



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr BELKAÏD-Tlemcen



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Thèse

En vue de l'obtention d'un diplôme de

Doctorat de troisième cycle

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Présentée par

M^{lle} KENDIL Wafaa

Émergence d'agents pathogènes résistants aux antimicrobiens dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse au CHU de Tlemcen : Impact des biofilms mixtes *Candida albicans*/bactéries sur cathéters et étude de leur inhibition

Soutenue le : 19/ 03/ 2026

Devant le jury composé de :

Président	Pr. AZZI Rachid	Université de Tlemcen
Directeur de thèse	Pr. SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib	Université de Naâma
Examineurs	Dr. KAZI-TANI BABA-AHMED Zakia Zahira	Université de Tlemcen
	Pr. MERGHACHE Djamila	Université de Tlemcen
	Dr. DERGAL Fayçal	CRAPC - Tipaza
	Dr. KEBDANI Mohammed	Université de Naâma

Année universitaire : 2025-2026

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

ملخص

تركز هذه الدراسة، التي أجريت في قسم أمراض الدم وقسم أمراض الكلى وغسيل الكلى في مستشفى تلمسان الجامعي، على الأغشية الحيوية المختلطة المرتبطة باستخدام القسطرة، ولا سيما تلك التي تتضمن *C. albicans* والبكتيريا معا. كشف تحليل 50 قسطرة تم جمعها عن معدل التغيرات المرتبطة بالجراثيم بلغ 76٪، تميز بغلبة التغيرات متعددة الميكروبات. كان الإستعمار الجرثومي هو الشكل الأكثر شيوعاً (32٪)، يليه التوضع الجرثومي (26٪) ثم الإصابة الجرثومية (18٪). وتبين ان خطر العدوى يرتبط بنوع القسطرة ومدة وضعها وعمر المريض والأمراض المصاحبة. أظهرت نتائج تحديد الميكروبات أن جميع عزلات *C. albicans* كانت مرفقة بوجود البكتيريا. كشف التصنيف الجزيئي لسلاسل هذه الخميرة بواسطة RAPD-PCR أنها غير مرتبطة جينياً. أظهر تحديد MIC فعالية الأمفوتريسين B والكاسيوفونجين ضد سلاسل *C. albicans*؛ بالإضافة الى ذلك، لوحظت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية عند العديد من السلالات البكتيرية. من ناحية أخرى، أظهر تقييم إمكانية تكوين الأغشية الحيوية أن جميع السلالات كانت قادرة على تشكيل أغشية حيوية وأن التفاعلات بين *C. albicans* والبكتيريا كانت شديدة التباين، وتغير على حسب السلالة والوقت. حفز تكوين الغشاء الحيوي النشاط التحليلي للفوسفوليبيز والبروتيناز عند *C. albicans* بعد تقييم مقارن لهذه الأنشطة عند السلالات الحرة وداخل الأغشية الحيوية باستخدام طريقة معدلة. تم تأكيد صحة الطريقة بواسطة التحليل الطيفي رامان (Raman)، الذي أظهر توزيعاً متجانساً للغشاء الحيوي على سطح الركيزة، وكشف التحليل المجهرى عن البنية ثلاثية الأبعاد لهذا الغشاء الحيوي. كشف تقييم النشاط المضاد للميكروبات لثلاثة سوائل أيونية عن حساسية تجاهها عند جميع السلالات التي تم اختبارها، باستثناء البكتيريا سالبة الجرام متعددة المقاومة. [P66614][فوسفينات] الذي أظهر أفضل توافق دموي الى غاية تركيز 2000 ميكروغرام/مل، وبالتالي تم اختياره لاختبارات مضادة للأغشية الحيوية التي أجريت على الغشاء الحيوي المختلط *C. albicans/S. haemolyticus* حيث لوحظ التأثير المثبط الأمثل خلال مرحلة الالتصاق (4 ساعات)، مع SMIC₅₀ بلغ 15 ميكروغرام/مل ضد الغشاء الحيوي المختلط. كشف رسم خرائط رامان بمساعدة الذكاء الاصطناعي عن حساسية تفاضلية بين النوعين تجاه العلاج بـ [P66614][فوسفينات]. أدى هذا العلاج إلى تثبيط التحول المورفولوجي لـ *C. albicans*، وتقليل المصفوفة البوليمرية الخارجية وتسبب في تحلل خلايا *S. haemolyticus*.

الكلمات المفتاحية: القسطرة، العدوى، أمراض الدم السريرية، أمراض الكلى وغسيل الكلى، الغشاء الحيوي المختلط، النشاط التحليلي، التثبيط، سائل أيوني.

Résumé

Cette étude, réalisée dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse du CHU de Tlemcen, porte sur les biofilms mixtes associés à l'utilisation des cathéters, en particulier ceux du type *C. albicans*-bactéries.

L'analyse de 50 cathéters prélevés a révélé un taux d'altération de 76%, caractérisé par une prédominance des altérations polymicrobiennes. La colonisation était la forme la plus fréquente (32%), suivie par la contamination (26%) et de l'infection (18%). Le type d'infectivité variait en fonction du type de cathéter, le temps de pose, l'âge des patients et la comorbidité. L'identification microbienne a montré que toutes les souches de *C. albicans* isolées étaient associées à des bactéries. Le typage moléculaire des souches de *C. albicans* par RAPD-PCR a révélé que les patients étaient colonisés par des souches non apparentées. La détermination des CMI a démontré l'efficacité de l'amphotéricine B et de la Caspofungine contre les souches de *C. albicans*, toutefois, une résistance multiple aux antibiotiques a été constatée chez plusieurs isolats bactériens.

L'analyse du potentiel de formation de biofilm a révélé que toutes les souches étaient capables de former des biofilms. De plus, les interactions entre *C. albicans* et les bactéries étaient très hétérogènes, souche-dépendantes et temporellement variables. L'activité hydrolytique des phospholipases et des protéinases de *C. albicans* a été stimulée par la formation de biofilm, comme l'a démontré une évaluation comparative de ces activités en conditions planctoniques et sessiles, réalisée à l'aide d'une méthode adaptée. La méthode a été validée par la spectroscopie Raman qui a mis en évidence une répartition uniforme du biofilm sur le substrat. L'examen microscopique a révélé sa structure en trois dimensions. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de trois liquides ioniques a révélé une sensibilité de l'ensemble des souches testées, à l'exception des bactéries à Gram négatif multi-résistantes. [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], présentant la meilleure hémocompatibilité (jusqu'à 2000 µg/mL), a été sélectionné pour les tests antibiofilms réalisés contre le biofilm mixte *C. albicans*/*S. haemolyticus*. L'effet optimal d'inhibition a été observé lors de la phase d'adhésion (4h), avec une SCMI₅₀ de 15 µg/mL contre le biofilm mixte. La cartographie Raman assistée par l'intelligence artificielle a mis en évidence une sensibilité différentielle des deux espèces au traitement par [P₆₆₆₁₄][Phosphinate]. Ce traitement a inhibé la transition morphologique de *C. albicans*, réduit la matrice exopolymérique et entraîné une lyse des cellules de *S. haemolyticus*.

Mots clés : Cathéter, Hématologie clinique, Néphrologie-hémodialyse, infectivité, activité hydrolytique, biofilms mixtes, inhibition, liquide ionique.

Abstract

This study, conducted in the clinical haematology and nephrology-haemodialysis departments of Tlemcen University Hospital, focuses on mixed biofilms associated with catheters use, particularly those involving *C. albicans* and bacterial species.

Analysis of 50 collected catheters revealed a 76% alteration rate, characterised by a predominance of polymicrobial alterations. Colonisation was the most common form (32%), followed by contamination (26%) and infection (18%). Infectivity types varied according to the catheter type, the duration of placement, the patient age and comorbidity. Microbial identification showed that all *C. albicans* isolates were associated with bacteria. Molecular typing of *C. albicans* strains by RAPD-PCR revealed that patients were colonised by unrelated strains. MIC determination showed the efficacy of amphotericin B and caspofungin against *C. albicans* strains; however, multidrug resistance to antibiotics was observed in several bacteria. Evaluation of biofilm formation potential revealed that all strains were biofilm-forming and that interactions between *C. albicans* and bacteria were highly heterogeneous, strain and time-dependent. On the other hand, biofilm formation stimulated the hydrolytic activity of phospholipases and proteinases in *C. albicans* following a comparative assessment of these activities under planktonic and sessile conditions using an adapted method. The validity of the method was confirmed by Raman spectroscopy, which demonstrated a homogeneous distribution of biofilm over the substrate surface, and microscopic analysis revealed the three-dimensional structure of this biofilm.

The evaluation of the antimicrobial activity of three ionic liquids revealed sensitivity in all strains tested, except for multi-resistant Gram-negative bacteria. [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] which exhibited the best hemo-compatibility up to 2000 µg/mL, was selected for the antibiofilm tests conducted against the mixed biofilm *C. albicans*/*S. haemolyticus*. The optimal inhibitory effect was observed during the adhesion phase (4 hours), with an SMIC₅₀ of 15 µg/mL against the mixed biofilm. Artificial intelligence-assisted Raman mapping revealed a differential sensitivity of the two species to treatment with [P₆₆₆₁₄][Phosphinate]. This treatment inhibited the morphological transition of *C. albicans*, reduced the exopolymeric matrix and caused lysis of *S. haemolyticus* cells.

Keywords: Catheter, clinical haematology, nephrology-haemodialysis, infectivity, hydrolytic activity, mixed biofilms, inhibition, ionic liquid.

Dédicaces

À l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à
Mes parents

Aucun mot ne saurait traduire la reconnaissance que je leur porte pour leurs sacrifices et leur amour, qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui

À ma source de force, à celui qui a partagé avec moi les moments les plus émotionnels de ce parcours ...à mon cher père, ce travail est le tien, c'est le résultat de longues années de sacrifices et d'encouragement pour m'aider à poursuivre mes études et réaliser mon rêve.

À la lune qui éclaire mon chemin et m'apaise dans les nuits de doute...à ma chère mère, pour ton amour infini, tes prières silencieuses et les encouragements qui m'ont portée jusqu'au bout de ce parcours.

À mes deux chers frères Zakaria et Anes, pour leurs encouragements et leur soutien moral.

À tous ceux qui, par un mot ou un geste, m'ont donné la force de persévérer.

À la mémoire de ma chère grand-mère, qui nous a quitté au cours de la réalisation de ce travail, emportée par une infection liée aux soins. Sa perte a donné un sens encore plus profond à mes recherches.

Puisse ce travail être un hommage à sa mémoire ainsi qu'à toutes les personnes qui souffrent de telles infections, que Dieu nous aide à apaiser leurs souffrances, qu'il les protège et leur accorde des jours meilleurs.

Wafaa

Remerciements

Je tiens tous d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers mon directeur de thèse **Monsieur SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib**, Professeur de biochimie à l'université de Naâma, pour son soutien constant, ses conseils éclairés et son encouragement indéfectible tout au long de ce parcours. Son expertise, sa patience et son dévouement ont été des atouts précieux qui ont énormément contribué à l'acheminement de cette recherche. Qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Je remercie **Monsieur AZZI Rachid**, Professeur au département de biologie à l'université de Tlemcen qui nous a fait l'honneur de présider ce jury. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse et pour les conseils que vous m'avez dispensés tout au long de mon parcours universitaire. Je vous exprime ici toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Ma profonde reconnaissance s'adresse également à **Madame KAZI-TANI BABA-AHMED Zakia Zahira**, Maître de conférences classe A de microbiologie au Département de Biologie, de l'université de Tlemcen pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner cette thèse. Je lui exprime toute la gratitude pour ses précieux conseils, sa bienveillance et la qualité de son enseignement qui ont profondément marqué mon parcours universitaire.

J'exprime mes remerciements à **Madame MERGHACHE Djamila**, Professeur de biochimie au département de Biologie de l'université de Tlemcen pour avoir accepté d'examiner et de discuter ce travail. Je lui suis profondément reconnaissante pour le temps qu'elle y consacre et pour l'intérêt qu'elle porte à ma recherche.

Ma profonde gratitude s'adresse également à **Monsieur DERGAL Fayçal**, Directeur de recherche au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) à Tipaza d'avoir accepté d'examiner ce travail, ainsi que pour son soutien, son aide précieuse et sa collaboration essentielle à la réussite de ce projet. Votre contribution a été déterminante pour sa réalisation.

Je remercie **Monsieur KEBDANI Mohammed**, Maître de conférences classe A de microbiologie à l'université de Naâma, pour avoir accepté d'examiner cette thèse. Je vous exprime toute ma gratitude et ma sincère reconnaissance.

La concrétisation de ce projet n'aurait pas été possible sans le soutien de nombreuses personnes, à qui je tiens à exprimer toute ma reconnaissance :

À **Monsieur MAHDAD Yassine Moustafa**, Maître de conférences classe A et **Monsieur MADIOUNI Mohammed Rida**, Maître de conférences classe B à l'université de Naâma pour leur collaboration fructueuse, leur aide précieuse qui ont été essentielles à la réalisation de ce travail. Je vous adresse toute ma gratitude.

À **Monsieur CHIALI Anisse**, Maître de conférences à l'École Supérieure en Sciences Appliquées de Tlemcen, Pour son aide précieuse et sa collaboration. Je lui exprime ici ma profonde reconnaissance.

À **Madame MEZOUAR Dounia**, Directrice du laboratoire LAPSAB et **Madame BOUCHERIT-OTMANI Zahia**, professeur de biochimie au département de biologie et responsable de l'équipe 1 du laboratoire LAPSAB à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir donné l'opportunité de rejoindre l'équipe 1 afin de réaliser la partie expérimentale de ma thèse.

Aux directeurs, membres et ingénieurs des Laboratoires de génétique appliquée à l'agriculture, à l'écologie et à la santé publique (GenApaGie) ; Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO), de l'université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen, ainsi qu'au laboratoire de gestion durable des ressources naturelles dans les zones arides et semi-arides, université de Naama, pour leur accueil, leur appui technique et la richesse de leurs échanges scientifiques. J'exprime également la reconnaissance au Centre de Mycologie Médicale des hôpitaux universitaires, Université Case Western Reserve, Cleveland, États-Unis, pour leur précieuse collaboration et l'ouverture internationale qu'ils ont apportée à ce travail.

Enfin, à tous les doctorants, techniciens et membres du laboratoire "LAPSAB", travailler à vos côtés a été un véritable plaisir. Je vous remercie sincèrement pour votre soutien à toute épreuve. Votre amitié et vos encouragements m'ont été une source précieuse de motivation.

Sommaire

Introduction	1
Première partie Synthèse bibliographique	4
Deuxième partie Matériel et méthodes	17
1. Recherche des altérations microbiennes mixtes levures/bactéries des cathéters.....	18
1.1. Échantillonnage.....	18
1.2. Étude des infectivités des cathéters.....	18
1.3. Isolement et identification des micro-organismes	19
1.3.1. Identification des levures	19
1.3.2. Identification des bactéries	20
1.4. Typage moléculaire des souches de <i>C. albicans</i> par RAPD-PCR	21
1.4.1. Amplification par RAPD-PCR.....	21
1.4.2. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	21
1.5. Tests de sensibilité aux antimicrobiens.....	22
1.5.1. Sensibilité de <i>C. albicans</i> aux antifongiques	22
1.5.2. Sensibilité des bactéries co-isolées avec <i>C. albicans</i> aux antibiotiques	22
2. Tests de formation des biofilms de <i>C. albicans</i> et des bactéries co-isolées	23
2.1. Formation des biofilms	23
2.2. Quantification des biofilms formés.....	23
2.2.1. Évaluation de la biomasse par coloration au cristal violet	23
2.2.2. Mesure de l'activité métabolique par réduction du XTT	24
3. Activité hydrolytique de <i>C. albicans</i>	26
3.1. Évaluation en mode planctonique	26
3.1.1. Activité des phospholipases	26
3.1.2. Activité des protéinases.....	27
3.2. Évaluation en mode sessile	27
3.2.1. Pré-traitement des disques de silicone.....	27

3.2.2. Formation des biofilms et évaluation de l'activité hydrolytique.....	27
3.2.3. Analyse du biofilm par spectroscopie Raman.....	28
3.2.4. Analyse microscopique du biofilm	29
4. Inhibition des biofilms par des liquides ioniques	31
4.1. Préparation des liquides ioniques.....	31
4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	32
4.3. Test de l'effet hémolytique	32
4.4. Effet sur la viabilité cellulaire sessile	33
4.5. Effet sur la structure du biofilm	34
4.5.1. Analyse par cartographie Raman confocale assistée par un modèle d'apprentissage profond (Deep learning)	34
4.5.1.1. Analyse des images et quantification des couleurs	34
4.5.1.2. Traitement des données par un modèle d'apprentissage profond	35
4.5.1.2.1. Apprentissage profond non supervisé	35
4.5.1.2.2. Apprentissage profond supervisé	35
4.5.2. Examen par microscopie à fluorescence	36
4.5.3. Examen par microscopie électronique à balayage	37
4.6. Analyse statistique	37
Troisième partie Résultats et discussion	38
1. Altérations mixtes des cathéters par <i>Candida albicans</i> /bactéries.....	39
1.1. Collecte des cathéters.....	39
1.2. Détermination des types d'infectivité des cathéters.....	42
1.2.1. Infectivité et service hospitalier	44
1.2.2. Infectivité et type de cathéter	45
1.2.3. Infectivité et durée de pose des cathéters	46
1.2.4. Infectivité et tranches d'âge	47
1.3. Identification des microorganismes	51

1.3.1. Identification des levures	51
1.3.2. Identification des bactéries	52
1.4. Typage moléculaire des souches de <i>C. albicans</i> par RAPD-PCR	59
1.5. Tests de sensibilité aux antimicrobiens en mode planctonique	62
1.5.1. CMI des antifongiques vis-à-vis des souches de <i>C. albicans</i>	62
1.5.2. CMI des antibiotiques vis-à-vis des bactéries	63
2. Biofilms mono-et multi-espèces de <i>C. albicans</i> et des bactéries co-isolées d'un même cathéter.....	67
2.1. Quantification de la biomasse des biofilms	67
2.2. Évaluation de l'activité métabolique sessile	70
3. Activité hydrolytique de <i>C. albicans</i>	77
3.1. Activité hydrolytique des phospholipases	77
3.2. Activité hydrolytique des protéinases	79
3.3. Analyse par spectroscopie Raman	81
3.4. Analyse par imagerie microscopique	88
4. Inhibition des biofilms : effets des liquides ioniques	91
4.1. Effet antifongique et antibactérien.....	91
4.2. Effet hémolytique des liquides ioniques	93
4.3. Effet sur la viabilité cellulaire sessile : détermination des SCMIs	95
4.4. Analyse spectrale et chimique de l'inhibition par cartographie confocale Raman assistée par l'intelligence artificielle	96
4.4.1. Application de l'apprentissage non supervisé : auto-encodeur	102
4.4.2. Application de l'apprentissage supervisé : CNN	104
4.5. Effet sur la transition morphologique de <i>C. albicans</i>	106
4.6. Effet sur la structure et la morphologie du biofilm.....	107
Quatrième partie Conclusion générale.....	110
Cinquième partie Références bibliographiques	116
Annexes	147

Liste des figures

Figure 1.	Mécanismes de contamination des cathéters veineux (Doit et al., 2015).....	6
Figure 2.	Phases de formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> sur cathéters, visualisées par microscopie électronique à balayage. A : adhésion des cellules sur une surface. B : regroupement des cellules en structure tridimensionnelle. C : synthèse visible de la matière polysaccharidique. D : réticulation entre les différentes cellules par la matière polysaccharidique. E et F : maturation du biofilm (Rebiahi et al.,2014).....	8
Figure 3.	Sites d'action des différents types de phospholipases (Dongol et al., 2014).....	11
Figure 4.	Principaux cations et anions couramment utilisés dans les formulations des liquides ioniques (Cruz & Ciach, 2021).....	14
Figure 5.	Procédure de la coloration de Gram (Créée sur Biorender.com).....	20
Figure 6.	Flux de travail pour l'application de l'IA à l'analyse de l'inhibition du biofilm à partir des données de la cartographie Raman (Crée sur BioRender.com).....	36
Figure 7.	Altérations microbiennes des cathéters dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse du CHU de Tlemcen.....	41
Figure 8.	Types d'infectivité des cathéters en fonction des prélèvements microbiologiques positifs.....	43
Figure 9.	Répartition proportionnelle des types d'infectivité selon le service hospitalier.....	44
Figure 10.	Répartition des types d'infectivité selon le type du cathéter.....	45
Figure 11.	Répartition des types d'infectivité selon la durée de pose des cathéters.....	47
Figure 12.	Répartition des types d'infectivité selon les tranches d'âges des patients....	48
Figure 13.	Analyse des correspondances multiples de l'ensemble des facteurs cliniques, microbiologiques et dispositifs médicaux.....	50

Figure 14.	Micrographie optique des cellules fongiques de <i>C. albicans</i> montrant des blastospores (rondes et ovales), des cellules bourgeonnantes et des tubes germinatifs (Grossissement $\times 40$).....	52
Figure 15.	Pourcentages et micrographies des bactéries à Gram négatif (A) et à Gram positif (B) isolées des cathéters altérés, observées au microscope optique après coloration de Gram (Grossissement $\times 100$, à immersion).....	53
Figure 16.	Répartition des associations <i>Candida albicans</i> /bactérie selon le type d'infectivité.....	58
Figure 17.	Dendrogramme UPGMA de similarité génétique des souches de <i>C. albicans</i> obtenu à partir des profils RAPD-PCR.....	60
Figure 18.	Résultats de la quantification de la biomasse des biofilms mono et multi-espèces formés in vitro par <i>C. albicans</i> et les bactéries co-isolées par la méthode du cristal violet, respectivement après 24h et 48h d'incubation. Les lettres distinctes "a – h" signalent des variations significatives dans les résultats. Les barres verticales représentent l'écart type.....	68
Figure 19.	Activité métabolique des biofilms mono- et multi-espèces, formés in vitro par les co-isolats de <i>C. albicans</i> et des bactéries, évaluée par la réduction du XTT après 24h et 48h d'incubation. Les lettres distinctes "a - h" signalent des variations significatives dans les résultats. Les barres verticales représentent l'écart type.....	72
Figure 20.	Activité Plp moyenne chez les cellules planctoniques et sessiles de <i>C. albicans</i> en fonction des valeurs Pz. Barre verticale : écart type. Les lettres a et b indiquent les différences significatives entre les moyennes. Ca1-Ca5 : isolats de <i>C. albicans</i> . ATCC10231 : <i>C. albicans</i> ATCC10231.....	78
Figure 21.	Activité Prt moyenne chez les cellules planctoniques et sessiles de <i>C. albicans</i> en fonction des valeurs Pz. Barre verticale : écart type. Les lettres a et b indiquent les différences significatives entre les moyennes. Ca1-Ca5 : isolats de <i>C. albicans</i> . ATCC10231 : <i>C. albicans</i> ATCC10231.....	80
Figure 22.	Spectres Raman typiques des cellules de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 (vert), du silicone (rouge) et du sérum sanguin (bleu).....	82

Figure 23.	Spectres Raman combinés à la microscopie de deux zones du biofilm de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 formé sur un disque SCS. Zone 1 : opaque et zone 2 : claire.....	86
Figure 24.	Cartographie Raman du biofilm de <i>C. albicans</i> ATCC10231 formé sur le disque SCS. (A): Pics Raman de la zone utilisée pour la cartographie, (B): Imagerie Raman de la même zone étudiée (grossissement $\times 50$), (C): Projection de la carte Raman, (D): Cartographie complète de l'image Raman.....	87
Figure 25.	Taux d'hémolyse induit par les trois liquides ioniques étudiés à différentes concentrations.....	94
Figure 26.	Spectres Raman du disque en silicone (noir), de <i>Candida albicans</i> (vert) et de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (bleu).....	98
Figure 27.	Cartographies Raman et taux du biofilm mixte <i>C. albicans</i> (vert)/ <i>S. haemolyticus</i> (bleu) formé sur un support en silicone (noir). (A) : test de contrôle (témoin négatif), (B) : inhibition par le liquide ionique [P ₆₆₆₁₄][Phosphinate] à différents points temporels 4h, 24h et 48h.....	99
Figure 28.	Clustering K-means en 3D des éléments du biofilm mixte du témoin négatif (A). Clustering K-means en 2D de l'effet inhibiteur de [P ₆₆₆₁₄][Phosphinate] contre les biofilms mixtes de <i>C. albicans</i> et <i>S. haemolyticus</i> de 4h, 24h et 48h (B). <i>C. albicans</i> (vert), <i>S. haemolyticus</i> (bleu) et le support en silicone (noir).....	103

Liste des tableaux

Tableau 1.	Catégorisation des souches microbiennes selon leur capacité à former un biofilm, en fonction des valeurs d'absorbance (A) (Villar-Vidal et al., 2011).....	25
Tableau 2.	Catégorisation de l'activité enzymatique selon Price et al. (1982), basée sur les valeurs Pz.....	26
Tableau 3.	Structures chimiques des liquides ioniques utilisés.....	31
Tableau 4.	Prélèvements des cathéters et taux de positivité de leurs cultures dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse.....	40
Tableau 5.	Espèces bactériennes à Gram positif identifiées et leurs proportions.....	54
Tableau 6.	Espèces bactériennes à Gram négatif identifiées et leurs proportions	55
Tableau 7.	Présentation des altérations mixtes <i>C. albicans</i> / bactérie en fonction du service hospitalier et de la nature du dispositif médical.....	56
Tableau 8.	CMI de l'AmB et de la CAS vis-à-vis des cellules planctoniques de <i>C. albicans</i>	62
Tableau 9.	CMI des antibiotiques vis-à-vis des bactéries à Gram positif.....	64
Tableau 10.	CMI des antibiotiques vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.....	66
Tableau 11.	Attribution des bandes Raman du silicone, de <i>Candida albicans</i> et du sérum sanguin (Alfano et al., 1991; Benladghem et al., 2022; Cai et al., 2010; Hanlon et al., 2000; Jarvis & Goodacre, 2008; Keleştemur & Çulha, 2017; Kneipp et al., 2006; X. Li et al., 2001; Pichardo-Molina et al., 2007; Podstawka et al., 2004; Potocki et al., 2019; Sujith et al., 2009).....	84
Tableau 12.	Concentrations minimales inhibitrices des trois liquides ioniques vis-à-vis des co-isolats de <i>Candida albicans</i> et des bactéries. Ca1-Ca5 : souches de <i>C. albicans</i>	92
Tableau 13.	SCMIs du [P ₆₆₆₁₄][Phosphinate] et des antimicrobiens conventionnels Amphotéricine B et Vancomycine vis-à-vis des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> et <i>S. haemolyticus</i> . L'astérisque (*) indique des différences significatives selon le test statistique de Tukey à un seuil critique de 0,01.....	95
Tableau 14.	Matrice de confusion illustrant les performances du CNN pour la classification des 3 composantes de référence (<i>C. albicans</i> , <i>S. haemolyticus</i> et le support).....	105

Liste des photos

- Photo 1. Polymorphismes des souches *C. albicans* (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4 et Ca5) générés par les amorces A : OPA-16, B : OPB-05 et C : OPC-07. M : marqueur de taille.....59
- Photo 2. Micrographies d'un disque de silicone stérile (A) et d'un biofilm de *Candida albicans* ATCC10231 formé sur le disque (B, C), obtenus par microscope à fluorescence. H : Hyphe, B : Blastospores, M : Matrice extracellulaire...88
- Photo 3. Micrographies électroniques du biofilm de *C. albicans* ATCC10231 formé sur une surface en silicone. M : matrice extracellulaire, H : hyphe. La flèche indique l'empreinte d'un hyphe qui a adhéré à la surface avant de s'en détacher (Grossissement : (A) $\times 2000$, (B) $\times 10000$).....89
- Photo 4. Micrographies MF d'une culture non traitée de *C. albicans* (A) et d'une culture traitée avec une concentration sub-inhibitrice de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] (B). H : hyphes. La flèche indique les cellules de levure (blastospores).....106
- Photo 5. Micrographies MEB illustrant l'effet de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] sur le biofilm mixte *C. albicans*/*S. haemolyticus*. (A) : biofilm non traité (témoin négatif). (B et C) : biofilm traité en post-incubation. (D) : biofilm traité en pré-incubation. H : hyphes. Les flèches indiquent les cellules bactériennes.....108

Liste des abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la santé.

UFC : Unité formant colonie

Plp : Phospholipases

Prt: Protéinases

ACM : Analyse des correspondances multiples

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

AmB : Amphotéricine B

CAS : Caspofungine

VAN : Vancomycine

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

MOPS: Acide morpholinepropanesulfonique

BHIB: Brain heart infusion broth

PBS: Phosphate-buffered saline

XTT: 2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide

Pz : Precipitation zone

BSA: Bovine serum albumin

SCS: serum-coated silicone

DMSO: Diméthylsulfoxyde

SCMI : Concentration Minimale Inhibitrice Sessile

RGB: Red-Green-Blue

CNN : Convolutional Neural Network

Introduction

Chaque année, des millions de patients hospitalisés à travers le monde sont exposés au risque d'infections associées à l'usage des dispositifs médicaux, notamment les cathéters. Ces dispositifs constituent de véritables portes d'entrée pour les micro-organismes ; en effet, la capacité de ces micro-organismes à adhérer à une surface et à former des biofilms favorise leur colonisation. Par définition, le biofilm est un agrégat microbien organisé en une structure tridimensionnelle complexe, protégé par une matrice exopolymérique qui héberge ces micro-organismes sessiles (**Costerton et al., 1978**).

Dans ce même cadre, l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2022**), a publié une liste de pathogènes fongiques prioritaires, soulignant l'urgence de développer des stratégies de surveillance, de diagnostic et de traitement des infections fongiques ainsi que de leur résistance émergente. *Candida albicans*, une levure opportuniste, appartenant à cette liste, a été classée parmi les espèces présentant une priorité critique.

La virulence de *C. albicans* repose sur un ensemble de facteurs déterminants, notamment la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphale, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques ainsi que la capacité de former des biofilms. Ces mécanismes confèrent à cette espèce une persistance accrue dans l'hôte et une résistance aux traitements antifongiques (**Kadosh, 2019; Mohammadi et al., 2021; Naglik et al., 2019**).

Parallèlement, environ 20 % des infections à *C. albicans* associées aux cathéters sont polymicrobiennes ; la capacité de cette espèce à vivre en harmonie avec des bactéries pathogènes au sein des biofilms mixtes, combinée à la multirésistance croissante des bactéries contribue à l'échec des traitements conventionnels, soulignant ainsi leur potentiel infectieux élevé (**Carolus et al., 2019**).

Ce problème suscite aujourd'hui une attention particulière en termes de recherche, d'où l'urgence de mettre en place de nouvelles approches thérapeutiques ayant un effet à la fois antibiotique et antifongique. Dans cette perspective, l'attention de nombreux chercheurs s'est récemment portée sur les liquides ioniques en tant qu'agents antimicrobiens de nouvelle génération (**Anandkumar et al., 2020; Metelytsia et al., 2022; Vieira et al., 2021**).

Ces sels, composés d'un cation et d'un anion, liquides à température ambiante, se distinguent par des caractéristiques physico-chimiques exceptionnelles, telles que la stabilité thermique, la solubilité ajustable et une capacité de fonctionnalité importante qui offre la possibilité d'adapter leur structure à des exigences spécifiques (**Zhuo et al., 2024**). Bien que de nombreuses études

aient démontré leur efficacité contre des biofilms mono-espèce, l'investigation du potentiel des liquides ioniques vis-à-vis des biofilms mixtes demeure largement non exploré.

L'étude des biofilms mixtes, hautement hétérogènes et complexes, nécessite des outils d'analyse avancés. L'examen structurale est fréquemment effectué en utilisant la microscopie électronique à balayage. Néanmoins, la spectroscopie Raman émerge comme un outil de choix, offrant une analyse chimique et structurale à l'échelle moléculaire. Elle offre la possibilité de différencier diverses espèces et d'étudier leur comportement en réponse aux différentes conditions dans des biofilms mixtes (Cleaver & Garnett, 2023).

Par ailleurs, l'intégration de l'intelligence artificielle rend plus facile l'interprétation des spectres Raman. Elle constitue, en effet, une approche prometteuse pour automatiser l'analyse des signatures spectrales complexes, détecter des motifs subtils et permettre une identification rapide et précise des agents pathogènes (Benahmed et al., 2025; Tang et al., 2024).

Dans cette perspective, nous avons entrepris cette recherche qui examine les biofilms affectant les cathéters implantés chez les patients du CHU de Tlemcen, en particulier ceux impliquant *C. albicans* et des bactéries. L'étude a été menée dans deux services hospitaliers, l'hématologie clinique et la néphrologie-hémodialyse, et se concentre sur trois points essentiels. L'analyse de la composition des biofilms mixtes, l'examen de leur virulence, ainsi que l'évaluation de nouveaux moyens d'inhibition. Pour atteindre cet objectif, nous avons défini les objectifs suivants :

- Analyser les dispositifs médicaux récupérés des patients admis aux services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse au CHU de Tlemcen.
- Mise en évidence des infectivités des cathéters.
- Identifier les espèces bactériennes et fongiques impliquées, en ciblant particulièrement les altérations mixtes (*C. albicans*/ bactéries).
- Évaluer la susceptibilité des espèces co-isolées aux antimicrobiens.
- Déterminer le potentiel des espèces co-isolées à former des biofilms mono- et multi espèces et vérifier l'impact du mode de vie sessile sur l'activité hydrolytique.
- Etudier l'effet inhibiteur des liquides ioniques contre les biofilms mixtes à l'aide de la spectroscopie Raman assistée par l'intelligence artificielle et de techniques d'imagerie microscopique.

Première partie

Synthèse bibliographique

Les infections liées aux soins, également connues sous le nom d'infections nosocomiales, sont à l'origine de millions de morts chaque année et constituent un enjeu crucial pour la santé publique. Il s'agit d'infections acquises au sein des établissements de santé, survenant au moins 48 heures après l'admission des patients. Ces infections compromettent par conséquent leur vie et augmentent le coût associé à leur prise en charge (**Khan et al., 2017**).

Selon le rapport mondial sur la lutte anti-infectieuse, publié par l'organisation mondiale de la santé (OMS), entre 5 % et 15 % des patients contractent une infection liée aux soins dans les pays développés ; ce risque est 2 à 20 fois plus élevé dans les pays en développement (**OMS, 2022**). Une méta-analyse réalisée par Raoofi et al. (**2023**), a montré que les pays d'Afrique enregistrent le taux le plus élevé avec une prévalence dépassant les autres régions du monde d'un facteur de 0,27.

Ces infections sont associées à divers facteurs de risque tels que les procédures invasives liées aux soins et l'état de santé des patients. En effet, l'utilisation prolongée de dispositifs médicaux tels que les cathéters, le non-respect des protocoles d'hygiène, la chirurgie invasive et l'immunosuppression chez les patients fragiles sont des facteurs clés dans la propagation des agents infectieux (**Isigi et al., 2023**). D'autres facteurs ont un impact sur le risque infectieux, tels que la thrombose intravasculaire du cathéter qui favorise fortement l'adhésion microbienne. Busch et al. (**2017**) ont signalé que les cathéters en silicone entraînent un taux d'infection plus élevé par rapport aux cathéters en polyuréthane, ce qui justifie l'impact de la nature du matériau.

Qu'ils soient urinaires ou veineux, les cathéters constituent des instruments indispensables dans la pratique clinique pour entraîner un fluide physiologique (sang, urine, infusion, médication...) vers l'intérieur du corps du patient ou inversement. Cependant, leur utilisation prolongée et fréquente est souvent associée aux infections du sang et des voies urinaires (**Miller et al., 2016; Lee et al., 2017; Yasir et al., 2018**).

Il existe cinq mécanismes principaux sous-jacents aux infections du cathéter (**figure 1**); ceux-ci débutent généralement par la contamination du cathéter lors de sa mise en place, puis se prolongent par la migration de micro-organismes cutanés, la contamination du hub par des sources venant de l'extérieur ou de l'intérieur via la lumière du cathéter, l'injection de liquide contaminé et la propagation hématogène à partir d'un site infectieux distant (**Bouza et al., 2002**).

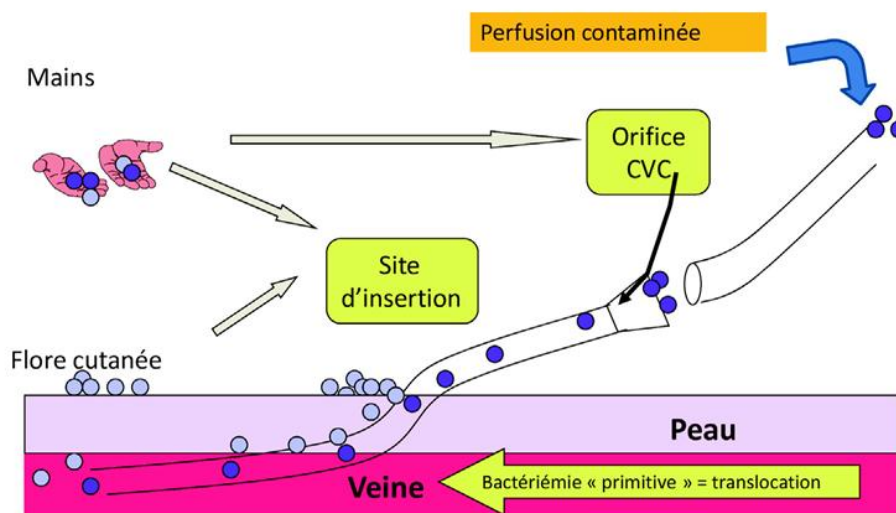


Figure 1. Mécanismes de contamination des cathéters veineux (Doit et al., 2015).

