés, en vitamines tamponné avec le 3-(W-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS).

-Le Brain-Heart Infusion Broth (BHIB). Les deux milieux contiennent 2 g/L de glucose.

Le RPMI 1640 est utilisé pour la formation des biofilms fongiques (**Ramage et López-Rib., 2005**) et le BHIB est utilisé pour la formation des biofilms bactériens [(**Stepanović et coll., 2004**); (**Oh et coll., 2007**)]

L'évaluation du potentiel des souches sélectionnées à former les biofilms est suivie par la méthode quantitative au crystal violet.

6.1. Formation de biofilms mixtes levures-bactéries sur milieu BHIB

La **figure N°16** regroupe les densités optiques relatives aux quantités des biofilms mixtes levures-bactéries formés sur BHIB

Les deux souches de *Candida albicans* testés n'ont pas le même pouvoir de formation de biofilms, les densités optiques enregistrées sont de 0,12 pour *Candida albicans* s2 et 0,25 pour la souche s1. Pour *Candida parapsilosis*, les densités optiques enregistrées sont de 0,65 pour la souche s1 et de 0,35 pour la souche s2.

Nous remarquons que les biofilms mixtes ont une biomasse plus importante que celle des biofilms mono-espèce formés par la même levure, à l'exception de *Candida parapsilosis* s1 qui a formé un biofilm mixte avec *Serratia liquefaciens* avec une biomasse moins importante que celle du biofilm mono-espèce.

D'après les résultats obtenus, *Candida albicans* montre des différences importantes entre les biomasses des biofilms mixtes et celles des biofilms mono-espèces (le maximum de différence est de 0,35 pour la souche s1 et 0,5 pour la souche s2), le plus grand écart observé est celui du biofilm mixte formé par *Candida albicans* et *Serratia liquefaciens*. A l'inverse, les différences entre les biofilms mixtes *Candida parapsilosis*- bactéries et la levure seule, n'ont pas été importantes (le maximum est de 0,15).

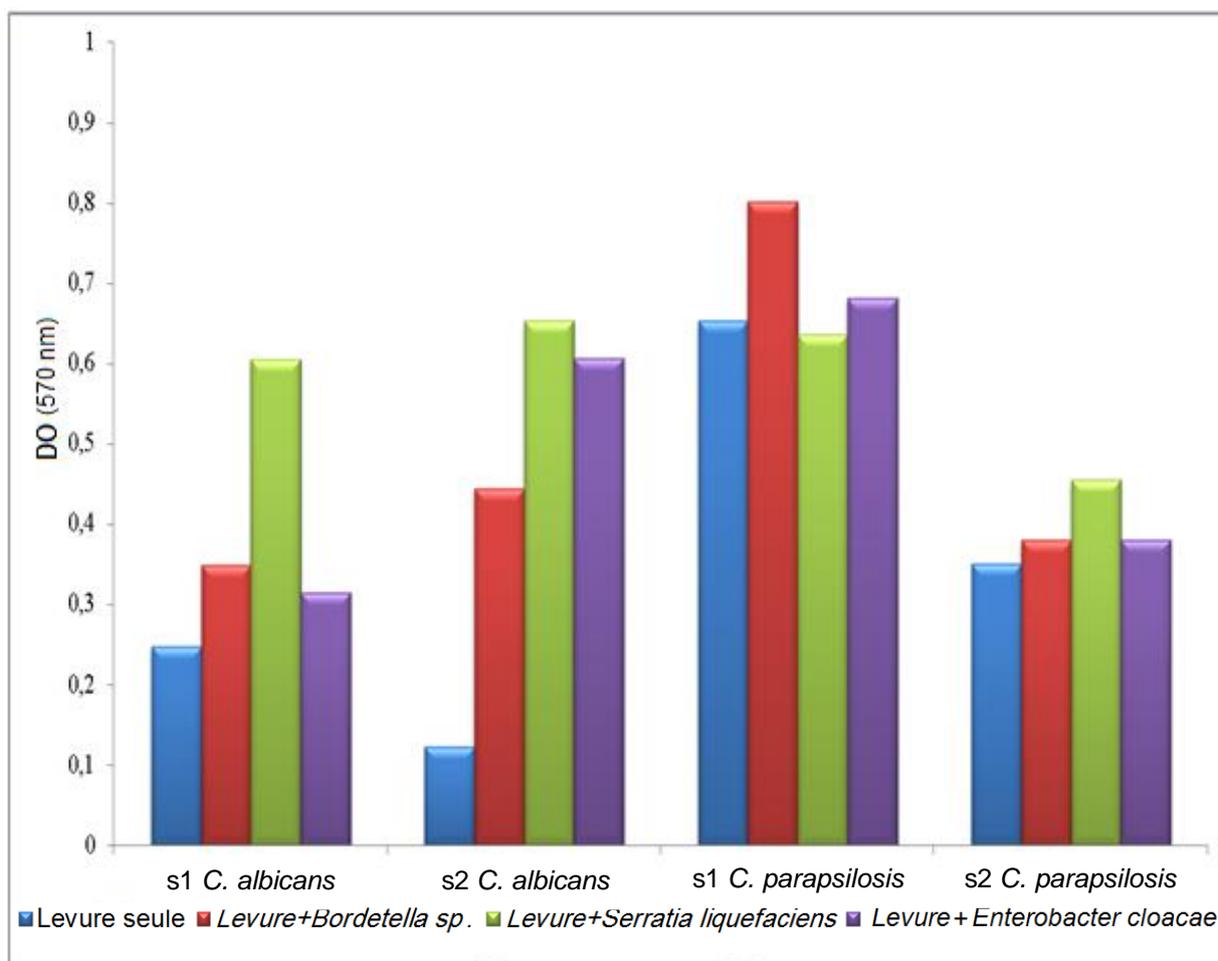


Figure N°16 : Biomasse des biofilms mixtes formés sur BHIB par la méthode du crystal violet

6.2. Formation de biofilms mixtes levures - bactéries sur milieu RPMI 1640

La **figure N°17** regroupe les densités optiques relatives aux quantités de biofilms mixtes levures-bactéries formés sur milieu RPMI 1640 par la méthode du crystal violet.

Les résultats obtenus montrent clairement que les densités optiques des différents biofilms formés sur milieu RPMI 1640 présentent moins de biomasse que celles enregistrées sur milieu BHIB avec les mêmes souches.

Nous remarquons que les biomasses des biofilms mono-espèces sont différentes. Les deux souches de *Candida albicans* n'ont pas le même pouvoir de formation de biofilms (*Candida albicans* s2 a une DO d'environ 0,18 alors que la souche s1 a une DO de 0,35). De même, la souche s1 de *Candida parapsilosis* affiche une densité optique de 0,18 alors que la DO de la souche s2 est égale au double de celle de la souche s1 (0,36).

Pour *Candida albicans* la plupart des biofilms mixtes ont des biomasses plus importantes que le biofilm mono-espèce de la même souche, sauf pour *Candida albicans* s1 où la biomasse du biofilm mixte formé avec *Enterobacter cloacae* est inférieure à celle du biofilm mono-espèce.

Les DO des biofilms mixtes de *Candida parapsilosis* s2 ont diminué par rapport à la DO du biofilm mono-espèce de la même levure, la différence la plus importante (0,22) est celle du biofilm mixte de *Candida parapsilosis* s2 et *Enterobacter cloacae*. En revanche, les densités optiques de *Candida parapsilosis* s1 en biofilms mixtes avec les bactéries sont plus élevées que celle du biofilm mono-espèce. La plus faible différence est enregistrée avec le biofilm *Candida parapsilosis* s1-*Serratia liquefaciens*.

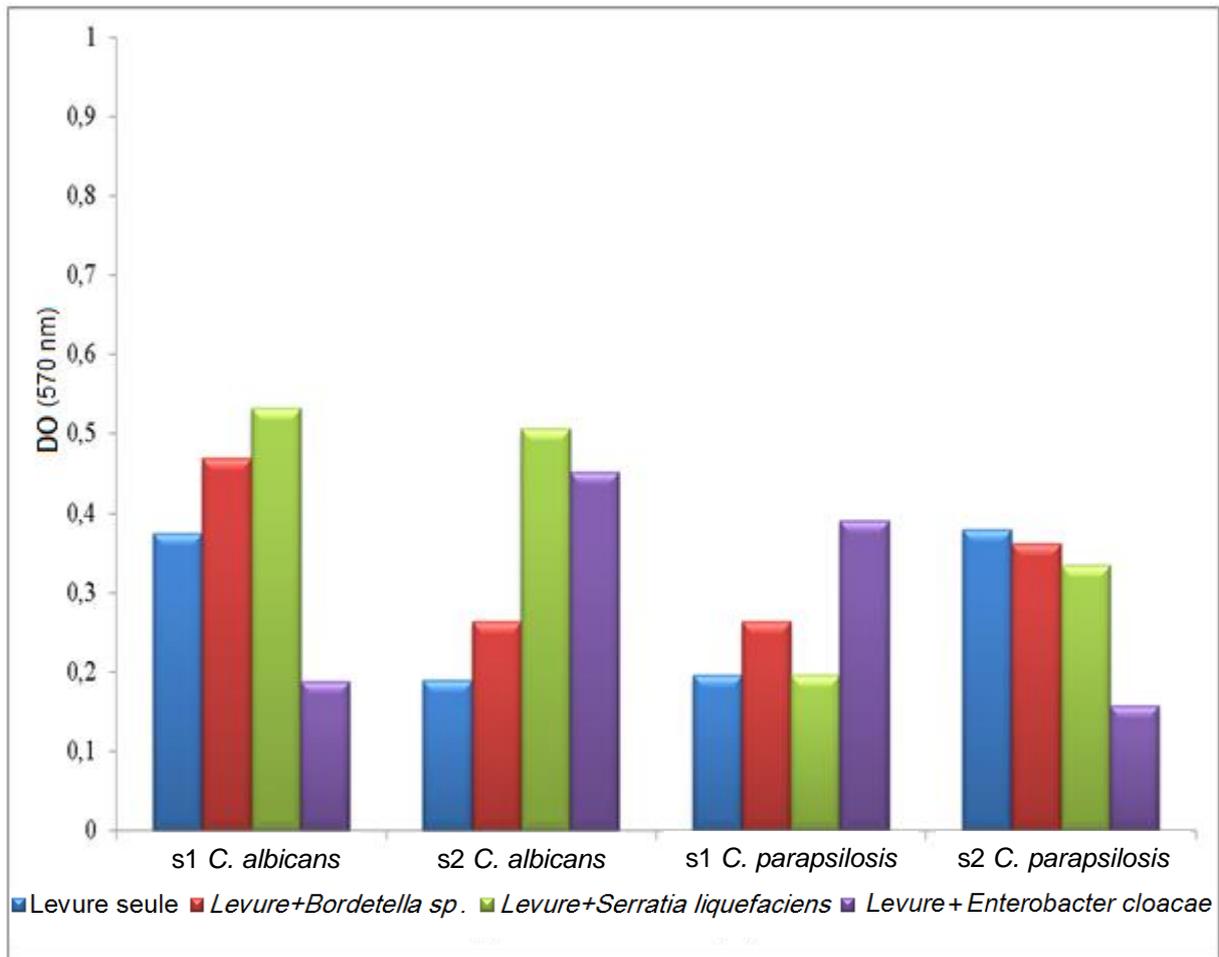


Figure N°17: Biomasse des biofilms mixtes formés sur milieu RPMI 1640

7. Variation du pH du milieu après la formation du biofilm

Le pH est un facteur important, qui doit être pris en compte lors de l'étude de l'adhésion des microorganismes pour former les biofilms. Les données disponibles montrent que le pH optimal pour l'attachement des espèces de *Candida* varie de 6 à 7 et est fonction du site corporel concerné [(Sobel et coll., 1981) ; (Wagner et Ottesen, 1982)]. C'est pourquoi, nous avons jugé nécessaire de mesurer le pH du milieu de culture après la formation des biofilms mixtes qui peut éventuellement influencer la quantité du biofilm formé.