L'altération des cathéters varie selon leur degré d'infectiosité ; pour évaluer ce dernier, également appelé infectivité du cathéter, des critères microbiologiques et cliniques sont employés. Ces derniers reposent sur des symptômes cliniques locaux et/ou globaux (rougeur, induration, fièvre, douleur...) ainsi que sur certains paramètres microbiologiques associés (Brun-Buisson et al., 1987; Gominet et al., 2017).

Trois types d'infectivité des cathéters sont connus, la contamination, la colonisation et l'infection. La contamination survient généralement lors de l'insertion du cathéter et se caractérise par une culture positive non significative de ses extrémités distales, sans signes cliniques d'infection. Un seuil inférieur à 10^3 UFC/mL indique une charge microbienne non significative du cathéter. La colonisation, quant à elle, se manifeste par une culture significativement positive de l'extrémité distale du cathéter ($\geq 10^3$ /mL) avec absence de signes d'infections. Cependant, l'infection du cathéter est déclarée lorsque des agents pathogènes envahissent le cathéter provoquant un état de septicémie et qu'une culture de son extrémité distale est significativement positive (Brun Buisson et al., 1987).

Il est impératif de distinguer une infection des cathéters d'une simple contamination. Une identification minutieuse du niveau d'infectiosité est essentielle pour adapter la prise en charge clinique, qu'il s'agisse d'une simple surveillance, d'un traitement antimicrobien ou du retrait du dispositif médical (Timsit et al., 2020).

Par ailleurs, l'impact de la pandémie COVID-19 sur ces infections a été considérable, certaines études ont, en effet, signalé une augmentation notable des infections sanguines ainsi que des voies urinaires, associées aux cathéters (Alsaffar et al., 2023; Fakh et al., 2022; Knepper et

al., 2020). En revanche, Suleyman et al. (**2021**) ont constaté une baisse de ces infections pendant cette période, indiquant que ces variations pourraient être liées aux changements dans les pratiques de prévention des infections et des modifications du profil des patients.

Outre leur rôle de transfusion des fluides physiologiques, les cathéters offrent des surface idéales pour l'adhésion durable des micro-organismes commensales ou environnementales, d'où la formation des biofilms (**Liu et al., 2024**). Ce mode de vie sessile est la forme d'existence microbienne la plus répandue dans la nature (**Seddiki, 2021**). Ces structures ont été définies comme des communautés microbiennes organisées, adhérant à une surface biotique ou abiotique et intégrées dans une matrice exopolymérique qu'elles produisent elles-mêmes (**Costerton et al., 1978**).

Le processus de formation des biofilms, qu'ils soient fongiques, bactériens ou mixtes, est à la fois dynamique et complexe, il se déroule en cinq phases distinctes (**figure 2**). Ce processus débute par une adhésion réversible, au cours de laquelle les micro-organismes se fixent à la surface par des interactions électrostatiques et hydrophobes. Par la suite, cette adhésion devient irréversible avec l'apparition de liaisons covalentes et hydrogène, généralement orchestrées par des protéines d'adhésion (**Seddiki, 2021**).

Progressivement, les cellules s'agrègent et forment des microcolonies avec la production d'une matrice exopolymérique qui confère une cohésion et une protection au biofilm. Au fur et à mesure de la croissance des microcolonies, le biofilm parvient à sa phase de maturation, acquérant une structure tridimensionnelle complexe accompagnée de la production de polymères extracellulaires tels que des polysaccharides, des protéines et de l'ADN extracellulaire. Finalement, sous effet de divers facteurs, certaines cellules se détachent lors de la dispersion, favorisant ainsi la colonisation de nouvelles surfaces (**Blackman et al., 2021; Otto, 2018**).

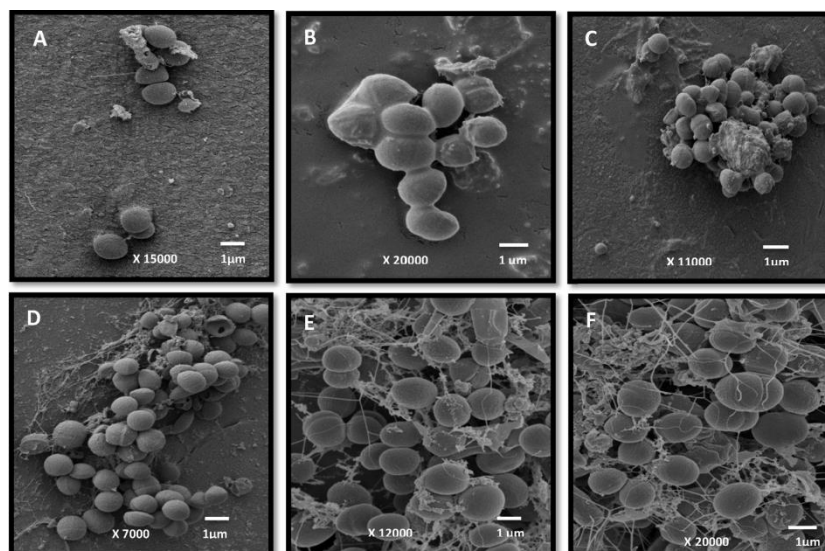


Figure 2. Phases de formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* sur cathéters, visualisées par microscopie électronique à balayage. A : adhésion des cellules sur une surface. B : regroupement des cellules en structure tridimensionnelle. C : synthèse visible de la matière polysaccharidique. D : réticulation entre les différentes cellules par la matière polysaccharidique. E et F : maturation du biofilm (Rebiahi et al., 2014).

L'adhésion des micro-organismes à un substrat est l'étape clé de la formation d'un biofilm. Elle est régie par divers facteurs, notamment le pH, la température, la force ionique, la disponibilité des nutriments et les propriétés de surface, ces éléments sont d'une importance considérable pour la colonisation des dispositifs médicaux. Dans de nombreuses situations, le développement de biofilms se produit rapidement et inévitablement sur la majorité des matériaux utilisés en médecine humaine, tels que les cathéters veineux et les cathéters urinaires et ce, malgré des mesures d'asepsie rigoureuses (So et al., 2024).

La formation du biofilm est contrôlée par un mécanisme de régulation et de communication cellulaire, le quorum sensing. Ce système dépend de la densité de la population sessile ; il s'agit d'un mécanisme de perception de la densité cellulaire basé sur le concept de masse critique. Le mécanisme de détection du quorum sensing repose sur la génération et l'identification de molécules de signalisation, ce qui permet aux cellules de coordonner leurs comportements, de contrôler le développement du biofilm, la formation des filaments, la production de la matrice extracellulaire, ainsi que d'autre processus vitaux (Atriwal et al., 2021).

Par ailleurs, les levures associées aux infections appartiennent principalement au genre *Candida*, elles sont responsables de 80% des infections fongiques. Cependant, *Candida*

albicans reste l'espèce la plus fréquente et la plus isolée des cathéters veineux centraux et urinaires (**Jung et al., 2020**).

Il s'agit d'une levure commensale qui fait partie de la flore normale de la peau, des muqueuses buccales, gastro-intestinales et génitales (Lopes & Lionakis, 2022). Toutefois, la perturbation de la flore naturelle de l'hôte, due à une immunosuppression pathologique ou thérapeutique, à une administration prolongée d'antibiotiques ou à une rupture des barrières cutanées et muqueuses, peut dévoiler le caractère opportuniste pathogène de cette levure. Elle peut être responsable d'une série d'infections, allant de candidoses superficielles bénignes à des candidoses systémiques potentiellement mortelles (**Lopes & Lionakis, 2022**).

L'incidence des infections à *C. albicans* a fortement augmenté, notamment en raison de la capacité de ce pathogène à s'adapter aux conditions environnementales, à moduler son métabolisme et à exploiter divers mécanismes physiopathologiques qui assurent sa survie et sa dissémination dans l'hôte (**Polke et al., 2015**).

La nature polymorphe et la capacité à passer d'une forme unicellulaire (blastopore) à une forme filamenteuse (hyphes et pseudohyphes) sont des éléments clés de la virulence de *C. albicans*. Cette transition est modulée par des mécanismes transcriptionnels et traductionnels complexes qui répondent aux signaux environnementaux ainsi qu'à l'expression des gènes impliqués dans la morphogenèse (**Kadosh, 2019**). En fait, la forme unicellulaire est principalement impliquée dans la dissémination de l'infection via la circulation sanguine; tandis que la forme filamenteuse est essentiellement impliquée dans l'invasion des tissus, favorisant la pénétration des barrières épithéliales et endothéliales (**Witchley et al., 2019**).

En revanche, le rôle virulent des enzymes hydrolytiques a été largement discuté par **Ghannoum (2000)**; leur mécanisme d'action repose sur la lyse directe des cellules en facilitant la dégradation des membranes des cellules hôtes, permettant ainsi à *C. albicans* de pénétrer et d'envahir les tissus. Ces enzymes permettent également au pathogène d'échapper aux réponses immunitaires de l'hôte.

Il a été démontré que la forme hyphale de *C. albicans* sécrète de la candidalysine, la première toxine peptidique identifiée chez un agent pathogène humain. Elle agit en créant des pores dans les membranes cellulaires, provoquant des lésions tissulaires et déclenchant une réponse immunitaire exacerbée (**Moyes et al. 2016**).

Cette pathogénie est par ailleurs accentuée par l'éventail d'enzymes hydrolytiques que possède cette espèce, en particulier les protéinases aspartiques sécrétées (Sap) et les phospholipases (Mohammadi et al., 2021).

Sap est, en effet, une famille d'enzymes hydrolytiques, codés par les gènes *SAP*, impliquées dans la virulence de *C. albicans*. Pour envahir les tissus de l'hôte et accéder à la circulation sanguine, *C. albicans* doit traverser les barrières physiologiques ; Sap facilitent cette invasion en dégradant les protéines de la membrane cellulaire (la fibronectine et le collagène). Cette activité enzymatique compromet l'intégrité des tissus, ouvrant la voie à une dissémination hématogène. En parallèle, ces enzymes peuvent interférer avec la cascade de coagulation sanguine en clivant les protéines clés, ce qui peut favoriser la formation de caillots septiques (Tomlin & Anna, 2018).

Dix molécules Sap (Sap1 - Sap10) sont identifiées, chacune ayant des propriétés spécifiques en termes de substrat, de conditions d'activité et de stade d'infection. Bien que huit protéinases (Sap1 - Sap8) soient sécrétées dans l'espace extracellulaire, Sap9 et Sap10 se fixent à la membrane cellulaire par encrage glycoposphatidyl-inositol. Ceci peut entraîner une modification de la paroi fongique en remodelant les protéines d'adhésion, ce qui favorise le développement du biofilm (Rajendran et al., 2016). *SAP9* influence principalement les interactions inter-espèces où la modification protéolytique des adhésines fongiques pourrait réguler la composition des biofilms polymicrobiens (Dutton et al. 2016). De plus, *SAP6* dévoile de nouvelles caractéristiques d'agrégation au sein des cellules épithéliales, indépendantes de sa fonction protéolytique (Kumar et al., 2015).

Par ailleurs, Kumar et al. (2010) ont montré que la surexpression de *SAP 2* est associée à une résistance accrue à l'amphotéricine B et à l'itraconazole. De même, *SAP 9* et *SAP 10* ont été fortement exprimées chez les souches résistantes au fluconazole, au voriconazole et à la flucytosine (Kadry et al., 2018).

Un autre rôle majeur des Sap réside dans leur capacité à moduler la réponse immunitaire en influençant l'action des neutrophiles ou par échappement aux macrophages. Les enzymes Sap peuvent hydrolyser également les composants essentiels de l'immunité innée tels que les immunoglobulines, les peptides antimicrobiens et les protéines du complément, réduisant ainsi leur efficacité et permettant à *C. albicans* d'échapper à la reconnaissance et à son élimination (Zawrotniak et al., 2017).

En raison de leur rôle clé dans la pathogénie de *C. albicans*, les Sap représentent désormais des biomarqueurs prometteurs pour le diagnostic des candidoses invasives, leur production étant induite lors des infections invasives pourrait permettre de distinguer une infection d'une simple colonisation (Bras et al., 2024).

En outre, les phospholipases sont des enzymes hydrolytiques capables d'hydrolyser une ou plusieurs liaisons esters des glycérophospholipides, essentiels à l'intégrité et au bon fonctionnement des membranes cellulaires.

Quatre types de phospholipases ont été identifiées chez *C. albicans*, la phospholipase A (PLA), B (PLB), C (PLC) et D (PLD), chaque enzyme est impliquée dans le clivage d'une liaison ester spécifique (figure 3). La phospholipase B dispose de trois activités catalytiques, d'abord, une activité hydrolytique induisant l'hydrolyse de la liaison ester aux positions sn-1 et sn-2 des glycérophospholipides ; ensuite, une deuxième activité lysophospholipidique générant des acides gras ; et enfin, une troisième activité transacylase permettant la synthèse de phospholipides à partir de lysophospholipides (Barman et al., 2018).

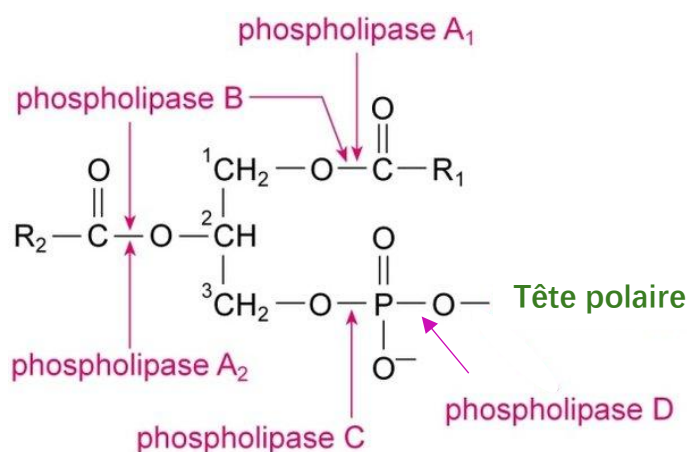


Figure 3. Sites d'action des différents types de phospholipases (Dongol et al., 2014).

Seuls les produits issus de l'expression des gènes *PLB1* et *PLB2* sont sécrétés à l'extérieur des cellules et contribuent principalement à la virulence de *C. albicans* (Watanabe et al., 2018). Ces enzymes hydrolysent les phospholipides en divers produits de signalisation, notamment l'acide phosphatidique, le diacylglycérol, les acides gras et les lysophospholipides qui régulent la germination et la transition morphologique de cette levure (Baker et al., 2002; Noverr & Huffnagle, 2004).

La formation du biofilm est le facteur de virulence le plus déterminant des microorganismes. Au sein des biofilms, les cellules sessiles sont 10 à 1000 fois plus résistantes aux

antimicrobiens et aux moyens de défenses de l'hôte que leurs homologues planctoniques, ce qui favorise la persistance des infections et la difficulté du traitement (Štefánek et al., 2022).

Il s'agit d'un phénomène multifactoriel impliquant plusieurs mécanismes synergiques. La matrice extracellulaire agit comme une barrière limitant la diffusion des antimicrobiens, tandis que la surexpression des pompes à efflux expulse ces agents à l'extérieur des cellules. De manière simultanée, la forte densité cellulaire des biofilms matures, le transfert horizontal de résistance entre les bactéries sessiles et l'existence de cellules persistantes, considérées comme des variantes phénotypiques en dormance, confèrent une résistance à des niveaux élevés d'antimicrobiens ainsi qu'aux mécanismes de défense immunitaire. En conséquence, les biofilms peuvent se reformer, rendant les infections particulièrement difficiles à éradiquer (Silva et al., 2017; Uruén et al., 2021).

Le biofilm de *C. albicans* se distingue par sa structure complexe et par un mixte de formes morphologiques, blastopores, pseudohyphes et hyphes ; dont les proportions varient en fonction de la composition du milieu, de la température et de la nature du substrat (Fernandes et al., 2016). La matrice extracellulaire, composée principalement du α -mannan, β -1,6-glucan et β -1,3-glucan, assure la stabilité mécanique au biofilm et protège les cellules sessiles contre la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte (Pierce et al., 2017; Silva et al., 2017).

De nos jours, les infections liées aux biofilms mixtes, formés de bactéries et de levures, s'avèrent de plus en plus préoccupantes et difficiles à traiter, en raison de leur hétérogénéité inhérente susceptible d'être accentuée par des interactions synergiques inter-espèces (Vila et al., 2021). Il a été rapporté que 20% des infections à *C. albicans* sont polymicrobiennes (Carolus et al., 2019). Les interactions entre cette espèce et les autres microorganismes cohabitant les surfaces biotiques et abiotiques sont diverses, elles peuvent être synergiques, antagonistes ou neutres. Ces interactions peuvent se manifester par un contact direct entre les cellules, des modifications de l'environnement de l'hôte, la sécrétion de substances chimiques ou une combinaison de ces mécanismes (Ponde et al., 2021).

C. albicans est souvent isolée en compagnie de bactéries à Gram positif, telles que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* ainsi que des bactéries à Gram négatif, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. Dans les biofilms composés de plusieurs espèces, *C. albicans*, par l'intermédiaire de ses hyphes, joue un rôle structurant en agissant comme un échafaudage favorisant l'adhésion des bactéries. Une étude a montré que le β -1,3-glucane sécrété par *C. albicans* contribue à une tolérance accrue de *S.*

aureus à la vancomycine. Inversement, les polymères extracellulaires produits par *S. epidermidis* limite la diffusion du fluconazole dans le biofilm (Carolus et al., 2019).

Toutefois, des interactions antagonistes ont été observées dans les biofilms mixtes de *C. albicans*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* (Allkja et al., 2023). Certaines interactions sont complexes, présentant à la fois des effets synergiques et antagonistes comme celle de *C. albicans* et *Pseudomonas aeruginosa*. Durant longtemps considérées comme antagonistes *in vitro* (Shirtliff et al., 2009), l'interaction entre ces deux espèces a révélé des effets synergiques dans des modèles *in vivo* (Bergeron et al., 2017).

De ce fait, l'association de médicaments antifongiques et antibactériens est une approche couramment adoptée pour traiter les biofilms mixtes (Benahmed et al., 2023; Gourari-Bouzouina, 2024). Cependant, l'urgence de trouver des solutions thérapeutiques fiables a été soulignée suite à l'émergence de la résistance aux antimicrobiens et ses conséquences néfastes (Fernandes et al., 2020).

Par conséquent, la compréhension des interactions inter-espèces qui régissent l'évolution des biofilms mixtes suscite un intérêt important car elle constitue une étape clé dans le développement de thérapies ciblées contre ce type d'infections. Plusieurs approches sont actuellement explorées, notamment l'emploi de peptides antimicrobiens, d'enzymes ciblant la matrice exopolymérique, des inhibiteurs du quorum sensing, le développement de nanoparticules lipidiques et polymériques pour une délivrance ciblée d'antimicrobiens et l'utilisation des plantes médicinales (Koo et al., 2017 ; Shamim et al., 2023).

Par ailleurs, le recours aux liquides ioniques constitue une alternative innovante. Ces sels se distinguent par leur capacité à rester liquides à des températures inférieures à 100° C. Ils sont généralement constitués d'un cation organique, le plus souvent centré sur l'azote (figure 4), tel que les cations tétraalkylammonium, l'alkylpyridinium, l'alkylimidazolium ou pyrrolidinium, mais peuvent également être fondés sur le phosphore (phosphonium) ou le soufre (sulfonium). Ce cation est associé à un anion organique ou inorganique présentant une grande variété structurale (Cruz & Ciach, 2021; Pendleton & Gilmore, 2015).

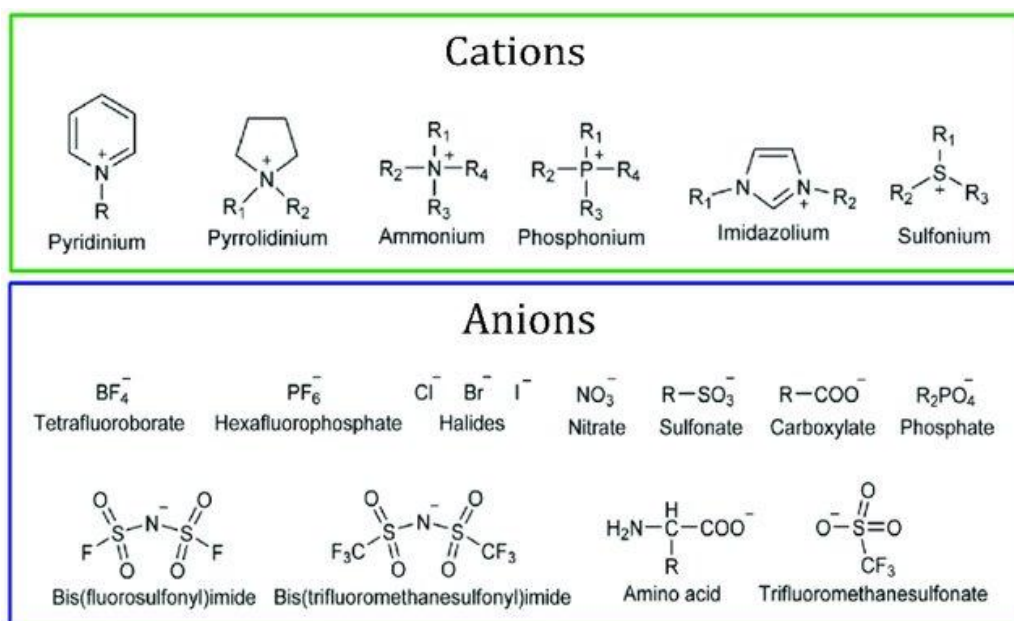


Figure 4. Principaux cations et anions couramment utilisés dans les formulations des liquides ioniques (Cruz & Ciach, 2021).

Ces liquides ioniques sont appropriés pour une multitude d'applications en raison de leur stabilité chimique et thermique, de leur faible volatilité, de leur grande solubilité dans divers composés organiques et inorganiques, ainsi que de leur flexibilité structurale (Cruz & Ciach, 2021).

Trois générations de liquides ioniques sont connues, la première génération correspond aux formes classiques, composées de cations organiques associés à des anions inorganiques. Leur principal intérêt réside dans leur utilisation comme substituts des composés organiques volatils comme solvants. La deuxième génération comprend les liquides ioniques dits "fonctionnalisés", conçus pour satisfaire des exigences spécifiques par l'inclusion de groupes fonctionnels qui modulent leurs caractéristiques physico-chimiques. Les liquides ioniques de troisième génération sont destinés aux applications pharmaceutiques et biologiques, intégrant souvent des ions bioactifs issus de composés naturels (Simões et al., 2021).

Dans ce cadre, plusieurs liquides ioniques ont démontré des propriétés antibactériennes, antifongiques et antibiofilm prometteuses (Belhocine et al., 2023; Egorova et al., 2017; Suchodolski et al., 2021). Parmi ces derniers, figurent les liquides ioniques à base d'imidazolium qui ont prouvé leur efficacité remarquable dans l'élimination des biofilms bactériens et fongiques (Anandkumar et al., 2020; Reddy & Nancharaiah, 2020). En revanche, ceux à base de phosphonium demeurent peu explorés dans le contexte de l'inhibition

des biofilms mixtes, malgré leur stabilité thermique élevée, leur structure cationique qui pourrait renforcer la lipophilie et optimiser l'interaction avec les membranes microbiennes, leur synthèse facile et leur efficacité antimicrobienne (**Faria & Bogel-Lukasik, 2015; Kiche et al., 2025; Nunes et al., 2024**).

Comme tout nouvel agent antimicrobien, l'évaluation rigoureuse de son efficacité contre les biofilms mixtes hautement complexes nécessite des techniques d'analyse avancées capables de mettre en évidence les interactions entre les espèces et les modifications subtiles au sein du biofilm. Sous cet angle, les méthodes de microscopie électronique à balayage, de microscopie épifluorescence et de spectroscopie Raman fournissent une résolution spatiale et chimique précieuse (**Cleaver & Garnett, 2023**).

En fait, la spectroscopie Raman émerge comme une technique puissante pour étudier la formation et l'inhibition des biofilms (**Benladghem et al., 2022; Kendil et al., 2024; Benahmed et al., 2025**). C'est une technique analytique non destructive basée sur la diffusion inélastique de la lumière. Lorsqu'un faisceau laser est dirigé sur un échantillon, la majorité des photons sont diffusés de manière élastique, cependant, une petite fraction subit un décalage d'énergie en interagissant avec les vibrations moléculaires de la matière, c'est ce que l'on appelle la diffusion inélastique (ou diffusion Rayleigh) à l'origine du signal Raman. Ce processus génère un marquage moléculaire distinct qui permet de déterminer la composition chimique d'un échantillon et de détecter des modifications structurels, offrant ainsi des renseignements sur la composition des biofilms microbiens (**Rodriguez et al., 2023**).

Couplée à un microscope, la cartographie Raman confocale offre la possibilité d'observer les composés chimiques dans un échantillon de manière spatiale, sans avoir besoin de marquage ou de préparation préalable, ce qui permet de distinguer les espèces dans les biofilms mixtes et de surveiller la distribution spatiale de ces éléments. Cette approche est très utile pour comprendre la dynamique des biofilms et les effets des traitements antimicrobiens (**Bodelón et al., 2018; Kim & Chin, 2023**). Toutefois, l'analyse des données que génère la spectroscopie Raman peut constituer une difficulté en raison de la complexité des résultats bruts produits par cette technique.

L'application des modèles d'intelligence artificielle, notamment ceux fondés sur l'apprentissage profond (deep learning) permet de surmonter ces limitations et d'ouvrir la voie à des applications concrètes en pratique clinique pour la détection et l'analyse des agents pathogènes. Cette application permet d'exploiter les données spectrales complexes issus de la

spectroscopie Raman en distinguant des motifs subtils. Ceci repose sur l'analyse automatisée des empreintes spectrales uniques et permet donc de faire la distinction entre les composants des biofilms afin de permettre une identification rapide et une analyse précise, révolutionnant ainsi le diagnostic et la gestion des infections (**Maruthamuthu et al., 2020; Yu et al., 2021**).

Dans cette recherche, nous avons mis en œuvre différentes approches méthodologiques afin d'explorer la problématique des biofilms mixtes dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse du CHU de Tlemcen. À cet effet, ce travail vise principalement à caractériser les infectivités associées aux cathéters, à identifier les microorganismes impliqués ainsi que leur sensibilité aux antimicrobiens et leur capacité à former les biofilms, à étudier l'impact de la vie sessile sur l'activité hydrolytique et enfin, à évaluer l'inhibition des biofilms par des liquides ioniques à l'aide d'approches spectroscopiques et microscopiques.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Les travaux de recherche ont été principalement conduits au Laboratoire : Antibiotiques antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques (LAPSAB), Abou Bekr Belkaïd - Université de Tlemcen.

Certaines parties ont été effectuées dans les laboratoires suivants: 1- Laboratoire de génétique appliquée à l'agriculture, à l'écologie et à la santé publique (GenApaGie) ; 2- Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO), Université Tlemcen ; 3- Laboratoire de gestion durable des ressources naturelles dans les zones arides et semi-arides, Université de Naama. 4- Centre de mycologie médicale, hôpitaux universitaires, Centre médical de Cleveland, Université Case Western Reserve, Cleveland, États-Unis.

1. Recherche des altérations microbiennes mixtes levures/bactéries des cathéters

1.1. Échantillonnage

Entre octobre 2021 et juin 2022, une collecte de cathéters a été réalisée dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse du CHU de Tlemcen (Algérie). Différents types de cathéters ont été prélevés après leur retrait des patients, notamment les cathéters veineux périphériques et centraux, ainsi que les cathéters urinaires, implantées depuis 48 heures ou plus. Un questionnaire descriptif a été consulté, après consentement des patients, afin de compléter les informations relatives à l'échantillonnage. Il s'agit d'une fiche fournissant les données cliniques et personnelles de chaque patient, notamment son âge, son sexe, le motif de son hospitalisation, sa température corporelle au moment du prélèvement, ainsi que d'autres données connexes (**annexe 1**). Ledit questionnaire a été réalisé en se référant à d'autres fiches utilisées lors d'enquêtes antécédentes, telles que celles de l'organisation mondiale de santé (**OMS, 2020**) et celle de Boucherit-Atmani et al. (**2011**).

1.2. Étude des infectivités des cathéters

Après son ablation, l'extrémité distale de chaque cathéter a été aseptiquement sectionnée et placée dans un tube contenant 5 mL d'eau physiologique stérile. Les échantillons ont été transportés ensuite au laboratoire pour être examinés.

Afin de détacher les cellules microbiennes adhérentes aux cathéters, une approche combinée a été mise en œuvre. Les tubes ont été d'abord agités au vortex pendant deux minutes (**Boucherit-Atmani et al., 2011**) puis soumis à une ultrasonication (40 kHz, 100 W) pendant une minute (Sonics materials VCX130). Cette approche a été approuvée par Karbysheva et al. (**2020**) pour son efficacité dans le diagnostic des infections associées aux cathéters.

Afin de déterminer les différents types d'infectivités des dispositifs médicaux, une mise en culture de 100 µL a été réalisée à partir de chaque dilution décimale de l'échantillon (1/10, 1/100 et 1/1000). La gélose nutritive a été utilisée pour les bactéries, tandis que la gélose Sabouraud dextrose a servi pour la culture des levures. Les boîtes de Petri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

La détermination des types d'infectivités des cathéters se basait sur la présence ou l'absence d'une charge microbienne significative, en tenant compte des signes d'infection associés (**Brun-Buisson et al. 1987**).

À cet effet, trois types d'infectivités sont souvent recherchés, la contamination, la colonisation et l'infection. Celles-ci se distinguent les unes des autres de la manière suivante.

- **Contamination** : culture positive non significative ($<10^3$ UFC/mL) sans présence de signes d'infection locaux ou généraux (rougeur, fièvre $>38^\circ\text{C}$).
- **Colonisation** : culture positive significative ($\geq 10^3$ UFC/mL) sans présence de signes d'infection locaux ou généraux.
- **Infection** : culture positive significative ($\geq 10^3$ UFC/mL) avec présence de signes d'infection locaux ou généraux.

1.3. Isolement et identification des micro-organismes

L'isolement des micro-organismes, levures et bactéries, a été approché en étude extemporanée de l'infectivité des cathéters. Des boîtes de Petri contenant la gélose Sabouraud dextrose, destinées à l'isolement des levures, ainsi que les géloses Mac Conkey et Chapman, pour l'isolement des bactéries, ont été ensemencées par stries à partir des échantillons prélevés. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Les souches isolées ont été purifiées par passages successifs entre bouillons et géloses. Chaque souche pure a été inoculée sur une gélose, qui avait été précédemment inclinée dans des tubes, puis incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures et enfin stockée à +4 °C.

1.3.1. Identification des levures

L'identification des isolats fongiques a été réalisée à l'aide du CHROM-Agar™ *Candida* (Sigma), les galeries Api *Candida*® et le système automatisé VITEK 2 (BioMérieux).

CHROM-Agar est une méthode efficace pour identifier rapidement les levures par la couleur des colonies. Cependant, Api *Candida*® est un système standardisé d'identification biochimique des levures du genre *Candida*, notamment celles rencontrées en microbiologie clinique, ce système a été utilisé pour l'identification des espèces appartenant au genre *Candida*.

Cependant, VITEK 2 est un système automatisé d'identification microbiologique bactérienne et fongique.

1.3.2. Identification des bactéries

D'abord, la coloration de Gram est réalisée en suivant le protocole décrit par Christian Gram (1884). Les étapes sont illustrées dans la **figure 5**.

Brièvement, un frottis bactérien a été préparé sur une lame puis fixé à la flamme. Ensuite, une coloration initiale au cristal violet a été réalisée pendant 1 minute, suivie de l'ajout d'un mordant pendant 1 minute, le Lugol. Après rinçage, une décoloration à l'alcool éthylique-acétone (1 :1) a été appliquée pendant 30 secondes. Après un second rinçage, une contre-coloration a été effectuée par l'ajout de la fuchsine pendant 1 minute. Après une étape finale de rinçage et de séchage, les lames ont été examinées au microscope optique à l'objectif $\times 100$ en immersion. Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet, tandis que celles à Gram négatif prennent la couleur rose/ rouge.

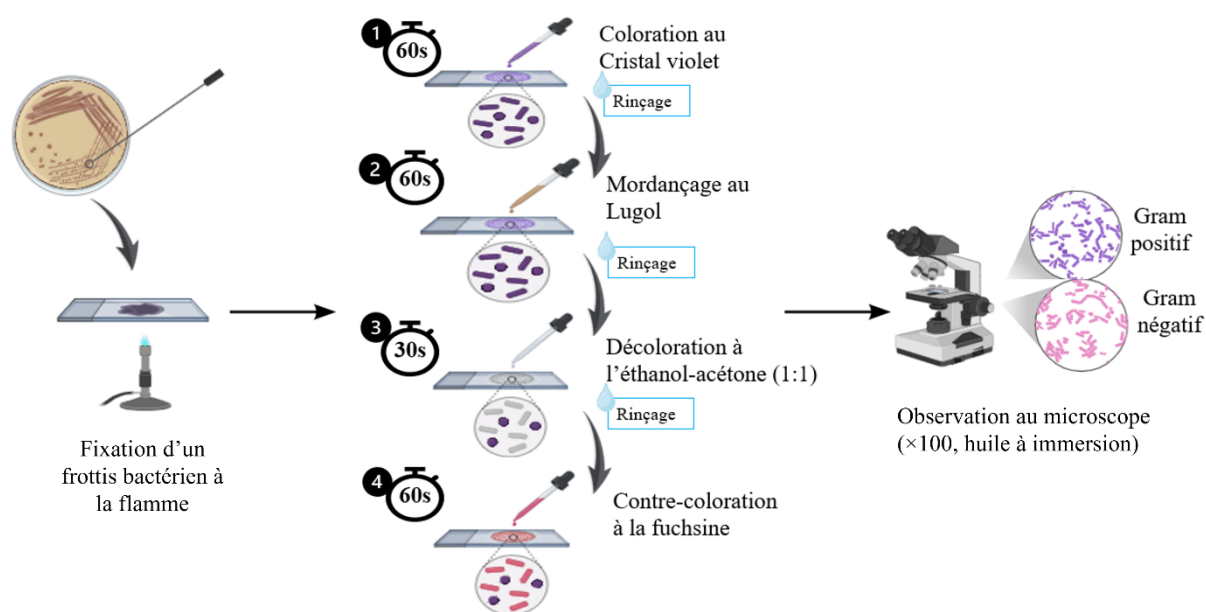


Figure 5. Procédure de la coloration de Gram (Générée sur Biorender. com).

Sur la base des résultats des aspects macroscopique et microscopique des tests précédents, les galeries Api 20E®, Api 20NE®, Api Staph® ainsi que le système VITEK 2 (BioMérieux) ont été utilisés pour l'identification des bactéries.

Il convient de préciser que la présente étude porte exclusivement sur la recherche des espèces de *Candida albicans* et des bactéries qui coexistaient sur le même cathéter.

1.4. Typage moléculaire des souches de *C. albicans* par RAPD-PCR

L'ADN a été extrait d'une culture pure de levures selon la méthode standard au phénol-chloroforme (Rana et al., 2019). Brièvement, après suspension des cellules dans un tampon Tris-EDTA (TE), la lyse cellulaire a été effectuée par traitement successif au lysozyme (35 mg/mL), à la protéinase K (10 mg/mL) et au dodécylsulfate de sodium (SDS, 10%), suivie d'une incubation en présence de bromure de cétyltriméthylammonium/chlorure de sodium (CTAB/NaCl, 10%/ 0,7M). L'extraction des protéines et débris a été réalisée à l'aide de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1, v/v/v), puis le surnageant a été précipité à l'isopropanol. Le culot d'ADN obtenu a été lavé à l'éthanol (70%), séché, remis en suspension dans du tampon TE et incubé à 37 °C pendant 1 heure avant conservation.

Les réactions RAPD-PCR ont été effectuées en utilisant les amorces oligonucléotidiques: OPA-16 (5'-AGC CAG CGA A-3'), OPB-05 (5'-TGC GCC CTTC-3') et OPC-07 (5'-GTC CCG ACGA-3').

1.4.1. Amplification par RAPD-PCR

Chaque réaction de PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µL, contenant 30 ng d'ADN génomique, un Master Mix composé de 1U de Taq polymérase de type Hot Start (Solis BioDyne), 2mM de MgCl₂ et 0,2 µM de chaque dNTP, ainsi que 0,5 µM d'amorces, le volume étant complété avec de l'eau ultra pure.

L'amplification est réalisée grâce à un thermocycleur (BIO-RAD® T100), sur une durée totale de 4 heures selon un programme Hot-Start, vue la nature de la polymérase utilisée. La phase de dénaturation initiale a été réalisée à 95°C pendant 15 minutes, suivie de 45 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, une hybridation à 35°C pendant 40 secondes et une élongation à 72°C pendant 2 minutes. Le programme se termine par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes, puis une phase de conservation à 4°.

1.4.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de la PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, préparé dans un tampon TAE (40mM Tris, 20mM acide acétique, 1 mM EDTA, pH 8). L'utilisation du GelRed (Solis BioDyne, X10000), un fluorochrome (300 nm/ 600 nm), a permis de réaliser la visualisation des bandes d'ADN sous la lumière UV à l'aide d'un appareillage GelDoc XM02 (BIO-RAD®).

Cette partie a été réalisée au laboratoire de génétique appliquée à l'agriculture, à l'écologie et à la santé publique (GenApaGie), université de Tlemcen.

1.5. Tests de sensibilité aux antimicrobiens

1.5.1. Sensibilité de *C. albicans* aux antifongiques

La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de deux antifongiques, amphotéricine B et caspofungine, vis-à-vis des cellules planctoniques de *C. albicans* a été effectuée selon le protocole standard du CLSI (2017). Les concentrations finales ont été ajustées entre 0,03 et 16 µg/mL pour l'amphotéricine B et entre 0,015 et 8 µg/mL pour la caspofungine.

Le milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Sigma), tamponné à pH 7 par de l'acide morpholinepropanesulfonique (MOPS, Sigma), a été utilisé en mettant en œuvre la technique de microdilution à l'aide de microplaques à 96 puits, recommandée pour cette expérimentation.

Dans chaque puits des microplaques, 100 µL de l'une des deux solutions antifongiques ont été introduites. 100 µL de l'inoculum, ajusté à une concentration finale de $0,5 \times 10^3$ cellules / mL, ont ensuite été ajoutés. Les microplaques ont été scellées puis placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures. Pour l'amphotéricine B, les CMIs ont été révélées par observation visuelle, tandis que pour la caspofungine, elles ont été déterminées par énumération des levures à l'aide d'une cellule Thoma. *C. albicans* ATCC 10231 a été utilisé comme souche de référence pour le contrôle-qualité du test.

1.5.2. Sensibilité des bactéries co-isolées avec *C. albicans* aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été effectuée dans le laboratoire d'analyses médicales du Dr. Benhamidat - Tlemcen à l'aide de l'automate VITEK® 2 (bioMérieux).

Ce système automatisé de pointe permet de réaliser des tests de sensibilité aux antibiotiques fournissant des résultats fiables pour la concentration minimale inhibitrice. Il offre également une procédure de travail optimisée et des résultats d'antibiogrammes rapides, accompagnés d'une interprétation catégorielle (sensible, intermédiaire ou résistante), basée sur les critères d'interprétation du CLSI. Ce dispositif permet de réduire les erreurs humaines associées aux techniques manuelles (Hogan et al., 2019). Les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (2020) ont servi de référence pour l'interprétation des résultats.

2. Tests de formation des biofilms de *C. albicans* et des bactéries co-isolées

2.1. Formation des biofilms

La formation des biofilms mono et multi-espèces a été évaluée *in vitro* en utilisant la méthode de Pierce et al. (2008) pour les levures et celle de O'Toole (2011) pour les bactéries.

En bref, des pré-cultures de 24 heures ont été préparées sur les milieux Sabouraud et BHIB (brain heart infusion broth), respectivement pour les levures et les bactéries. Une centrifugation a été effectuée à +4°C (3000g, 5 min pour les levures et 1000g, 15 min pour les bactéries). Les culots ont été récupérés, lavés deux fois avec du tampon phosphate salé (PBS, pH 7,4 ; 10 mM), puis suspendus dans le RPMI 1640 tamponné à pH 7,4 avec le MOPS.

La concentration cellulaire a été ajustée à 10^6 cellules/mL pour les levures et à 10^7 cellules/mL pour les bactéries. Dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, 100 µL de la suspension microbienne ont été introduits, qu'il s'agisse de levures ou de bactéries.

Pour les biofilms mixtes, les suspensions de différentes souches (levures et bactéries) ont été combinées à part égal dans un même puits, avec un volume final de 100 µL. Les microplaques ont été scellées par la suite et placées en incubation à 37°C pour des durées de 24 et 48 heures. Tous les tests ont été réalisés en triplicata.

2.2. Quantification des biofilms formés

2.2.1. Évaluation de la biomasse par coloration au cristal violet

Afin d'estimer la biomasse des biofilms microbiens préformés dans les puits des microplaques, la technique de coloration au cristal violet a été mise en œuvre selon le protocole de O'Toole (2011). Ainsi, les puits ont été vidés de leur contenu puis rincés deux fois avec du PBS (10 mM, pH 7,4). Afin de renforcer la fixation du biofilm sur les parois des puits, 100 µL de méthanol (99%) ont été incorporés dans ceux-ci et laissés agir 15 minutes à température ambiante. Les puits ont été rincés après élimination de l'alcool puis remplis avec 100 µL d'une solution de cristal violet (0,1 w/v).

Les microplaques ont été fermées et laissées 20 minutes à température ambiante afin de permettre au colorant d'interagir avec les biofilms. Après rinçage des puits, une première observation de la teinte violette à l'œil nu dans les puits a été effectuée. Cette étape permet une évaluation initiale de la capacité à former des biofilms microbiens (O'Toole, 2011).

Afin d'évaluer ce pouvoir avec plus de précision, le cristal violet lié aux biofilms a été libéré suite à l'ajout de 150 μ L d'acide acétique (33%) dans les puits, cette solution acide présente une affinité plus importante pour le colorant que pour les éléments des biofilms microbiens ; Par la suite, 100 μ L ont été transférés dans les puits d'une nouvelle microplaque et l'absorbance a été déterminée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biochrom Asys UVM340). Les valeurs d'absorbance supérieures à celles du puits contrôle signalent une biomasse plus élevée, témoignant d'une capacité à former le biofilm.

2.2.2. Mesure de l'activité métabolique par réduction du XTT

L'activité métabolique des biofilms mono et multi-espèces de *C. albicans* et des bactéries co-isolées d'un même cathéter a été évaluée par la méthode de Villar-Vidal et al. (2011). C'est une méthode basée sur la réduction du XTT (2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide), un indicateur de viabilité cellulaire. Sous l'action d'une déshydrogénase, le XTT se transforme en formazan, un composé orange dont la concentration est déterminée en mesurant son absorbance à 490 nm.

Tout d'abord, le XTT (Sigma) est solubilisé dans du PBS (pH 7,4 ; 10 mM,) à une concentration de 0,5 g/L. En parallèle, une solution mère de ménadione (10 mM, SIGMA) a servi pour préparer une deuxième solution dans de l'acétone (1,7 mg/mL). Ensuite, 1 μ L de cette dernière a été mélangée avec 10 mL de la solution XTT puis stérilisée à l'aide d'un filtre de 0,22 μ m de porosité.

La ménadione (2-méthyl-1,4-naphtoquinone, vitamine K3) sert d'accepteur d'électrons dans la réaction d'oxydoréduction de la déshydrogénase microbienne, permettant ainsi la conversion du XTT en formazan.

À l'aide de PBS stérile, les puits dans lesquels les biofilms se sont formés ont été lavés, puis 100 μ L du mélange XTT/ménadione y ont été ajoutés. À la suite d'une incubation à 37°C pendant 3 à 4 heures, 75 μ L du contenu de chaque puits ont été transférés dans une nouvelle microplaque. L'absorbance a été mesurée ensuite à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biochrom Asys UVM340). Les résultats obtenus permettent de catégoriser les souches en six classes (**tableau 1**).

Tableau 1. Catégorisation des souches microbiennes selon leur capacité à former un biofilm, en fonction des valeurs d'absorbance (A) (Villar-Vidal et al., 2011).

Catégorie +6	$A > 1,30$	Souches hautement formatrices de biofilms
Catégorie +5	$A = 1 \text{ à } 1,29$	
Catégorie +4	$A = 0,70 \text{ à } 0,99$	Souches modérément formatrices de biofilms
Catégorie +3	$A = 0,40 \text{ à } 0,69$	
Catégorie +2	$A = 0,20 \text{ à } 0,39$	Souches faiblement formatrices de biofilms
Catégorie +1	$A < 0,20$	Souches non-formatrices de biofilms

3. Activité hydrolytique de *C. albicans*

En raison de leur rôle crucial dans la pathogénie de *C. albicans*, les activités des enzymes hydrolytiques, phospholipases et protéinases, ont été examinées. L'hydrolyse enzymatique entraîne l'apparition d'un halo autour de la colonie fongique formée sur la gélose appropriée pour chaque test enzymatique. Un ratio, appelé "Pz", a été calculé en rapportant le diamètre de la colonie sur le diamètre total de la colonie plus celui de la zone de précipitation (**Price et al., 1982**). Chacune des activités hydrolytiques suivantes a été réalisée en trois répétitions. L'activité hydrolytique de chaque enzyme a été classée selon les valeurs Pz (**tableau 2**).

Tableau 2. Catégorisation de l'activité enzymatique selon Price et al. (1982), basée sur les valeurs Pz.

Valeur Pz	Activité enzymatique
Pz = 1	Négative
$0,90 < Pz \leq 0,99$	Très faible
$0,80 < Pz \leq 0,89$	Faible
$0,70 < Pz \leq 0,79$	Modérée
$Pz < 0,70$	Forte

3.1. Évaluation en mode planctonique

3.1.1. Activité des phospholipases

L'activité des phospholipases (Plp) a été évaluée en utilisant la méthode de Tsang et al. (**2007**), avec l'apport de certaines modifications nécessaires.

Tout d'abord, une gélose au jaune d'œuf a été préparée en mélangeant 13,0g de gélose Sabouraud dextrose, 11,7g de NaCl et 0,11g CaCl₂ dans 184 mL d'eau distillé, puis stérilisé dans un autoclave (15 min, 120 °C). Par la suite, 5 mL du surnageant de jaune d'œuf préalablement centrifugé (3000g, 10 min, 4°C) y ont été ajoutés dans des conditions aseptiques, puis versés dans des boîtes de Petri. Ces dernières ont étéensemencées en déposant 10 µL de la suspension fongique (10⁶ cellules/mL) à leurs surfaces. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37 °C pendant 72 heures.

3.1.2. Activité des protéinases

L'activité des protéinases (Prt) a été évaluée en se référant à la méthode de Aoki et al. (1990). Un test est considéré positif après la dégradation de l'albumine du sérum bovin (BSA).

Ainsi, une solution de 60 mL a été préparée ; elle contient du MgSO_4 (0,04 g), K_2HPO_4 (0,5 g), NaCl (1 g), extrait de levure (0,2 g), glucose (4g) et 0,05 g d'albumine du sérum bovin. La solution a été soumise à une stérilisation au moyen d'un filtre d'une porosité de 0,22 μm , avant d'être ajoutée à 140 mL d'agar stérile. Ce mélange a été versé dans des boîtes de Petri, puis un spot de 10 μL de l'inoculum (10^6 cellules/mL) a été déposé sur la surface de la gélose. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 7 jours.

3.2. Évaluation en mode sessile

Afin d'examiner l'existence d'un lien possible entre l'activité hydrolytique et le mode de vie sessile, les deux activités enzymatiques ont été évaluées après la formation de biofilms de *C. albicans*. Pour y parvenir en mode sessile, les protocoles susmentionnés pour le mode planctonique ont été ajustés et adaptés en s'appuyant sur ceux de Chandra et al. (2008) et Samaranayake et al. (2013). Il s'agit d'une méthode qui repose sur l'utilisation de microplaques à 24 puits et de disques de silicone de 1 cm de diamètre.

3.2.1. Pré-traitement des disques de silicone

Les substrats destinés pour la formation du biofilm sur leurs surfaces ont été préparés au laboratoire. Brièvement, des disques de 1 cm de diamètre ont été découpés à partir des feuilles de silicone (Invotec International). Ceux ci ont été rincés à l'eau distillée, puis séchés à l'air avant d'être placés dans des flacons en verre pour une stérilisation à la chaleur humide (121°C, 15 min).

Par la suite, les disques ont subi un traitement en les immergeant dans du sérum humain stérile ; chaque disque a été introduit individuellement dans un puits d'une microplaque stérile de 24 puits, l'incubation a été réalisée à 37° C pendant 24 heures. Ce prétraitement enrobe les disques de protéines, ce qui permet à *C. albicans* de mieux adhérer à la surface des disques (Chandra et al. 2008; Samaranayake et al., 2013).

3.2.2. Formation des biofilms et évaluation de l'activité hydrolytique

Les disques de silicone prétraités au sérum (SCS, pour serum-coated silicone) ont été transmis dans de nouveaux puits contenant 1 mL de l'inoculum (10^6 cellule/mL), puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

Après la formation de biofilms sur leurs surfaces, les disques SCS ont été lavés deux fois avec du PBS stérile afin d'éliminer les cellules planctoniques on non adhérentes. Ils ont ensuite été plaqués séparément sur les géloses adaptées pour évaluer chaque activité hydrolytique, phospholipases et protéinases. En fonction de l'activité hydrolytique examinée, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 72 heures pour les phospholipases et pendant 7 jours pour les protéinases (Aoki et al., 1990; Tsang et al., 2007). Une boîte de Petri contenant un disque SCS non inoculé a été incubée comme un test témoin négatif.

3.2.3. Analyse du biofilm par spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique vibrationnelle qui permet l'analyse chimique des interactions moléculaires au sein d'un échantillon lorsqu'il est exposé à une lumière laser. L'application de cette technique à des contextes cliniques tels que la détection et l'identification de micro-organismes s'est avérée avantageuse en raison de sa rapidité et de sa précision (Nag & Lahiri, 2021; Pahlow et al., 2015).

Dans cette partie de l'étude, réalisée au sein du laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO), Université Tlemcen ; la spectroscopie Raman a été employée pour analyser les biofilms formés sur les disques SCS ; la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 a été choisie à cette fin. L'analyse a été réalisée à l'aide d'un spectromètre Raman (HORIBA LABRAM HR) opérant en mode spectrographique unique avec un réseau dispersif holographique de 600 rainures/mm.

Les cellules de *C. albicans* ATCC 10231, le sérum sanguin et les disques de silicone ont d'abord été soumis à une analyse spectrale Raman ; cette approche fournit des bandes spectrales caractéristiques pour chaque élément. Simultanément, une analyse spectrale a été réalisée sur les biofilms fongiques préalablement formés sur les disques SCS.

Les échantillons ont été analysés en mode rétrodiffusion sur la platine d'un microscope confocal Olympus fixé au spectromètre, couplé à un objectif longue distance de travail $\times 50$. Le détecteur utilisé était un dispositif à couplage de charge Symphony IGA refroidi à l'azote liquide. Des filtres coupe-bande holographique de 663 et 785 nm ont été utilisés pour éliminer la lumière diffusée par Rayleigh. La largeur de la fente d'entrée était de 100 μm , ce qui donne une résolution de 2 cm^{-1} dans la plage comprise entre 100 et 5000 cm^{-1} . Des acquisitions répétées utilisant le plus fort grossissement ont été accumulées pour améliorer le rapport signal/bruit dans les spectres. Les spectres ont été calibrés en utilisant la ligne 520,5 cm^{-1} d'une plaquette de silicium.

Étant donné que la cartographie Raman fournit une grande précision de la topographie de surface et de la distribution des échantillons (**Zhang et al., 2021**), elle a été effectuée dans l'objectif d'examiner la répartition du biofilm de *C. albicans* par rapport aux protéines sériques sur le substrat en silicone. Cette analyse concerne un pic particulier à 2909 cm^{-1} correspondant à l'étirement symétrique CH_3 associé au silicone, un autre à 2019 cm^{-1} lié au Phe, Tyr de la levure, ainsi qu'un pic distinctif à 933 cm^{-1} représentant l'étirement squelettique α du sérum. Une image obtenue à un grossissement de $\times 50$ sur une surface d'environ $100\text{ }\mu\text{m}^2$ du disque de silicone a été utilisée pour réaliser la cartographie Raman.

3.2.4. Analyse microscopique du biofilm

L'examen des structures du biofilm a été effectué en utilisant la microscopie à fluorescence (MF) au laboratoire de gestion durable des ressources naturelles dans les zones arides et semi-arides à l'université de Naama et la microscopie électronique à balayage (MEB) au Centre de mycologie médicale, hôpitaux universitaires, Centre médical de Cleveland, Université Case Western Reserve, Cleveland, États-Unis.

Un disque SCS sur lequel le biofilm de *C. albicans* ATCC 10231 a été préformé et un autre disque stérile ont été examinés au microscope à fluorescence (Euromex iScope, IS.3152-PLi/3). Aucune coloration n'a été appliquée aux échantillons. Cependant, des filtres de fluorescence bleus (475 nm) et verts (520 nm) ont été utilisés. Le microscope à fluorescence utilise une lumière d'excitation pour irradier les atomes de l'échantillon, ce qui excite les électrons à un niveau d'énergie plus élevé. Lorsque ces atomes reviennent à leur niveau d'origine, ils émettent de la lumière en réponse à l'excitation. Ceci permet d'observer les différentes zones d'un échantillon selon leur nature (**Hattori et al., 2012**).

D'autre part, le MEB fournit une imagerie haute résolution de la structure tridimensionnelle des biofilms et de leur distribution sur une surface (**Relucenti et al., 2021**). De ce fait, le biofilm précédemment formé sur les disques SCS a été lavé deux fois avec du PBS stérile, puis fixé pendant une nuit à 4°C en utilisant une solution de glutaraldéhyde à 2,5% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Les disques SCS ont ensuite été lavés à l'aide du tampon NaCACo (0,1 M) puis post-fixés dans une solution d' OsO_4 à 1% pendant 1 heure à 4°C .

Après un second lavage des disques, effectué à l'aide de NaCACo, suivi d'un double rinçage à l'eau distillée ; les disques ont été traités à l'acide tannique (1 %), puis laissés à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Trois rinçages à l'eau distillée ont ensuite été effectués avant de déposer les disques dans l'acétate d'uranyle (1 %) , également dans l'obscurité pendant une

heure. Une dernière étape de rinçage à l'eau distillée a été réalisée avant la déshydratation progressive dans une série d'éthanol de concentrations croissantes (30%, 50%, 75%, et 100%).

Les disques ont ensuite été séchés au point critique, recouverts de palladium par ombrage métallique et examinés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Thermo Fisher Scientific Apreo 2).

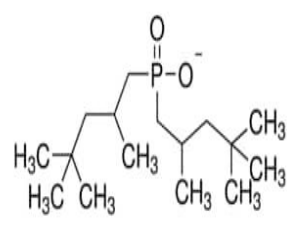
4. Inhibition des biofilms par des liquides ioniques

Les propriétés bioactives des liquides ioniques ont été évaluées afin d'apprécier leur potentiel en tant qu'agents antibactériens et antifongiques vis-à-vis des cellules de *C. albicans* ainsi que des bactéries co-isolées du même cathéter. Par la suite, leur activité hémolytique a été examinée afin d'évaluer leur toxicité potentielle, avant d'étudier leur effet sur la formation et la viabilité des biofilms.

4.1. Préparation des liquides ioniques

Trois liquides ioniques ont été utilisés dans cette étude, le Trihexyl(tétradécyl)phosphonium chlorure ($[P_{66614}][Cl]$), le Trihexyl(tétradécyl)phosphonium dicyanamide ($[P_{66614}][Dicyanamide]$) et le trihexyl(tétradécyl)phosphonium bis(2,4,4-triméthylpentyl) phosphinate ($[P_{66614}][Phosphinate]$). Les trois liquides ioniques ont été fournis avec un degré de pureté $\geq 90,0 \%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ; leurs structures chimiques sont représentées dans le **tableau 3**.

Tableau 3. Structures chimiques des liquides ioniques utilisés.

Nomenclature	Structure chimique
Trihexyl(tétradécyl)phosphonium chlorure $([P_{66614}][Cl])$	$ \begin{array}{c} (CH_2)_5CH_3 \\ \\ H_3C(H_2C)_5-P^+- (CH_2)_{13}CH_3 \quad Cl^- \\ \\ (CH_2)_5CH_3 \end{array} $
Trihexyl(tétradécyl)phosphonium dicyanamide $([P_{66614}][Dicyanamide])$	$ \begin{array}{c} (CH_2)_5CH_3 \\ \\ H_3C(H_2C)_5-P^+- (CH_2)_{13}CH_3 \\ \\ (CH_2)_5CH_3 \quad NC-N^-\equiv CN \end{array} $
Trihexyl(tétradécyl)phosphonium bis(2,4,4-triméthylpentyl) phosphinate $([P_{66614}][Phosphinate])$	$ \begin{array}{c} CH_2(CH_2)_4CH_3 \\ \\ CH_3(CH_2)_4CH_2-P^+-CH_2(CH_2)_{12}CH_3 \\ \\ CH_2(CH_2)_4CH_3 \end{array} $ 

Les liquides ioniques ont été conservés à température ambiante. Les solutions de travail ont été préparées en dissolvant chaque liquide ionique dans du diméthyl-sulfoxyde (DMSO, Sigma),

puis ont été stérilisées par filtration (filtres de 0,22 µm de porosité) et diluées à la concentration désirée dans le milieu de culture juste avant leur emploi.

4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les concentrations minimales inhibitrices des trois liquides ioniques [P₆₆₆₁₄][Cl], [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide] et [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] vis-à-vis des cellules planctoniques de *C. albicans* et des bactéries co-isolées ont été déterminées par la méthode de microdilution sur microplaques selon les protocoles du CLSI (2017) pour *C. albicans* et du CLSI (2012) pour les bactéries.

Des dilutions ont été réalisées dans le milieu de culture à partir des solutions mères de chaque liquide ionique à des concentrations finales allant de 0,122 µg/mL à 2000 µg/mL. L'inoculum fongique a été ajusté afin d'obtenir une concentration finale de $0,5 \times 10^3$ cellules/mL dans le milieu RPMI 1640, tandis que l'inoculum bactérien a été préparé dans le milieu Mueller Hinton pour atteindre une concentration finale de 10^6 cellules/mL.

Dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, 100 µL de la solution liquide ionique ainsi que 100 µL de l'inoculum microbien ont été introduits. Les microplaques ont ensuite été scellées et incubées pendant 24 heures, à une température de 35°C pour les levures et de 37°C pour les bactéries. Les CMI ont été établies par observation à l'œil nu des puits correspondants à la plus faible concentration de liquide ionique ayant démontré une inhibition complète de la croissance des micro-organismes. Les tests ont été menés en triplicata.

4.3. Test de l'effet hémolytique

Pour juger de la toxicité des concentrations actives des liquides ioniques examinés, une évaluation de l'hémolyse a été réalisée sur des érythrocytes humains ; le protocole de Wei et Bobek (2004) a été établi pour atteindre cet objectif. Le sang de volontaires sains a été prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA. Les érythrocytes ont été récupérées et lavés trois fois à l'aide du PBS stérile (2000 rpm, 10 min, 20 °C).

Une série de concentrations allant de 7,81 à 2000 µg/mL a été préparée dans des tubes stériles pour chaque liquide ionique, à savoir le [P₆₆₆₁₄][Cl], [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide] et [P₆₆₆₁₄][Phosphinate]. À partir de la suspension érythrocytes/PBS (1 % v/v), 100 µL ont été ajoutés à 100 µL des différents liquides ioniques dans des tubes stériles. Un témoin d'hémolyse totale a été préparé à l'aide d'une solution de Triton X-100 à 1% (Sigma-Aldrich).

Les tubes ont été incubés pendant une heure à une température de 37 °C puis soumis à une centrifugation (2000 rpm, 10 min). À partir du surnageant, 150 µL ont été placés dans les puits d'une microplaque, l'absorbance a ensuite été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (RT-2100C). Les mesures ont été réalisées en triplicata.

Le taux d'effet hémolytique des liquides ioniques a été déterminé à l'aide de la formule suivante, révélant le degré de toxicité de chacun d'eux (Wei et Bobek, 2004).

$$\text{Hémolyse \%} = [(A_{\text{échantillon}} - A_{\text{témoin négatif}}) / (A_{\text{témoin positif}} - A_{\text{témoin négatif}})] \times 100$$

A_{échantillon} : A₄₅₀ de l'échantillon traité au liquide ionique, A_{témoin négatif} : A₄₅₀ de l'échantillon traité au tampon, A_{témoin positif} : A₄₅₀ de l'échantillon traité au Triton X-100.

4.4. Effet sur la viabilité cellulaire sessile

Le liquide ionique ayant exprimé la meilleure activité antimicrobienne, associée à un faible effet hémolytique a été sélectionné pour évaluer son effet inhibiteur contre le biofilm mixte de *C. albicans* et *S. haemolyticus* (association N°5). Rappelons que ces deux microorganismes ont été co-isolés à partir d'un même cathéter d'hémodialyse après son ablation d'un patient hospitalisé dans le service de néphrologie-hémodialyse. Le protocole décrit par Pierce et al. (2008) a été utilisé avec quelques modifications, afin d'examiner l'impact du liquide ionique sur différents stades de la formation du biofilm.

En résumé, le biofilm est formé comme décrit ci-dessus, avec une incubation à 37 °C pendant différentes périodes ; 4 heures (phase d'adhésion), 24 heures et 48 heures (phase de maturation). Le surnageant a été ensuite retiré et les puits ont été lavés avec du PBS stérile (10 mM, pH 7,4) pour éliminer les cellules qui n'avaient pas adhéré à leur surface.

Par la suite, des volumes de 100 µL des solutions de liquides ioniques, préparées à des concentrations croissantes allant de 3 à 2000 µg/mL, ont été ajoutés aux puits. L'amphotéricine B et la vancomycine ont servi d'agents antimicrobiens de référence. Des tests de contrôle négatif et positif ont été réalisés en parallèle, puis les microplaques ont été réincubées pendant 24 h.

Après lavage des puits au PBS stérile, l'effet du liquide ionique sur les cellules sessiles a été évalué en utilisant la méthode de réduction du XTT, précédemment décrite. Les SCMI ont été déterminées en appliquant la formule suivante. Chaque test a été réalisé en triplicata.

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - A_{490} \text{ du biofilm traité} / A_{490} \text{ du contrôle positif}) \times 100$$

A₄₉₀ : Absorbance mesurée à 490 nm.

4.5. Effet sur la structure du biofilm

Afin d'analyser l'effet du liquide ionique sur la structure des biofilms, ces derniers ont été cultivés sur des disques en silicone (10 mm de diamètre), puis soumis à différents examens spectraux et microscopiques.

4.5.1. Analyse par cartographie Raman confocale assistée par un modèle d'apprentissage profond (Deep learning)

Pour étudier les changements structuraux et chimiques au sein du biofilms après traitement par le liquide ionique, des biofilms de 4, 24 et 48 heures ont été formés sur des disques de silicone et traités avec le liquide ionique à une concentration de 1 mg/mL, puis les échantillons ont été séchés à l'air, à température ambiante avant d'être analysés. Dans un premier temps, l'étude spectroscopique Raman a été réalisée à l'aide d'un spectromètre Raman (HORIBA LABRAM HR) pour identifier les différentes composantes du biofilm.

Dans un deuxième temps, une cartographie Raman confocale a été réalisée pour étudier la perspective spatiale de l'inhibition du biofilm mixte de *C. albicans* et de *S. haemolyticus* sur le support en silicone après le traitement par le liquide ionique. Pour cela, le pic à 2905 cm^{-1} de la chaîne CH aromatique a été pris comme référence pour le silicone (noir), à 943 cm^{-1} de la protéine pour *C. albicans* (vert) et à 1452 cm^{-1} de l'hydrate de carbone pour *S. haemolyticus* (bleu).

4.5.1.1. Analyse des images et quantification des couleurs

Un programme Python a été utilisé pour calculer le pourcentage de couleurs RVB de la cartographie Raman (Benahmed et al., 2025). Le programme a été configuré pour répondre approximativement au vert, au bleu et au noir. Pour ce faire, des images provenant d'un chemin de fichier désigné ont été chargées à l'aide de la bibliothèque OpenCV. Elles ont ensuite été converties de l'espace colorimétrique BGR par défaut à l'espace colorimétrique RGB, mieux adapté à la perception humaine et à l'analyse des couleurs. Ensuite, le code a calculé l'histogramme des couleurs à l'aide de la fonction `cv2.calcHist` d'OpenCV. Les valeurs de l'histogramme des couleurs ont ensuite été normalisées en divisant chaque valeur d'une classe de l'histogramme par le nombre total de pixels dans l'image, puis en multipliant par 100 pour obtenir des taux représentant la fréquence relative de chaque intensité de couleur dans l'image.

4.5.1.2. Traitement des données par un modèle d'apprentissage profond

L'intégration de l'apprentissage automatique profond aux données spectrales Raman constitue une approche innovante pour l'étude de l'inhibition des biofilms. Cette approche permet d'exploiter des données spectrales complexes en identifiant automatiquement des groupes de signatures chimiques identiques (**Rodriguez et al., 2023**).

Le flux analytique comprend le prétraitement des données, l'extraction des fonctions, le regroupement et l'interprétation des résultats (**figure 6**). En suivant l'approche décrite par Han et al. (**2024**), les images de la cartographie Raman ont été débruitées à l'aide d'un filtrage gaussien afin d'éliminer le bruit de fond, puis après une correction de ligne de base, les données ont été normalisées (mise à l'échelle des intensités spectrales) pour garantir la comparabilité inter-échantillons et une réduction de dimensions par analyse en composantes principales, conservant 99 % de la variance.

4.5.1.2.1. Apprentissage profond non supervisé

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un auto-encodeur convolutionnel, dont les vecteurs de caractéristiques extraits ont été regroupés par clustering K-means, pour distinguer les signatures spectrales typiques de *S. haemolyticus*, *C. albicans* et du substrat. Le clustering a été effectué aux temps T1 (4h), T2 (24h) et T3 (48h) afin d'évaluer l'évolution spatio-chimique des biofilms avec ou sans l'ajout du liquide ionique. Ensuite, des nuages de points ont été générés pour comparer l'intensité du biofilm avant et après l'application du traitement. Cette approche automatisée a permis une évaluation objective et à haut débit de l'inhibition des biofilms préformés à différents moments. Avec une précision de classification élevée attestée par un indice de rand ajusté de 0,9812.

4.5.1.2.2. Apprentissage profond supervisé

Parallèlement à l'apprentissage profond non supervisé, un modèle supervisé d'apprentissage profond a été élaboré pour la classification des spectres Raman en différentes composantes du biofilm au moyen d'un réseau de neurones convolutionnel (CNN). Le jeu de données a été divisé en 80% pour l'entraînement du modèle et 20% pour le test. Après encodage des étiquettes, la stabilité du modèle a été évaluée par validation croisée, révélant une bonne précision moyenne.

Le CNN a permis de classer avec précision les composantes de *C. albicans*, *S. haemolyticus* et du support et les performances du modèle ont été illustrés par une matrice de confusion.

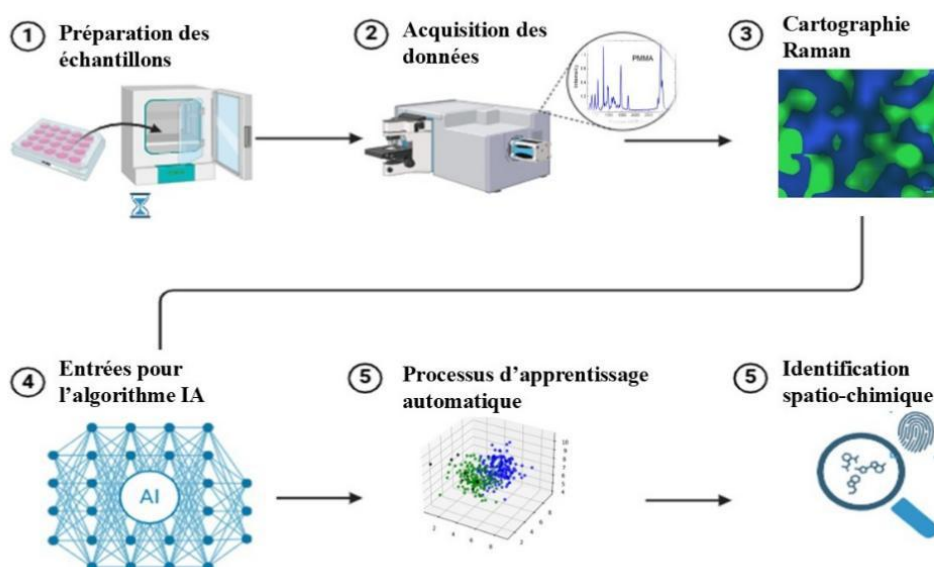


Figure 6. Flux de travail pour l'application de l'IA à l'analyse de l'inhibition du biofilm à partir des données de la cartographie Raman (Générée sur BioRender. com).

4.5.2. Examen par microscopie à fluorescence

Compte tenu de l'importance de la transition hyphes-levures pour l'intégrité du biofilm de *C. albicans* (Witchley et al., 2019), l'effet du liquide ionique sur la formation d'hyphes a été évalué à l'aide de la méthode de Jiang et al. (2016).

Pour cela, des disques de silicone ont été d'abord préparés. Les cellules de *C. albicans* ont été cultivées pendant une nuit dans du Sabouraud liquide à 30°C; la croissance des blastospores est favorisée dans ces conditions (Ramage et al., 2001). Les cellules de levures ont été récupérées (3000g, 5 min, 4°C), puis lavées deux fois avec du PBS stérile avant de les remettre en suspension dans du RPMI 1640 à une concentration finale de 10^6 cellules/mL. Le liquide ionique leur a été incorporé à une concentration finale sub-inhibitrice (3 μ g/mL) pour étudier son impact sur la morphologie cellulaire.

Des disques de silicone, utilisés comme support pour les biofilms, ont été contaminés par cette suspension microbienne puis incubés à 37°C pendant 24 h. Un test de contrôle positif a été effectué sans l'ajout du liquide ionique.

Les disques contaminés par des suspensions de levure, traités et non-traités par le liquide ionique, ont fait l'objet d'un examen à l'aide d'un microscope à fluorescence pour évaluer la formation des hyphes (Euromex iScope, IS.3152- PLi/3). Des filtres de fluorescence bleus (475 nm) et verts (520 nm) ont été utilisés sans coloration des échantillons.

4.5.3. Examen par microscopie électronique à balayage

En raison de l'importance de la caractérisation structurale des biofilms et de leur répartition sur une surface déterminée par le MEB (**Relucenti et al., 2021**), cet outil de haute résolution a été utilisé pour examiner l'effet du liquide ionique lors de la phase initiale d'adhésion du biofilm ainsi qu'après sa maturation (24 h).

Un biofilm mixte a été formé sur des disques appropriés. Ceux-ci ont ensuite été placés dans des puits d'une microplaques à 24 puits contenant 1 mg/L du liquide ionique. Les microplaques ont été incubés ensuite à 37°C pendant 24 heures. Une fois retirés des puits, les disques ont été rincés trois fois avant d'être préparés pour leur examen au MEB (Fisher Scientific Apreo 2).

4.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide des logiciels statistiques SPSS version 27.0.1 et Gen Stat discovery, Edition 3. La comparaison entre les moyennes a été étudiée par une analyse de la variance (ANOVA) et les tests de Tukey et Duncan pour les analyses post-hoc, où les différences étaient considérées comme statistiquement significatives si $p < 0,01$. De plus, une analyse des Correspondances Multiples (ACM) a été réalisée afin d'explorer les associations entre les variables catégorielles de l'étude.

Concernant l'analyse RAPD-PCR, l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) a été utilisé afin de regrouper les souches fongiques en fonction de leur similarité génétique, à l'aide du logiciel PAST version 4.0.3.

Troisième partie

Résultats et discussion

Cette recherche, réalisée dans le contexte d'une thèse doctorale, se centre sur une problématique fréquemment soulevée par les équipes médicales ; celle qui concerne les infections associées à l'utilisation de cathéters au sein des services hospitaliers. En fait, les dispositifs médicaux invasifs, tel que les cathéters, jouent un tandem de rôle marquant car ils constituent une porte d'entrée et une surface privilégiée pour l'adhésion de divers agents pathogènes. Cela conduit à des infections qui restent un défi majeur pour les systèmes de santé du monde entier, affectant la vie des patients hospitalisés, en particulier ceux souffrant d'immunodéficience (Isigi et al., 2023).

Cette étude porte également sur l'étude des biofilms mixtes, levures/bactéries notamment, formés sur des cathéters prélevés dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse du CHU de Tlemcen-Algérie.

1. Altérations mixtes des cathéters par *Candida albicans*/bactéries

1.1. Collecte des cathéters

Les prélèvements ont été réalisés entre octobre 2021 et juin 2022. Cinquante (50) cathéters ont été collectés à partir des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen, dont 36 du service d'hématologie clinique et 14 du service de néphrologie-hémodialyse. Il convient de préciser que seuls les cathéters implantés pendant une période de 48 heures et plus ont été pris en compte.

Parmi l'ensemble des cathéters prélevés, 69,44% ont donné une culture microbienne positive au service d'hématologie clinique et 92,85% au service de néphrologie-hémodialyse, ce qui donne un taux global d'altération de 76% (**tableau 4**). Ces taux préoccupants reflètent l'ampleur du risque associé à l'utilisation des cathéters dans les services hospitaliers étudiés. Cette situation est d'autant plus alarmante puisque 26% des patients sont décédés au service d'hématologie clinique au cours de la période de prélèvement (taux délivré par le personnel administratif du service) ; ce qui souligne le danger clinique à l'égard des patients.

Tableau 4. Prélèvements des cathéters et taux de positivité de leurs cultures dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse.

Service hospitalier	Culture positive	Culture négative
Hématologie clinique (%) n=36	69,44% (25)	30,55% (11)
Néphrologie-hémodialyse (%) n=14	92,85% (13)	7,14% (1)
Totale (%) n=50	76% (38)	24% (12)

Il convient de noter que le nombre des patients hospitalisés dans le service de néphrologie-hémodialyse était inférieur à celui observé en hématologie clinique. Cependant, la prédominance des cas positifs au service de néphrologie-hémodialyse pourrait être attribuée aux spécificités des populations hospitalisées et à la gestion des cathéters au sein de chaque service.