La **figure N°18** représente les variations du pH du milieu de culture utilisé pour former les biofilms mono-espèces et multi-espèces de *Candida albicans* avec les trois espèces bactériennes retenues.

Les résultats obtenus montrent des variations du pH du BHIB après la formation des différents biofilms (mono-espèces et mixtes), comparées aux pH des mêmes biofilms formés dans le RPMI 1640. En effet, dans le milieu BHIB, la variation la plus importante est observée en présence de *Bordetella sp.* en biofilm mono-espèce (pH varie de 7,4 à 5,6) ou bien en biofilm mixte avec *Candida albicans-Bordetella sp.* ou le pH passe de 7,4 à 6,8. Par contre, *Enterobacter cloacae* ne cause pas une grande modification du pH en biofilm mixte avec la levure, le pH du milieu dans le biofilm mono-espèce que cette bactérie a formé, est resté quasiment inchangé. Il est important de noter que le milieu BHIB, contrairement au milieu RPMI 1640, n'est pas tamponné.

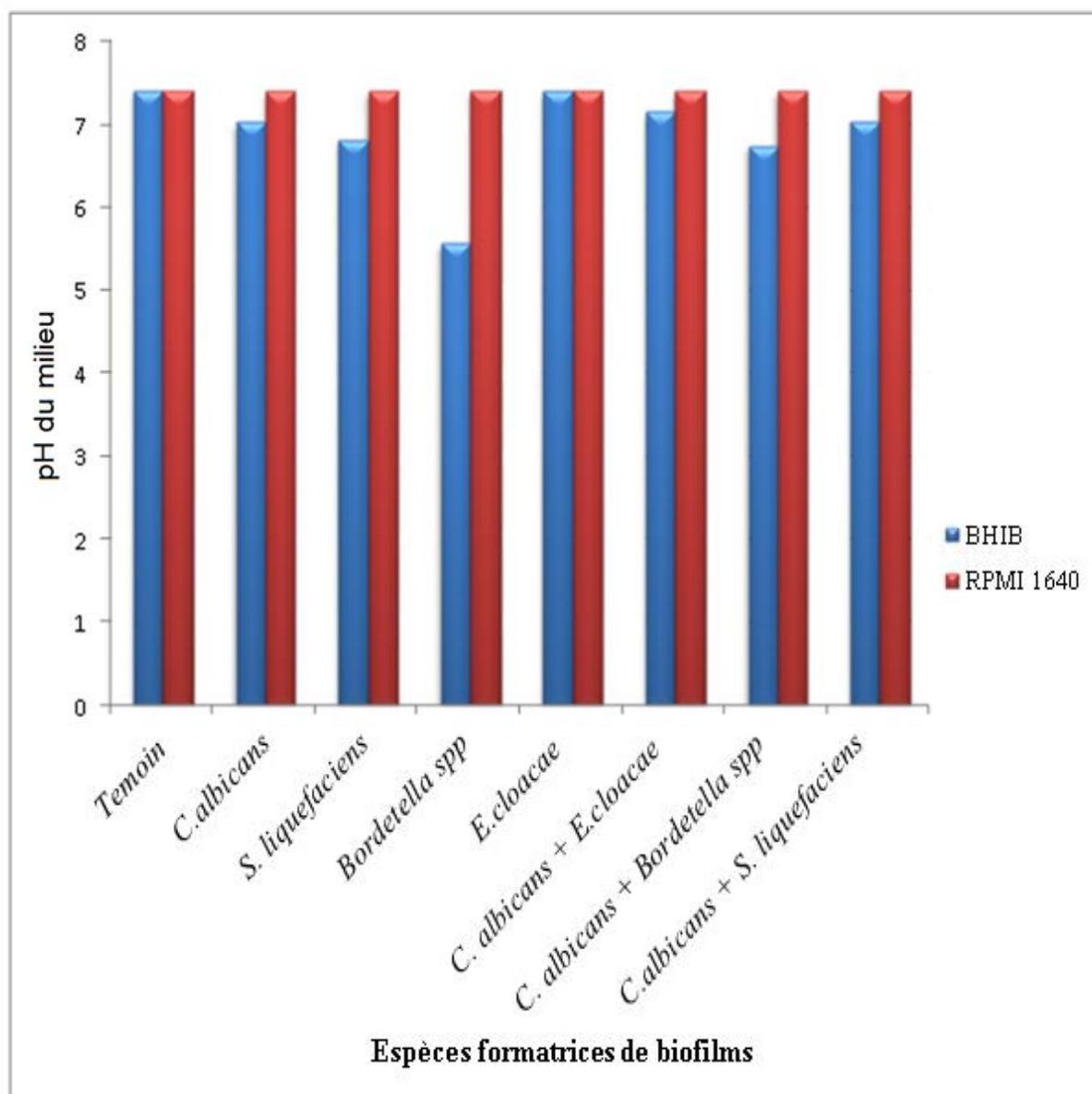


Figure N°18 : Variation du pH du milieu de culture après la formation des biofilms mixtes et mono-espèces.

Discussion

La quantité de biofilms mono-espèces évaluée par la méthode du crystal violet varie entre les deux espèces étudiées, entre les souches de la même espèce et aussi en fonction du milieu de culture. En effet, plusieurs études affirment que les souches des espèces *Candida* diffèrent par leur capacité à former les biofilms **[(Kuhn et coll., 2002a) ; (Li et coll., 2003)]**.

Nos isolats de *Candida parapsilosis* possèdent un potentiel à former les biofilms plus élevé que *Candida albicans* notamment sur le milieu BHIB.

Les travaux de **Weems (1992)** ont montré que *Candida albicans* forme plus de biofilms que les autres souches de ce genre, mais certaines souches font l'exception comme un isolat de *Candida parapsilosis* (AAHB 4479) qui a un grand pouvoir de formation de biofilms comparé aux autres souches de la même espèce. Les différences dans le pouvoir de formation de biofilms sont dues à des mutations génétiques. Le mécanisme qui régit l'apparition de ces mutations n'est pas totalement élucidé, certaines observations stipulent que les souches provenant de différents sites corporels ne forment pas les biofilms de la même manière **[(Xu et coll., 1999a) ; (Xu et coll., 1999b) ; (Xu et coll., 2000)]**.

De plus, la composition du milieu de culture affecte la quantité de biofilm produite d'autant plus que les deux espèces sont différentes d'un point de vue métabolique. Une étude réalisée sur *Candida albicans* a montré que cette espèce forme plus de biofilms quand le milieu contient une importante concentration en source de carbone. Aussi, la présence d'une forte quantité de galactose permet de produire plus d'adhésine **(Douglas, 1992)**.

Les sucres sont indispensables à la production de la matrice polysaccharidique **[(McCourtie et Douglas, 1985) ; (Abu El-Teen et coll., 1989) ; (kaita, 1989)]** mais peuvent également empêcher l'adhésion par l'occupation des sites d'adhésion des levures **[(Calderone et braun, 1991) ; (Ghannoum et coll., 1991)]**

Si la teneur en glucides est comparable dans les deux milieux, le RPMI est plus riche en ions métalliques qui ont leur part d'influence sur l'attachement des *Candida* aux surfaces.

Les ions divalents comme le calcium (Ca^{2+}) et le magnésium (Mg^{2+}) augmentent l'adhésion des levures par réduction des forces électrostatiques répulsives chargées négativement (Fletcher, 1980) alors que certains cations réduisent l'adhésion [(McCourtie et Douglas, 1985) ; (Cutler et coll., 1990) ; (Klotz et coll., 1993)]. Ces paramètres influencent aussi les biofilms mixtes qui sont sous le contrôle des interactions des espèces microbiennes présentes dans le milieu. Les résultats que nous avons obtenus révèlent une variabilité dans la quantité de biofilms mixtes comparés aux biofilms mono-espèces. Des études antérieures ont montré que les bactéries rentrent en compétition avec les levures pour les sites d'adhésion [(Wargo et Hogan, 2006) ; (Lynch et Robertson, 2008)]. De plus, les bactéries peuvent empêcher la croissance des levures par la sécrétion de toxines [(Kerr et coll., 1999) ; (Hibbing et coll., 2010)].

8. Observation des biofilms mixtes formés *in vitro* au microscope électronique à balayage

Malgré que *Candida parapsilosis* soit l'espèce dominante dans les prélèvements que nous avons réalisés sur cathéters vasculaires périphériques du service de cardiologie et de chirurgie générale, l'étude de l'inféctivité a montré que c'est l'espèce *Candida albicans* qui est responsable des infections dans les deux services. C'est pourquoi, seule l'espèce *Candida albicans* est retenue pour la formation des biofilms mixtes *in vitro*. Nous avons testés la formation des biofilms mixtes sur fond des puits de la microplaque et sur cathéters dans deux milieux de culture différents le RPMI 1640 et le BHIB. Nous avons testé les associations suivantes : *Candida albicans-Serratia liquefaciens*, *Candida albicans-Bordetella sp.* et *Candida albicans-Enterobacter cloacae*.

Les biofilms mixtes formés *in vitro* sont observés au microscope électronique à balayage au Centre de Microscopie Electronique Stéphanois en France.

La **photo N°1** représente les microphotographies de la microscopie électronique à balayage des biofilms mixtes formés sur les fonds des puits d'une microplaque par *Candida albicans* et *Enterobacter cloacae* dans le milieu RPMI 1640. La **photo N°1(A)** [x300] révèle un biofilm formé d'un réseau d'hyphes de *Candida albicans*. Aux grossissements plus importants (**photo N°1(B)** [x2500] et

photo N°1(C) [x3000]), nous observons les bactéries attachés aux hyphes de la levure.