Ces résultats s'inscrivent dans la variabilité notable des taux rapportés en néphrologie. **Rahman et al. (2020)** ont rapporté 66%, alors qu'un taux de 89% a été enregistré par **Al-Solaiman et al. (2011)**. **Mahmood et al. (2019)** ont, en revanche, rapporté un taux très faible (1,1 %). Cette hétérogénéité pourrait être expliquée par les différences dans les protocoles d'asepsie et la durée d'utilisation des cathéters. Concernant le service d'hématologie, **Özalp Gerçeker et al. (2019)** ont rapporté un taux de 61,8% ce qui est proche de celui rapporté dans la présente étude.

L'analyse microbienne des cathéters a révélé divers types d'altération, les résultats du profil d'altération microbienne des cathéters sont représentés dans la **figure 7**.

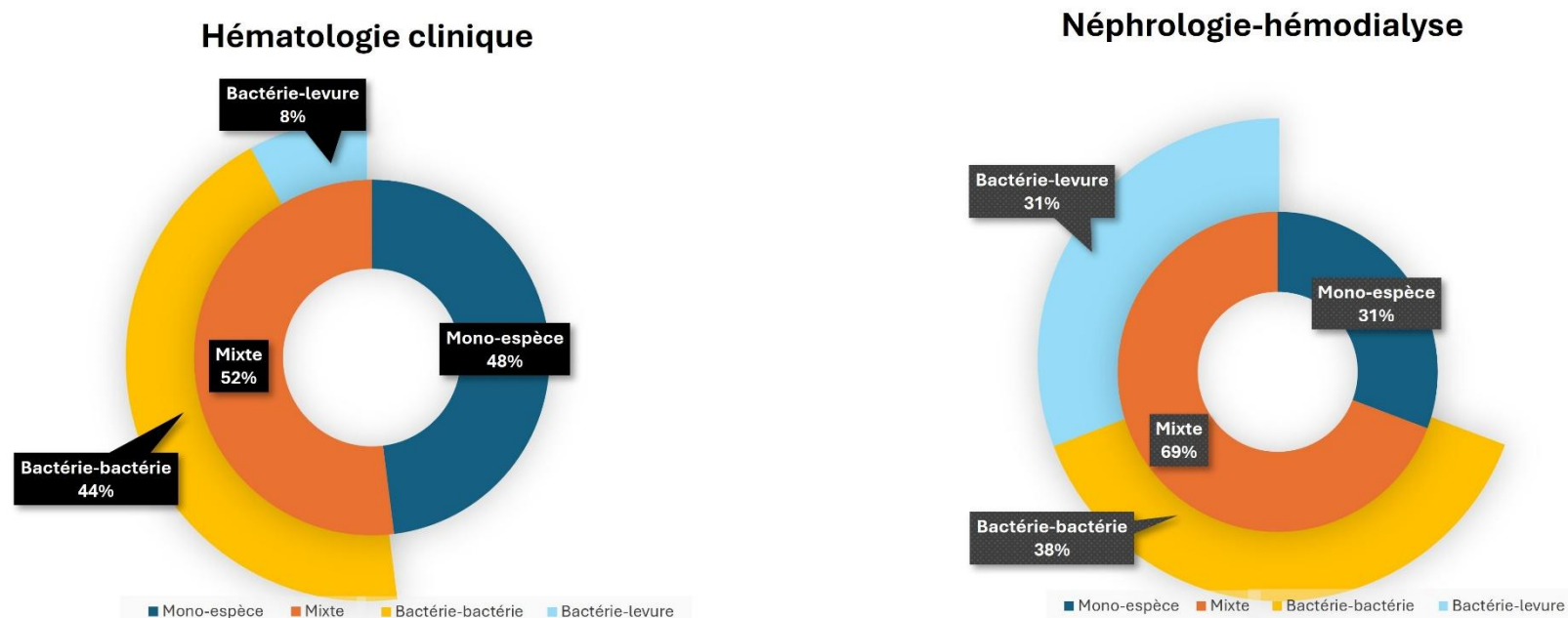


Figure 7. Altérations microbiennes des cathéters dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse du CHU de Tlemcen.

L'analyse microbienne des cathéters a révélé une prédominance notable des altérations mixtes de ces dispositifs médicaux, associant bactérie-bactérie ou bactérie-levure, par rapport aux altérations mono espèces. Cette dominance témoigne de la complexité croissante des infections associées à l'utilisation des cathéters. Il est par ailleurs surprenant que les altérations à espèce unique ne soient représentées que par des bactéries.

Les disparités sont apparentes lorsqu'on examine chaque service individuellement (**figure 7**). Au sein du service d'hématologie clinique, les altérations microbiennes mixtes ont légèrement dominé (52%), avec un taux notable d'associations entre bactéries (44%) et un faible taux d'associations entre bactéries et levures (8%). En revanche, le service de néphrologie-hémodialyse a montré une situation différente avec une nette dominance des altérations mixtes (69%), incluant 31% d'associations bactérie-levure. Cette situation pourrait s'expliquer en partie par des éléments de susceptibilité propres aux différences entre groupes de patients.

En effet, Dariane et al. (**2015**) ont rapporté que l'insuffisance rénale, ainsi que les séances d'hémodialyse répétées constituent des facteurs de risque importants pour les infections fongiques, notamment à *Candida spp.* Filho et al. (**2017**) ont ajouté que les patients greffés du rein sous immunosuppresseurs sont particulièrement exposés aux infections mixtes, en raison d'une altération profonde de la réponse immunitaire.

Il est important tout de même de souligner que les patients inclus dans cette étude ont reçu un traitement antibiotique, exclusivement antibactériens ; la vancomycine, le métronidazole, l'imipénème/ Cilastatine et la céftazidime dans le service d'hématologie clinique, tandis que la céftazidime, la ciprofloxacine, l'imipénème/ Cilastatine, la cefazoline et la gentamicine ont été administrés dans le service de néphrologie-hémodialyse.

Bien que les altérations bactérie-levure étaient de 31% dans le service de néphrologie-hémodialyse et 8% dans le service d'hématologie clinique, aucun traitement antifongique n'a été instauré au cours de la période des prélèvements.

1.2. Détermination des types d'infectivité des cathéters

Rappelons que selon **Brun Buisson et al. (1987)**, la contamination se définit par une culture positive non significative (seuil de signification $\geq 10^3$) sans présence de signes locaux ou généraux d'infection, tandis que la colonisation fait référence à une culture positive significative en l'absence de signes d'infection. En revanche, l'infection se définit par une culture positive significative avec présence de signes d'infections.

Les résultats relatifs à la détermination des types d'infectivité des cathéters prélevés à partir des patients dans les deux services sont regroupés dans la **figure 8**.

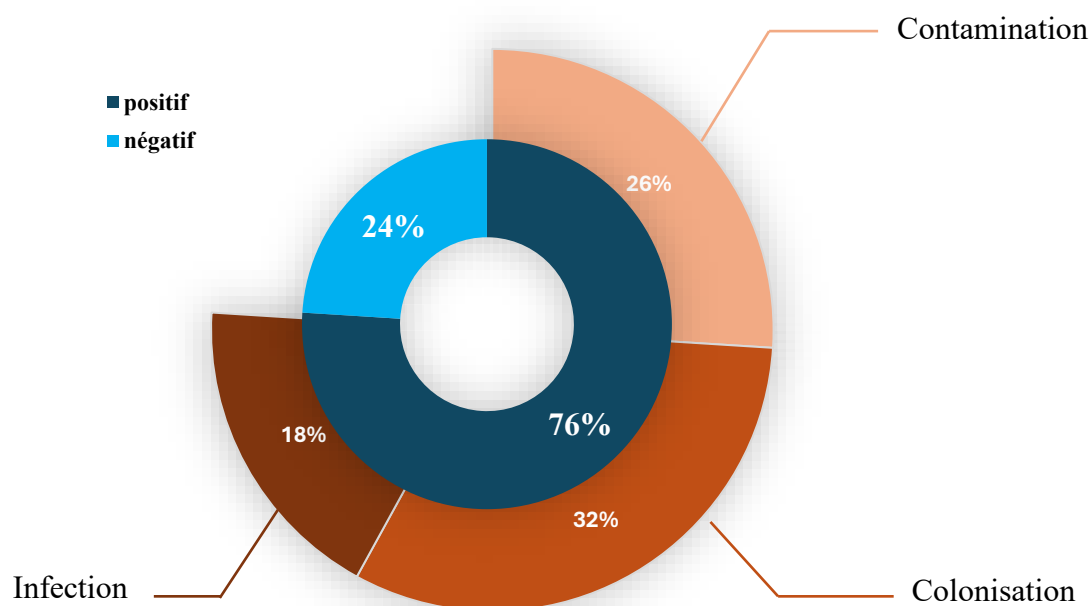


Figure 8. Types d'infectivité des cathéters en fonction des prélèvements microbiologiques positifs.

L'analyse des cathéters aux cultures positives met en évidence l'existence des trois formes d'infectivité. Dans cette étude, la colonisation a été identifiée comme l'infectivité la plus fréquente (32%), suivie de près par la contamination (26%), tandis que l'infection a concerné 18% des cas.

Selon **Quinet, (2006)**, une souche qui colonise un cathéter induit une infection dans 20% des cas. Cependant, les résultats obtenus dans cette recherche ne vont pas dans le même sens avec ceux rapportés par **Touil (2023)**, où l'infection était la forme d'altération dominante, dont les cathéters ont été prélevés des services d'anesthésie-réanimation, neurologie médicale et chirurgie ortho-traumatologie du même centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Ces résultats pourraient refléter une prise en charge des patients en amont dans les services d'hématologie clinique et de néphrologie-hémodialyse.

Par ailleurs, nous avons évalué l'effet de plusieurs facteurs sur les types d'infectivité enregistrés, à savoir le service hospitalier, le type de cathéter utilisé, la durée de son implantation et l'âge des patients.

1.2.1. Infectivité et service hospitalier

L'analyse des résultats a révélé que les deux formes d'infectivité, à savoir la colonisation et la contamination, ont été les plus couramment observées dans les deux services soumis à l'étude ; les résultats de la répartition des types d'altération des cathéters en fonction du service hospitalier sont illustrés dans la **figure 9**.

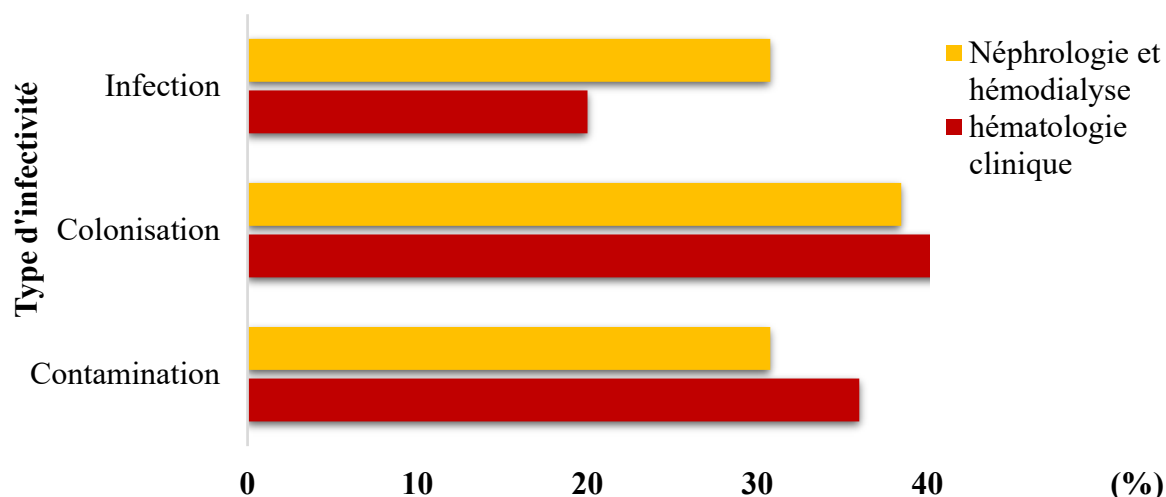


Figure 9. Répartition proportionnelle des types d'infectivité selon le service hospitalier.

Dans le service d'hématologie clinique, 44% des colonisations et 36% de contaminations liées aux cathéters ont été enregistrées, tandis que le service de néphrologie-hémodialyse a enregistré les mêmes infectivités respectives avec 38,46% et 30,76%. En revanche, l'infection a été plus prononcée dans le service de néphrologie-hémodialyse avec un taux de 30,76% par rapport à l'hématologie clinique (20%). Ces observations montrent une variabilité des types d'infectivité selon le contexte hospitalier.

Seghir (2015) dans son étude a rapporté une prédominance des contaminations et des colonisations dans le service de chirurgie par rapport au service de cardiologie du même CHU. De même, la recherche menée par Seddiki et al. (2015) sur les infections fongiques liées aux cathéters, recueillie au CHU de Sidi Bel Abbès, a révélé une disparité notable des types d'infections en fonction des départements hospitaliers. Le service de réanimation-anesthésie a occupé la première place en termes d'infections et de contaminations, tandis que le service de chirurgie générale a présenté le taux de colonisation le plus élevé. A l'inverse, le service d'hématologie clinique n'a rapporté qu'un seul cas de colonisation.

D'autres recherches ont signalé que les patients en néphrologie présentent un risque accru d'infections, en particulier dues à des bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques et ce, par rapport à la colonisation (Girndt, 2020; Wang et al., 2019). Cette divergence reflète la variabilité des facteurs de risque ; les services ayant recours de manière accrue à des cathéters invasifs maintenus sur une durée prolongée chez des patients vulnérables sont les plus susceptibles de subir des infections liées aux cathéters.

1.2.2. Infectivité et type de cathéter

Le type d'infectivité s'est avéré étroitement lié au type de cathéter utilisé dans les deux services étudiés. D'après la **figure 10**, qui montre la répartition des types d'infectivité selon le type de cathéter prélevé, la contamination était plus fréquente en ce qui concerne les cathéters veineux périphériques (45,83%).

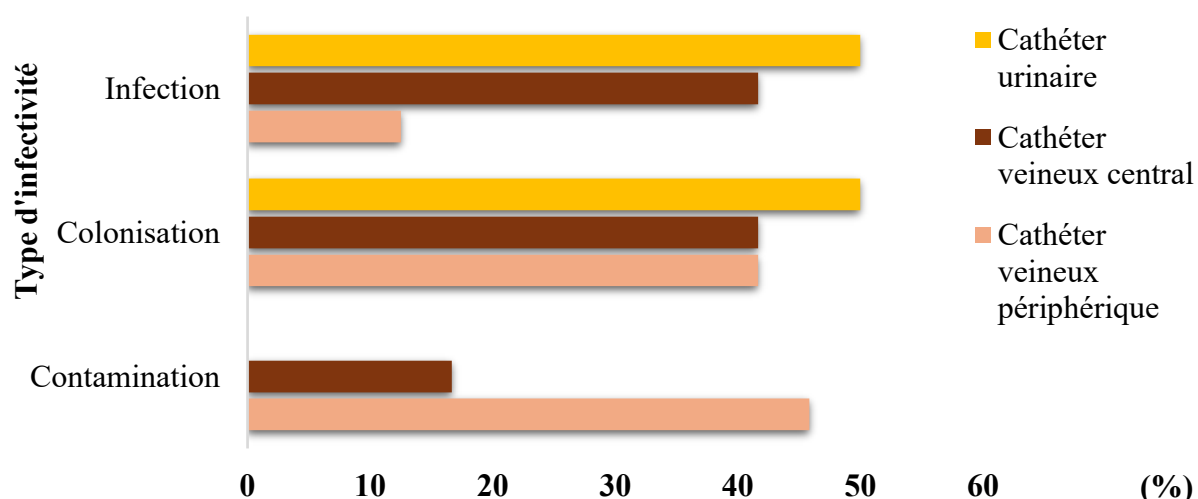


Figure 10. Répartition des types d'infectivité selon le type du cathéter.

Cependant, seulement un sixième (1/6) des cathéters veineux centraux présentait une infectivité de type contamination. Toutefois, les cathéters veineux centraux et périphériques ont affiché un taux de colonisation identique (41,66 %). Par ailleurs, le taux enregistré des cathéters veineux centraux présentant une infection (41,66%) était plus de trois fois supérieur à celui des cathéters veineux périphériques (12,5%).

Les cathéters sont fréquemment manipulés, ce qui traduit leur susceptibilité importante à l'adhésion et la prolifération microbienne. Selon Becerra-Bolaños et al. (2025), des facteurs propres au patient, tels que des antécédents d'oncologie ou de pathologie cardiaque, ainsi que

la voie d'insertion, exercent une influence majeure sur la colonisation des cathéters veineux centraux. Toutefois, la méthode de pose du cathéter n'a pas révélé de lien significatif, que ce soit avec sa colonisation ou son infection.

En revanche, les cathéters urinaires ont présenté une situation préoccupante avec un taux équivalent d'infection et de colonisation (50%), ce qui traduit un risque infectieux élevé surtout pour les patients immunodéprimés. La présente analyse partage les mêmes observations que celle réalisée par **Touil (2023)** au CHU de Tlemcen qui a révélé que les cathéters urinaires étaient les plus touchés par l'infection, tandis que la contamination affectait principalement les cathéters veineux périphériques et que la colonisation était liée à l'usage de sondes vésicales à 50%, ainsi que de cathéters veineux centraux et périphériques. Cela met en exergue la forte implication des cathéters urinaires dans l'infection et la colonisation.

Dans ce même contexte, l'équipe de **Bashir et al. (2020)** a démontré que le risque d'infection lié aux cathéters urinaires est caractérisé par une progression rapide avec un taux quotidien de 3 à 7%.

1.2.3. Infectivité et durée de pose des cathéters

Le temps de pose de ces dispositifs médicaux est un facteur déterminant du type de leur infectivité. La **figure 11** regroupe les résultats relatifs à la répartition des types d'infectivité selon la durée de pose des cathéters, trois jours ou moins, ou plus de trois jours. Il faut noter que tous les cathéters prélevés ont été implantés chez des patients hospitalisés depuis 48 heures ou plus.

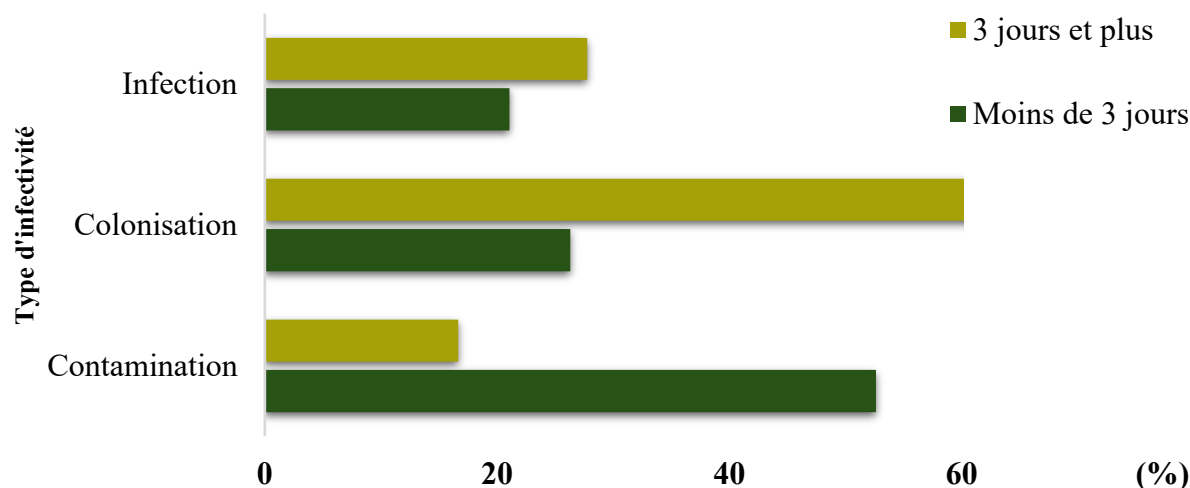


Figure 11. Répartition des types d'infectivité selon la durée de pose des cathéters.

Une contamination a été observée chez plus de la moitié des cathéters implantés depuis moins de 3 jours (52,63 %). Au-delà de ce temps de pose, ce type d'infectivité n'atteint que 16,66 %. En revanche, pour les cathéters insérés pendant trois jours ou plus, la colonisation et l'infection ont été observées avec des taux respectifs de 61,11% et 27,77%.

D'après ces résultats, il apparaît que l'infectivité des cathéters de type colonisation et/ou infection se manifeste après une durée d'installation de trois jours ou plus. En fait, la contamination des cathéters est le stade précoce de leur infection (**Brun Buisson et al., 1987**).

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Seghir (2015)**, qui a montré que la majorité des cas d'infection (75%) sont enregistrés lorsque les cathéters sont mise en place pendant 3 jours et plus. Cela souligne l'impact significatif de la durée de pose sur l'altération microbienne des cathéters. Une étude prospective réalisée dans un hôpital grecque par **Pitiriga et al. (2022)** a montré qu'une prolongation de la durée de pose des cathéters est associée à des taux plus élevés d'infections, même en cas de mise en place d'un ensemble de mesures préventives. En plus, **Fukuoka et al. (2018)** ont signalé dans leur étude que chaque jour supplémentaire de sondage urinaire augmente le risque d'infection de 5%.

1.2.4. Infectivité et tranches d'âge

Une répartition des types d'infectivité selon les tranches d'âge des patients est réalisée afin de vérifier l'existence d'un rapport ou non entre ces deux paramètres. Il convient de souligner que les tranches d'âge ont été déterminés selon la classification suggérée par **Statistique Canada**

(2024) comme suit, adolescent (15 à 24 ans), adulte (25 - 64 ans) et aînée (65 ans et plus). Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 12**.

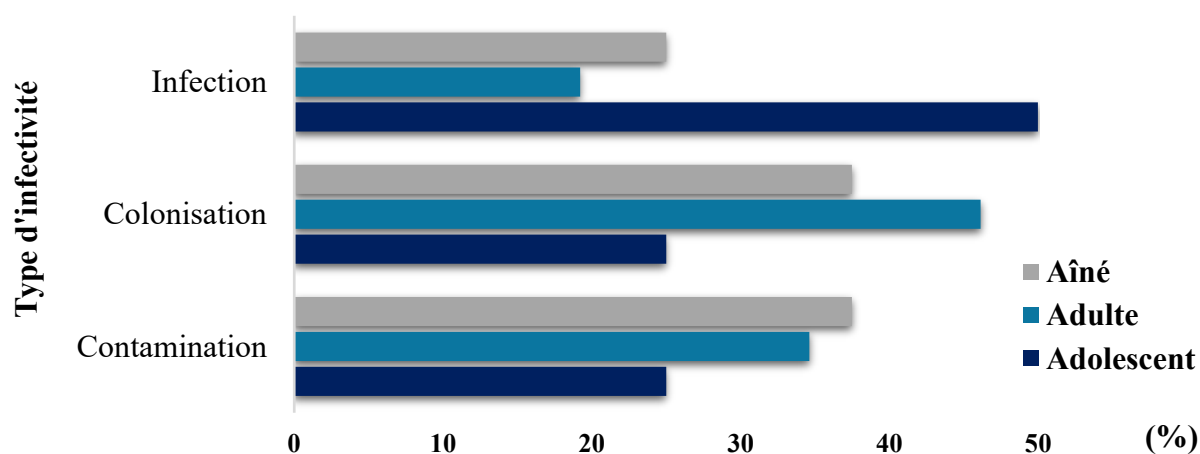


Figure 12. Répartition des types d'infectivité selon les tranches d'âges des patients.

D'après cette étude, l'infectivité des cathéters semble fluctuer en fonction de l'âge des patients. En effet, une nette prédominance de la colonisation des cathéters a été observée chez les adultes (46,15%) suivie par la contamination (34,62%) puis, l'infection (19,23%). Chez les aînés, les taux de contamination et de colonisation ont toutes deux été égaux (37,5% chacun), tandis que l'infection atteignait un taux de 25%.

A l'inverse de ce qui est largement rapporté dans la littérature, reliant souvent l'âge avancé à une vulnérabilité accrue aux infections liées aux cathéters (**Guo et al., 2024; Zhao et al., 2019**) ; nos observations indiquent que chez les adolescents, l'infection est la principale forme d'altération des cathéters (50%). Ce taux élevé pourrait en partie être attribué à une gestion particulière apportée à cette catégorie de patient, souvent perçue comme moins à risque.

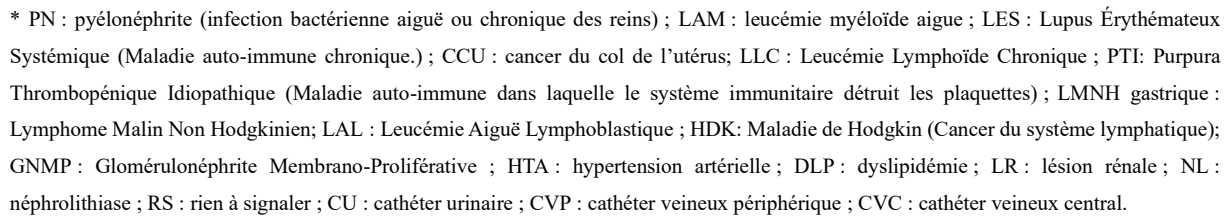
Ce constat est soutenu par les conclusions de Neji et al. (**2021**) qui ont démontré que l'occurrence des infections associées aux cathéters d'hémodialyse est principalement liée à des facteurs de risque tels que l'obésité, l'hygiène corporelle plutôt qu'à l'âge adulte ou juvénile pris isolément. En hématologie, Trembath et al. (**2024**) ont également rapporté que l'âge n'est pas un facteur de risque significatif pour les infections liées au cathéter. Au contraire, c'est plutôt l'état clinique, en particulier l'immunodépression, la présence de maladies hématologiques et les éléments liés au dispositif médical, tels que le type de cathéter et la durée de son utilisation qui impactent.

Cela suggère que la forte incidence des formes sévères d'altérations microbiennes des cathéters, observée chez les patients le plus jeunes pourrait être liée aux caractéristiques cliniques spécifiques de la population étudiée. Les patients en hématologie, incluant de nombreux cas de pathologies oncologiques, ainsi qu'en néphrologie, notamment les receveurs de greffes rénales, présentent un système immunitaire affaibli qui les rend particulièrement vulnérables aux infections, indépendamment de l'âge.

Etant donné que les infections associées aux cathéters sont reconnues comme étant multifactorielle (**Diagne et al., 2022**); une analyse des correspondances multiples (ACM) a été réalisée afin d'examiner simultanément l'ensemble des variables cliniques et démographiques des patients étudiés, susceptibles d'influencer le type de l'infectivité observé, et ainsi de mieux interpréter les résultats observés (**figure 13**).

L'analyse ACM a révélé un taux d'information globale de 21,3% pour l'ensemble des axes. Concernant le compartiment 1 (+X ; +Y), le modèle statistique a mis en évidence une association étroite entre l'infection du cathéter et un état de polymorbidité, incluant notamment le diabète, l'hypertension artérielle et la dyslipidémie. Par ailleurs, l'insuffisance rénale ainsi que les antécédents d'intervention chirurgicale augmentent spécifiquement ce risque au sein du service de néphrologie-hémodialyse. Sur le plan microbiologique, l'infection du cathéter est souvent associée à des altérations polymicrobiennes de type bactérie-levure ou bactérie-bactérie, traduisant une gravité accrue et une complexité clinique. Ces observations plaident, d'une part, pour un renforcement des pratiques d'asepsie et du contrôle des dispositifs médicaux, et d'autre part, pour une meilleure adaptation des traitements antibiotiques et antifongiques.

En effet, l'impact des comorbidités sur les infections liées aux cathéters a été rapporté dans la littérature. **Zahra Zahid et al. (2023)** ont souligné que les patients souffrant de maladies chroniques telles que le cancer, l'insuffisance rénale ou des maladies cardiovasculaires présentent un risque significativement accru d'infections liées aux cathéters. Ces comorbidités sont souvent associées à une immunodépression, à une exposition prolongée aux procédures invasives et à une hospitalisation répétée. Cela confirme que la gravité de la maladie sous-jacente et l'état physiologique général du patient sont des déterminants majeurs dans la genèse de ces infections.



Concernant le compartiment 2 (+X ; -Y), celui-ci est représentatif des altérations mono-espèce d'origine bactérienne. La colonisation et la contamination des cathéters surviennent fréquemment chez des patients porteurs de CVC. Ces altérations, de nature mono-espèce bactérienne traduisent un état pré-infectieux, probablement lié à des manipulations répétées des dispositifs sans signification clinique marquée. Cet état semble associé à divers facteurs prédisposants tels que le goitre, le lymphome malin non hodgkinien, une infection COVID-19 ancienne, le purpura thrombopénique idiopathique ainsi que des affections métaboliques comme le diabète, la dyslipidémie et la néphrolithiase. Par ailleurs, le sexe féminin apparaît comme un facteur influençant ce type d'altération des cathéters, ce qui est en accord avec les observations de l'étude transversale menée sur six hôpitaux par Letica-Kriegel et al. (2019), où le sexe féminin a été identifiée comme un facteur de risque significatif pour les infections liées aux cathéters urinaire.

Le service d'hématologie clinique est, quant à lui, majoritairement associé à des patients adultes et adolescents atteints de pathologies hématologiques telles que la leucémie lymphoïde chronique, des lymphomes non hodgkiniens, souvent sous antibiothérapie, comme représenté par le compartiment 3 (-X ; -Y). Ceci correspond à un état clinique moins alarmant et traduit un risque plus faible et un contrôle satisfaisant des infections liées aux cathéters dans ce service.

Enfin, le compartiment 4 (-X ; +Y) regroupent principalement des modalités associées à une faible ou inexistante activité infectieuse. La proximité de comorbidités telles que l'anémie et la cardiopathie suggère qu'elles ne constituent pas, dans ces profils précis, des facteurs déterminants pour la positivité des cultures.

1.3. Identification des microorganismes

Outre la méthode de coloration de Gram utilisée pour les bactéries, et CHROM-Agar™ *Candida* pour les levures ; l'identification de l'ensemble des levures et des bactéries isolées des cathéters altérés a été effectuée grâce aux galeries Api et VITEK 2.

1.3.1. Identification des levures

L'identification des levures a permis d'attribuer six souches au genre *Candida* ; cinq isolats de *Candida albicans* et un seul pour *C. kefyr*. Cette prédominance de *C. albicans* est cohérente avec les données de la littérature, qui identifient cette espèce comme la levure pathogène humaine la plus souvent retrouvée sur les dispositifs médicaux altérés (Huang et al., 2024; Wijaya et al., 2023).

De plus, *C. albicans* génère rapidement des biofilms structurés, qui résistent à l'action des antifongiques et à la réaction du système immunitaire, ce qui fait de lui un pathogène opportuniste majeur lié aux dispositifs médicaux (Seddiki et al., 2015). Cela résulte de la capacité élevée d'adhésion aux surfaces abiotiques que possède cette espèce, stimulée par la présence de plusieurs protéines d'adhésion et par la transition morphologique levure-hyphe, qui lui procure un caractère compétitif (Lopes & Lionakis, 2022).

La micrographie de *C. albicans* montre clairement différentes formes fongiques, à savoir les blastospores, les cellules bourgeonnantes et les tubes germinatifs (figure 14).

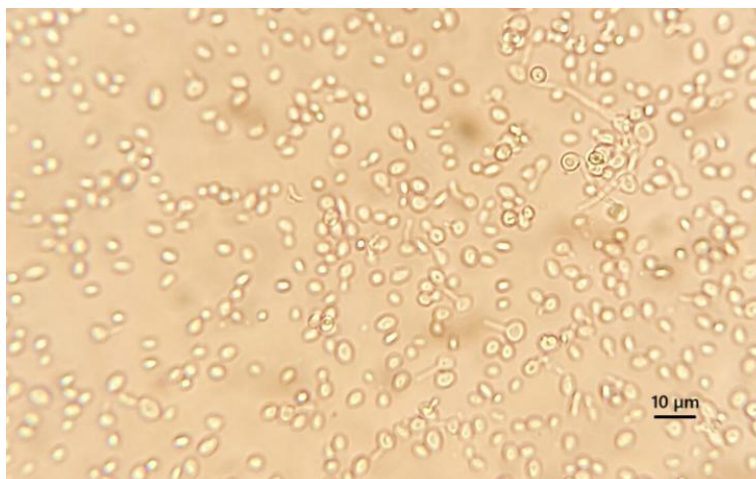


Figure 14. Micrographie optique des cellules fongiques de *C. albicans* montrant des blastospores (rondes et ovales), des cellules bourgeonnantes et des tubes germinatifs (Grossissement $\times 40$).

L'isolement de l'espèce *C. kefyr* mérite d'être souligné. Bien que communément admise comme étant commensale, cette espèce a récemment émergé comme agent opportuniste, en particulier chez les patients immunodéprimés dans un contexte post-COVID-19 (**Spiliopoulou et al., 2022**). Il est d'ailleurs notable que, dans notre étude, l'espèce *C. kefyr* a été isolée à partir d'un cathéter chez un patient dans le service d'hématologie clinique ayant présenté une infection à SARS-CoV-2, ce qui renforce l'hypothèse d'existence d'un lien entre l'état immunitaire altéré par cette infection et l'émergence de cette espèce. En plus, **Ahmad et al. (2020)** ont indiqué que malgré la faible prévalence de *C. kefyr* parmi les isolats cliniques (0,83%), cette espèce provoque des infections invasives.

1.3.2. Identification des bactéries

Dans un premier temps, l'ensemble des bactéries isolées a été soumis à une coloration de Gram en vue d'une orientation initiale de l'identification. Ce test a révélé une légère majorité des bactéries présentant une couleur violette caractéristique des bactéries à Gram positif (56%), tandis que 44% ont manifesté une couleur rose, typique des bactéries à Gram négatif (**figure 15**).

Morphologiquement, les bactéries à Gram-positif ont été observées principalement sous forme de cocci libres ou regroupés en amas, suggérant leur appartenance au genre *Staphylococcus*. Une minorité restreinte de bactéries se présentaient sous forme de bacille. En revanche, les bactéries à Gram négatif ont été essentiellement observées sous forme de bâtonnets.

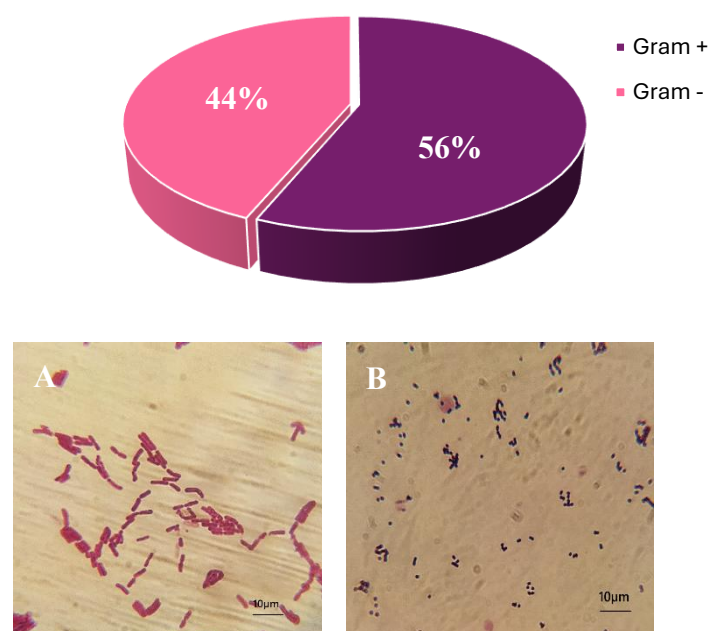


Figure 15. Pourcentages et micrographies des bactéries à Gram négatif (A) et à Gram positif (B) isolées des cathéters altérés, observées au microscope optique après coloration de Gram (Grossissement x100, à immersion).

Ces résultats ont été complétés dans un deuxième temps par l'identification biochimique. Les tableaux suivants (**Tableau 5 et 6**) regroupent les espèces bactériennes identifiées ainsi que leurs proportions.

Plusieurs genres de bactéries à Gram-positif ont été identifiés, toutefois *Staphylococcus spp.* a été l'isolat le plus fréquent, représentant 65% du total (**Tableau 5**). Ce résultat corrobore ceux d'autres études ayant montré que *Staphylococcus* représente le genre bactérien majoritairement isolé des dispositifs médicaux altérés (**Pietrocola et al., 2022; Zheng et al., 2018**).

Staphylococcus haemolyticus, un staphylocoque à coagulase négative, s'est avéré être l'isolat dominant. Cette espèce, longtemps perçue comme un colonisateur commensal de la peau, est désormais reconnue comme une menace émergente impliquée dans les infections nosocomiales, notamment chez les patients immunodéprimés ou porteurs de dispositifs médicaux (**Magnan et al., 2024**). Son rôle pathogène et d'autant plus préoccupant du fait qu'elle présente fréquemment une résistance aux antibiotiques, ce qui limite considérablement les choix du traitement (**Rossi et al., 2024**).

Concernant *S. aureus* et *S. epidermidis*, les taux d'isolement étaient relativement faibles par rapport à leur importance clinique et épidémiologique (**Oliveira et al., 2018**). Il convient de noter que d'autres espèces de *Staphylococcus* ont été isolées, notamment *S. lentus*, *S. hominis*,

S. capitis, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. auricularis* et *S. xylosus* (Tableau 5). D'autres genres bactériens à Gram positif, ont également été détectés, tels que *Micrococcus*, *Bacillus*, *Dermaococcus* et *Kocuria*, connus comme des commensaux de la peau et pathogènes émergents (Moskovicz et al., 2021; Napolitani et al., 2019; Williams & MacLea, 2019; Zhu et al., 2021).

Tableau 5. Espèces bactériennes à Gram positif identifiées et leurs proportions.

Genre et espèce	Nombre (%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7 (17,5)
<i>Staphylococcus lentus</i>	4 (10)
<i>Staphylococcus hominis</i>	4 (10)
<i>Micrococcus luteus</i>	4 (10)
<i>Staphylococcus capitis</i>	3 (7,5)
<i>Bacillus spp.</i>	3 (7,5)
<i>Kocuria kristinae</i>	3 (7,5)
<i>Staphylococcus warneri</i>	2 (5)
<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	2 (5)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1 (2,5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (2,5)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (2,5)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1 (2,5)
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1 (2,5)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1 (2,5)
<i>Kocuria rizophila</i>	1 (2,5)
<i>Kocuria varians</i>	1 (2,5)
Total	40 (100)

Concernant les bactéries à Gram négatif, *Enterobacter cloacae* s'est révélé être l'espèce la plus fréquemment isolée (45,16%), sa présence prédominante semble illustrer sa capacité à persister sur les dispositifs médicaux. Cette entérobactérie opportuniste est fréquemment associée aux infections nosocomiales, notamment respiratoires, urinaires et sanguines (Annavaiah et al., 2019).

D'autres genres bactériens ont été identifiés avec des proportions moindre, à savoir *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Pantoa*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Kluyvera* et *Pasteurella* (Tableau 6).

Tableau 6. Espèces bactériennes à Gram négatif identifiées et leurs proportions.

Genre et espèce	Nombre d'isolats (%)
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	14 (45,16)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	5 (16,13)
<i>Rhizobium radiobacter</i>	3 (9,68)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (6,45)
<i>Pantoa spp.</i>	2 (6,45)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (3,23)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (3,23)
<i>Kluyvera spp.</i>	1 (3,23)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 (3,23)
<i>Pasteurella testudinis</i>	1 (3,23)
Total	31 (100)

Bien que peu fréquente, l'isolement de *Rhizobium radiobacter* mérite une attention clinique particulière. Autrefois identifiée comme saprophyte du sol ou phytopathogène, cette espèce a été signalée comme pathogène opportuniste chez l'homme, souvent lié à l'immunosuppression ou à l'utilisation de dispositifs médicaux invasifs (Stamou et al., 2018). Récemment, on a signalé des cas d'une résistance à la céftazidime chez *R. radiobacter*, soulignant la nécessité de maîtriser sa propagation (Hartman et al., 2023).

Il convient de noter que la suite de cette étude a exclusivement porté sur les associations microbiennes mixtes, *C. albicans*/bactérie. Ces associations sont fréquemment observés chez des patients présentant des complications cliniques et thérapeutiques sévères (Du et al., 2022; Ranjan & Dongari-Bagtzoglou, 2018; Rodrigues et al., 2020). Ce choix s'appuie également sur l'urgence mondiale signalée par l'OMS (2022), qui a établi une liste de pathogènes fongiques prioritaires. Celle-ci inclut les espèces présentant un risque élevé pour la santé publique et place *C. albicans* dans la catégorie critique en raison de sa pertinence clinique et de ses conséquences thérapeutiques. L'OMS a appelé à mettre l'accent sur la recherche concernant cette espèce et à développer de nouveaux agents antifongiques.

Tableau 7. Présentation des altérations mixtes *C. albicans*/ bactérie en fonction du service hospitalier et de la nature du dispositif médical.

	Service hospitalier	Implant médical	Levure	Bactérie Gram positif	Bactérie Gram négatif
N° 1	Hématologie clinique	CVC	<i>C. albicans</i> (Ca1)		<i>Pasteurella testudinis</i> 1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 1
N° 2	Néphrologie-hémodialyse	CVC	<i>C. albicans</i> (Ca2)		<i>Sphingomonas paucimobilis</i> 2
N° 3	Néphrologie-hémodialyse	CU	<i>C. albicans</i> (Ca3)	<i>Staphylococcus hominis</i> 3	
N° 4	Néphrologie-hémodialyse	CU	<i>C. albicans</i> (Ca4)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 4 <i>Staphylococcus hominis</i> 4	
N° 5	Néphrologie-hémodialyse	CVC	<i>C. albicans</i> (Ca5)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 5	

*CVC : cathéter veineux central ; CU : cathéter urinaire.

Dans cette étude, tous les cas d'altérations fongiques par la levure *C. albicans* étaient associés à des bactéries, mettant en évidence un profil d'altération polymicrobien (**tableau 7**). Ce constat est largement décrit dans la littérature, où *C. albicans* était souvent impliquée dans des infections de type levure-bactérie (**Allison et al., 2016**).

Les altérations mixtes observées concernaient principalement les cathéters veineux centraux et les cathéters urinaires, suggérant que ces dispositifs pourraient constituer des facteurs à haut risque, notamment dans le service de néphrologie-hémodialyse (quatre cas d'altérations), contre un seul cas dans le service d'hématologie clinique.

C. albicans a été co-isolée avec trois bactéries à Gram négatif, à savoir *Pasteurella testudinis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. L'association de *C. albicans* avec ces deux dernières est connue pour son implication dans des co-infections sévères (**Sophonsri et al., 2023**).

Le co-isolément de *C. albicans* avec deux bactéries Gram-positives, *Staphylococcus haemolyticus* et *Staphylococcus hominis*, met en évidence cette association, déjà rapportée dans les infections liées aux cathéters (**Touil, 2023**). Paradoxalement, Severn et al. (**2022**) ont rapporté que dans de telles associations, *S. hominis* produit des peptides auto-inducteurs qui inhibent la virulence des agents pathogènes, y compris celle d'autres staphylocoques.

Par ailleurs, *C. albicans* a été co-isolée conjointement avec *Sphingomonas paucimobilis*, une bactérie environnementale rarement responsable d'infection chez l'homme (**Marincu et al., 2023**). Deux autres associations levure/bactérie ont été retrouvée sur le même dispositif médical, il s'agit de *C. albicans*/*S. hominis* et *C. albicans*/*S. haemolyticus*. Cette dernière mérite une attention particulière en raison de l'émergence notable de la multirésistance de *S. haemolyticus*, de sa grande capacité d'adaptation et de sa persistance en milieu hospitalier, ce qui en fait un facteur de risque majeur dans les infections associées aux soins (**Rossi et al., 2024**).

Étant donné la pathogénie synergique clairement établie entre *C. albicans* et *S. aureus*, connues pour leur tendance à former des biofilms mixtes hautement résistants et potentiellement virulents (**Dühring & Schuster, 2024**), la question suivante se pose avec insistance:

Une souche hautement virulente telle que *S. haemolyticus* pourrait-elle induire un effet synergique similaire, voire exacerbant, avec *C. albicans* ?

À la suite de la mise en évidence des différentes associations de *C. albicans* et de bactéries co-isolées identifiées, une distinction des types d'infectivité relatives aux cas d'altérations des cathéters est établie et ce, dans le but d'analyser la pertinence clinique de ces co-isolats. La figure suivante (**Figure 16**) représente la répartition des associations *C. albicans*/bactérie en fonction du type d'infectivité.

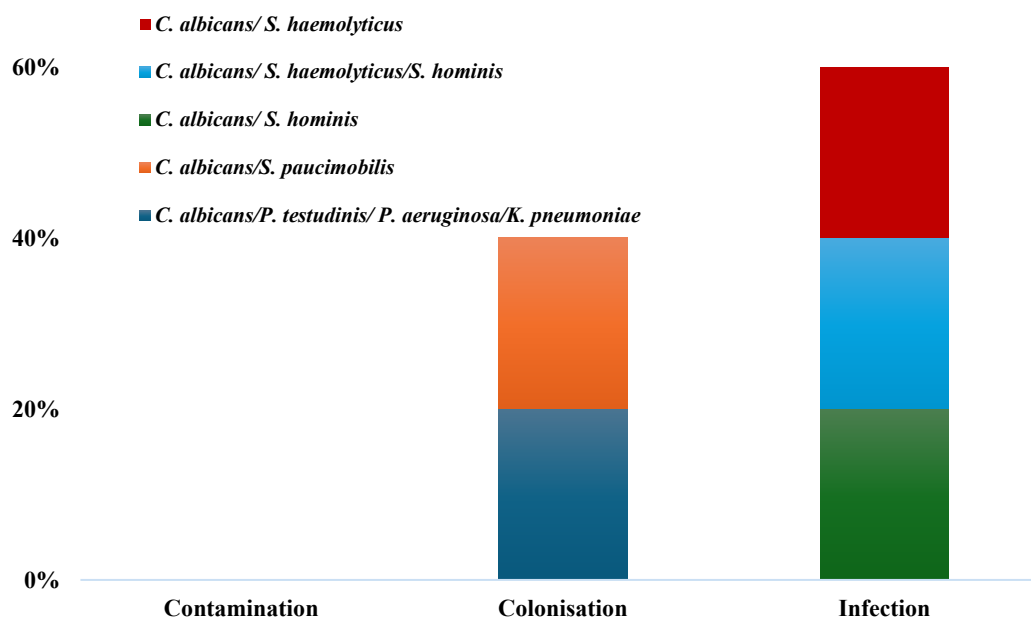


Figure 16. Répartition des associations *Candida albicans*/bactérie selon le type d'infectivité.

Sur un ensemble de cinq associations *C. albicans*/bactérie, trois correspondaient à des cas d'infection, caractérisés principalement par les associations "*C. albicans*/*S. haemolyticus*", "*C. albicans*/*S. haemolyticus*/*S. hominis*" et "*C. albicans*/*S. hominis*" (**figure 16**). Ceci s'accorde avec le constat de Carolus et al., (2019), qui a montré que les co-isolats de *C. albicans* et *Staphylococcus spp.* étaient associés à des infections caractérisées par une virulence prononcée.

Par ailleurs, deux associations (40%) correspondaient à des cas de colonisation, avec des co-isolats impliquant des bacilles à Gram négatif. Il s'agit de *C. albicans*/*P. testudinis*/*P. aeruginosa*/*K. pneumoniae* et de *C. albicans*/*S. paucimobilis*.

Il est important de souligner qu'aucune des associations précédentes n'ait été liée à un cas de contamination, ce qui suggère la pertinence clinique et l'implication du caractère virulent de telles associations.

1.4. Typage moléculaire des souches de *C. albicans* par RAPD-PCR

La variabilité génétique des isolats cliniques de *C. albicans* a été étudiée par amplification aléatoire d'ADN polymorphe, connue sous le nom de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Cette technique fait partie des méthodes les plus utilisées pour évaluer la diversité génétique d'un agent pathogène donné. Le RAPD-PCR a déjà démontré son caractère discriminant dans le typage d'isolats fongiques et bactériens provenant de dispositifs médicaux, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (Bal & Altanlar, 2022; Rao et al., 2014; Sakita et al., 2017).

Cette analyse comporte d'abord une phase d'évaluation individuelle du polymorphisme génétique des levures à l'aide de trois amorces RAPD utilisées (OPA-16, OPB-05 et OPC-07). Chaque amplification a été examinée en fonction de la présence ou de l'absence de bandes, de leur taille (en paires de bases) ainsi que de leur clarté ou intensité. Dans une seconde étape, l'ensemble des résultats a été traité selon une classification ascendante hiérarchique (CAH), utilisée pour regrouper les souches en classes ou clusters sur la base de leur similarité génétique.

L'amplification des isolats de *C. albicans* en utilisant les amorces choisies a produit plusieurs bandes polymorphes (Photo1).

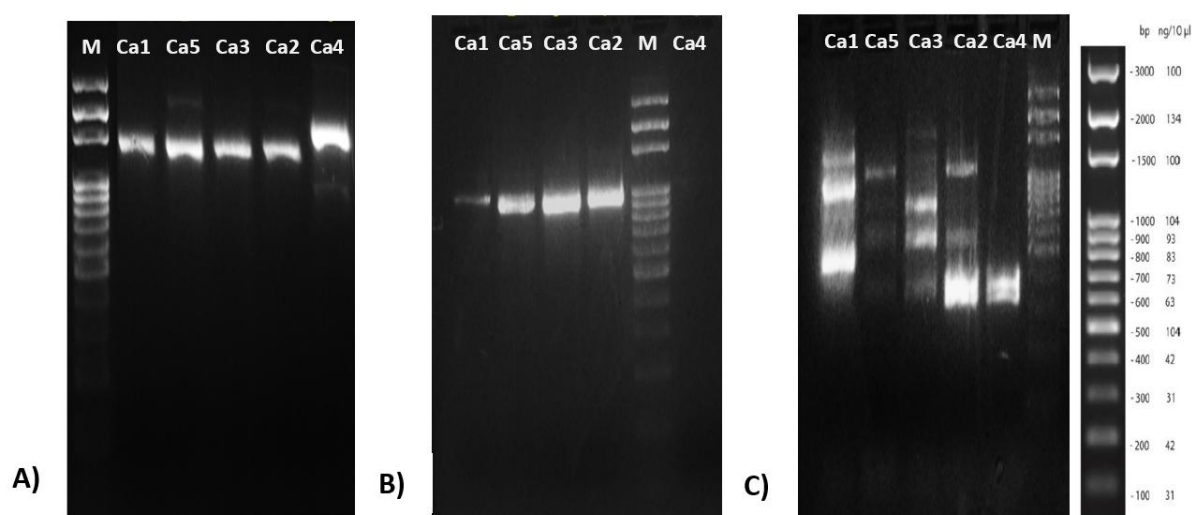


Photo 1. Polymorphismes des souches *C. albicans* (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4 et Ca5) générés par les amorces A : OPA-16, B : OPB-05 et C : OPC-07. M : marqueur de taille.

L'amorce OPA-16 a révélé un total de sept fragments polymorphes parmi l'ensemble des souches étudiées, avec des tailles variant de 1000 à 1500 pb. La bande la plus intense, observée

autour de 1500 pb, a été particulièrement marquée chez la souche Ca4, suggérant une forte amplification d'un locus spécifique à cette souche.

Par ailleurs, l'amorce OPB-05 a permis la détection de cinq fragments amplifiés, dont les tailles s'étendent de 800 à 1000 pb. Aucun produit d'amplification n'a été observé chez la souche Ca4, traduisant une possible absence ou une divergence de la séquence complémentaire à cette amorce dans son génome. Les bandes les plus intenses ont été observées à 800 pb, notamment chez les souches Ca5, Ca3 et Ca2.

Enfin, 15 amplifications ont été repérées pour l'amorce OPC-07 par rapport à la totalité des souches, les amplifications varient entre des petits fragments de 100 pb comme valeur minimale et 1000 pb comme valeur maximale, les bandes les plus intenses sont repérées dans l'intervalle 200 bp à 800 bp.

Pour mettre en évidence la similarité génétique et la structure de regroupement entre les cinq clones de *C. albicans*, l'UPGMA est utilisé. Les souches fongiques les plus similaires sont rassemblées en groupes. L'ensemble de ces profils a servi de base à la construction d'un dendrogramme de similarité génétique entre les cinq souches étudiées. Les distances sont exprimées en niveau de similarité. Le dendrogramme est représenté dans la **figure 17**.

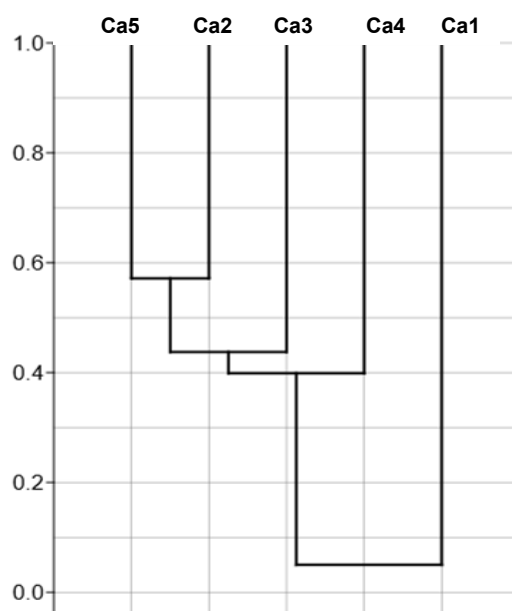


Figure 17. Dendrogramme UPGMA de similarité génétique des souches de *C. albicans* obtenu à partir des profils RAPD-PCR.

L'analyse de la classification hiérarchique fondée sur les distances euclidiennes met en évidence la formation de deux groupes majeurs distincts. Le premier, constitué uniquement de la souche Ca1, isolée du service d'hématologie clinique, se distingue nettement du reste des isolats, suggérant une divergence importante vis-à-vis des autres souches provenant du service de néphrologie-hémodialyse. Cette différenciation pourrait s'expliquer par les conditions d'hospitalisation et les facteurs de risque distincts propres aux patients hématologiques, comme il a été démontré dans la section 1.2, où l'ACM a mis en évidence l'association de ce service à des modalités cliniques particulières.

Le second groupe, rassemblant les souches Ca5, Ca3, Ca2 et Ca4, se subdivise à environ 0,4 unité en deux sous-groupes, le premier représenté par la souche Ca4 et le second regroupant les souches Ca5, Ca3 et Ca2.

Cette structuration reflète une variabilité génétique intra-espèces au sein des isolats étudiés. Par conséquent, il semble que les cathéters sont colonisés par des microorganismes non apparentés, témoignant d'une origine ou d'une dynamique de colonisation distincte.

Ces résultats concordent globalement avec les travaux de Marol & Yücesoy (2008) et Malek et al. (2017) qui ont rapporté que la majorité des souches de *Candida* isolées des cathéters présentaient des profils RAPD distincts, suggérant une origine endogène des infections chez les patients, avec seulement quelques cas de transmission croisée entre individus. Cependant, Sakita et al. (2017), ont mis en évidence une similarité génétique élevée ($\geq 80\%$) entre les souches prélevées sur les mains du personnel soignant et celles issues des unités de soins intensifs. Cela confirme que, bien que la majorité des infections à *Candida* soient considérées comme d'origine endogène, les mains du personnel sont de plus en plus reconnues comme vecteurs potentiels de transmission de ces agents pathogènes en milieu hospitalier.

1.5. Tests de sensibilité aux antimicrobiens en mode planctonique

1.5.1. CMI des antifongiques vis-à-vis des souches de *C. albicans*

La sensibilité des souches planctoniques de *C. albicans* a été évaluée vis-à-vis de la caspofungine (CAS), souvent utilisée en milieu clinique, ainsi que l'amphotéricine B (AmB), connue pour son large spectre d'action.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices de ces antifongiques vis-à-vis des souches isolées, après 24 heures d'incubation sont regroupés dans le **tableau 8**.

Tableau 8. CMI de l'AmB et de la CAS vis-à-vis des cellules planctoniques de *C. albicans*.

Souches	AmB CMI (µg/mL)	CAS CMI ₅₀ (µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	0,25
Ca1	1	0,5
Ca2	1	0,25
Ca3	2	0,5
Ca4	2	0,5
Ca5	0,5	0,5

Les résultats présentés dans le tableau précédent démontrent que les CMI de l'AmB vis-à-vis des cellules planctoniques de *C. albicans* étaient comprises entre 0,5 et 2 µg/mL. Toutefois, ces valeurs restent dans l'intervalle des CMI établie par Hammond (1977), d'où la conclusion que toutes les souches de *C. albicans* testées ont réagi de manière sensible à l'AmB, y compris la souche de référence, *C. albicans* ATCC 10231.

Pour la caspofungine, les CMI₅₀ variaient de 0,25 à 0,5 µg/mL. Ces valeurs sont conformes à celles rapportés dans des recherches antérieures réalisées sur des souches de *C. albicans* isolées à partir de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen (Benahmed, 2025; Touil, 2023).

Par ailleurs, en se référant aux normes du Clinical and Laboratory Standards Institute (2020), les souches Ca1, Ca3, Ca4 et Ca5 ont montré une sensibilité intermédiaires à la CAS (CMI = 0,5 µg/mL), tandis que Ca2 était sensible (CMI = 0,25 µg/mL), comparable à la souche de

référence. Le profil CAS intermédiaire est souvent associé à des mutations dans les gènes *FKS1/FKS2*, qui codent la β -1,3-glucane synthase, ce qui diminue l'affinité de la cible pour cet agent antifongique (Pristov & Ghannoum, 2019).

1.5.2. CMI des antibiotiques vis-à-vis des bactéries

La sensibilité des bactéries à Gram positif co-isolées conjointement avec *C. albicans* a été évaluée à l'aide du système VITEK®2. Les résultats des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des souches planctoniques sont regroupés dans le **tableau 9**.

Les résultats obtenus ont révélé une résistance marquée à la méticilline. Trois quarts des souches examinées ont présenté un test céfoxitine screen positif, corroboré par une résistance à l'oxacilline ($\text{CMI} \geq 4$), il s'agit des souches *S. hominis*³, *S. haemolyticus*⁴ et *S. haemolyticus*⁵. Ce résultat témoigne d'une probable expression du gène *mecA*, qui est à l'origine de la résistance des staphylocoques aux bêta-lactamines. (Lade & Kim, 2023).

D'autre part, un profil multirésistant inquiétant a été notée chez *S. haemolyticus*⁴ caractérisé par une résistance à la kanamycine, à la lévofloxacine, à la clindamycine, à l'acide fusidique ainsi qu'à la rifampicine. De même, *S. haemolyticus*⁵ a présenté une résistance à la kanamycine, à la lévofloxacine, à la clindamycine, à la rifampicine et au triméthoprim / sulfaméthoxazole. Toutefois, ces souches demeurent sensibles à la vancomycine, constituant une alternative thérapeutique de dernier recours. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Magnan et al. (2024), chez qui tous les isolats de *S. haemolyticus* étaient résistants à la méticilline, à l'érythromycine, aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones.

En outre, la sensibilité à la clindamycine, associée à un test de résistance inductible à la clindamycine positif chez *S. haemolyticus*⁴, suggère un phénotype iMLSB (inducible macrolide-lincosamides-streptogramines B), probablement médié par le gène *erm* (Powell et al., 2024).

Tableau 9. CMI des antibiotiques vis-à-vis des bactéries à Gram positif.

		<i>Staphylococcus hominis</i> ³	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ⁴	<i>Staphylococcus hominis</i> ⁴	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ⁵
	Test céfoxitine screen	Positif	Positif	Négatif	Positif
CMI en µg/mL (Interprétation)	Oxacilline	≥ 4 (R)	≥ 4 (R)	≤ 0,25 (S)	≥ 4 (R)
	Gentamicine	≤ 0,5 (S)	≥ 16 (R)	≤ 0,5 (S)	8 (I)
	Kanamycine	≤ 4 (S)	≥ 64 (R)	8 (S)	≥ 64 (R)
	Lévofoxacine	≤ 0,12 (S)	≥ 8 (R)	0,25 (S)	4 (R)
	Résistance inductible à la clindamycine	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
	Clindamycine	0,25 (S)	≤ 0,12 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
	Quinupristine/ dalfopriline	0,5 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5 (S)	≤ 0,25 (S)
	Linézolide	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)
	Daptomycine	≤ 0,12 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
	Téicoplanine	1 (S)	8 (S)	1 (S)	8 (S)
	Vancomycine	≤ 0,5 (S)	1 (S)	≤ 0,5 (S)	1 (S)
	Tétracycline	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	4 (S)	2 (S)
	Nitrofurantoïne	≤ 16 (S)	≤ 16 (S)	64 (I)	≤ 16 (S)
	Acide fusidique	≥ 32 (R)	16 (R)	≥ 32 (R)	≤ 0,5 (S)
	Rifampicine	≤ 0,03 (S)	≥ 4 (R)	≤ 0,03 (S)	≥ 4 (R)
	Triméthoprime / sulfaméthoxazole	80 (R)	≤ 10 (S)	≤ 10 (S)	160 (R)

S : sensible, *I* : intermédiaire, *R* : résistant.

Concernant les bactéries à Gram négatif, les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques sont présentés dans le **tableau 10**. Ces résultats mettent en évidence une diversité des profils de résistance parmi les souches étudiées.

Pseudomonas aeruginosa 1 a présenté une résistance remarquable aux β -lactamines antipseudomonas (ticarcilline, pipéracilline/ tazobactam). Cette souche, en particulier, a montré une sensibilité à l'imipénème, à la ciprofloxacine, à la gentamicine et à l'amikacine. Ce profil concorde avec les constatations rapportées dans une recherche réalisée en Éthiopie, où la plupart des souches nosocomiales de *P. aeruginosa* étaient résistantes à plusieurs antibiotiques, exceptés l'imipénème et la colistine (**Mekonnen et al., 2021**).

En outre, *Klebsiella pneumoniae* 1 a présenté un profil sensible aux carbapénèmes (imipénème), aux aminosides et aux fluorquinolones, mais résistant à certaines β -lactamines ainsi qu'à la combinaison Triméthoprim/ sulfaméthoxazole. C'est un profil typique des souches fréquemment décrites dans le milieu hospitalier (**Shah et al., 2025**).

Bien que la résistance à la fosfomycine ait été notable, *Pasteurella testudinis* 1, en revanche, a présenté une sensibilité étendue à la majorité des antibiotiques testés. Ces résultats confirment que cette souche conserve sa sensibilité, ce qui correspond aux données trouvées dans la littérature (**Kerek et al., 2024**).

Concernant *Sphingomonas paucimobilis* 2, cette souche a montré une sensibilité globale envers toutes les molécules testées sauf pour la colistine, ce qui est bien en accord avec l'étude de Rohilla et al. (**2021**) qui ont rapporté également une résistance à la colistine chez la même espèce isolée dans un hôpital en Inde.

Tableau 10. CMI des antibiotiques vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.

		<i>Pasteurella testudinis</i> ¹	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ²
CMI en µg/mL (Interprétation)	Ticarcilline	NA	≥ 128 (R)	NA	NA
	Ticarcilline/ Acide clavulanique	NA	≥ 128 (R)	NA	NA
	Ampicilline	≤ 0,2 (S)	NA	≥ 32 (R)	NA
	Amoxicilline/ acide clavulanique	≤ 0,2 (S)	NA	4 (S)	NA
	Pipéracilline/ Tazobactam	≤ 4 (S)	≥ 128 (R)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)
	Ceftazidime	≥ 64 (R)	≥ 60 (R)	32 (R)	1 (S)
	Céfépime	NA	≥ 60 (R)	NA	NA
	Imipénème	≤ 0,25 (S)	2 (S)	≤ 0,25 (S)	≤ 0,25 (S)
	Amikacine	≤ 2 (S)	≤ 2 (S)	≤ 2 (S)	≤ 2 (S)
	Gentamicine	≤ 1 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)
	Ciprofloxacine	≤ 0,25 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5 (S)	≤ 0,25 (S)
	Colistine	NA	2 (S)	NA	≥ 16 (R)
	Triméthoprim/ sulfaméthoxazole	≤ 20 (S)	NA	≥ 320 (R)	≤ 20 (S)
	Céfazoline	≤ 4 (I)	NA	≥ 64 (R)	≤ 4 (I)
	Céfoxitine	≤ 4 (S)	NA	≤ 4 (S)	≤ 0,25 (S)
	Fosfomycine	≥ 256 (R)	NA	32 (S)	NA

S: sensible, I: intermédiaire, R: résistant

NA : non applicable en raison du spectre naturel ou des recommandations spécifiques à l'espèce.

2. Biofilms mono-et multi-espèces de *C. albicans* et des bactéries co-isolées d'un même cathéter

Les infections associées aux biofilms mixtes à la surface des cathéters, notamment ceux issus d'interactions interrègnes, tendent à être les plus complexes et les plus difficiles à traiter en raison de leur hétérogénéité inhérente et leur tolérance accentuée aux traitement antimicrobiens conventionnels (Magnan et al., 2024; Vila et al., 2021).

Dans la présente étude, l'évaluation *in vitro* du potentiel des co-isolats microbiens à former des biofilms mono- et multi-espèces (*C. albicans*/bactéries) a été réalisée à l'aide de la technique de coloration au cristal violet, qui permet de quantifier leur biomasse. Celle-ci a été effectuée conjointement avec la méthode de réduction du XTT, qui indique l'activité métabolique des micro-organismes sessiles, présents dans le biofilm.

2.1. Quantification de la biomasse des biofilms

La **figure 18** illustre l'évaluation de la biomasse des biofilms mono et multi-espèces, composés de *C. albicans* et/ou de bactéries co-isolées, réalisée à l'aide de la technique au cristal violet. Ce graphique représente les absorbances associées aux quantités de biofilms formés *in vitro* après une incubation de 24h et 48h.

Après 24 heures d'incubation, les résultats ont révélé que toutes les souches soumises à ce test ont formé des biofilms mono-espèces. Toutefois, la biomasse des micro-organismes sessiles diffère d'une espèce à l'autre. En fait, les souches de *C. albicans* ont montré les biomasses les plus importantes ; la souche Ca1 a présenté le meilleur résultat avec une absorbance de $1,468 \pm 0,025$. Les souches Ca2, Ca3, Ca4 et Ca5, quant à elles, ont présenté des biomasses moins importantes, sans différences significatives entre elles.

En ce qui concerne les bactéries, des biomasses plus faibles ont été observées en comparaison avec celles des levures, leurs absorbances ont enregistré des valeurs allant de $0,055 \pm 0,049$ à $0,66 \pm 0,01$. Par contre, *S. haemolyticus*5 a montré une biomasse importante avec une absorbance de $1,097 \pm 0,110$, surpassant ainsi celle de Ca5 (**figure 18**).

Pour les biofilms mixtes, leurs absorbances ont affiché des valeurs intermédiaires entre celles des bactéries et de la levure co-isolée pour chaque association microbienne.

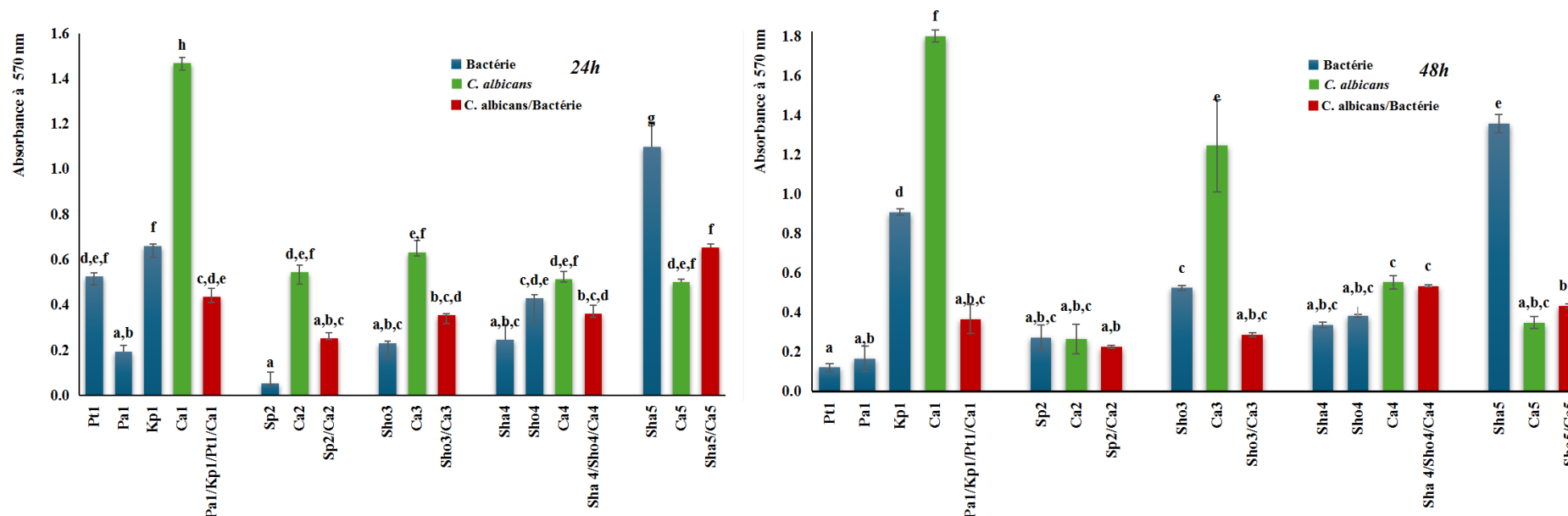


Figure 18. Résultats de la quantification de la biomasse des biofilms mono et multi-espèces formés in vitro par *C. albicans* et les bactéries co-isolées par la méthode du cristal violet, respectivement après 24h et 48h d'incubation. Les lettres distinctes "a – h" signalent des variations significatives dans les résultats. Les barres verticales représentent l'écart type.

D'autre part, une différence très significative a été notée entre les absorbances mesurées à 24 heures et à 48 heures ($p < 0,001$), indiquant une progression temporelle nette de la biomasse des biofilms plus anciens (**Figure 18**).

À l'exception des souches Ca2 et Ca5, dont la biomasse a été réduite après 48 heures d'incubation par rapport à 24 heures, une augmentation de l'absorbance du biofilm a été observée chez les autres levures, mettant en évidence une augmentation de la biomasse fongique du biofilm au fil du temps.

De même, pour les bactéries, la majorité des souches ont montré une croissance de leur potentiel à générer davantage de biomasse du biofilm après 48 heures d'incubation, en particulier les souches *S. haemolyticus*4 et *S. haemolyticus*5.

Cette augmentation du volume du biofilm est cohérente avec la forte capacité à former le biofilm de cette espèce, comme le souligne la bibliographie (**Magnan et al., 2024; Mora et al., 2025; Pereira-Ribeiro et al., 2022**). Dans ce contexte, il a été rapporté que le biofilm de *S. haemolyticus*, riche en ADN extracellulaire et en protéines, manifeste une maturation tardive mais robuste, et démontre donc un accroissement également tardive de la biomasse de son biofilm (**Rossi et al., 2024**).

Par ailleurs, *K. Pneumoniae*1 (Kp1) a enregistré une augmentation intense de la biomasse de son biofilm, avec une absorbance de $0,910 \pm 0,015$ à 48h contre $0,661 \pm 0,01$ à 24h. En revanche, les souches *P. testudinis*1 (Pt1) et *P. aeruginosa*1 (Pa1) ont montré une diminution de leurs absorbances après 48 h, atteignant respectivement $0,121 \pm 0,018$ et $0,166 \pm 0,066$, contre $0,527 \pm 0,016$ et $0,196 \pm 0,027$ à 24h. Ce résultat pourrait indiquer un déclin de la viabilité microbienne ou une fragilisation de la structure du biofilm.

Ce phénomène a déjà été identifié chez *P. aeruginosa* par Li et al. (**2014**). Ces chercheurs ont démontré que la maturation du biofilm de cette espèce peut initier un processus actif de dispersion des cellules bactériennes afin de coloniser de nouveaux sites, ce qui pourrait entraîner une réduction de la population sessile.

Concernant les biofilms mixtes, une diminution de l'absorbance a été enregistrée après 48h pour la majorité des associations microbiennes, mettant en évidence une possible compétition inter-espèces ou une absence de coopération métabolique comme le souligne l'étude de Mora et al. (**2025**).

Cependant, nous avons noté une exception marquante pour l'association Sha4/Sho4/Ca4 qui a montré une croissance de biomasse après 48 heures. Ceci suggère une attribution probable de coopération métabolique entre ces espèces. Ces résultats confirment que les interactions *C. albicans*/bactérie au sein des biofilms sont souche-dépendantes et temporellement variables, soulignant l'importance de considérer l'évolution temporelle propre à chaque association microbienne.

Conformément à nos résultats, l'analyse de Touil (2023) a indiqué que la capacité à former des biofilms mixtes varie en fonction du temps d'incubation et de la composition microbienne. Selon le même auteur, une diminution notable est observée après 48 heures d'incubation par rapport au biofilm de 24 heures, notamment dans les cas d'associations impliquant *Candida albicans* et certaines entérobactéries telles que *Providencia stuartii* ; en revanche, l'association *C. albicans*/*S. aureus* a montré une augmentation significative, suggérant un effet synergique entre ces deux espèces.

2.2. Évaluation de l'activité métabolique sessile

Les variations dans l'activité métabolique des micro-organismes présents dans le biofilm permettent de les classer dans l'une des catégories suivantes: hautement, modérément, faiblement ou non formatrices de biofilm. Cette classification est possible en fonction du potentiel à réduire le XTT en formazane par les cellules sessiles (Villar-Vidal et al., 2011).

Les résultats de l'activité métabolique des cellules sessiles de *C. albicans*, des bactéries co-isolées avec ces dernières, et des biofilms mixtes mesurée après 24h et 48h d'incubation sont présentés dans la **figure 19**.

Nous avons constaté que les absorbances mesurées pour les biofilms mono-espèces des isolats de *C. albicans* étaient comprises entre $0,213 \pm 0,012$ et $0,412 \pm 0,002$ et entre $0,485 \pm 0,002$ et $1,107 \pm 0,038$, respectivement après 24 heures et 48 heures d'incubation. Ces résultats affichent une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'activité métabolique de cette espèce en prolongeant le temps d'incubation.

Effectivement, l'activité métabolique de trois souches (Ca2, Ca3 et Ca4) a augmenté, passant de faiblement formatrices de biofilm (catégorie +2) à modérément formatrices de biofilm (catégories +3 et +4). En augmentant la durée d'incubation de 24h à 48h, la souche Ca1 est passée de formatrice de biofilm modéré à fortement biofilmogène (catégorie +5). Tandis que la

souche Ca5 a préservé son activité métabolique, mettant en évidence une aptitude modérée et stable à former un biofilm (**figure 19**).