L'attachement des *Enterobacter cloacae* est plus important dans certaines zones comme le montre la **photo N°1(C)**. De plus, certaines bactéries sont attachées au fond du puits de la microplaque. L'aspect global du biofilm semble être dominé par les hyphes de *Candida albicans*.

La **photo N°2 (A, B et C)** représente les images de microscopie électronique à balayage des biofilms mixtes formés sur fond du puits d'une microplaque par *Candida albicans* et *Enterobacter cloacae* sur milieu BHIB. Nous observons qu'*Enterobacter cloacae* couvre la quasi-totalité de la surface, la présence levurienne se résume à quelque amas d'hyphes séparés (**photo N°1(A)** [x350]). Les hyphes sont entièrement couverts par les bactéries **photo N°2(B)** [x1500] et **photo N°2(C)** [x3000].

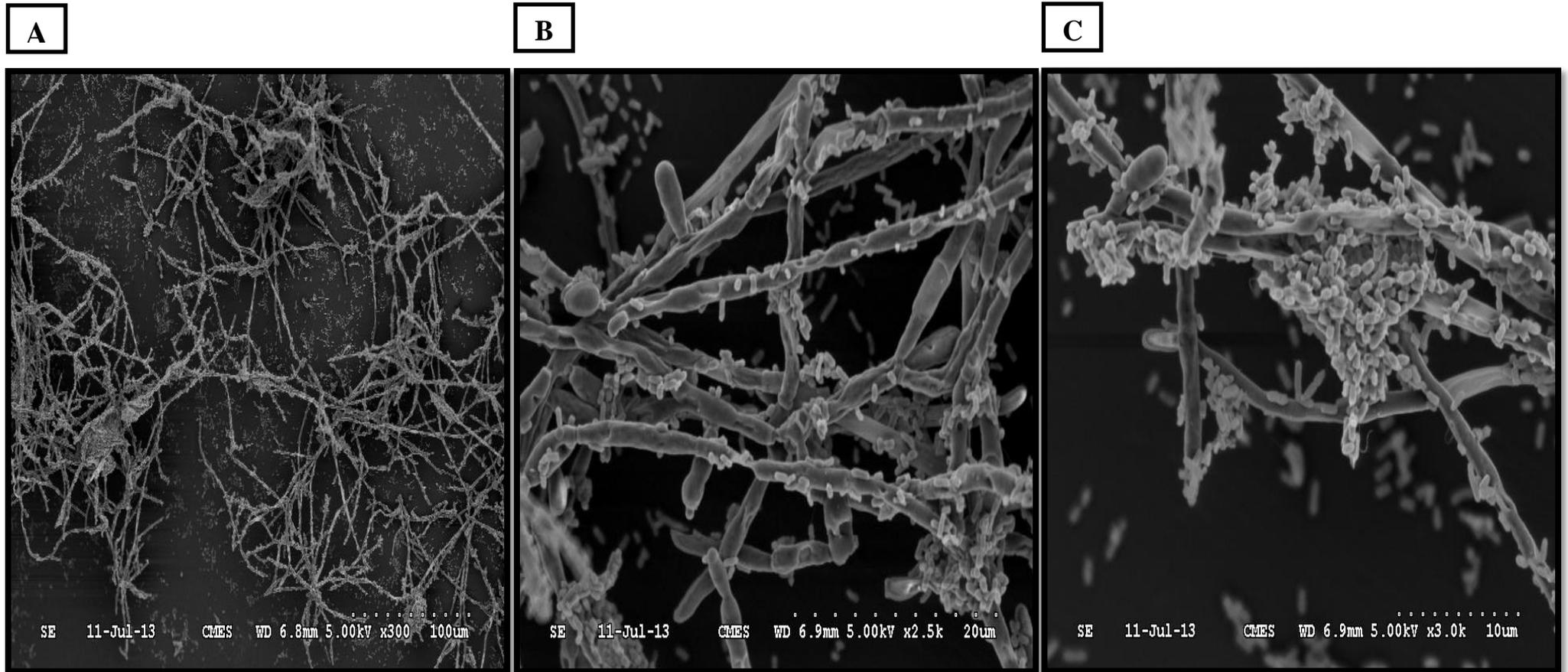


Photo N°1 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Enterobacter cloacae* sur milieu RPMI 1640 sur fond de puits d'une microplaque.

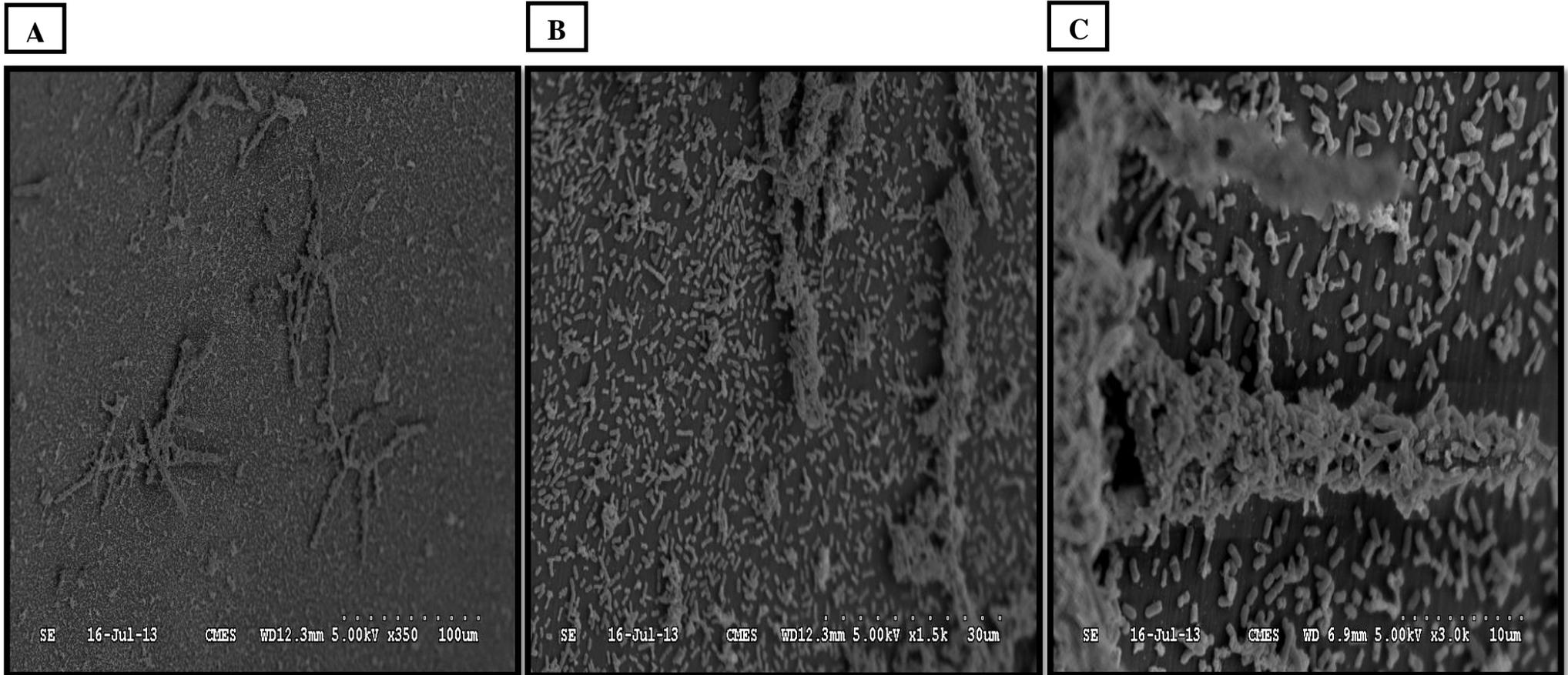


Photo N°2 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Enterobacter cloacae* sur milieu BHIB sur fond de puits d'une microplaque.

La **photo N°3** représente les microphotographies de la microscopie électronique à balayage des biofilms mixtes formés sur fond de puits d'une microplaque par *Candida albicans* et *Bordetella sp.* sur milieu RPMI 1640.

Nous constatons que le biofilm est formé d'hyphe de *Candida albicans*, les bactéries sont attachées aux levures et au fond du puits de la microplaque **photo N°3 (A et C)**. La distribution des bactéries n'est pas homogène, sur certaines zones nous retrouvons des amas de bactéries attachées aux levures. *Candida albicans* est principalement sous forme filamenteuse, seul un petit nombre de levures est resté sous forme de blastospores **(photo N°3 (B))**.

Sur la **photo N°4** qui représente les microphotographies de la microscopie électronique à balayage des biofilms mixtes formés sur le fond du puits d'une microplaque par *Candida albicans* et *Bordetella sp.* sur le milieu RPMI 1640. Nous remarquons que la présence bactérienne est dominante. *Bordetella sp.* couvre la surface du fond du puits alors que *Candida albicans* forme des réseaux d'hyphe séparés par les espaces occupés par les bactéries **(photo N°4(A et B))**. Les bactéries sont également attachées massivement aux levures **photo N°4(C)**.

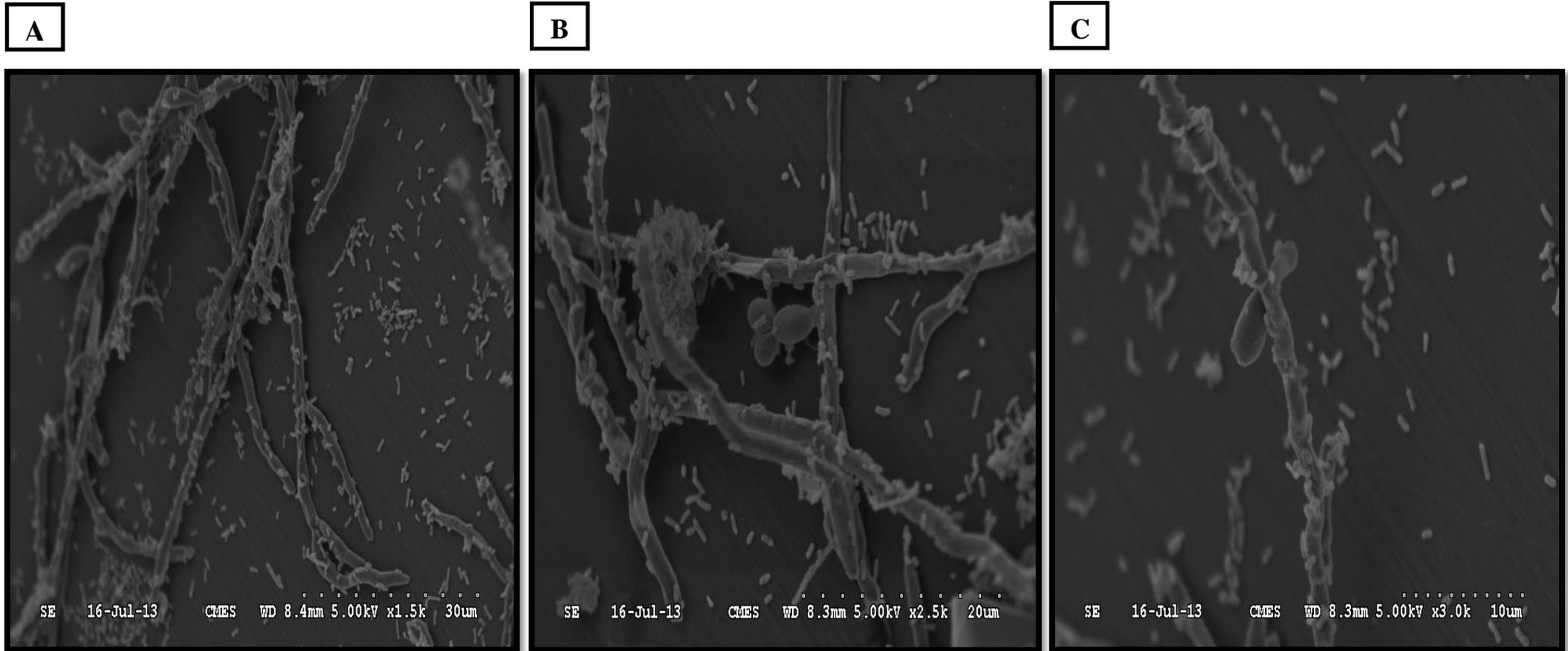


Photo N°3 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Bordetella* spp dans le RPMI 1640 sur fond de puits d'une microplaque.

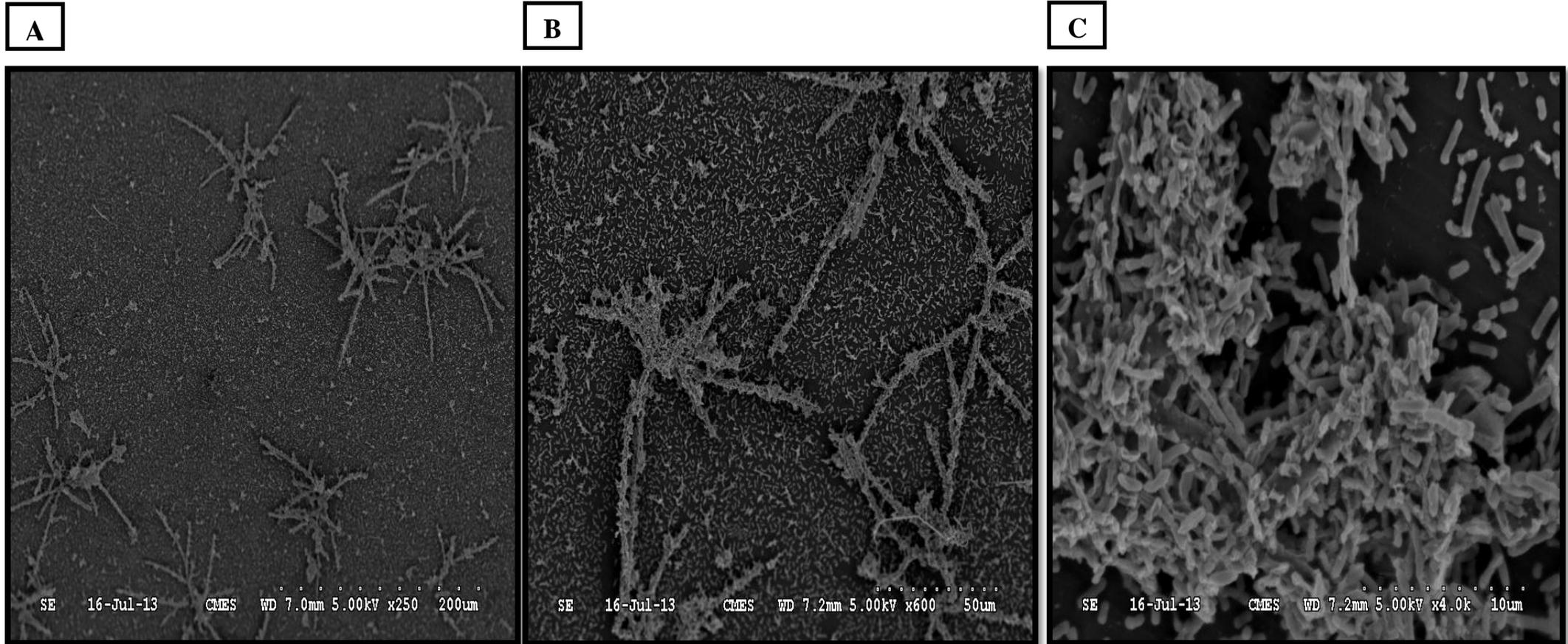


Photo N°4 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Bordetella* sp. dans le BHIB sur fond de puits d'une microplaque.

La **photo N°5** représente les microphotographies de la microscopie électronique à balayage des biofilms mixtes formés sur cathéters vasculaires périphériques par *Candida albicans* et *Serratia liquefaciens* sur milieu RPMI 1640

Nous remarquons que le biofilm mixte formé par *Candida albicans* et *Serratia* est compact. Les levures sont majoritaires (**photo N°5(A)**). La levure est présente sous forme de filaments mais aussi de blastospores (**photo N°5(B)**). Les bactéries sont attachés principalement aux hyphes (**photo N°5(B et C)**), la quantité de la matrice exo-poly-saccharidique est plus visible comparée aux biofilms formés sur fond de microplaque.

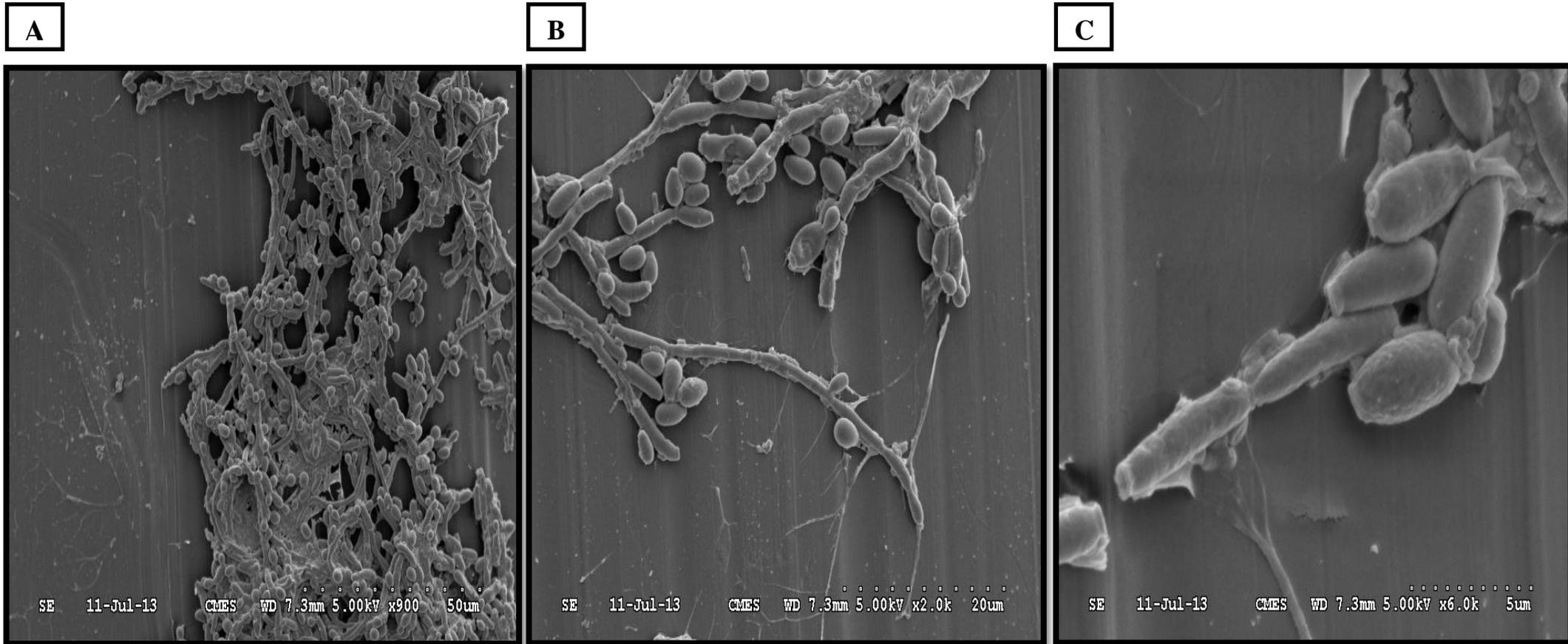


Photo N°5 : Observations au Microscope Electronique à Balayage des biofilms mixtes formés par *Candida albicans* et *Serratia liquefaciens* dans le RPMI 1640 sur cathéters vasculaires périphériques.

Discussion

Les observations faites par microscopie électronique à balayage ont montré que les biofilms formés ont une architecture différente en fonction du milieu de culture utilisé. Ces observations renforcent les résultats de quantification de la biomasse que nous avons obtenus et qui ont montré que la biomasse des biofilms mixtes est plus importante quand ces derniers sont formés dans le BHIB. De plus, les photos révèlent que l'accroissement de la biomasse dans le BHIB est dû essentiellement au nombre important de bactéries qui dominent les levures, les biofilms formés dans le RPMI 1640 sont plus équilibrés entre bactéries et levures. En effet, la formation du biofilm dépend des facteurs environnementaux tels que la composition du milieu et le pH (**Ramage et coll., 2006**).

La différence observée entre les deux milieux peut être due en partie à la composition du RPMI 1640 qui diffère de celle du BHIB et le pH qui change au cours de la formation du biofilm dans ce dernier comme l'ont montré nos résultats.

Selon des travaux antérieurs, la dominance des bactéries sur les levures peut témoigner d'une compétition entre les deux pathogènes pour les sites d'adhésion [(**Wargo et Hogan, 2006**) ; (**Lynch et Robertson, 2008**)].

Cette dominance bactérienne est observée seulement sur BHIB, il est possible que la composition du milieu et le pH qui varie dans ce dernier est en faveur des bactéries. Nous avons remarqué que la densité du biofilm diffère en fonction des espèces bactériennes co-formatrices de biofilms avec *Candida albicans* notamment quand il s'agit de biofilms formés sur RPMI 1640. Le biofilm mixte formé de *Candida albicans* et *Enterobacter cloacae* est plus dense que celui formé par *Candida albicans* et *Bordetella sp.* L'adhérence de *Candida albicans* dépend fortement des espèces bactériennes présentes dans le milieu et leurs interactions avec la levure et par conséquent la formation du biofilm mixte [(**Wargo et Hogan, 2006**) ; (**Lynch et Robertson, 2008**)].