L'augmentation de l'activité métabolique sessile de *C. albicans*, par rapport aux résultats du test au cristal violet qui ont montré une hausse de la croissance des biofilms, met en évidence une évolution vers un stade de maturité structurale accompagnée d'une croissance active progressive entre 24h et 48h. Dans cette perspective, Rajendran et al. (**2016**) stipulent que l'augmentation du volume du biofilm de *C. albicans* est associé à une régulation renforcée des voies métaboliques des acides aminées entre 24h et 48h, en particulier par le biais de la surexpression du gène *AAT1* qui code pour l'aspartate aminotransférase.

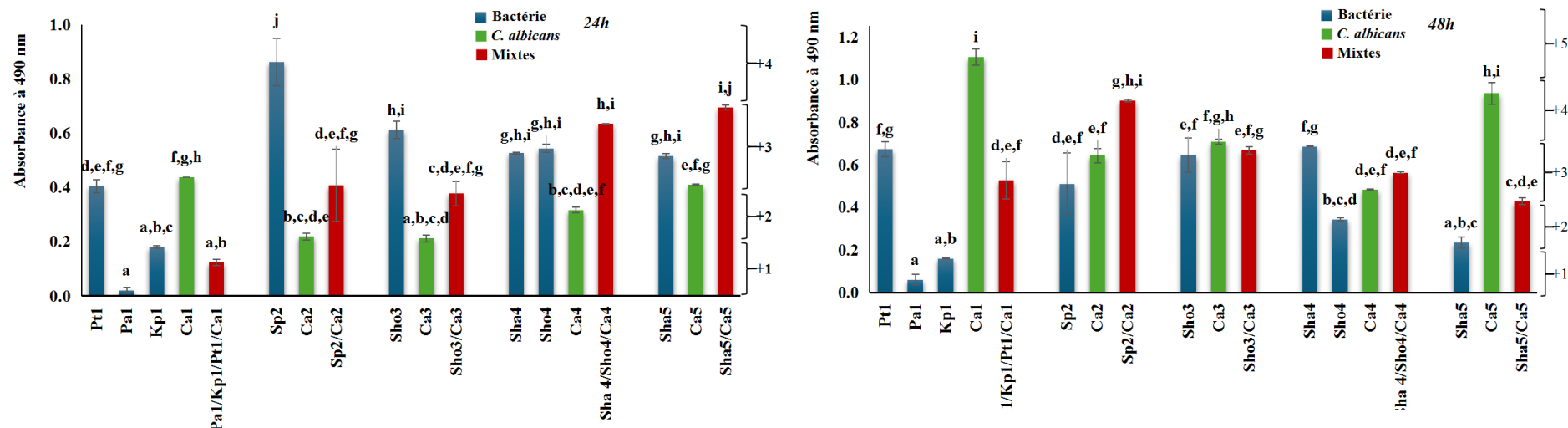


Figure 19. Activité métabolique des biofilms mono- et multi-espèces, formés *in vitro* par les co-isolats de *C. albicans* et des bactéries, évaluée par la réduction du XTT après 24h et 48h d'incubation. Les lettres distinctes "a - h" signalent des variations significatives dans les résultats. Les barres verticales représentent l'écart type.

D'après la **figure 19**, des variations d'absorbance (A) distinctes ont été observées en fonction des espèces bactériennes co-isolées avec *C. albicans*. En effet, après 24 heures d'incubation, *S. paucimobilis*² s'est distinguée par une capacité modérée à former le biofilm ($A = 0,863 \pm 0,088$), la plaçant ainsi dans la catégorie +4. Contrairement aux levures, cette souche voit sa performance métabolique réduite après 48 heures ($A = 0,512 \pm 0,146$), abaissant ainsi son potentiel à former un biofilm en catégorie +3.

Un comportement similaire a été observé chez *S. hominis*⁴ et *S. haemolyticus*⁵ qui sont passées d'un potentiel biofilmogène modéré à faible après 48h, reflétant une diminution métabolique surprenante. Tandis que d'autres souches bactériennes (*P. testudinis*¹, *S. hominis*³ et *S. hominis*⁴) ont préservé leurs activités métaboliques stables tout au long des deux temps d'incubation (catégorie +3). *K. pneumoniae*¹ a également montré une capacité stable et faible à former des biofilms. En outre, la souche Pa1 qui est classée dans la catégorie +1 (non formatrice de biofilm) avec une absorbance de $0,021 \pm 0,011$ est passée à la catégorie +2, une activité toutefois évaluée comme faible.

Par ailleurs, cette étude a démontré que les biofilms mixtes présentent une diversité d'activités métaboliques, suggérant des interactions qui vont de l'antagonisme à la synergie. Lorsque *Candida albicans* a été co-cultivée avec *P. aeruginosa*¹, *K. pneumoniae*¹ et *P. testudinis*¹ (association N° 1, **figure 19**), une diminution significative ($p < 0,01$) de l'activité métabolique a été constatée aussi bien après 24 heures qu'après 48 heures d'incubation par rapport au biofilm mono-espèce de *C. albicans*, signalant un effet antagoniste.

Ce constat est en accord avec celui de Kamath et al. (2024) qui ont démontré que la croissance de *C. albicans* était fortement réduite lorsque celle-ci était co-cultivée avec *Pseudomonas aeruginosa*, avec une baisse atteignant jusqu'à 99,99% pour certaines souches. Cette inhibition est en réalité associée à la production de phénazines sous le contrôle du quorum sensing bactérien qui perturbe la morphogénèse des hyphes et la viabilité fongique (Fourie et al., 2016).

De plus, le biofilm incluant les espèces *C. albicans* et *K. pneumoniae* a montré une activité métabolique inférieure lorsqu'elle est déterminée par le test de réduction du XTT, comparativement à celle évaluée avec la méthode au cristal violet. Ceci peut être expliqué par la présence conjointe de ces deux espèces dans un biofilm mixte qui stimule la production de la matrice extracellulaire, notamment l'alginate, sans accroître la viabilité cellulaire (Phuengmaung et al., 2024).

Afin de surmonter la contrainte de la méthode au cristal violet, Nirmala et al. (2024) ont récemment suggéré une nouvelle approche fondée sur une double coloration qui permet la distinction des cellules sessiles de la matrice extracellulaire.

À l'inverse des résultats précédemment rapportés, l'association de cette levure avec *Sphingomonas paucimobilis*2 (Sp2) dans le même biofilm (association N° 2, **figure 19**) a démontré une synergie notable. Le biofilm mixte a révélé une activité métabolique significativement plus élevée que celle du biofilm mono-espèce de *C. albicans*, à 24 heures et 48 heures ($p < 0,001$). *S. paucimobilis*, rarement mentionnée dans le contexte des biofilms mixtes, semble stimuler la vitalité du consortium, suggérant une synergie métabolique continue.

En ce qui concerne les staphylocoques à coagulase négatif, l'interaction avec *S. hominis*3 (Sho3) dans l'association N°3 (**figure 19**) a donné lieu à une augmentation significative de l'activité métabolique après 24 heures, néanmoins cette différence n'était plus statistiquement significative après 48 heures. Ce résultat pourrait représenter une synergie précoce et/ou transitoire.

Dans cette optique, Pohl (2022) stipule que *C. albicans* peut former des biofilms mixtes avec une multitude de bactéries grâce à des interactions soit synergiques, soit antagonistes, ce qui influence significativement l'évolution clinique des infections associées. Au sein de ces biofilms mixtes, *C. albicans* tient un rôle central, tant pour la composition du biofilm que pour la modulation de l'expression génétique des bactéries associées, ajoute ce même auteur.

D'autre part, en comparaison avec l'association *C. albicans*/*S. hominis*3, l'association *C. albicans*/*S. hominis*4/*S. haemolyticus*4 (association N°4, **figure 19**) a démontré un gain métabolique significatif à 24 heures par rapport au biofilm mono- espèce de *C. albicans*, cependant cet effet a été atténué après 48 heures d'incubation, où une légère augmentation non significative a été notée.

En utilisant *S. epidermidis* comme modèle, Carolus et al. (2019) ont rapporté dans leur étude une cohabitation sans inhibition notable, où les staphylocoques étaient capables de se fixer aux hyphes fongiques par le biais des protéines Als3 sans perturber la croissance fongique.

Enfin, l'association entre *C. albicans* et *S. haemolyticus*5 (association N° 5, **figure 19**) a démontré une capacité maximale à former le biofilm après 24 heures d'incubation, en comparaison avec les autres associations. De plus, cette association s'est avérée très significative que celle de *C. albicans* dans le biofilm mono-espèce ($p < 0,001$). L'absorbance

du biofilm mixte ($A_{24h} = 0,696 \pm 0,008$; $A_{48h} = 0,43 \pm 0,017$), qui ne présentait pas une différence statistiquement significative avec celle de *S. haemolyticus*5, aussi bien après 24 qu'après 48 heures d'incubation, laisse supposer que le comportement de la bactérie pourrait influencer le biofilm mixte.

Toutefois, après 48 heures d'incubation, une diminution de l'activité métabolique du biofilm mixte a été constatée, bien que le niveau d'activité soit resté dans la même catégorie (+3). Ce changement dans l'activité métabolique pourrait refléter une interaction dépendante du temps ou l'établissement progressif d'un effet de compétition.

Ces constatations rejoignent celles de Mora et al. (2025) qui ont rapporté la baisse d'un tiers de la viabilité des cellules au sein du biofilm mixte de *C. albicans* et *S. haemolyticus* comparativement aux biofilms à espèce unique.

Dans l'ensemble, les interactions *C. albicans*-bactéries étaient hautement hétérogènes, souches-dépendante et évolutives au cours du temps. Ces résultats corroborent ceux de Bandara et al. (2019) qui ont rapporté que l'activité métabolique des biofilms mixtes dépend de la nature de la bactérie qui module la physiologie du biofilm et influence la morphogenèse des levures.

Dans le même ordre d'idées, Seghir et al. (2015) ont montré dans leur étude effectuée au CHU de Tlemcen que *C. albicans* avait la faculté de former des biofilms mixtes en association avec diverses bactéries à Gram négatif isolées à partir des mêmes cathéters (*Enterobacter cloacae*, *Bordetella spp.* et *Serratia liquefaciens*). Leurs résultats ont révélé que la biomasse des biofilms mixtes était généralement supérieure à celle des biofilms constitués d'une seule espèce.

L'étude de Benahmed et al. (2023) confirme cette tendance et souligne que la coexistence levure-bactérie dans un biofilm mixte modifie le comportement physiologique des deux partenaires, renforçant ainsi la résistance globale du biofilm. De plus, Gourari-Bouzouina et al. (2024) ont montré qu'au sein du biofilm mixte de *Candida* et *Staphylococcus aureus*, les cellules fongiques forment un échafaudage d'hyphes sur lequel s'ancrent préférentiellement les cocci bactériens, démontrant une coopération structurale qui contribue à la stabilité et à la virulence des biofilms mixtes.

3. Activité hydrolytique de *C. albicans*

Candida albicans est souvent impliquée dans des infections nosocomiales aux conséquences fatales. Sa virulence est amplifiée par son activité d'hydrolyse et son potentiel à former le biofilms (Tefiani et al., 2020). Comprendre le lien entre ces deux facteurs de virulence est cependant essentiel pour mettre en œuvre des stratégies de prévention et de traitement efficaces.

Cette partie de l'étude visait à examiner l'impact de la formation de biofilms sur l'activité hydrolytique des phospholipases (Plp) et des protéinases (Prt), en recourant à une technique adaptée à cet effet. Celle-ci repose sur une comparaison simultanée des activités enzymatiques à l'état planctonique et sessile.

Les activités hydrolytiques Plp et Prt ont pu être évaluées de manière simultanée en conditions planctoniques et sessiles. Les résultats ont montré que la génération de biofilm avait un impact positif hautement significative ($p < 0,001$) sur ces activités hydrolytiques, tout en notant des différences entre les souches (Figures 20 et 21). Ces fluctuations significatives des valeurs Pz ont mis en évidence la sensibilité de la technique adoptée, attestant ainsi de son application possible.

3.1. Activité hydrolytique des phospholipases

D'après les valeurs Pz obtenues, variant entre $0,45 \pm 0,01$ et $0,66 \pm 0,02$ (figure 20), l'activité Plp a été détectée chez toutes les souches testées, y compris *C. albicans* ATCC10231. Selon la catégorisation établie par Price et al. (1982), cette activité pourrait donc être qualifiée de forte chez ces souches.

Ces niveaux d'activité se situent dans l'intervalle rapporté dans des études antérieures. Similairement à nos résultats, Ramos et al. (2015) et Gharaghani et al. (2021) ont enregistré l'activité Plp chez 100% des isolats de *C. albicans*.

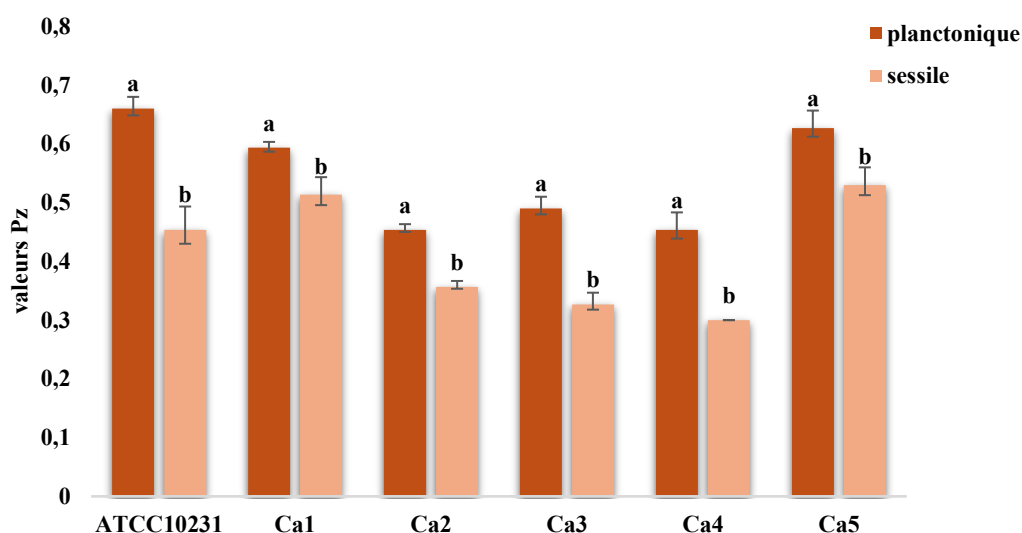


Figure 20. Activité Plp moyenne chez les cellules planctoniques et sessiles de *C. albicans* en fonction des valeurs Pz. Barre verticale : écart type. Les lettres a et b indiquent les différences significatives entre les moyennes. Ca1-Ca5 : isolats de *C. albicans*. ATCC10231 : *C. albicans* ATCC10231.

Par ailleurs, une hausse notable des activités Plp a été observée à l'état sessile. Dans l'ensemble, une diminution très significative ($p < 0,001$) des valeurs Pz a été enregistrée lors du passage du mode planctonique au mode sessile pour toutes les souches de *C. albicans*, atteignant une valeur de $0,3 \pm 0,00$ pour la souche Ca4, ce qui indique une activité fortement amplifiée.

Considérant l'ordre croissant d'activité hydrolytique, le test de comparaisons multiples de Duncan a révélé que seuls Ca3, Ca2 et Ca4 ont affiché une variation d'activité Plp moins significative que celle de *C. albicans* ATCC10231 entre les deux formes, planctonique et sessile. Cependant, les souches Ca5 et Ca1 n'ont présenté aucune différence significative par rapport à la souche de référence.

Samaranayake et al. (2013), stipulent que l'augmentation de l'activité hydrolytique dépendait de la souche. Cependant, des éléments extérieurs tels que l'exposition aux antifongiques pourraient influencer l'activité hydrolytique des phospholipases. De même, les conditions spécifiques à l'hôte pourraient moduler cette activité (Erum et al., 2020).

En utilisant la PCR en temps réel, Nailis et al. (2010) ont en outre, démontré que l'expression des gènes *PLP* était plus prononcée à l'état sessile, ce qui est en accord avec les observations de cette recherche.

Bien que l'activité hydrolytique ait été significativement plus élevée à l'état sessile, aucune corrélation apparente n'a été constatée entre le niveau d'activité enzymatique et le potentiel de

formation de biofilm des souches précédemment évalué, d'après la biomasse et l'activité métabolique. Les souches Ca1 et Ca5, présentant le potentiel de formation de biofilm le plus élevé, ont enregistré la plus faible activité Plp, ce qui est cohérent avec les observations de Samaranayake et al. (2005) et Rajendran et al. (2010), ayant signalé l'absence de corrélation statistique significative entre ces deux facteurs de virulence, qui sont régulés indépendamment.

Ceci indique que la stimulation de l'activité enzymatique en conditions sessiles pourrait être associée au microenvironnement particulier du biofilm. En effet, un gradient de nutriments, de pH et d'oxygène, croissant ou décroissant, s'établit à mesure que l'on progresse vers la profondeur du biofilm, induisant un stress qui stimule la sécrétion d'enzymes hydrolytiques par réaction adaptative. Dans leur étude, Tefiani et al. (2020) ont démontré effectivement que les niveaux d'activité des Plp et des Prt était significativement modulés par les variations du pH et de la température, ce qui reflète la plasticité adaptative de *C. albicans*, un phénomène qui explique les résultats observés.

3.2. Activité hydrolytique des protéinases

Concernant l'activité Prt, elle a été détectée chez 83,33% des souches (**figure 21**). En fait, cette activité s'est avérée variable entre les souches, de forte à négative ($P_z = 0,66 \pm 0,00$ à 1). Deux souches, Ca2 et Ca5, ont présenté une activité forte (P_z respectifs de $0,68 \pm 0,00$ et $0,66 \pm 0,00$), tandis que Ca1 et Ca4 ont enregistré une activité modérée avec des valeurs P_z de $0,78 \pm 0,00$ et $0,73 \pm 0,00$. Cependant, cette activité a été enregistrée faible chez la souche de référence *C. albicans* ATCC10231 ($P_z = 0,83 \pm 0,04$) et négative chez Ca3. Ces résultats soulignent le rôle des enzymes hydrolytiques en tant que facteurs pathogènes potentiels chez *C. albicans*.

L'activité hydrolytique des protéases a été rapportée à des taux variables dans diverses études antérieures, notamment, 40% (El-houssaini et al., 2019), 77% (Mashaly & Zeid, 2022) et 100% (Gharaghani et al., 2021). Dans ce contexte, ces données, qui semblent cohérentes avec celles de la présente étude, peuvent être interprétées comme étant dépendantes de la souche (Samaranayake et al. 2013).

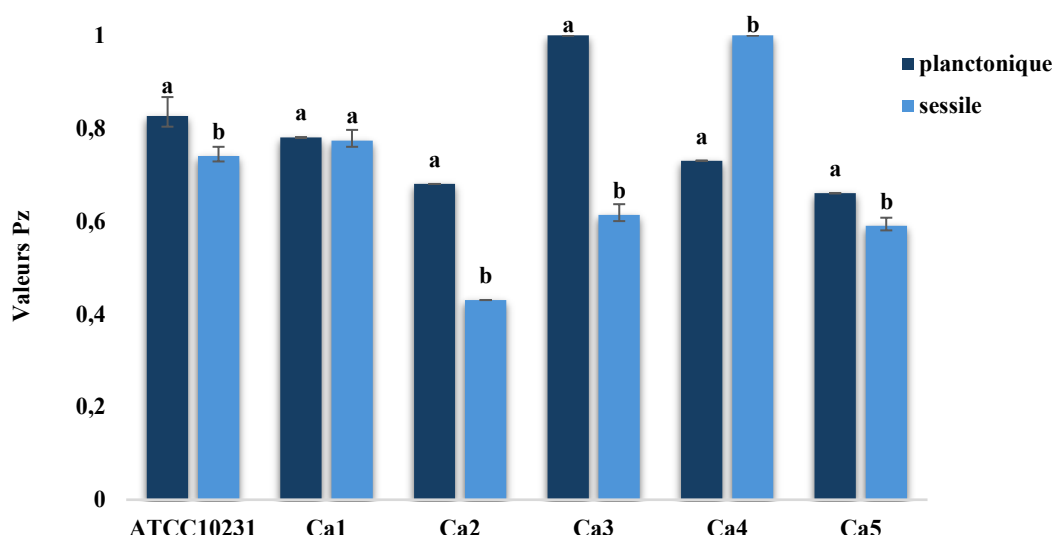


Figure 21. Activité Prt moyenne chez les cellules planctoniques et sessiles de *C. albicans* en fonction des valeurs Pz. Barre verticale : écart type. Les lettres a et b indiquent les différences significatives entre les moyennes. Ca1-Ca5 : isolats de *C. albicans*. ATCC10231 : *C. albicans* ATCC10231.

Similairement à l'activité Plp, une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'activité Prt a été notée en mode de vie sessile. À l'exception de la souche Ca4, qui a montré une diminution de cette activité hydrolytique, passant d'un Pz de $0,73 \pm 0,00$ à 1 ; (**Figure 21**). Ce caractère a été associé à une filamentation excessive sur la gélose BSA, une transition morphologique étroitement impliquée dans la pathogénie de cette espèce (**Samaranayake et al., 2013**). Ces mêmes chercheurs ont suggéré qu'il pourrait y avoir une régulation compensatoire génétique entre la production de protéinases et le développement des hyphes. Les valeurs de Pz pour les autres souches variaient de $0,43 \pm 0,00$ à $0,77 \pm 0,02$

Par ailleurs, seules Ca1, Ca3 et Ca4 n'ont pas montré de différences significatives par rapport à la souche de référence ($p > 0,01$). Ces souches ont enregistré une augmentation notable de l'activité Prt, passant de faible à modéré pour *C. albicans* ATCC10231 et de manière plus marquée de négative à forte pour Ca3.

Ce résultat peut être partiellement expliqué par une régulation des gènes relatifs aux protéinases après la formation du biofilm, qui étaient totalement réprimés à l'état planctonique. D'un point de vue génétique, hormis *SAP3*, l'expression de tous les gènes *SAP* augmente dans les biofilms cultivés *in vitro* et *in vivo* (**Nailis et al. 2010**).

Selon Costa et al. (2010), l'activité hydrolytique pourrait être influencée par divers facteurs externes, ces chercheurs ont observé que les souches de *C. albicans* manifestaient une activité protéolytique accrue malgré qu'elles aient subi une inhibition de croissance suite à leur exposition au fluconazole.

Outre leur rôle dans l'invasion tissulaire et l'évasion des défenses immunitaires de l'hôte, les protéinases aspartiques sécrétées ont également un impact significatif sur la formation et la maturation du biofilm. L'expression de *SAP5* et *SAP6*, en particulier, est associée à la transition morphologique levure-hyphe, à l'origine des infections invasives à *C. albicans* (Samaranayake et al., 2013). De plus, il a été démontré que l'inhibition ciblée de *SAP5* limite de manière significative la prolifération des hyphes de cette espèce, diminuant ainsi l'adhésion de *S. aureus* dans un biofilm mixte (Kulshrestha & Gupta, 2025).

3.3. Analyse par spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman a largement prouvé son efficacité dans l'étude des biofilms microbiens (Benladghem et al., 2022; Keleştemur & Çulha, 2017; Rebrošová et al., 2019). Dans la présente étude, une analyse spectroscopique Raman a initialement été réalisée pour identifier individuellement chaque composant de l'échantillon. Cela a produit des intensités basées sur le décalage Raman, fournissant des spectres caractéristiques du silicone, composant des disques, du sérum sanguin et des cellules de *C. albicans* ATCC10231. Ces spectres ont mis en évidence plusieurs pics distinctifs (figure 22).

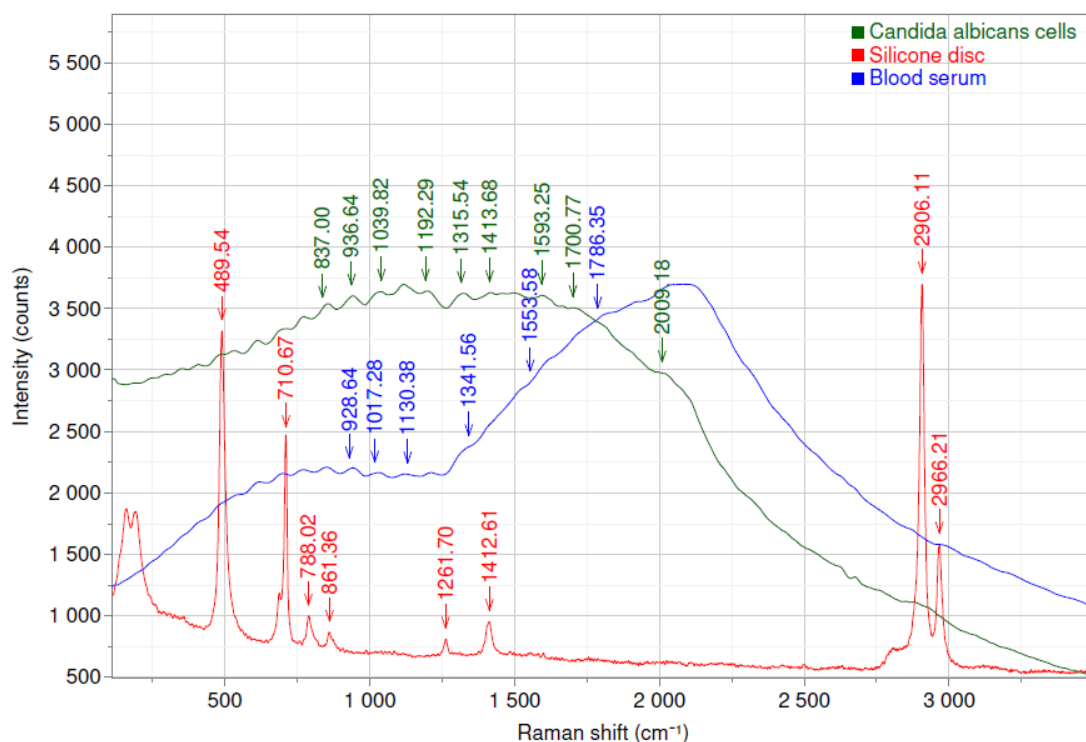


Figure 22. Spectres Raman typiques des cellules de *Candida albicans* ATCC10231 (vert), du silicone (rouge) et du sérum sanguin (bleu).

Le spectre Raman du silicone a révélé les groupes moléculaires réactifs vinyle et silane. Les vibrations d'étirement C-H aromatiques existent à 2800 et 2906 cm^{-1} , tandis que les vibrations C-H oléfiniques des groupes vinyliques ont été observées juste au-dessus de 2966 cm^{-1} . Le groupe Si-C₆H₅ a donné lieu à d'autres bandes à 1260 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} , 782 cm^{-1} et 706 cm^{-1} . En outre, les bandes de vibration du groupe Si-CH=CH₂ ont été mentionnées à 1400 cm^{-1} et également à 1600 cm^{-1} , se chevauchant avec la vibration du groupe phényle. Cependant, d'autres bandes ont été recouvertes par les bandes d'absorption des vibrations Si-O-Si les plus intenses autour de 1000 cm^{-1} (**Figure 22**). Toutes ces données correspondent à celles décrites dans la littérature (**Tableau 11**).

Pour les spectres de *C. albicans* ATCC10231, les pics obtenus correspondent principalement à la fonction amide (CO-NH), présente dans les protéines. D'autre part, plusieurs pics Raman caractéristiques ont été enregistrés entre 100,77 cm^{-1} et 837 cm^{-1} avec des intensités comprises entre 3000 et 3500. En effet, les déplacements Raman de 1322 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} et 1603 cm^{-1} représentent respectivement, les vibrations d'étirement C-NH₂, les vibrations de déformation C-H des lipides et les vibrations d'étirement des anneaux des désoxyribonucléotides adénosine monophosphate. En plus des bandes CO qui s'étirent à 1700 cm^{-1} , des pics attribués à l'amide III à 1192 cm^{-1} , à la phénylalanine à 1039 cm^{-1} , aux glucides à 869 cm^{-1} et à la tyrosine à 837

cm^{-1} sont également mis en évidence, ce qui est en accord avec les données bibliographiques (**Tableau 11**).

Pour le sérum sanguin, différents pics sont apparus entre $928,64 \text{ cm}^{-1}$ et $1553,58 \text{ cm}^{-1}$ à des intensités comprises entre 2200 et 2900 (**figure 22**). D'après les données du **tableau 11**, ces pics correspondent aux protéines, aux amides, aux hélices α ainsi qu'à l'étirement des phospholipides en C-C. Cependant, un pic du β -carotène a été détecté à 1544 cm^{-1} . La même chose a été constatée pour l'étirement squelettique α , les vibrations de bascule CH_2 et les polysaccharides, qui ont été observés autour de 938 cm^{-1} , 848 cm^{-1} et 698 cm^{-1} , respectivement. De plus, des pics additionnels liés aux protéines aux environs de 630 cm^{-1} et 758 cm^{-1} ont également été observés.

Un autre pic très caractéristique a été détecté à $1786,35 \text{ cm}^{-1}$ avec une intensité supérieure à 3400, celui-ci correspond aux protéines, aux amides, aux hélices α et aux phospholipides (**Tableau 11**). Ce pic est le point d'intersection de deux pics distincts, celui des cellules de *Candida albicans* ATCC10231 et celui du sérum sanguin.

Tableau 11. Attribution des bandes Raman du silicone, de *Candida albicans* et du sérum sanguin (Alfano et al., 1991; Benladghem et al., 2022; Cai et al., 2010; Hanlon et al., 2000; Jarvis & Goodacre, 2008; Keleştemur & Çulha, 2017; Kneipp et al., 2006; X. Li et al., 2001; Pichardo-Molina et al., 2007; Podstawka et al., 2004; Potocki et al., 2019; Sujith et al., 2009).

Silicone		Levure (<i>Candida albicans</i>)		Sérum sanguin	
Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Mode	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Mode	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Mode
2966	Étirement asymétrique CH ₃	2019	Phénylalanine, Tyrosine	1786	Protéines, amide, hélice α, phospholipides
2906	Étirement symétrique CH	1700	C=O	1544	Bêta-carotène
1412	Courbure asymétrique CH ₃	1603	Vibrations d'étirement des anneaux des désoxyribonucléotides adénosine monophosphate	1311	Adénine
1261	Flexion symétrique CH ₃	1420	Vibrations de déformation C-H des lipides	1127	Protéine, phospholipide étirement C-C
861.0	CH ₃ bascule symétrique	1322	Étirement C-NH ₂	1022	Phényle
788	Bascule asymétrique CH ₃ , Étirement asymétrique Si-C	1192	Amide III	938	Étirement squelettique α
711	Étirement symétrique Si-C	1128	C-CN	848	CH bascule dans CH ₂
489	Étirement Si-O-Si	1039	Phénylalanine	759	Protéine
		869	Hydrates de carbone	698	Polysaccharides
		837	Tyrosine	630	Mode anneau des protéines

En se référant aux résultats précédents et à la microscopie Raman du biofilm de *C. albicans* ATCC10231 sur le disque SCS, deux zones distinctes ont été sélectionnées pour l'analyse spectrale (**figure 23**), l'une opaque (zone 1), caractérisée par des chevauchements filamenteux complexes et l'autre claire (zone 2).

La spectroscopie Raman a montré une concordance entre les spectres précédemment décrits et ceux du disque SCS recouvert par le biofilm de *C. albicans* ATCC10231. Cependant, de légères variations ont été mises en évidence, qui pourraient être attribuées à la fixation et à l'interaction des éléments de l'échantillon (**Tong et al., 2016**). En fait, deux zones ont été distinguées, la zone 1, caractérisée par une forte densité cellulaires identifiées par l'apparition d'un pic intense à 1322 cm^{-1} d'étirement C-NH₂ liée à la biomasse et de pics caractéristiques des hydrates de carbone des exopolysaccharides autour de 800 cm^{-1} , principaux composants de la matrice exopolymérique du biofilm (**Di Martino, 2018**).

Par ailleurs, des pics attribués au sérum sont apparus à 938 cm^{-1} (étirement squelettique α) avec l'apparition de pics de silicone, avec de faible intensité à 2900 et 2964 cm^{-1} (respectivement d'étirement asymétrique CH₃ et d'étirement symétrique CH₃). D'autres pics autour de 1100 cm^{-1} pour l'amide III ont été observés. L'apparition de pics de silicone avec une intensité plus faible par rapport à la zone 2 soutient l'idée que la formation du biofilm fongique dans cette zone a empêché la détection du substrat par le spectroscope Raman, constat souligné également par Benladghem et al. (**2022**).

À contrario, le spectre Raman de la zone 2 a révélé des pics de silicone de forte intensité par rapport à la zone 1. Cela indique que la surface du disque de silicone n'était pas entièrement recouverte à cause d'une biomasse réduite, ce qui signifie que la zone 2 n'était pas tapissée par le biofilm. En effet, l'apparition de pics à 1410 cm^{-1} (repliement asymétrique) et à 938 cm^{-1} (étirement squelettique α) du sérum avec une intensité inférieure à celle observée en zone 1 corrobore cette observation. D'ailleurs, les pics caractéristiques de *C. albicans* ATCC10231 étaient très faibles voire difficiles à détecter (**figure 23**).

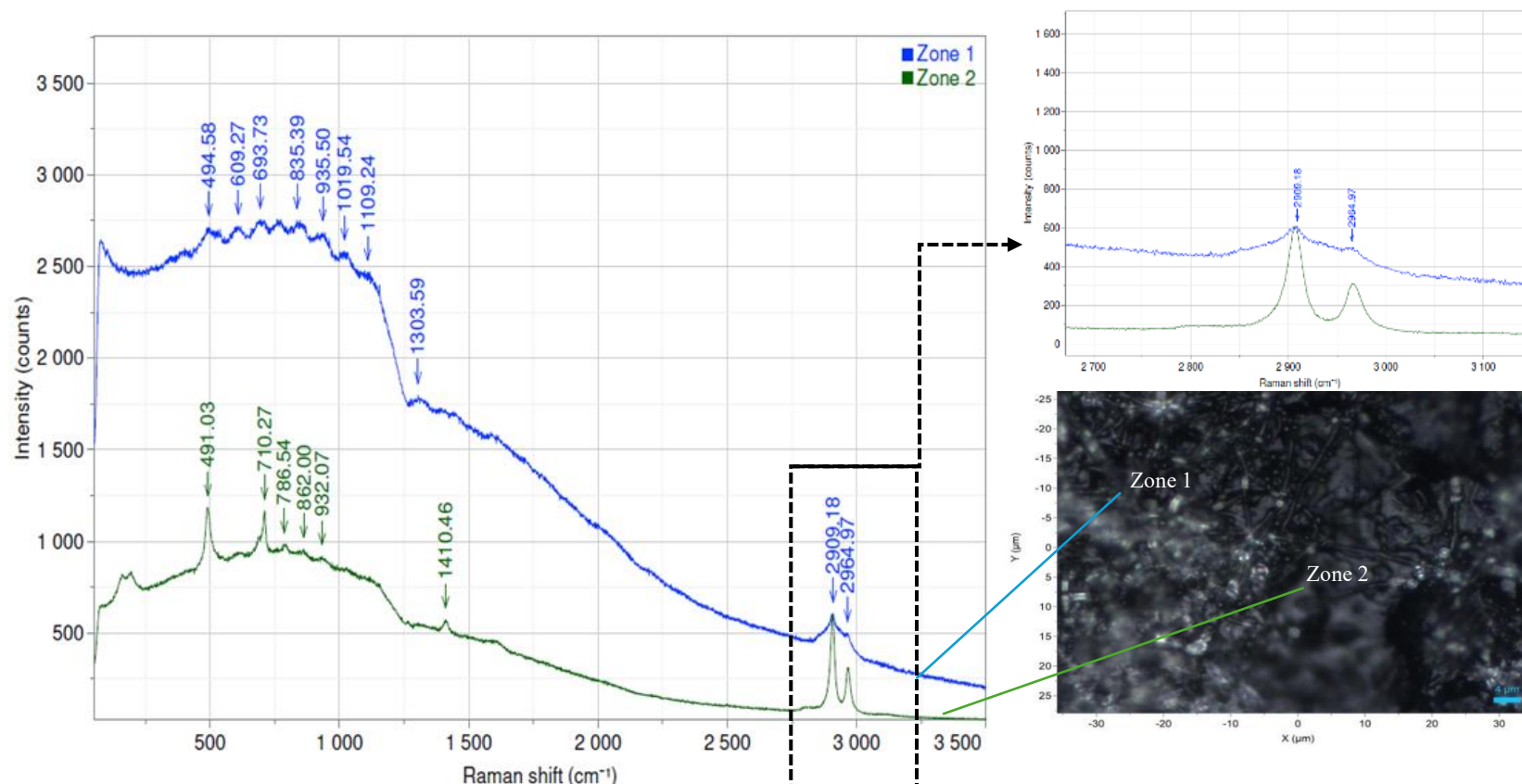


Figure 23. Spectres Raman combinés à la microscopie de deux zones du biofilm de *Candida albicans* ATCC10231 formé sur un disque SCS. Zone 1 : opaque et zone 2 : claire.

D'autre part, la cartographie Raman a permis de déterminer la distribution du biofilm fongique et des composants du sérum humain sur le support en silicone (**figure 24**). À cet égard, le pic observé vers 2909 cm^{-1} de l'étirement symétrique CH_3 a été pris comme référence pour le silicone, coloré en rouge ; celui à 2019 cm^{-1} pour les acides aminés Phe et Tyr du biofilm de *Candida albicans* ATCC10231 (vert) ; tandis que le pic à 933 cm^{-1} caractérise l'étirement squelettique α du sérum (bleu).