Candida albicans peut exister sous plusieurs formes dans un biofilm (**Kumamoto et Vines, 2005**), la forme majoritaire que nous avons observée est la forme hyphe, cependant, certains biofilms abritent des levures sous forme blastospores. La transition de *Candida albicans* de la forme blastospores vers les formes

filamenteuses (hyphes, pseudohyphes) est une étape primordiale pour la formation des biofilms de cette levure **(Kumamoto et Vincés, 2005)**.

La transition entre les différentes formes peut être influencée par les bactéries comme le cas de *Pseudomonas aeruginosa* qui peut inhiber la filamentation de *Candida albicans* par le biais des molécules auto inductrices **[(Hogan et coll., 2004) ; (Williams et Cámara, 2009)]**. C'est une explication possible pour l'existence de la forme blastospore dans les biofilms mixtes de *Candida albicans* avec *Serratia liquefaciens* et *Bordetella sp.*

La topographie des biofilms diffère en fonction du support utilisé. En effet, la microscopie électronique à balayage implique la dégradation de la matrice extracellulaire en raison des protocoles effectués au cours de la préparation de l'échantillon (la fixation et la déshydratation au laboratoire de l'imagerie électronique) **(Chandra et coll., 2008)**. La matrice extracellulaire est plus visible quand il s'agit du biofilm formé sur cathéter que celle formée sur fond de puits d'une microplaque. Cela pourrait être dû à l'effet du lavage qui génère une force de frottement plus importante sur le fond du puits que sur de petits fragments de cathéters dans un tube.

Quatrième partie
Conclusion générale

L'augmentation du nombre de situations d'immunodéficiences au cours de ces dernières décennies a créé un terrain favorable au développement des infections fongiques. Parmi les agents responsables de ces infections, les levures du genre *Candida* occupent une place prépondérante. En outre, l'utilisation croissante des antifongiques a modifié le profil des espèces rencontrées en clinique, en favorisant celles qui leurs sont le moins sensibles. De plus, la formation des biofilms à la surface des dispositifs médicaux tels que les cathéters, représente un élément fondamental dans la survenue des infections associées aux soins ce qui a contraint la communauté scientifique à orienter leur travaux vers la compréhension de ce mode de vie microbien et l'adaptation de l'antibiothérapie appropriée.

Malheureusement, la plupart des travaux réalisés *in vitro* portaient sur l'étude des biofilms mono-espèces (bactéries ou levures) sans prendre en compte que dans la nature, les levures cohabitent dans le milieu avec les bactéries et que les biofilms peuvent être formés d'un mélange d'espèces.

Partant de ces données, nous avons réalisé cette étude qui avait pour objectif de :

- Déterminer les différents types d'infectivités fongiques, bactériennes et mixtes (levures-bactéries) sur les cathéters vasculaires périphériques prélevés des services de cardiologie et de chirurgie générale du CHU de Tlemcen,
- Tester la sensibilité des souches fongiques isolées vis-à-vis de deux antifongiques
- Evaluer leur potentiel à former des biofilms mixtes dont l'architecture a été mise en évidence par microscopie électronique à balayage.

Les résultats obtenus, nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- Sur les 151 prélèvements effectués 42,37% sont altérés par les bactéries et les levures dont 7,28 % par les deux groupes microbiens à la fois.
- Trois types d'infectivités fongiques bactériennes et mixtes des cathéters veineux périphériques ont été recensés dans les deux services étudiés du CHU de Tlemcen. Les infections représentent 12,3%. Les levures seules ne sont pas impliquées dans les infections, en revanche, associées aux bactéries, elles causent la moitié de ce type d'infectivités.
- Les facteurs de risque qui ont accompagné les cas d'infections sont la durée d'implantation qui est égale ou supérieure à 3 jours et le sexe masculin.

- A partir de 29 prélèvements altérés par les levures, 35 souches de *Candida* sp. ont été isolées. Quatre espèces sont identifiées, *Candida parapsilosis* (21 souches) suivie de *Candida albicans* (07 souches), *Candida glabrata* (5 souches) et *Candida famata* (02 souches). *Candida parapsilosis* est l'espèce dominante au CHU de Tlemcen. Cependant, *Candida albicans* est l'espèce la plus isolée dans un contexte infectieux.

- Les concentrations minimales inhibitrices sont comprises entre 0,5 et 2 µg/mL pour l'amphotéricine B et entre 0,125 et 2 µg/mL pour la caspofungine. 12 souches de *Candida parapsilosis* sont non sensibles à l'amphotéricine B, alors qu'elles sont toutes sensibles à la caspofungine.

- Le taux de présence bactérienne sur les cathéters est de 30,46%. Trois espèces bactériennes sont isolées des mêmes cathéters qui abritaient les levures. Il s'agit de *Serratia liquefaciens*, *Bordetella* spp, et *Enterobacter cloacae*. Elles sont toutes résistantes à la céfotaxime et l'ampicilline. En revanche, *Bordetella* spp a montré également une résistance envers la gentamicine.

- Les isolats de *Candida parapsilosis* et de *Candida albicans*, ont le pouvoir de former des biofilms mixtes avec les bactéries. La quantité des biofilms produites varie en fonction des souches, des espèces, de la composition du milieu de culture et son pH.

- Les observations faites au microscope électronique à balayage ont montré que la structure des biofilms mixtes dépend du support sur lequel les biofilms sont attachés et varie aussi en fonction des espèces, de plus une compétition a été observée entre levures et bactéries dont la composition du milieu et son pH jouent un rôle en favorisant la dominance de l'un sur l'autre.

La prévention des infections associées aux dispositifs médicaux est obligatoire et s'appuie sur :

- Le lavage soigneux des mains avec le respect des règles d'hygiène.

- La référence à des protocoles simples et régulièrement enseignés de l'ensemble de l'équipe soignante.

La recommandation essentielle tient dans la limitation des indications et de la durée du cathétérisme. Les manipulations sur les lignes de perfusion doivent être réduites au minimum.

- Dans le cas d'une infection fongique, la caspofungine est le traitement recommandé

- Les infections liées aux cathéters sont généralement précédées par les contaminations. De ce fait, l'utilisation des antibiotiques doit être soumise à des règles plus rigoureuses.

Pour continuer dans la voie de la recherche ouverte par cette étude, il serait intéressant d' :

-Elargir l'étude épidémiologique qui regroupe les bactéries et les levures pour couvrir d'autres établissements de santé et d'autres dispositifs médicaux.

-Etudier le pouvoir de formation des biofilms mixtes par plusieurs espèces bactériennes et fongiques, dans différentes conditions physico-chimiques.

-Etudier les interactions qui régissent la formation des biofilms mixtes que nous avons obtenus, notamment le quorum sensing.

-Evaluer l'efficacité des antibiotiques vis-à-vis des biofilms mixtes, et déterminer les paramètres qui peuvent inhiber ou diminuer leur formation.

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. Abi-Said D., Anaissie E., Uzun O., Raad I., Pinzcowski H., Vartivarian S. (1997) The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases*, 24(6), 1122-1128.
2. Abraham W.R. (2006) Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria. *Current Medicinal Chemistry*, 13:1509–1524.
3. Abu El-Teen K., Ghannum M., Stretton R.J. (1989) Effects of Sub-Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents on Adherence of *Candida spp.* to Buccal Epithelial Cells *in Vitro*. *Mycoses*, 32(11), 551-562.
4. Adam B., Baillie G.S., Douglas L.J. (2002) Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, 51:344-349.
5. Ahmad S., Khan Z., Mustafa A.S., Khan Z.U. (2002) Seminested PCR for diagnosis of candidemia : comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *Journal of clinical microbiology*, 40(7), 2483-2489.
6. Alam F.F., Mustafa A.S., Khan Z.U. (2007) Comparative evaluation of (1, 3)- β -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC infectious diseases*, 7(1), 103.
7. Allison D.G., Ruiz B., SanJose C., Jaspe A., Gilbert P. (1998) Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 167:179–84.
8. Almirante B., Rodríguez D., Cuenca-Estrella M., Almela M., Sanchez F., Ayats J., et al. (2006) Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of clinical microbiology*, 44(5), 1681-1685.
9. Anaissie E.J., Bodey G.P. (1990) Fungal infections in patients with cancer. *Pharmacotherapy* 10, 164S–169S.
10. Arendrup M.C., Sulim S., Holm A., Nielsen L., Nielsen S. D., Knudsen J. D., et al. (2011) Diagnostic Issues, Clinical Characteristics and Outcome for Patients with Fungaemia. *Journal of clinical microbiology*, JCM-00179.
11. Arthington-Skaggs B.A., Warnock D.W., Morrison C.J. (2000) Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole

- treatment in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(8), 2081-2085.
12. Azoulay E., Timsit J.F., Tafflet M., De Lassence A., Darmon M., Zahar J.R., et al. (2006) *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent pseudomonas ventilator-associated pneumonia. *CHEST Journal*, 129(1), 110-117.
 13. Baillie G.S., Douglas L.J. (1998) Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8):1900–8.
 14. Baillie G.S., Douglas L.J. (1999) Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. 48:671–679.
 15. Baillie G.S., Douglas L.J. (2000) Matrix polymers of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46:397–403.
 16. Bamford C.V., d'Mello A., Nobbs A.H., Dutton L.C., Vickerman M.M., Jenkinson H.F. (2009) *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infection and immunity*, 77(9), 3696-3704.
 17. Bandara H.M.H.N., Yau J.Y.Y., Watt R.M., Jin L.J., Samaranayake L.P. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *in-vitro* *Candida* biofilm development. *BMC Microbiology*, 10:125.
 18. Barker K.S., Rogers P.D. (2006) Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. *Current infectious disease reports*, 8(6): 449-456.
 19. Bendinger B., Rijnaarts H.H., Altendorf K., Zehnder A.J. (1993) Physico-chemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*, 59(11), 3973-3977.
 20. Blankenship J.R., Mitchell A.P. (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology*, 9(6), 588-594.
 21. Blignaut E., Pujol C., Lockhart S., Joly S., Soll D.R. (2002) Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive and healthy individuals reveals a new clade in South Africa. *Journal of clinical microbiology*, 40(3), 826-836.