La **figure 24 (A)** met en évidence les pics Raman de la zone utilisée pour la cartographie. La **figure 24 (B)** montre une image du disque de silicone couvrant une zone de $580\text{ }\mu\text{m}^2$ sur laquelle la cartographie Raman a été réalisée. D'autre part, la **figure 24 (C)** montre effectivement la distribution du biofilm de *C. albicans* ATCC10231 et du sérum sanguin. La **figure 24 (D)** par ailleurs, représente la cartographie complète de l'image Raman. Il s'agit d'une simulation de l'ensemble de l'image prise par microscopie, réalisée à l'aide du logiciel LabSpec 6 de Horiba LabRam HR Raman.

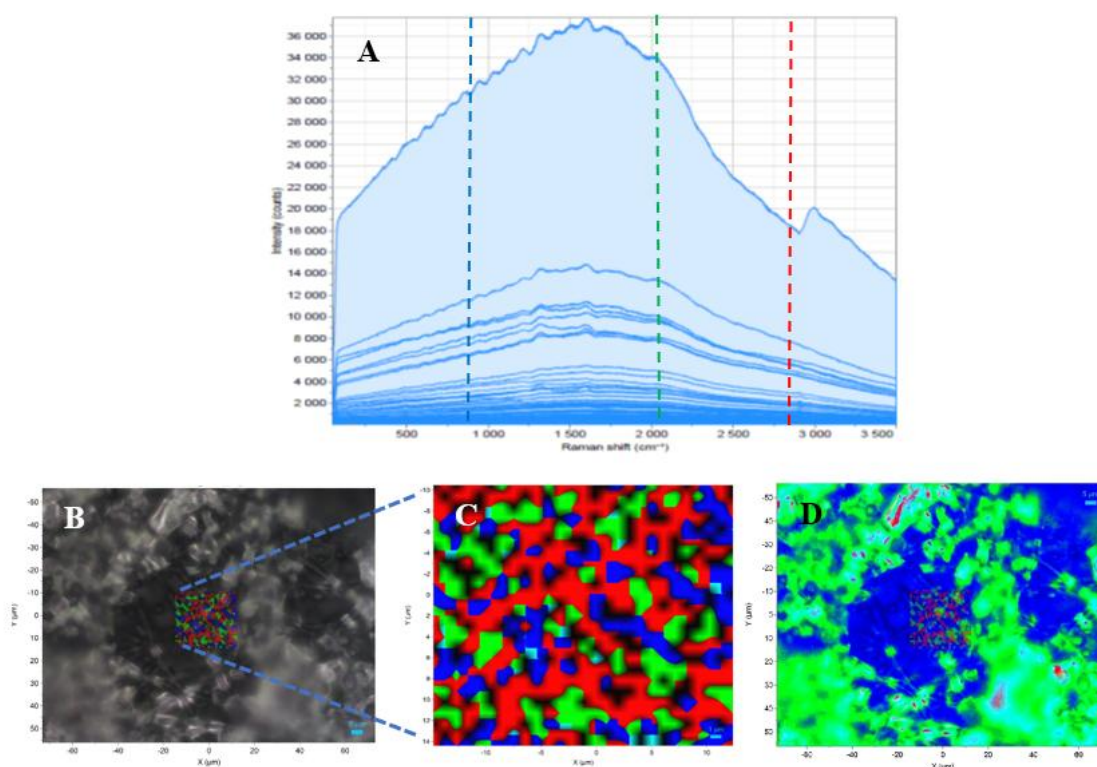


Figure 24. Cartographie Raman du biofilm de *C. albicans* ATCC10231 formé sur le disque SCS. (A) : Pics Raman de la zone utilisée pour la cartographie, (B) : Imagerie Raman de la même zone étudiée (grossissement $\times 50$), (C) : Projection de la carte Raman, (D) : Cartographie complète de l'image Raman.

Cette représentation cartographique illustre la projection de 164 points spectraux sur une surface en silicone sous les mêmes conditions. Elle a démontré que la répartition du biofilm et du sérum sur la surface de silicone était homogène. Cela valide l'observation que le substrat était correctement enduit de constituants sériques, ce qui a favorisé l'adhésion cellulaire et la formation de biofilm, corroborant ainsi les constatations de Samaranayake et al. (2013).

3.4. Analyse par imagerie microscopique

L'analyse du biofilm de *C. albicans* ATCC10231 formé sur le disque SCS par microscope à fluorescence et par microscope électronique à balayage est illustrée dans les **photos 2** et **3**, respectivement.

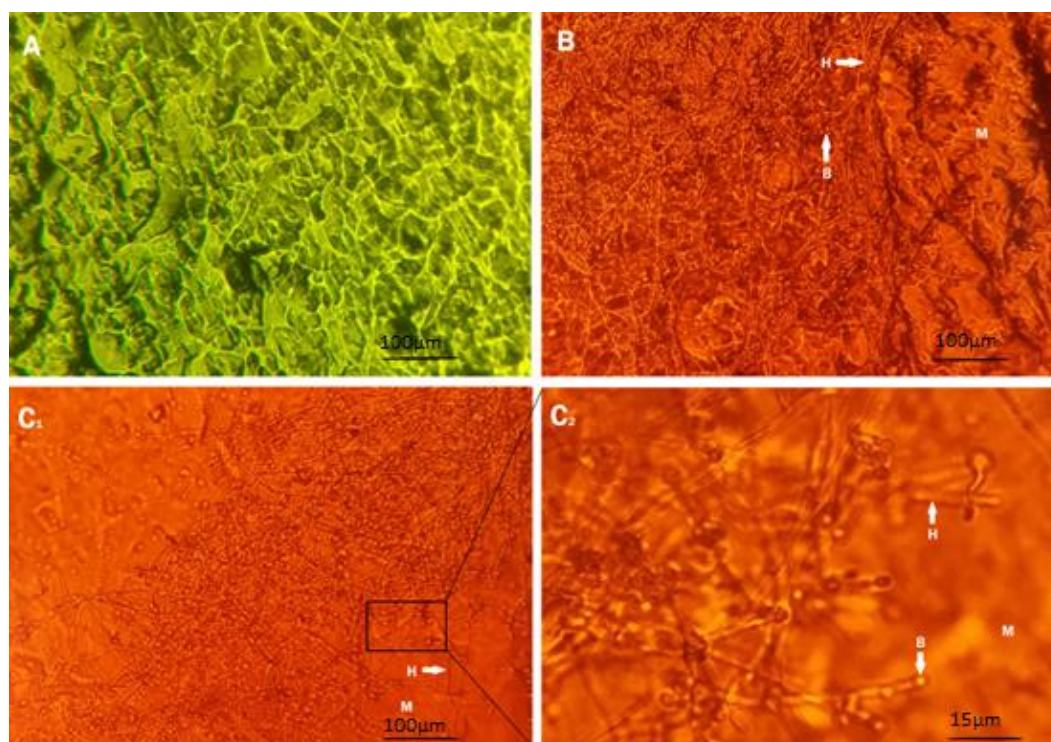


Photo 2. Micrographies d'un disque de silicone stérile (A) et d'un biofilm de *C. albicans* ATCC10231 formé sur le disque (B, C), obtenus par microscope à fluorescence. H : Hyphe, B : Blastospores, M : Matrice extracellulaire.

L'analyse des micrographies obtenues à l'aide du microscope à fluorescence a fourni des informations pertinentes. En effet, la **photo 2A**, représentant la surface du disque de silicone stérile dépourvu de biofilm, révèle une topographie à texture rugueuse et uniforme, propice à l'adhésion cellulaire. En revanche, la présence du biofilm de *C. albicans* ATCC10231 a été observée à la surface du disque traité, présentant une structure stratifiée et hétérogène,

composée de filaments hyphaux entremêlés de corps cellulaires. La présence simultanée de blastospores, d'hyphes et d'une matrice exopolymérique recouvrant le disque témoigne du développement et de la maturation du biofilm (Seddiki, 2021).

La **photo 2B** montre clairement que les blastospores et les hyphes étaient plus abondantes dans la couche supérieure du biofilm. De plus, l'existence d'une matrice recouvrant les autres constituants du biofilm suggère que sa structure devient de plus en plus complexe à mesure que le biofilm arrive à maturité (**photo 2C₁ et 2C₂**). Par conséquent, la surface rugueuse du disque de silicone semble favoriser l'adhésion et l'allongement des filaments de *C. albicans*, ce qui conduit à la formation du biofilm.

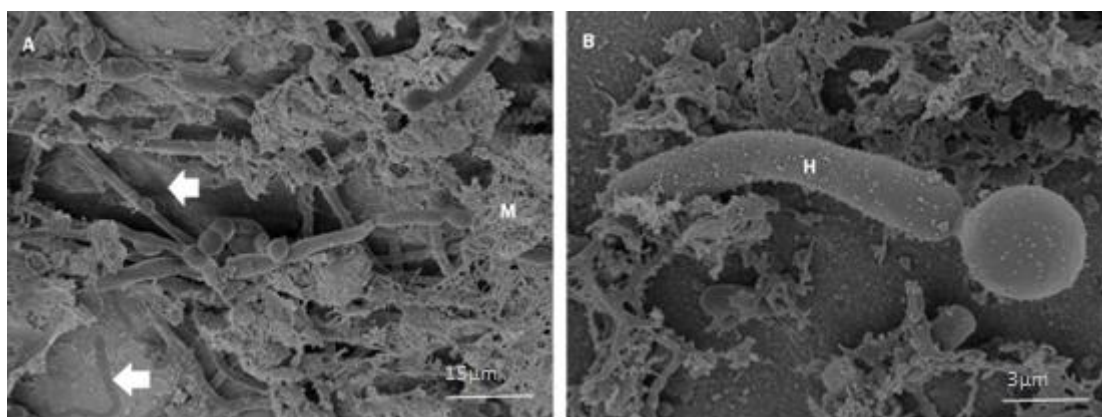


Photo 3. Micrographies électroniques du biofilm de *C. albicans* ATCC10231 formé sur une surface en silicone. M : matrice extracellulaire, H : hyphe. La flèche indique l'empreinte d'un hyphe qui a adhéré à la surface avant de s'en détacher (Grossissement : (A) $\times 2000$, (B) $\times 10000$).

Le microscope électronique à balayage a fourni une vue détaillée sur le biofilm de *C. albicans* ATCC10231 formé sur le disque de silicone. La **photo 3A** a effectivement mis en évidence la structure complexe du biofilm de cette levure, composée de blastospores, d'hyphes et d'une matrice extracellulaire dans laquelle étaient confinées les cellules et les hyphes. Cependant, Cette structure filamentaire était évidente à un grossissement plus élevé (**photo 3B**) ; les hyphes et les blastospores de *C. albicans* ATCC10231 étaient nettement perceptibles avec davantage de détails.

Ces résultats concordent avec ceux de la microscopie Raman ; la complexité du biofilm a dévoilé en effet une structure tridimensionnelle formée par un chevauchement d'hyphes et de blastospores contenues dans une matrice extracellulaire. Selon plusieurs auteurs (Lopes &

Lionakis, 2022; Wijaya et al., 2023), l'hétérogénéité structurelle et architecturale semble être une propriété commune des biofilms formés par cette espèce fongique.

Par ailleurs, le détachement et la dispersion des cellules sessiles jouent un rôle extrêmement important dans la dissémination du biofilm, ce qui peut expliquer son émergence (**Rumbaugh & Sauer, 2020**). Dans cette optique, le microscope électronique à balayage a non seulement fourni une imagerie haute résolution, mais a également détecté avec succès les empreintes hyphales qui se sont détachées de la surface du disque après y avoir adhéré (**photo 3A**).

L'identification réussie de traces d'hyphes détachées de la surface du disque renforce la position de l'imagerie électronique comme instrument efficace pour l'analyse des biofilms. Cette affirmation s'aligne sur les conclusions de diverses études qui ont mis en avant l'efficacité du microscope électronique à balayage pour la caractérisation détaillée des biofilms (**Benahmed et al., 2023; Gourari-Bouzouina et al., 2024; Relucenti et al., 2021**).

4. Inhibition des biofilms : effets des liquides ioniques

4.1. Effet antifongique et antibactérien

Les effets antifongique et antibactérien des trois liquides ioniques à base de phosphonium [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], [P₆₆₆₁₄][Chlorure] et [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide] ont été testé contre les souches de *C. albicans* et des bactéries co-isolées à partir des mêmes cathéters.

Les différentes valeurs de CMI obtenues sont présentées dans le **tableau 12**. L'analyse des résultats obtenus a mis en évidence une activité inhibitrice prometteuse, ce qui est cohérent avec les rapports précédents indiquant que la classe de liquides ioniques dérivés du phosphonium, contenant de longues chaînes alkyles présente des propriétés antimicrobiennes (**Fernandes et al., 2022; Li et al., 2022**).

Toutes les souches examinées ont montré une sensibilité aux trois liquides ioniques, sauf pour certaines bactéries à Gram négatif résistantes, à savoir *P. aeruginosa*1 et *K. pneumoniae*1 qui présentaient une CMI ≥ 2000 µg/mL. En outre, *S. paucimobilis*2 a démontré une sensibilité notable au [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], affichant une CMI de 0,24 µg/mL; ainsi qu'au [P₆₆₆₁₄][Chlorure] et au [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide] (CMI= 0,49 µg/mL). Ce niveau élevé de sensibilité est en accord avec son profil de sensibilité aux antibiotiques conventionnels, précédemment discuté.

En termes d'activité antibactérienne, les deux liquides ioniques, [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide] et [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], ont démontré une action inhibitrice comparable, bien qu'une légère différence dans les concentrations minimales inhibitrices ait été notée. En réalité, [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide] a démontré une meilleure efficacité contre *S. hominis*3 et *S. hominis* 4 (**tableau 12**).

Conformément à ces constatations, les données rapportées par Thasneema et al. (**2020**) ont révélé une activité antimicrobienne supérieure des liquides ioniques à base de phosphonium et de l'anion dicyanamide comparativement aux autres anions testés. Il semble que cet anion ait une forte tendance à interagir avec les membranes fongiques et bactériennes, ce qui lui permet d'exercer son effet antimicrobien à de faibles concentrations.

Tableau 12. Concentrations minimales inhibitrices des trois liquides ioniques vis-à-vis des co-isolats de *Candida albicans* et des bactéries. Ca1-Ca5 : souches de *C. albicans*.

	CMI (µg/ mL)		
	[P ₆₆₆₁₄][Phosphinate]	[P ₆₆₆₁₄][Chlorure]	[P ₆₆₆₁₄][Dicyanamide]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> 2	0.24	0.49	0.49
<i>Staphylococcus hominis</i> 3	1.95	3,91	0.93
<i>Pasteurella testudinis</i> 1	1.95	3,91	0.93
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	≥ 2000	1000	≥ 2000
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 4	3,91	3,91	7.81
<i>Staphylococcus hominis</i> 4	1.95	3,91	0.93
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 5	7.81	3,91	3.75
Ca1	7, 81	3,91	7, 81
Ca5	7, 81	3,91	7, 81
Ca4	7, 81	3,91	7, 81
Ca3	7, 81	3,91	7, 81
Ca2	7, 81	3,91	7, 81

Par ailleurs, [P₆₆₆₁₄][Chlorure] a exercé une activité antibactérienne moins importante comparée aux deux autres liquides ioniques, avec des concentrations minimales inhibitrices se situant autour de 3,91 µg/mL pour la plupart des bactéries. Toutefois, ce composé a démontré une meilleure efficacité antifongique contre les souches de *C. albicans*, présentant une CMI de 3,91 µg/mL en comparaison aux valeurs de 7,81 µg/mL pour [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide] et [P₆₆₆₁₄][Phosphinate].

Conformément à nos conclusions, Croitoru & Roata (2020) ont observé que le choix de l'anion a un impact considérable sur l'activité antimicrobienne d'un liquide ionique. En outre, des CMI comparables obtenues contre les souches de *C. albicans* et *S. haemolyticus* ont démontré que cette classe de liquides ioniques possède une activité antimicrobienne à large spectre.

Ces constatations pourraient s'expliquer en partie par la capacité du liquide ionique à attaquer des cibles cellulaires élémentaires communes, structurales et/ou métaboliques, ce qui pourrait ainsi faciliter les schémas thérapeutiques et réduire le risque de développement de résistances (Croitoru & Roata 2020).

4.2. Effet hémolytique des liquides ioniques

Lors de l'évaluation de nouveaux agents antimicrobiens, la cytotoxicité est un critère clé à prendre en compte, car elle détermine leur potentiel thérapeutique. Le test d'hémolyse a donc été choisi en tant que marqueur préliminaire de cytotoxicité, étant donné la sensibilité élevée des érythrocytes aux agents perturbateurs de membrane (Frag & Alagawany, 2018).

Le taux d'hémolyse causé par l'action des trois liquides ioniques a été déterminé à différentes concentrations par la mesure de l'absorbance à 450 nm. Les résultats sont présentés dans la figure 25.

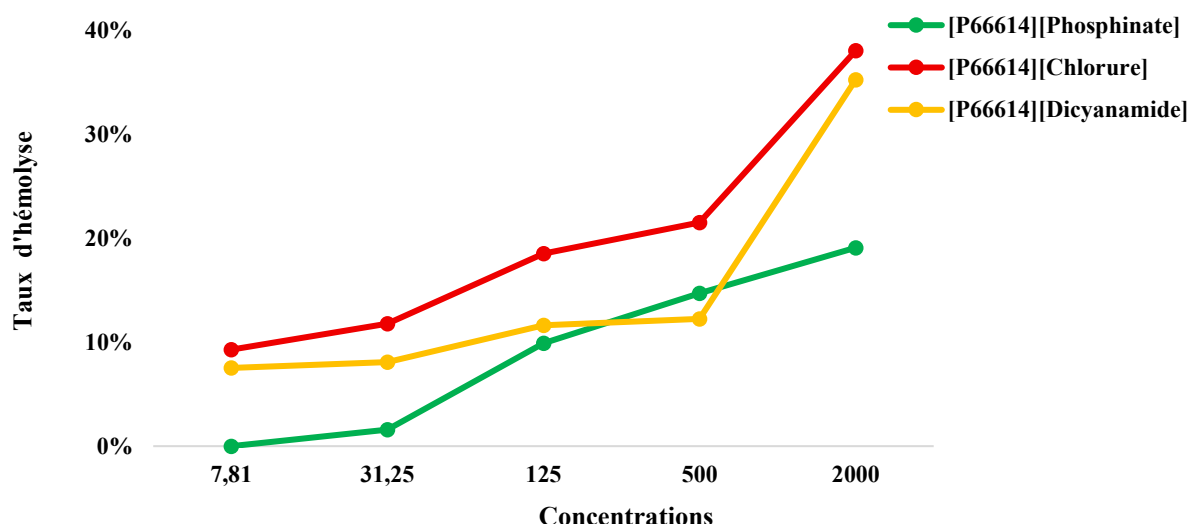


Figure 25. Taux d'hémolyse induit par les trois liquides ioniques étudiés à différentes concentrations.

Les résultats du test d'hémolyse ont révélé une hématotoxicité dose-dépendante, avec des différences notables. A une concentration de 7,81 µg/mL, correspondant à la CMI partagée par les trois liquides ioniques, [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] n'a provoqué aucun effet hémolytique. En revanche, [P₆₆₆₁₄][Chlorure] et [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide] ont entraîné respectivement 9,28 % et 7,52 % d'hémolyse à ce même niveau.

À des concentrations plus élevées, l'effet hémolytique a augmenté progressivement pour les trois composés. Toutefois, cet effet a toujours été moins prononcé pour [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], à l'exception de la concentration de 500 µg/mL. Par ailleurs, à une concentration de 2000 µg/mL, ces écarts se stabilisaient autour de 20% (19,08%) pour [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], tandis qu'ils dépassaient 35 % pour les deux autres liquides ioniques (**figure 25**).

Contrairement à l'observation rapportée par Ermolaev et al. (2022), selon laquelle l'effet hémolytique dépend principalement de la structure du cation, les résultats de la présente recherche ont souligné un impact significatif de l'anion sur l'hémolyse.

Par conséquent, cette différence d'hémolyse, associée aux performances antimicrobiennes précédemment démontrées, désigne clairement [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] comme le candidat le plus prometteur en tant qu'agent antibiofilm, compte tenu de sa biocompatibilité à une concentration active élevée.

4.3. Effet sur la viabilité cellulaire sessile : détermination des SCMI

En raison de sa bonne activité antimicrobienne, associée à son hémocompatibilité, [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a été sélectionné pour examiner son effet sur le biofilm mixte de *Candida albicans* et *Staphylococcus haemolyticus* (association N° 5), co-isolés à partir d'un cathéter d'hémodialyse.

Ce consortium microbien constitue un modèle de biofilm mixte hautement pathogène, combinant une levure biofilmogène impliquée dans des infections invasives et un staphylocoque multirésistant émergent. Il est par conséquent indispensable d'explorer cette association microbienne qui mérite un examen approfondi.

Les résultats du test de réduction du XTT sont présentés dans le **tableau 13**. L'analyse ANOVA a montré une différence globale très significative ($P < 0,000$) des valeurs SMICs entre les trois points temporels (4h, 24h et 48h). Le test de Tukey a confirmé que cette différence se situait précisément entre les temps d'incubation de 4h et 24h, ainsi qu'entre 4h et 48h.

Tableau 13. SCMI du [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] et des antimicrobiens conventionnels Amphotéricine B et Vancomycine vis-à-vis des cellules sessiles de *C. albicans* et *S. haemolyticus*. L'astérisque (*) indique des différences significatives selon le test statistique de Tukey à un seuil critique de 0,01.

	SCMI (µg/mL)			AmB	VAN
	[P ₆₆₆₁₄][Phosphinate]				
	*				
	*				
	4h	24h	48h		
<i>C. albicans</i>	250	1000	1000	64	/
<i>S. haemolyticus</i>	250	500	1000	/	> 256
<i>C. albicans</i> / <i>S. haemolyticus</i>	15	1000	250	/	/

D'après les résultats obtenus, le liquide ionique [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a montré un effet maximal lorsqu'il a été administré pendant la phase d'adhésion (4h), avec des SCMI de 15 µg/mL pour le biofilm mixte et de 250 µg/mL pour les biofilms mono-espèces correspondants. Cette constatation soutient d'autres recherches ayant déterminé que se focaliser sur la phase précoce de formation du biofilm est essentiel pour une inhibition optimale (Eltwisy et al., 2022; Fu et al., 2021).

Pour les biofilms de 24 heures, les SCMI du liquide ionique et de l'AmB étaient 128 fois plus élevées que leurs CMI correspondantes, soit 7,81 et 0,5 µg/mL. Ceci témoigne d'une résistance accrue du biofilm de *C. albicans*, attribuée à des mécanismes spécifiques tels que l'augmentation de la concentration en ergostérol membranaire et la surexpression des gènes de résistance (Mukherjee & Chandra, 2004). Il a également été rapporté que la matrice extracellulaire, riche en β -1,6-glucane et β -1,3-glucane, contribue également à cette résistance (Silva et al., 2017).

De plus, les données de cette recherche ont révélé une SCMI du liquide ionique de 1000 µg/mL vis-à-vis du biofilm de *C. albicans* et du biofilm mixte, mettant en évidence une augmentation hautement significative ($p < 0,000$). Toutefois, la SCMI contre le biofilm de *S. haemolyticus* a doublé (500 µg/mL) par rapport au biofilm de 4 heures.

Par ailleurs, en dépit de la faible efficacité de la vancomycine contre le biofilm de *S. haemolyticus*, constat également souligné par Pereira-Ribeiro et al. (2019), mettant en lumière l'énorme défi thérapeutique associé à cette espèce, [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a montré une certaine efficacité pour atténuer sa résistance.

En ce qui concerne les biofilms de 48 heures, les SCMI ont été maintenues constantes pour *C. albicans*, tandis qu'elles ont continué à augmenter pour *S. haemolyticus* (1000 µg/mL). Cependant, la SCMI du liquide ionique a baissé d'une manière inattendue face au biofilm mixte de 48 heures (250 µg/mL) comparativement à celui formé après 24 heures d'incubation.

Cet effet surprenant suggère une perturbation des interactions inter-espèces induite par le liquide ionique. Il est intéressant à cet égard de souligner que l'effet inhibiteur de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] contre les biofilms mixtes de 4 heures et 48 heures a augmenté par rapport à celui des biofilms mono-espèces.

4.4. Analyse spectrale et chimique de l'inhibition par cartographie confocale Raman assistée par l'intelligence artificielle

Dans cette partie de l'étude, la spectroscopie Raman a été utilisée comme outil efficace pour analyser l'effet de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] sur le biofilm mixte *C. albicans*/*S. haemolyticus* à trois moments différents (4h, 24h et 48h). Grâce à l'analyse spectrale Raman (figure 26), nous avons pu reconnaître la même espèce de levure (*C. albicans*) ainsi que le même matériau (silicone) servant de substrat au biofilm, examinés dans la section 3.3. Bien que l'analyse du spectre relatif à la bactérie *S. haemolyticus* ait été basée sur des données issues de la littérature, elle a permis

de mettre en évidence plusieurs pics caractéristiques de composants cellulaires typiques (**figure 26**).

Il s'agit notamment de la vibration d'étirement C-CO à 547 cm^{-1} , ainsi que de la phénylalanine, de la tyrosine et de l'adénine à 609 cm^{-1} , 635 cm^{-1} et 726 cm^{-1} , respectivement. D'autres pics ont également été mis en évidence, dont ceux liés à la phénylalanine, la cytosine et l'uracile ($782,31\text{ cm}^{-1}$), au phosphate (1095 cm^{-1}), ainsi qu'à l'adénine, la guanine, la tyrosine et le tryptophane (1323 cm^{-1}). De plus, des pics associés aux protéines ont fait leur apparition à 1449 cm^{-1} , tandis que les graisses insaturées et la bande amide I des protéines ont été détectées à 1667 cm^{-1} . Pour ce qui est des vibrations d'étirement CH, elles ont été repérées à 2937 cm^{-1} . Toutes ces bandes et vibrations d'étirement ont été rapportées dans plusieurs recherches (**Benladghem et al., 2022; Ho et al., 2019; Rebrošová et al., 2017**).

Ces résultats attestent ainsi des performances exceptionnelles de la spectroscopie Raman pour une identification concise non seulement des espèces microbiennes, mais également du substrat du biofilm à l'échelle moléculaire.

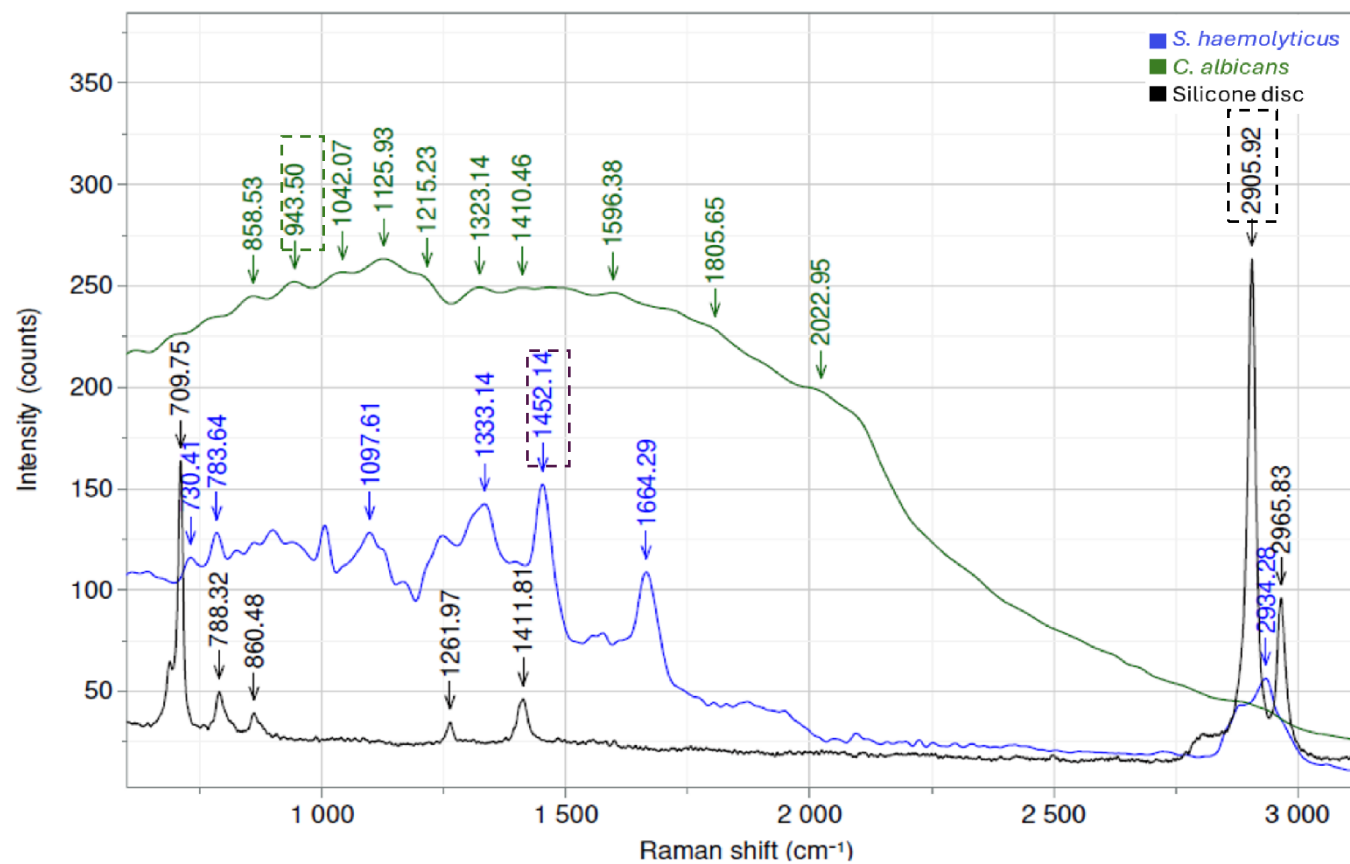


Figure 26. Spectres Raman du disque en silicone (noir), de *Candida albicans* (vert) et de *Staphylococcus haemolyticus* (bleu).

D'autre part, la cartographie Raman confocale a permis une représentation spatiale de l'effet inhibiteur du [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] sur la différenciation de *C. albicans* et *S. haemolyticus* au sein du biofilm mixte, ainsi que le suivi de leur distribution suite au traitement au moyen de ce liquide ionique. En utilisant le programme Python développé à partir des données cartographiques, nous avons procédé à l'analyse des images et au calcul des taux de recouvrement du substrat en silicone par les biofilms mixtes, ces résultats sont illustrés dans la **figure 27**.

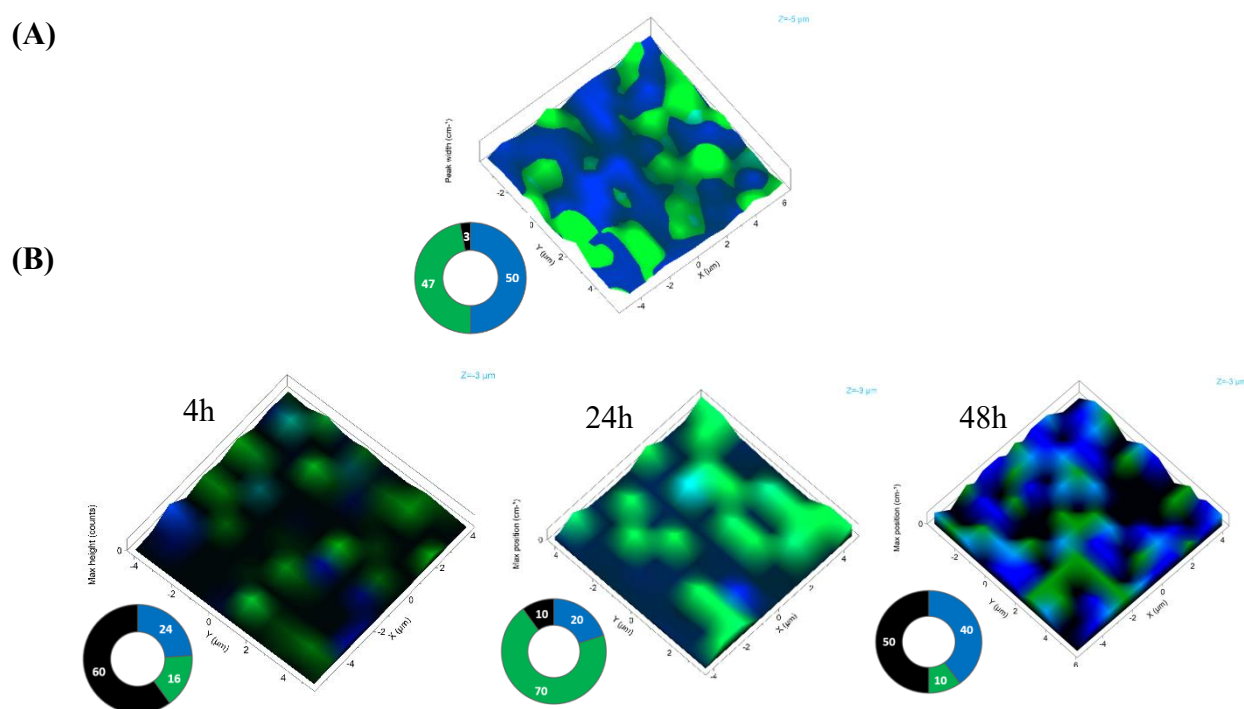


Figure 27. Cartographies Raman et taux du biofilm mixte de *C. albicans* (vert) et *S. haemolyticus* (bleu) formé sur un support en silicone (noir). (A) : test de contrôle (témoin négatif), (B) : inhibition par le liquide ionique [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] à différents points temporels 4h, 24h et 48h.

Dans le biofilm témoin négatif (sans traitement inhibiteur), l'analyse Raman a montré que le biofilm mixte recouvrait de manière homogène l'ensemble de la surface du support, révélant une répartition relativement équilibrée entre *C. albicans*, avec un taux de 47%, et *S. haemolyticus* (50%) (**figure 27A**). Cela suggère que les deux micro-organismes ont probablement coévolué sans exclusion compétitive. Il s'agit d'un facteur très important dans les biofilms mixtes, ce qui complique leur élimination en milieu clinique.

Le profil d'inhibition de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] s'est révélé être dépendant du temps (**figure 27B**), présentant une efficacité optimale lors des premières phases de développement du biofilm (4h) où il atteint une inhibition de 60%, corroborant ainsi les résultats du test XTT. Conformément à nos conclusions, une recherche menée par Kim et Chin (**2023**) utilisant la spectroscopie Raman a démontré que les cinq premières heures du développement du biofilm étaient les plus susceptibles à l'effet des antibiotiques.

Néanmoins, grâce à l'identification des marqueurs spectraux durant les premières quatre heures des deux micro-organismes, *C. albicans* et *S. haemolyticus*, nous avons pu examiner le profil d'inhibition sélective associé à la sensibilité particulière de chaque espèce au traitement par le liquide ionique [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] au sein du biofilm mixte.

À ce stade précoce de la formation du biofilm, *C. albicans* a montré une plus grande sensibilité au traitement d'inhibition que *S. haemolyticus*, avec seulement 16 % du biofilm de levure restant sur le substrat, contre 24 % pour le biofilm bactérien (**figure 27B**). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la formation du biofilm de cette levure repose sur une transition morphologique, susceptible d'être perturbée dès la première phase, entraînant une inhibition plus importante des cellules fongiques (**Pereira et al., 2021**).

Ces résultats suggèrent que les liquides ioniques à base de phosphonium pourraient empêcher l'adhésion microbienne, ce qui plaide en faveur de leur utilisation future comme agents anti-adhésifs dans les revêtements de cathéter pour la gestion anticipée des biofilms. Par ailleurs, Torres et al. (**2021**) ont effectivement incorporé avec succès du [Et-hex-en][Tf₂N], un liquide ionique à base d'ammonium, dans des revêtements polymères et ont rapporté une activité antimicrobienne prometteuse.

En outre, après 24 heures d'incubation, l'ajout du liquide ionique au biofilm a entraîné une diminution marquée de l'inhibition, ramenée à 10 %. Ce qui suggère que le biofilm avait déjà atteint le stade de maturation et de structuration complexe, ce qui le rendait moins réactif au traitement appliqué.

De plus, la prédominance de *C. albicans* (70 %) dans le biofilm résiduel suggère qu'elle a montré une plus grande résistance au traitement par le liquide ionique comparativement à *S. haemolyticus*. Cela pourrait être attribué à la meilleure adaptabilité métabolique de cette levure, à sa capacité à générer une matrice extracellulaire élaborée et étendue, ou à de potentielles interactions synergétiques au sein du biofilm qui favorisent sa persistance (**Dühning & Schuster, 2024; Lopes & Lionakis, 2022**).

En revanche, le fait que l'application du [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] au biofilm de 48 heures ait conduit à un taux d'inhibition de 50 %, laissant un biofilm résiduel composé de 10 % de *C. albicans* et de 40 % de *S. haemolyticus*, pourrait être associé à des facteurs liés à la maturation du biofilm tels que le stress métabolique ou la viabilité cellulaire réduite (Stewart, 2015).