22. Boktour M.R., Kontoyiannis D.P., Hanna H.A., Hachem R.Y., Girgawy E., Bodey G. P., Raad I.I. (2004) Multiple-species candidemia in patients with cancer. *Cancer*, 101(8), 1860-1865.
23. Bonassoli L.A., Bertoli M., Svidzinski T.I.E. (2005) High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *Journal of Hospital Infection*, 59(2), 159-162.
24. Borges-Walmsley M., McKeegan K., Walmsley A. (2003) Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal*, 376, 313-338.
25. Botto H. (2003) Infections urinaires nosocomiales de l'adulte. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 33 223s–244s.
26. Boucherit-Atmani Z., Seddiki S. M. L., Boucherit K., Sari-Belkharoubi L., Kunkel D. (2011) *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *Journal de Mycologie Médicale*, 21(3), 182-187.
27. Boyce T.G., Gruber W.C., Fisher R .G. (2004) Enterobacter. In R. D. Feigin, Cherry, Demmler & Kaplan (Eds.), *Textbook of pediatric infectious diseases 5th ed.*, pp. 1427- 1431.
28. Boyd A., Chakrabarty A.M. (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:2355–2359.
29. Brun-Buisson C., Abrouk F., Legrand P., Huet Y., Larabi S., Rapin M. (1987) Diagnosis of central venous catheter-related sepsis : critical level of quantitative tip cultures. *Archives of internal medicine*, 147(5), 873-877.
30. Burin Des Roziers M. (2002) Les biofilms. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.
31. Calderone R.A., Braun P.C. (1991) Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiological reviews*, 55(1), 1-20.
32. Carlson E. (1983a) Effect of strain of *Staphylococcus aureus* on synergism with *Candida albicans* resulting in mouse mortality and morbidity. *Infection and Immunity* 42: 285–292.
33. Carlson E. (1983b) Enhancement by *Candida albicans* of *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, and *Streptococcus faecalis* in the establishment of infection in mice. *Infection and Immunity* 39: 193–197.

34. CASFM. (2010) Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
35. Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A. (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1771-1776.
36. 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.
37. Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2008) *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nature Protocols*; Vol 3 (12) 1909.
38. Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G.R. (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 5048-5052.
39. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
40. CLSI. (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: informational supplement, M27-S3. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
41. CLSI. (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
42. Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 435-464.
43. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H. M. (1995) *Microbial biofilms*. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.
44. Costerton J.W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *Journal of bacteriology*, 176(8), 2137.

45. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318–1322.
46. CTINILS. (2007) Actualisation de la définition des infections nosocomiales. Définitions des infections associées aux soins. DHOS/DGS/Ministère de la santé, 11 p.
47. Cugini C., Worth Calfee M., Farrow J.M., Morales D.K., Pesci E.C., Hogan D.A. (2007) Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 65: 896–906.
48. Cutler J.E., Brawner D.L., Hazen K.C., Jutila M.A. (1990) Characteristics of *Candida albicans* adherence to mouse tissues. *Infection and immunity*, 58(6), 1902-1908.
49. Dannaoui É. (2013) Résistance des *Candida* aux antifongiques: détection et mécanismes. *revue francophone des laboratoires* (450), 71-77.
50. Davies D.G., Geesey G.G. (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and environmental microbiology*, 61(3), 860-867.
51. Davis-Hanna A., Piispanen A.E., Stateva L.I., Hogan D.A. (2008) Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Molecular microbiology*, 67(1), 47-62.
52. De Chalvet De Rochemonteix A. (2009) Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.
53. Decousser J.W. (2008) Stratégies thérapeutiques efficaces pour le traitement des infections fongiques invasives : un traitement précoce approprié pour chaque patient. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 38 ,1-7.
54. De la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Fernandez L., Hancock R.E. (2013) Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current opinion in microbiology*, 16(5), 580-589.
55. Develoux M., Bretagne S. (2005) Candidoses et levures diverses. *EMC-Maladies infectieuses*, 2(3), 119-139.

56. Dick J.D., Merz W.G., Saral R. (1980) Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(1), 158-163.
57. Diekema D.J., Messer S.A., Boyken L.B., Hollis R.J., Kroeger J., Tendolkar S., Pfaller M.A. (2009) *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *Journal of clinical microbiology*, 47(10), 3170-3177.
58. Diekema D.J., Messer S.A., Hollis R.J., Wenzel R.P., Pfaller M.A. (1997) An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 29(3), 147-153.
59. Donlan R.M. (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 277.
60. Douglas L.J. (1992) Mannoprotein adhesins of *Candida albicans*, p. 34-50. In J. E. Bennett, R. J. Hay, and P. K. Peterson (ed.), *New strategies in fungal disease*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
61. Douglas L.J. (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 139–143.
62. Douglas L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* 11: 30–36.
63. Dunne W.M. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155-166.
64. Eberhard A., Burlingame A.L., Eberhard C., Kenyon G.L., Neilson K.H., Oppenheimer N.J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fishcheri* luciferase. *Biochemistry* 20:2444–2449.
65. Ebrey R, Hamilton M.S, Cairns G. (2004) Biofilms and hospital acquired infections. In: Ghannoum M, O'Toole GA, editors. *Microbial biofilms*. Washington, DC: AMS Press; p. 294-313.
66. Edmond M.B., Wallace S.E., McClish D.K., Pfaller M.A., Jones R.N., Wenzel R. P. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 29(2), 239-244.
67. El Bakkouri J., Belabbes H., Zerouali K., Belaiche A., Messaoudi D., Gros Claude J.D.P., El Mdaghri N. (2009) Résistance aux antibiotiques d'*Escherichia coli* uropathogène communautaire et consommation

- d'antibiotiques à Casablanca (Maroc). *European Journal of Scientific*, 36, 49-55.
68. El-Azizi M.A., Starks S.E., Khardori N. (2004) Interactions of *Candida albicans* with other *Candida spp.* and bacteria in the biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 96: 1067–1073.
69. Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B. (2010) Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires* (426), 51-63.
70. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (EUCAST) Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1, 2010-04-27.
71. Fletcher M. (1980) In *Bacterial Adherence (Receptors and Recognition)*, Series B, Vol. 6, E. H. Beachey (Ed.), Chapman and Hall, London, pp. 345–374.
72. Fournier P. (2011) Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida sp.* : étude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble. Doctorat en pharmacie. Université de Grenoble.
73. Frasca D., Dahyot-Fizelier C., Mimoz O. (2008) La colistine en réanimation. *Réanimation*, 17: 251-258.
74. Gallien S., Sordet F., Enache-Angoulvant A. (2007) Traitement des candidémies chez un patient porteur d'un cathéter vasculaire. *Journal de Mycologie Médicale*; 17 : 42-49.
75. García-Sánchez S., Aubert S., Iraqui I., Janbon G., Ghigo J M., D'enfert C. (2004) *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic cell*, 3(2), 536-545.
76. Gardini F., Suzzi G., Lombardi A., Galgano F., Crudele M.A., Andrighetto C., et al. (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS yeast research*, 1(2), 161-167.
77. Ghannoum M. A., Abu-El Teen K., Ibrahim A., Stretton R. (1991) Protection against *Candida albicans* gastrointestinal colonization and dissemination by saccharides in experimental animals. *Microbios*, 67(271), 95-105.
78. Ghigo J.M. (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845), 442-445.

79. Goldmann D.A., Pier G.B. (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clinical microbiology reviews*, 6(2), 176-192.
80. Grimaudo N.J., Nesbitt W.E. (1997) Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species. *Oral Microbiology and Immunology* 12: 168–173.
81. Grinad N. (2012) les biofilms a *Candida spp* : Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Faculté de pharmacie. Université de Nantes.
82. Haras D. (2005) Biofilms et altérations des matériaux : De l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques*, 93, 27–41 Hors Série.
83. Harding M.W., Marques L.L., Howard R.J., Olson M.E. (2009) Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in microbiology*, 17(11), 475-480.
84. Harriott M.M., Noverr M.C. (2009) *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 3914–3922.
85. Harriott M.M., Noverr M.C. (2010) Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(9), 3746-3755.
86. Harriott M.M., Noverr M.C. (2011) Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in microbiology*, 19(11), 557-563.
87. Hart C.A. (2006) *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter and Serratia sp. Principles and practice of clinical bacteriology, England, UK: John Wiley and Sons Ltd*, 2, 377-386.
88. Hazen K.C., Cutler J.E. (1979) Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 24(3), 661-666.
89. Hazen K.C., Cutler J.E. (1983) Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *Journal of biochemistry*, 94(3), 777-783.
90. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 15-25.
91. Hogan D.A., Kolter R. (2002) *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*, 296(5576), 2229-2232.

92. Hogan D.A., Vik Å., Kolter R. (2004) A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology*, 54(5), 1212-1223.
93. Holmes A.R., McNab R., Jenkinson H.F. (1996) *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin–receptor interactions. *Infection and Immunity*, 64:4680–4685.
94. Holmes A.R., Van der Wieien P., Cannon R.D., Ruske D., Dawes P. (2006) *Candida albicans* binds to saliva proteins selectively adsorbed to silicone. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 102: 488–494.
95. Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D., Tasto J.J., Jahnke B., Shoemaker R., et al. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2982-2992.
96. Hornby J.M., Kebaara B.W., Nickerson K.W. (2003) Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(7), 2366-2369.
97. Institut de Veille Sanitaire. (2006) Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales.
98. Irie Y., Parsek M.R (2008) Quorum Sensing and Microbial Biofilms, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322. 67 – 84.
99. Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A Jr., Merz W.G., Kelley J.I., Baqui A.A.M.A., Meiller T.F. (1999) Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1464–1468.
100. Jenkinson H.F., Douglas L.J. (2002) *Candida* interactions with bacterial biofilms. *Polymicrobial Infections and Disease* (Brogden KA & Guthmiller JM, eds), pp. 357–373. ASM Press, Washington, DC.
101. Jensen J., Muñoz P., Guinea J., Rodríguez-Créixems M., Peláez T., Bouza E. (2007) Mixed fungemia: incidence, risk factors, and mortality in a general hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 44(12), e109-e114.
102. Kaita H. (1989) Adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Fukuoka Shika Daigaku Gakkai zasshi*, 16(3), 407-422.
103. Kaitwatcharachai C. (2002) *Candida parapsilosis* peritonitis in patients on CAPD. *Mycopathologia*, 154(4), 181-184.

104. Kam A.P., Xu J. (2002) Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 43(1), 19-28.
105. Kennedy M.J., Volz P.A. (1985) Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infection and immunity*, 49(3), 654-663.
106. Kerr J.R., Taylor G.W., Rutman A., Hoiby N., Cole P.J., Wilson R. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of clinical pathology*, 52(5), 385-387.
107. Khot P.D., Suci P.A., Miller L.R., Nelson R.D., Tyler B.J. (2006) A small Subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotéricine B associated with differential regulation of ergosterol and β -1,6-glucan pathway genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 :3708–3716.
108. Kibber C. (2007) Évolution de l'épidémiologie des candidoses et aspergilloses invasives. *Médecine et maladies infectieuses*, 37:2-4.
109. Kirkpatrick W.R., Lopez-Ribot J.L., McAtee R.K., Patterson T.F. (2000) Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *Journal of clinical microbiology*, 38(2), 902-904.
110. Klotz S.A., Chasin B.S., Powell B., Gaur N.K., Lipke P.N. (2007) Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59(4), 401-406.
111. Klotz S.A., Rutten M.J., Smith R.L., Babcock S.R., Cunningham M.D. (1993). Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. *Microbial pathogenesis*, 14(2), 133-147.
112. 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. *Infection and immunity*, 70(2), 878-888.

113. Kuhn D.M., George T., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2002b) Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1773-1780.
114. Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Clark T. A., Pujol C., Chandra J., Hajjeh R. A., et al. (2004) *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerging infectious diseases*, 10(6), 1074.
115. Kumamoto C.A. (2002) *Candida* biofilms. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 608-611.
116. Kumamoto C.A., Vines M.D. (2005) Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annual Review of Microbiology*, 59:113-33.
117. La Fleur M.D., Kumamoto C.A., Lewis K. (2006) *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), 3839-3846.
118. Lanternier F., Lortholary O. (2010) Caspofungine. *Journal de Mycologie Médicale*, 20(3), 190-193.
119. Lawrence J.R., Korber D.R., Hoyle B.D., Costerton J.W., Caldwell D.E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology*, 173(20), 6558-6567.
120. Leake J.L., Dowd S.E., Wolcott R.D., Zischkau A.M., Sun Y. (2009) Identification of yeast in chronic wounds using new pathogen-detection technologies. *Journal of wound care*, 18(3), 103-108.
121. Levison M.E., Pitsakis P.G. (1987) Susceptibility to experimental *Candida albicans* urinary tract infection in the rat. *Journal of Infectious Diseases*, 155(5), 841-846.
122. Lewis K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5:48-56.
123. Lewis K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:999-1007.
124. Li X.Z., Hauer B., Rosche B. (2007) Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1255-1262.
125. Li X., Yan Z., Xu J. (2003) Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353-362.

126. Lolom I., Deblangy C., Capelle A., Guerinot W., Bouvet E., Barry B et al. (2009) Effect of a long-term quality improvement program on the risk of infection related to peripheral venous catheters. *Presse medicale (Paris, France: 1983)*, 38(1), 34-42.
127. Lynch A.S., Robertson G.T. (2008) Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review of Medicine*, 59, 415-428.
128. Mah T.F.C., O'Toole G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
129. Mahfouz T., Anaissie E. (2003) Prevention of fungal infections in the immunocompromised host. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 4(8), 974-990.
130. Maki D.G., Kluger D.M., Crnich C.J. (2006) The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. In *Mayo Clinic Proceedings*, 81(9), 1159-1171).
131. Marcon M.J. (1997) Clinical and laboratory diagnostic features of *Bordetella sp.*—pertussis and beyond. *Clinical Microbiology Newsletter*, 19(24), 185-191.
132. Marrie T.J., Nelligan J., Costerton J.W. (1982) A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*, 66(6), 1339-1341.
133. McAlester G., O'Gara F., Morrissey J.P. (2008) Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology*, 57(5), 563-569.
134. McCourtie J.A.N.E., Douglas L.J. (1985) Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. *Journal of general microbiology*, 131(3), 495-503.
135. McLean R.J., Pierson L.S., Fuqua C. (2004) A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of microbiological methods*, 58(3), 351-360.
136. Mermel L.A., McCormick R.D., Springman S.R., Maki D.G. (1991) The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary artery Swan-Ganz catheters: a prospective study utilizing molecular subtyping. *The American journal of medicine*, 91(3), S197-S205.

137. Mimoz O., Rayeh F., Debaene B. (2001) Infections liées aux cathéters veineux en réanimation. Physiopathologie, diagnostic, traitement et prévention. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*, 20(6), 520-536.
138. Mirabaud M.I. (2003) *Entérobactéries à β -lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996*. Thèse de Doctorat en médecine. Université de Genève
139. Molin S., Tolker-Nielsen T., Hansen S.K., Ghannoum M., O'Toole G.A. (2004) Microbial interactions in mixed-species biofilms. *Microbial biofilms*, 206-221.
140. Monds R.D., 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.
141. Mukherjee P.K., Chandra J. (2004) *Candida* biofilm resistance. *Drug resistance updates*, 7(4), 301-309.
142. Nace H.L., Horn D., Neofytos D. (2009) Epidemiology and outcome of multiple-species candidemia at a tertiary care center between 2004 and 2007. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(3), 289-294.
143. Nasser W., Reverchon S. (2007) New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(2), 381-390.
144. Nett J.E., Lepak A.J., Marchillo K., Andes D.R. (2009) Time course global gene expression analysis of an *in vivo Candida* biofilm. *Journal of infectious diseases*, 200(2), 307-313.
145. Nolte F.S., Parkinson T., Falconer D.J., Dix S., Williams J., Gilmore C., et al. (1997) Isolation and characterization of fluconazole-and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(1), 196-199.
146. O'Sullivan J.M., Jenkinson H.F., Cannon R.D. (2000) Adhesion of *Candida albicans* to oral *streptococci* is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology* 146: 41–48.
147. O'Toole G A (2003). To build a biofilm. *Journal of bacteriology*; 185 (9) : 2687 - 2689.

148. O'Toole G.A., Gibbs K.A., Hager P.W., Phibbs P.V. Jr, Kolter R. (2000) The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182:425–31.
149. Oh S.W., Chen P.C., Kang D.H. (2007) Biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* grown in artificial broth and infant milk formula on plastic surface. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 15(4), 311-319.
150. Oliver A., Cantón R., Campo P., Baquero F., Blázquez J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288(5469), 1251-1253.
151. Ortega M., Marco F., Soriano A., Almela M., Martínez J.A., López J., et al. (2011) *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *Journal of Hospital Infection*, 77(2), 157-161.
152. O'Shaughnessy E.M., Lyman C.A., Walsh T.J. (2009) Amphotericin B: Polyene resistance mechanisms. In *Antimicrobial drug resistance* (pp. 295-305). Humana Press.
153. Ostrosky-Zeichner L., Rex J. H., Pappas P. G., Hamill R. J., Larsen R. A., Horowitz H. W., et al. (2003) Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(10), 3149-3154.
154. Pagotto F.J., Nazarowec-White M., Bidawid S., Farber J.M. (2003) *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Food Protection*®, 66(3), 370-375.
155. Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 538-582.
156. Peleg A.Y., Hogan D.A., Mylonakis E. (2010) Medically important bacterial-fungal interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 340-349.
157. Pemán J., Cantón E., Quindós G., Eraso E., Alcoba J., Guinea J., et al. (2012) Epidemiology, species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(5), 1181-1187.

158. Perloth J., Choi B., Spellberg B. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, 45: 321–346.
159. Peters B.M., Jabra-Rizk M. A., Scheper M.A., Leid J.G., Costerton J.W., Shirtliff M.E. (2010) Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 493-503.
160. Peters G., Locci R., Pulverer G. (1982) Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *Journal of Infectious Diseases*, 146(4), 479-482.
161. Pfaller M.A., Chaturvedi V., Diekema D.J., Ghannoum M.A., Holliday N.M., Killian S.B., et al. (2008) Clinical evaluation of the sensititre yeast one colorimetric antifungal panel for antifungal susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *Journal of clinical microbiology*, 46(7), 2155-2159.
162. Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., Newell V.A., Ellis D., Tullio V., et al. (2010) Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of clinical microbiology*, 48(4), 1366-1377.
163. Pfaller M.A., Diekema D.J., Messer S.A., Boyken L., Hollis R.J., Jones R.N. (2003) *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 78-83.
164. Pfaller M.A., Jones R.N., Doern G.V., Fluit A.C., Verhoef J., Sader H.S., et al. (1999) International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 35(1), 19-25.
165. Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L., Tendolkar S., Hollis R.J., Diekema D. J. (2004) Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *Journal of clinical microbiology*, 42(7), 3142-3146.

166. Pfaller M.A., Moet G.J., Messer S.A., Jones R.N., Castanheira M. (2011) Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *Journal of clinical microbiology*, 49(1), 396-399.
167. Poulain D. (2013) *Candida albicans*, plasticité et pathogénie. *Revue Francophone des Laboratoires*, (450), 37-46.
168. Pruitt Jr B.A., McManus A.T., Kim S.H., Goodwin C.W. (1998) Burn wound infections: current status. *World journal of surgery*, 22(2), 135-145.
169. Pulimood S., Ganesan L., Alangaden G., Chandrasekar P. (2002) Polymicrobial candidemia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 44(4), 353-357.
170. Purevdorj-Gage L., Costerton J.W., Stoodley P. (2005) Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology*, 151:1569–1576.
171. Quindós G. (2014) Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista iberoamericana de micología*, 31(1), 42-48.
172. Quinet B. (2006) Abord veineux de longue durée: épidémiologie, diagnostic, prévention et traitement des complications infectieuses. *Archives de pédiatrie*, 13(6), 718-720.
173. Raad I.I., Bodey G.P. (1992) Infectious complications of indwelling vascular catheters. *Clinical infectious diseases*, 197-208.
174. RAISIN. (2008) Surveillance des bactériémies nosocomiales en France. Résultats 2004. INVS, 36 p.
175. Ramage G., Martínez J.P., López-Ribot J.L. (2006) *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS yeast research*, 6(7), 979-986.
176. Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., López-Ribot J.L. (2005) *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 633-638.
177. Ramage G., Walle K.V., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L. (2001) Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*, 18(4), 163-170.

178. Ramage G., López-Rib J. L. (2005) Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. In *Antifungal Agents* (pp. 71-79). Humana Press.
179. Rex J.H., Walsh T.J., Sobel J.D., Filler S.G., Pappas P.G., Dismukes W.E., Edwards J.E. (2000) Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clinical infectious diseases*, 30(4), 662-678.
180. Romano J.D., Kolter R. (2005) *Pseudomonas*–*Saccharomyces* interactions: influence of fungal metabolism on bacterial physiology and survival. *Journal of Bacteriology*, 187: 940–948.
181. Ross J.F. (2010) La réponse au farnésol de *Candida albicans*: production de biofilms et parenté génétique. Mémoire de Maîtrise en Microbiologie et Immunologie, *Université de Montréal*.
182. Rupp C.J., Fux C.A., Stoodley P. (2005) Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:2175–2178.
183. Saá-Ibusquiza P., Herrera J.J., Vázquez-Sánchez D., Cabo M.L. (2012) Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida* *Food Control*, 25(1), 202-210.
184. Safdar N., Kluger D.M., Maki D.G. (2002) A review of risk factors for catheter-related bloodstream infection caused by percutaneously inserted, noncuffed central venous catheters: implications for preventive strategies. *Medicine*, 81(6), 466-479.
185. Samonis G., Gikas A., Toloudis P., Maraki S., Vrentzos G., Tselentis Y., et al. (1994) Prospective study of the impact of broad-spectrum antibiotics on the yeast flora of the human gut. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(8), 665-667.
186. Sato T., Watanabe T., Mikami T., Matsumoto T. (2004) Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 751-752.

187. Seddiki S.M.L., 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. *International journal of general medicine*, 6, 1.
188. Seddiki S.M.L. (2014) Evaluation de la formation des biofilms de *Candida* sp. isolé des dispositifs médicaux au CHU de Sidi Bel Abes. Thèse de doctorat en biologie. Université de Tlemcen.
189. Shirliff M.E., Peters B.M., Jabra-Rizk M.A. (2009) Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 299: 1–8.
190. Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D W., Azeredo J. (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.
191. Sobel J.D., Myers P.G., Kaye D., Levison M.E. (1981) Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases*, 143(1), 76-82.
192. Stepanović S., Ćirković I., Ranin L. (2004) Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428-432.
193. Stephan F., Bah M.S., Desterke C., Rezaiguia-Delclaux S., Foulet F., Duvaldestin P., Bretagne S. (2002) Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clinical Infectious Diseases*, 35 : 1477–1483
194. Stoodley P., Debeer D., Lewandowski Z. (1994) Liquid Flow in Biofilm Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2711-2716.
195. Sutherland I.W. (2001) The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222-227.
196. Tavanti A., Davidson A.D., Gow N.A., Maiden M.C., Odds F.C. (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 284-292.
197. Thein Z.M., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. (2006) Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 51(8), 672-680.

198. Thein Z.M., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. (2007) Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *Apmis*, 115(11), 1241-1251.
199. Thein Z.M., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. (2005) Oral bacteria modulate *Candida* biofilm formation. The International Association for Dental Research - 20th Annual Scientific Meeting of the Southeast Asia Division and Southeast Asia Association for Dental Education - 16th Annual Scientific Meeting, Sept. 1-4.
200. Thein Z.M., Seneviratne C.J., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. (2009) Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses*, 52(6), 467-475.
201. Timsit J.F., Bruneel F., Cheval C., Mamzer M.F., Garrouste-Orgeas M., Wolff M., et al. (1999) Use of tunneled femoral catheters to prevent catheter-related infection a randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 130(9), 729-735.
202. Timsit J.F., Sebille V., Farkas J.C., Misset B., Martin J.B., Chevret S., Carlet J. (1996) Effect of subcutaneous tunneling on internal jugular catheter-related sepsis in critically ill patients: a prospective randomized multicenter study. *Jama*, 276(17), 1416-1420.
203. Tortorano A.M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C.C., Faure O., et al. (2004) Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(4), 317-322.
204. Toubas D. (2013) Epidémiologie des candidoses invasives. *Revue Francophone des Laboratoires*, (450), 27-36.
205. Tremblay S. (2007) Étude moléculaire du recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques. Doctoral dissertation. Université Laval.
206. Van der Mei H.C., Free R.H., Elving G.J., Van Weissenbruch R., Albers F.W.J., Busscher H.J. (2000) Effect of probiotic bacteria on prevalence of yeasts in oropharyngeal biofilms on silicone rubber voice prostheses *in vitro*. *Journal of Medical Microbiology*, 49(8), 713-718.

207. Van Merode A.E.J., Pothoven D.C., Van Der Mei H.C., Busscher H.J., Krom B.P. (2007) Surface charge influences enterococcal prevalence in mixed-species biofilms. *Journal of applied microbiology*, 102(5), 1254-1260.
208. Viscoli C., Girmenia C., Marinus A., Collette L., Martino P., Vandercam B., et al. (1999) Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clinical infectious diseases*, 28(5), 1071-1079.
209. Wagner G., Ottesen B. (1982) Vaginal physiology during menstruation. *Annals of internal medicine*, 96(6-Part-2), 921-923.
210. Walters M.C., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Stewart P.S. (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(1), 317-323.
211. Wargo M.J., Hogan D.A. (2006) Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Current opinion in microbiology*, 9(4), 359-364.
212. Waters C.M., Bassler B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology*, 21:319–346.
213. Watnick P.I., Kolter R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular biology*. 34(3):586–95.
214. Weber K., Sohr R., Schulz B., Fleischhacker M., Ruhnke M. (2008) Secretion of E, E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(5), 1859-1861.
215. Weems J.J. (1992) *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical infectious diseases*, 14(3), 756-766.
216. Wenzel R.P., Gennings C. (2005) Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clinical infectious diseases*, 41(Supplément 6), S389-S393.

217. Williams P., Cámara M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current opinion in microbiology*, 12(2), 182-191.
218. Williamson D.R., Albert M., Perreault M.M., Delisle M.S., Muscedere J., Rotstein C., et al. (2011) The relationship between *Candida* species cultured from the respiratory tract and systemic inflammation in critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Canadian Journal of Anesthesia*, 58(3), 275-284.
219. Winans S.C., Bassler B.L. (2002) Mob psychology. *Journal of bacteriology*, 184(4), 873-883.
220. Wingard J.R., Merz W.G., Rinaldi M.G., Johnson T.R., Karp J.E., Saral R. (1991) Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *New England Journal of Medicine*, 325(18), 1274-1277.
221. Xu J., Mitchell T.G., Vilgalys R. (1999a) PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans*. *Molecular Ecology*, 8, 59–73.
222. Xu J., Vilgalys R., Mitchell T.G. (1999b) Lack of genetic differentiation between two geographic samples of *Candida albicans* isolated from patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Bacteriology*, 181, 1369–1373.
223. Xu J., Vilgalys R., Mitchell T.G. (2000) Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Ecology*, 9, 1471–1481.
224. Yang Y.L. (2003) Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 36(4), 223-228.
225. Yera H., Poulain D., Lefebvre A., Camus D., Sendid B. (2004) Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. *Journal of clinical pathology*, 57(2), 196-198.

Annexes

Annexe N°1 :

Questionnaire

Prélèvement N°:

Date:

Service :

Sexe: Homme Femme

Age :

Duré d'implantation du cathéter :

Pathologies immunosuppressives:

Non.

Oui (détails) : _____

Antibiothérapie:

Non.

Oui (détails) : _____

Signe d'inflammation local ou générale :

Non.

Oui (Précisions): _____

Annexe N°2.1 : Composition du RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®)

Composants g/L	
Sels inorganiques	
Nitrate de calcium • 4H ₂ O	0,1
Sulfate de magnésium (anhydre)	0,04884
chlorure de potassium	0,4
Bicarbonate de sodium	-
Chlorure de sodium	6
Phosphate disodique (anhydre)	0,8
Acides aminés	
L-Alanyl-L-Glutamine	-
L-Arginine	0,2
L-Asparagine (anhydre)	0,05
Acide L-aspartique	0,02
L-cystine • 2HCl	0,0652
Acide L-glutamique	0,02
L-Glutamine	0,3
Glycine	0,01
L-Histidine	0,015
Hydroxy-L-Proline	0,02
L-Isoleucine	0,05
L-Leucine	0,05
L-Lysine • HCl	0,04
L-Méthionine	0,015
L-Phénylalanine	0,015
L-Proline	0,02
L-Serine	0,03
L-Thréonine	0,02
L-Tryptophane	0,005
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0,02883
L-Valine	0,02
Vitamines	
D-biotine	0,0002
Chlorure de choline	0,003
Acide folique	0,001
Myo-Inositol	0,035
Niacinamide	0,001
Acide p-aminobenzoïque	0,001
D-acide pantothénique (hémicalcium)	0,00025
Pyridoxine• HCl	0,001
Riboflavine	0,0002
Thiamine• HCl	0,001
Vitamine B12	0,000005
Autres	
D-Glucose	2
Glutathion (réduit)	0,001
Rouge de phénol • Na	0,0053
Suppléments	
L-Glutamine	-
Le bicarbonate de sodium	2

Annexe N°2.1 : Composition du BHIB (Sigma-Aldrich®)

Composants	g/L
Cerveaux de veau (perfusion de 200g)	12,5
Cœur de bœuf (perfusion de 250g)	5,0
Peptone	10,0
Chlorure de sodium	5,0
D(+) Glucose	2,0
Phosphate disodique	2,5

Annexe N°3 :

Prélèvements (Cardiologie)	sexe	Durée de pose	âge	pathologies	Signes d'inflammation	ATB	Espèces de levures isolées	Infectivités
P1	Femme	2j	76	-	-	-	<i>C. parapsilosis et C.famata</i>	Colonisation
P2	Femme	2j	79	-	-	CLAFORAN	<i>C. parapsilosis</i>	Colonisation
P3	Homme	2j	58	Diabète	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P4	Homme	2j	74	Diabète	-	-	<i>C. parapsilosis et C.famata</i>	contamination
P5	Homme	7j	89	-	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P6	Homme	5j	70	-	-	CLAFORAN	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P7	Homme	6j	47	Diabète	+	-	<i>C. albicans</i>	Infection
P8	Homme	5j	56	Diabète	-	CEFACIDAL	<i>C. glabrata</i>	contamination
P9	Homme	4j	56	HTA	+	CEFACIDAL	<i>C. albicans</i>	Infection
P10	Homme	moins de 24h	54	Diabète	+	-	<i>C. parapsilosis</i>	Infection
P11	Femme	6	31	-	-	CLAFORAN	<i>C. parapsilosis</i>	contamination

Prélèvements (chirurgie A et B)	sexe	Durée de pose	âge	pathologies	Signes d'inflammation	ATB	Espèces de levures isolées	Infectivités
P1	Femme	2 j	33	-	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P2	Femme	2j	46	-	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P3	Femme	2j	40	-	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P4	Femme	2j	42	-	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P5	Femme	2j	44	-	-	CEFACIDAL	<i>C. glabrata</i>	contamination
P6	Femme	2j	68	Diabète HTA	-	CEFACIDAL	<i>C. glabrata</i>	contamination
P7	Femme	2j	39	-	-	CEFACIDAL	<i>C. glabrata</i>	contamination
P8	Femme	2j	37	-	-	CEFACIDAL	<i>C. glabrata</i>	contamination
P9	Femme	2j	50	HTA	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P10	Homme	2j	44	-	-	GENTAMICINE, FLAGYL	<i>C. albicans</i>	colonisation
P11	Femme	2j	45	HTA	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P12	Femme	3j	36	-	-	CEFACIDAL	<i>C. albicans et C. parapsilosis</i>	colonisation
P13	Homme	3j	34	-	+	CEFACIDAL	<i>C. albicans et C. parapsilosis</i>	infection
P14	Femme	2j	20	-	-	CEFACIDAL	<i>C. albicans et C. parapsilosis</i>	colonisation
P15	Femme	3j	47	-	-	CEFACIDAL	<i>C. albicans et C. parapsilosis</i>	colonisation

P16	Homme	4j	37	-	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P17	Femme	2j	48	-	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	contamination
P18	Homme	2j	41	-	-	CEFACIDAL	<i>C. parapsilosis</i>	colonisation