Toutefois, les changements observés dans la composition des espèces peuvent indiquer une susceptibilité différentielle des constituants du biofilm à ce stade avancé de maturation. En particulier, l'émergence des cellules sessiles persistantes occupe une place centrale dans cette perspective (Ramage et al., 2012; Seddiki, 2021). Dans ce cadre, khelissa et al. (2017) ont constaté qu'une période d'incubation prolongée favorise des interactions intercellulaires plus étendues ainsi que la génération de substances polymères extracellulaires chez *Staphylococcus sp.*

Une autre étude, utilisant la spectroscopie Raman en temps réel, a révélé que l'exposition de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine entraînait l'élimination des couches supérieures du biofilm en 24 heures, tandis que les couches plus profondes demeuraient viables et reprenaient leur croissance pour atteindre un volume considérable au bout de 48 heures (Bae et al., 2019).

En outre, la cartographie Raman s'est révélée être un outil efficace pour analyser les schémas d'inhibition des biofilms, fournissant des données spatiales qui viennent compléter les techniques de quantification conventionnelles. Cette méthode a effectivement mis en lumière des réactions spécifiques de *C. albicans* et *S. haemolyticus* suite à leur exposition au [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], mettant l'accent sur les susceptibilités distinctes de chaque espèce.

Conformément aux résultats actuels, des recherches antérieures ont établi que *Actinomyces denticolens* et *Streptococcus oralis* pouvaient être distinguées dans un biofilm subgingival. Cela atteste de la précision de la cartographie Raman pour l'identification des espèces et le suivi ciblé de leur croissance et/ou leur inhibition au sein des biofilms mixtes (Kriem et al., 2021).

La spectroscopie Raman présente un potentiel considérable pour la détection et l'identification microbienne. Toutefois, la complexité des données spectrales générées par cette technique nécessite des méthodes d'analyses avancées. Couplée à l'intelligence artificielle, l'analyse spectroscopique Raman offre la possibilité d'interpréter les données spectrales provenant d'échantillons complexes, identifiant les variations subtiles entre ses composants qui sont souvent ardues à déceler par des techniques conventionnelles. Grâce à l'analyse automatisée des signatures spectrales uniques, l'intelligence artificielle pourrait faciliter la détection des constituants du biofilm (Maruthamuthu et al., 2020; Yu et al., 2021).

4.4.1. Application de l'apprentissage non supervisé : auto-encodeur

Dans le cadre de cette étude, le recours au clustering non supervisé fondé sur un auto-encodeur, appliqué à la cartographie Raman a mis en œuvre de manière automatique l'effet inhibiteur de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] à différents temps (4h, 24h et 48h), en identifiant des groupements spectraux distincts associés à l'efficacité du traitement.

En bref, un auto-encodeur a été entraîné sur des spectres Raman et a réussi à minimiser leur dimensionnalité et à obtenir une représentation compacte. Cela a permis au clustering k-means d'effectuer une classification automatique des spectres Raman en fonction des caractéristiques spectrales communes, telles que l'intensité, la position et l'étendue des pics.

Cet algorithme a obtenu un score élevé de 0,9812 lors de son évaluation à l'aide de l'Index Rand Ajusté (Adjusted Rand Index, ARI). Cela atteste de l'aptitude du modèle à identifier de manière efficace les signatures chimiques propres aux différents composants du biofilm.

La **figure 28** est une représentation des résultats du regroupement K-means de *C. albicans* et *S. haemolyticus* dans un biofilm mixte formé sur un substrat en silicone, grâce à l'utilisation de la librairie Python scikit-learn.

L'analyse de la densité des points, de leur dispersion spatiale et de leur classification par clustering K-Means a mis en évidence une distribution relativement homogène entre les bactéries (bleu) et les levures (vert). Toutefois, les points noirs qui symbolisent le substrat en silicone étaient moins visibles. Sur la base de la **figure 28A**, l'analyse séparée du groupement de points a montré une forte densité de points verts (*C. albicans*) et bleus (*S. haemolyticus*) dans des agrégats denses au sein de l'échantillon témoin, le biofilm mature non traité. Cela corrobore les données des spectres Raman qui ont révélé des intensités élevées à 943 cm⁻¹ et 1452 cm⁻¹, correspondant respectivement à *C. albicans* et *S. haemolyticus*.

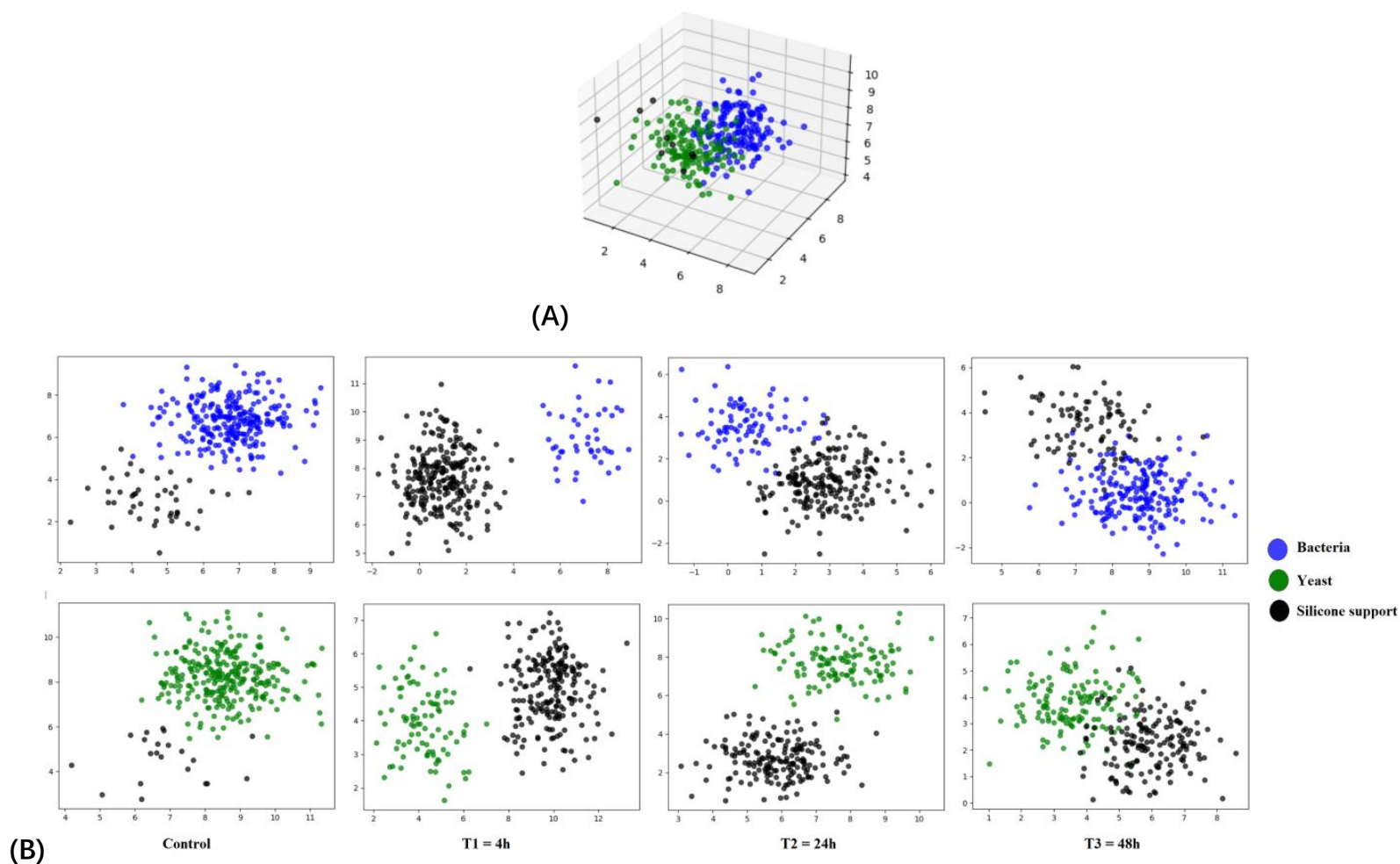


Figure 28. Clustering K-means en 3D des éléments du biofilm mixte du témoin négatif (A). Clustering K-means en 2D de l'effet inhibiteur de [P₆₆₁₄][Phosphinate] contre les biofilms mixtes de *C. albicans* et *S. haemolyticus* de 4h, 24h et 48h (B). *C. albicans* (vert), *S. haemolyticus* (bleu) et le support en silicone (noir).

Par ailleurs, suite à l'application du [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] sur le biofilm mixte de 4h, le nuage de points verts et bleus s'est réduit, tandis que les points noirs ont augmenté en nombre. L'écart type des points verts et bleus a augmenté, mettant en évidence une réduction exponentielle du nombre de points actifs, ce qui explique la dispersion réduite des micro-organismes. Par ailleurs, la distance moyenne entre les points a augmenté, témoignant d'une baisse de l'adhésion microbienne (**figure 28B**). Cela souligne l'effet éradicateur du biofilm par le liquide ionique, d'où la réapparition des points noirs, représentant le matériau silicone.

En revanche, comparé au test témoin négatif, l'analyse a révélé une réduction des points verts et bleus suite à l'application du liquide ionique après 24 heures. Néanmoins, cette baisse demeure moins significative que celle constatée après le traitement de 4 heures (**figure 28B**), suggérant que [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a une meilleure performance contre les biofilms mixtes de *C. albicans* et *S. haemolyticus* de 4 heures.

Des résultats comparables ont été observés pour les biofilms mixtes de 48 heures. Il est toutefois important de noter que la diminution des points verts et bleus était moins prononcée, comparée à celle constatée pour les biofilms de 24 heures. Par conséquent, l'effet inhibiteur d'autant plus marqué que les biofilms mixtes sont jeunes.

4.4.2. Application de l'apprentissage supervisé : CNN

Les résultats de l'analyse des performances du réseau neuronal convolutionnel via la matrice de confusion, pour la classification de *C. albicans*, *S. haemolyticus* et le support, sont présentés dans le **tableau 14**.

Sur cette matrice de confusion chaque cellule représente le pourcentage d'isolats classés dans une catégorie spécifique par le CNN. Les cellules situées sur la diagonale (du coin supérieur gauche au coin inférieur droit) correspondent aux classifications correctes, tandis que celles en dehors de la diagonale révèlent les erreurs de classification, mettant en évidence les limitations de ce modèle. La précision du présent modèle varie entre 92% à 98%.

Pour chaque analyse, la matrice de confusion confronte la réalité biologique (la véritable nature du composant ou de la zone mesurée : bactérie, levure ou substrat) à l'identification effectuée sur la base du spectre Raman ; un bon résultat signifie une identification correcte. Pour chaque groupe, le pourcentage de classifications correctes (valeurs situées sur la diagonale) est considérablement élevé, atteignant 92% pour *S. haemolyticus*, identifiée par conséquent de manière précise. Cependant, seulement quelques erreurs concernant *C. albicans* (4%), sans

aucune confusion avec le substrat. Ainsi *C. albicans*, a été correctement reconnu (90%) et marginalement associé au substrat (2%). La confusion limitée entre la bactérie et la levure est cohérente avec le chevauchement de bandes Raman de composés partagés (lipides/ protéines). En revanche, le substrat a été très bien séparé du signal biologique (98%), signe d'un prétraitement efficace.

Tableau 14. Matrice de confusion illustrant les performances du CNN pour la classification des 3 composantes de référence (*C. albicans*, *S. haemolyticus* et le support).

		VALEURS PREDITES		
		<i>S. haemolyticus</i>	<i>C. albicans</i>	Support
VALEURS REELLES	<i>S. haemolyticus</i>	92.0 %	4.0 %	0.0 %
	<i>C. albicans</i>	4.0 %	90.0 %	2.0 %
	Support	0.0 %	2.0 %	98.0 %

L'approche d'apprentissage profond utilisée (auto-encodeur suivi d'un CNN pour l'évaluation du modèle) offre une segmentation et une classification solides des éléments du biofilm mixte à partir de spectres Raman complexes, permettant ainsi la mise en place d'un modèle reproductible et évolutif pour le suivi temporel des biofilms et l'analyse des traitements inhibiteurs.

Bien que l'intégration de l'intelligence artificielle dans le traitement des données Raman ait progressivement émergé ces dernières années (Maruthamuthu et al., 2020; Tang et al., 2024; Zou et al., 2024; Benahmed et al., 2025), notre recherche constitue, à notre connaissance, la première mise en œuvre de l'apprentissage profond dans l'analyse de l'inhibition d'un biofilm mixte complexe basée sur les données Raman.

La combinaison de la spectroscopie Raman et de l'intelligence artificielle s'avère hautement performante pour distinguer les signatures spectrales spécifiques aux composants du biofilm et leurs réponses au traitement, même dans un environnement complexe, hétérogène et sans

marquage préalable. Ces données illustrent l'intérêt grandissant pour l'application de l'intelligence artificielle à la spectroscopie Raman afin de développer des outils de diagnostic automatisés, rapides et précis. De surcroît, elles ouvrent la voie à des applications plus étendues dans le contrôle antimicrobien des biofilms et l'analyse des dispositifs médicaux contaminés, révolutionnant ainsi le diagnostic et la gestion des infections.

4.5. Effet sur la transition morphologique de *C. albicans*

L'impact du [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] sur la transition morphologique des blastospores de *C. albicans* vers la forme hyphale a été évalué à l'aide d'une concentration sub-inhibitrice du liquide ionique (3,91 µg/mL). La micrographie du groupe non traité (**photo 4A**) a montré que *C. albicans* a généré une structure dense et stratifiée d'hyphes allongés, cohérente avec les modèles de croissance constatés dans des conditions favorisant la formation d'hyphes.

En revanche, les cellules traitées avec [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] ont montré une diminution significative des hyphes, les blastospores étant la forme prédominante, bien qu'elles possèdent une biomasse moins conséquente par rapport au groupe non traité (**photo 4B**).

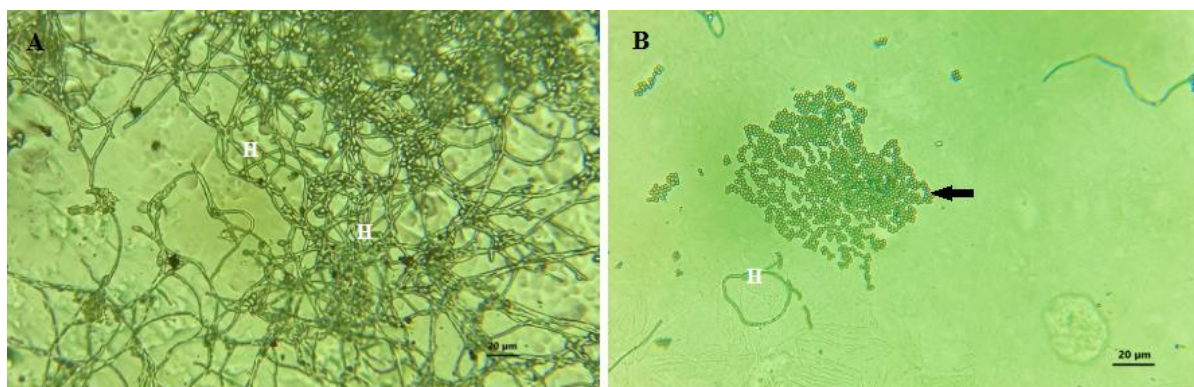


Photo 4. Micrographies MF d'une culture non traitée de *C. albicans* (A) et d'une culture traitée avec une concentration sub-inhibitrice de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] (B). H : hyphes. La flèche indique les cellules de levure (blastospores).

D'après Qian et al., (2020), le phénomène de transition des levures en hyphes est un facteur de virulence clé dans les infections invasives à *C. albicans*. En effet, ces structures filamenteuses favorisent l'invasion des tissus de l'hôte, en plus de leur rôle dans la formation et la persistance du biofilm.

L'inhibition efficace de la croissance des hyphes est également cruciale dans la perturbation des interactions inter-espèces, comme en témoigne la faible valeur de SMIC requise pour inhiber le

biofilm mixte après 48 heures. Suchodolski et al. (2017) ont démontré que certains liquides ioniques dérivés du (-) -menthol étaient également capables d'inhiber la filamentation de *C. albicans*.

4.6. Effet sur la structure et la morphologie du biofilm

L'observation au microscope électronique à balayage a mis en évidence l'impact du [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] sur la structure et la morphologie des cellules sessiles au sein du biofilm mixte *C. albicans*/*S. haemolyticus* (photo 5).

Les micrographies du biofilm témoin ont dévoilé une architecture hétérogène, dotée d'une structure complexe. *C. albicans* a principalement montré une morphologie hyphale caractérisée par des surfaces lisses et des segmentations clairement visibles, indiquant que les cellules étaient engagées dans un processus métabolique actif. Par ailleurs, la forme cocci de *S. haemolyticus* restait préservée, les cellules sessiles se regroupaient principalement à la surface du support et le long des hyphes de *C. albicans* (photo 5A).

En outre, au sein du biofilm mixte, *C. albicans* et *S. haemolyticus* étaient recouvertes d'une matrice exopolymérique dense, présentant une structure stratifiée, constituée de cellules sessiles et d'hyphes qui se superposent en forme d'échafaudage. L'architecture complexe de ce biofilm hétérogène met en évidence les interactions synergiques qui le définissent.

D'autre part, outre la réduction considérable de la matrice exopolymérique, le biofilm mature traité par le liquide ionique présentait des perturbations au niveau de sa structure. Les cellules sessiles de *C. albicans* ont effectivement montré des modifications morphologiques, incluant la déformation et le rétrécissement des hyphes (photo 5B). Ce qui suggère une réduction de l'activité métabolique et une viabilité cellulaire compromise suite au traitement par [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], soutenant ainsi les conclusions tirées du test du XTT.

De plus, la densité des cellules sessiles de *S. haemolyticus* a diminué, celles-ci semblent subir une déformation morphologique prononcée (photo 5C), en particulier des altérations de la paroi cellulaire caractérisées par leur lyse et leurs formes irrégulières. Ces observations ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], ce qui est cohérent avec les résultats selon lesquels les liquides ioniques à base de phosphonium à longue chaîne alkyle favorisent la perméabilité membranaire et la lyse bactérienne (Fernandes et al., 2022; Sharma et al., 2024). L'action antibiofilm de ce liquide ionique ne se limite donc pas à une réduction

de la biomasse ou de l'activité métabolique, mais s'accompagne d'une altération profonde de l'architecture tridimensionnelle, mettant en péril la stabilité et la virulence du consortium mixte.

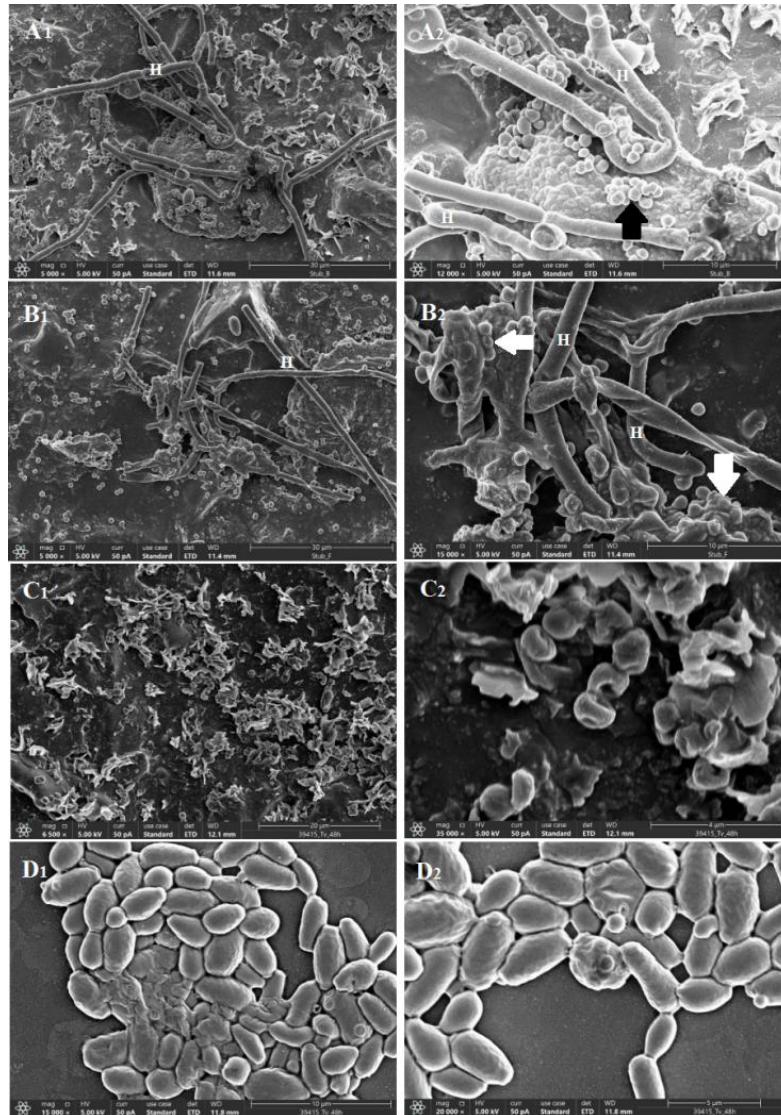


Photo 5. Micrographies MEB illustrant l'effet de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] sur le biofilm mixte *C. albicans*/*S. haemolyticus*. (A) : biofilm non traité (témoin négatif). (B et C) : biofilm traité en post-incubation. (D) : biofilm traité en pré-incubation. H : hyphes. Les flèches indiquent les cellules bactériennes.

De plus, l'utilisation de [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] pour le traitement des biofilms en pré-incubation a mis en évidence des blastospores ovales de *C. albicans*. Ces dernières se distinguent par leur taille variable et leur forme particulièrement allongée, présentant des vésicules (cloques) à leurs surfaces. Il convient de noter qu'aucune cellule de *S. haemolyticus* ni aucune forme hyphale de *C. albicans* n'ont été observées (**photo 5D**).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par la microscopie à fluorescence, démontrant que [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] inhibe non seulement la transition levure-hyphe de *C. albicans* isolée, mais empêche également le développement des hyphes au sein des biofilms mixtes.

L'évaluation de l'effet antibiofilm d'un composé requiert des méthodes d'imagerie aptes à dévoiler l'ultrastructure la plus détaillée. Dans ce cadre, la microscopie électronique à balayage conserve sa position privilégiée en raison de sa qualité d'image supérieure, sa haute résolution et sa capacité à préserver la structure réelle du biofilm (**Relucenti et al., 2021**).

La désorganisation structurelle étant un facteur clé de l'efficacité des agents antibiofilm, plusieurs études ont utilisé le microscope électronique à balayage (MEB) pour évaluer cet effet. Dans une étude sur *Escherichia coli*, des micrographies MEB ont révélé que les cellules exposées à l'ampicilline avaient une morphologie étirée en comparaison aux cellules non traitées (**Gomes & Mergulhão, 2017**).

Dans leur étude, Qian et al. (**2020**) ont démontré que de fortes concentrations de sanguinarine ont permis d'éradiquer le biofilm mixte de *C. albicans*/*S. aureus*, tout en induisant une transition morphologique des hyphes de *C. albicans*. De même, l'aurantofine, un composé aurifère à ligands mixtes, a montré une forte capacité à réduire les cellules de *S. aureus*. Néanmoins, son action contre les biofilms constitués de bactéries, ainsi que de *C. albicans* et *C. parapsilosis*, s'est avérée plus modérée, comme l'ont attesté les résultats obtenus au microscope électronique à balayage (**She et al., 2020**).

Quatrième partie

Conclusion générale

Les infections associées aux cathéters représentent une cause majeure de morbidité et de mortalité en milieu hospitalier. Les cathéters créent un environnement propice à l'adhésion des micro-organismes et à la formation de biofilms, des structures complexes qui renforcent la résistance aux antimicrobiens, entraînant ainsi l'échec thérapeutique (Liu et al., 2024).

Parmi les micro-organismes impliqués, *Candida albicans* occupe une place centrale en raison de son dimorphisme, sa production d'enzymes hydrolytiques et surtout, sa capacité à former des biofilms hautement structurés et résistants, souvent en association avec des bactéries, ce qui renforce la virulence et la persistance des infections (Kadosh, 2019; Mohammadi et al., 2021).

L'inefficacité des approches antimicrobiennes conventionnelles face à ces biofilms mixtes hautement hétérogènes, soulignent l'impératif de trouver de nouvelles substances à large spectre d'action, dotées d'effets antibactériens et antifongiques.

À la lumière de ces données, nous avons entrepris la présente recherche relative aux biofilms *C. albicans*-bactérie, associés à l'utilisation de cathéters au CHU de Tlemcen. L'objectif est d'analyser leur structure et leur potentiel virulent et, à terme, de contribuer à leur contrôle. Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

1- Concernant l'échantillonnage,

- Sur un total de 50 cathéters prélevés, 69,44 % ont révélé une culture microbienne positive dans le service d'hématologie clinique et 92,85 % dans le service de néphrologie-hémodialyse. Cela correspond à un taux d'altération global de 76 %.
- Bien qu'il y ait eu une prédominance notable d'altérations mixtes, combinant bactéries-bactéries ou bactéries-levures, les patients inclus dans cette étude ont été traités exclusivement avec des agents antibactériens.

2- L'infectivité des cathéters semble être fortement associée à divers facteurs de risque.

- La colonisation était la forme la plus fréquente (32%), suivie de près par la contamination (26%), tandis que l'infection a compté pour 18% des cas.
- Le type de cathéter paraît affecter l'infectivité ; la contamination était principalement liée aux cathéters veineux périphériques, tandis que l'infection et la colonisation était majoritairement associées aux cathéters urinaires.

- La durée d'implantation a également joué un rôle déterminant dans l'infectivité des cathéters; prédominance de la contamination (52,6%) si moins de 3 jours, de la colonisation (61,1%) et de l'infection (27,8%) si ≥ 3 jours.
- Chez les patients adultes, un taux de colonisation élevé (46,15%) a été observé, suivi de contamination (34,62%) et d'infection (19,23%).
- L'infection du cathéter était associée à une polymorbidité (diabète, hypertension, dyslipidémie, insuffisance rénale) et était liée à des altérations polymicrobiennes incluant des bactéries et des levures.

3- Concernant l'identification des micro-organismes isolés,

- Six souches fongiques du genre *Candida* ont été identifiées; dont cinq appartiennent à l'espèce *C. albicans* et une à *C. kefyr*. Parmi les isolats bactériens, une légère dominance de bactéries à Gram positif a été observée (56 %), avec *Staphylococcus haemolyticus* comme espèce la plus fréquemment isolée (17,5 %). Les bactéries à Gram négatif représentaient 44%, *Enterobacter cloacae* étant l'espèce majoritaire.
- Tous les cas d'altérations impliquant *C. albicans* étaient associées à des co-isolats bactériens. Parmi les cinq associations identifiées, trois correspondaient à des infections, dominées par les combinaisons *C. albicans*/*S. haemolyticus*, *C. albicans*/*S. haemolyticus*/*S. hominis* et *C. albicans*/*S. hominis*. Deux associations (40 %) correspondaient à des colonisations et incluaient des bacilles à Gram négatif, notamment les associations *C. albicans*/*P. testudinis*/*P. aeruginosa*/*K. pneumoniae* et *C. albicans*/*S. paucimobilis*.
- L'analyse de la diversité génétique par RAPD-PCR a mis en évidence une divergence génétique entre les isolats de *C. albicans* étudiés.

4- La détermination des CMI a montré l'efficacité des antifongiques utilisés contre *C. albicans*, cependant, une multirésistance aux antibactériens a été observée chez plusieurs bactéries.

- Toutes les souches de *C. albicans* étaient sensibles à l'AmB (CMI de 0,5 à 2 µg/mL). Pour la caspofungine, une susceptibilité intermédiaire (CMI = 0,5 µg/mL) des souches Ca1, Ca3, Ca4 et Ca5 et une sensibilité chez Ca2 (CMI = 0,25 µg/mL) ont été rapportés.

- Une résistance marquée des bactéries à Gram positif à la méticilline a été observée. Ainsi, un profil multirésistant a été notée chez *S. haemolyticus*, avec une sensibilité à la vancomycine, constituant une alternative thérapeutique.
- Quant aux bactéries à Gram négatif, une diversité des profils de résistance a été constatée. *P. aeruginosa*1 a présenté un phénotype multirésistant, avec une inefficacité total des β -lactamines. *K. pneumoniae*1 était sensible aux carbapénèmes, aux aminosides et aux fluorquinolones, mais résistante à certaines β -lactamines et à la combinaison Triméthoprim/ sulfaméthoxazole. En revanche, *P. testudinis*1 et *S. paucimobilis*2 ont présenté une sensibilité étendue à la majorité des antibiotiques testés.

5- Les interactions entre *C. albicans* et les bactéries au sein des biofilms étaient très hétérogènes, souche-dépendantes et temporellement variables.

- En termes de biomasse, toutes les souches testées étaient capables de former les biofilms, mono et multi-espèces.
- Pour les biofilms mixtes, les absorbances ont affiché des valeurs intermédiaires entre celles des biofilms mono-espèces de leur co-isolats constitutifs, bactériens et fongiques.
- À l'exception de *P. testudinis*1 et *P. aeruginosa*1 qui ont montré une diminution, la biomasse a augmenté de manière significative ($p < 0,01$) chez la plupart des biofilms mono-espèces après 48 heures d'incubation. Quant aux biofilms mixtes, une réduction de la biomasse a été enregistrée chez la majorité des souches bactériennes.
- En termes d'activité métabolique, *C. albicans* en biofilm mono-espèce a montré une augmentation significative ($p < 0,01$) entre 24 à 48 heures d'incubation. En revanche, les biofilms mixtes associant *C. albicans* aux bactéries co-isolées ont présenté des profils métaboliques hétérogènes, suggérant des interactions variables allant de l'antagonisme à la synergie.
- L'association *C. albicans*/*S. haemolyticus*5 présentait la plus forte capacité à former le biofilm après 24 heures d'incubation.

6- Les activités hydrolytiques des phospholipases (Plp) et des protéinases (Prt) ont été évaluées simultanément en conditions planctoniques et sessiles, en utilisant une méthode adaptée

- La formation de biofilm a exercé un effet hautement significatif ($p < 0,001$) sur l'activité hydrolytique fongique, avec des variations entre les souches.

- En mode planctonique, toutes les souches de *C. albicans* ont enregistré une activité Plp forte, laquelle s'est accentuée en mode sessile.
- L'activité Prt, a été détectée chez 83,33% des souches, avec une variabilité marquée entre les souches planctoniques ($P_z = 0,66 \pm 0,00$ à 1) et une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'activité en mode sessile.

7- Par ailleurs, l'efficacité de la méthode proposée a été corroborée par l'analyse par cartographie Raman ainsi que par des techniques microscopiques.

- La cartographie Raman a confirmé une distribution homogène du biofilm de *C. albicans* et du sérum sanguin sur la surface du support, validant le rôle du revêtement sérique dans la promotion de l'adhésion cellulaire et de la formation du biofilm.
- L'analyse microscopique, par MF et par MEB, a révélé que le biofilm recouvrait le disque de silicone sous une structure tridimensionnelle. Cette organisation, constituée d'un chevauchement d'hyphes et de blastospores au sein de la matrice extracellulaire, témoigne du développement et de la maturation du biofilm.

8- Trois liquides ioniques à base de phosphonium ont été évalués pour leur pouvoir antimicrobien, [P₆₆₆₁₄][Phosphinate], [P₆₆₆₁₄][Chlorure] et [P₆₆₆₁₄][Dicyanamide].

- Toutes les souches examinées ont montré une sensibilité aux trois liquides ioniques, à l'exception des bactéries Gram-négatives multi-résistantes, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. Le choix de l'anion a eu un impact considérable tant sur l'activité antimicrobienne que sur l'effet hémolytique du liquide ionique.
- [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a présenté la meilleure hémocompatibilité sur un intervalle de concentrations actives allant jusqu'à 2000 µg/mL, le qualifiant comme candidat prometteur pour les tests antibiofilm.
- [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a montré un effet maximal lorsqu'il a été administré pendant la phase d'adhésion (4h), avec une SCMI₅₀ de 15 µg/mL pour le biofilm mixte *C. albicans*/*S. haemolyticus*, suggérant son potentiel comme agent antiadhésif dans les revêtements de cathéter pour la gestion anticipée des biofilms.
- Contrairement à la vancomycine, inefficace contre le biofilm de *S. haemolyticus*, [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a démontré son efficacité en réduisant la résistance du biofilm.

9- L'effet antibiofilm du [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a été confirmé par des analyses spectroscopiques et microscopiques, mettant en lumière des altérations de la structure, de l'activité cellulaire, ainsi que de la morphologie des biofilms mixtes.

- L'analyse spectrale par cartographie Raman a révélé une sensibilité différentielle des espèces au traitement avec [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] dans le biofilm mixte.
- Au stade précoce de la formation du biofilm, *C. albicans* a présenté une sensibilité plus élevée au traitement inhibiteur que *S. haemolyticus*, avec une persistance de seulement 16 % du biofilm fongique, contre 24 % pour le biofilm bactérien.
- L'utilisation d'algorithmes d'apprentissage profond a prouvé son efficacité dans l'interprétation automatique des données spectrales et l'identification des composants du biofilm selon leurs signatures spectrales.
- [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] a inhibé la transition morphologique de *C. albicans* et l'expansion des hyphes, élément cruciale dans la perturbation des interactions inter-espèces.
- L'analyse par MEB a montré que le traitement réduisait la matrice exopolymérique, déformait et raccourcissait les hyphes fongiques, et entraîné la diminution et la lyse des cellules de *S. haemolyticus*.

Les conclusions tirées ouvrent des horizons prometteurs et appellent à des investigations plus approfondies à travers l'adoption des approches et perspectives suivantes :

- Application de la méthode proposée à l'étude des activités hydrolytiques d'autres espèces de *Candida* ainsi que de différentes bactéries.
- Une étude plus approfondie de l'effet antibiofilm du [P₆₆₆₁₄][Phosphinate] sur divers modèles de biofilms mixtes à travers une analyse génétique.
- Évaluation de la cytotoxicité de ce liquide ionique sur les cellules humaines et ce, en vue d'une meilleure évaluation de sa biocompatibilité.
- Développement de formulations cliniques adaptées (revêtements de cathéters, gels ou solutions de lavage) incorporant ce composé actif pour prévenir et traiter les infections associées aux dispositifs médicaux.

Cinquième partie

Références bibliographiques

- Ahmad, S., Khan, Z., Al-Sweih, N., Alfouzan, W., Joseph, L., & Asadzadeh, M. (2020). *Candida kefyr* in Kuwait: Prevalence, antifungal drug susceptibility and genotypic heterogeneity. *PLOS ONE*, 15(10), e0240426. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0240426>
- Al-Solaiman, Y., Estrada, E., & Allon, M. (2011). The Spectrum of Infections in Catheter-Dependent Hemodialysis Patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 6(9), 2247. <https://doi.org/10.2215/CJN.03900411>
- Alfano, R. R., Liu, C. H., Sah L., W., Zhu, H. R., Akins, D. L., Cleary, J., Prudente, R., & Cellmer, E. (1991). Human breast tissues studied by IR Fourier transform Raman spectroscopy. *Lasers in the Life Sciences*, 4(1), 23-28.
- Allison, D. L., Willems, H. M. E., Jayatilake, J. A. M. S., Bruno, V. M., Peters, B. M., & Shirtliff, M. E. (2016). *Candida* –Bacteria Interactions: Their Impact on Human Disease. *Microbiology Spectrum*, 4(3), 1-15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0030-2016>
- Allkja, J., Goeres, D. M., Azevedo, A. S., & Azevedo, N. F. (2023). Interactions of microorganisms within a urinary catheter polymicrobial biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering*, 120(1), 239-249. <https://doi.org/10.1002/BIT.28241>
- Alsaffar, M. J., Alsheddi, F. M., Humayun, T., Aldalbehi, F. Z., Alshammari, W. H. S., Aldecoa, Y. S., Burhan, N. M., El-Saed, A., Tawfeeq, S., & Alanazi, K. H. (2023). Impact of COVID-19 pandemic on the rates of central line associated bloodstream infection and catheter-associated urinary tract infection in an intensive care setting: National experience. *American journal of infection control*, 51(10), 1108-1113. <https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2023.03.016>
- Anandkumar, B., George, R. P., & Philip, J. (2020). Efficacy of imidazolium and piperidinium based ionic liquids on inhibiting biofilm formation on titanium and carbon steel surfaces. *Analytica chimica acta*, 1126, 38-51. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.05.072>
- Annavajhala, M. K., Gomez-Simmonds, A., & Uhlemann, A. C. (2019). Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Frontiers in Microbiology*, 10(1), 439849. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00044/BIBTEX>

- Aoki, S., Ito-Kuwa, S., Nakamura, Y., & Masuhara, T. (1990). Comparative Pathogenicity of a Wild-Type Strain and Respiratory Mutants of *Candida albicans* in Mice. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 273(3), 332-343. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80437-8](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80437-8)
- Atriwal, T., Azeem, K., Husain, F. M., & Hussain, A. (2021). Mechanistic Understanding of *Candida albicans* Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 12(4), 1-34. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638609>
- Bae, K., Zheng, W., Ma, Y., & Huang, Z. (2019). Real-time monitoring of pharmacokinetics of antibiotics in biofilms with Raman-tagged hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy. *Theranostics*, 9(5), 1348-1357. <https://doi.org/10.7150/thno.32043>
- Baker, C. A., Desrosiers, K., & Dolan, J. W. (2002). Propranolol Inhibits Hyphal Development in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3617-3620. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3617>
- Bal, H., & Altanlar, N. (2022). Determination of Genetic Diversity and Similarity among Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* strains by RAPD-PCR. *Turkish Journal of Science and Health*, 3(1), 62-69. <https://doi.org/10.51972/TFSD.1015796>
- Bandara, H. M. H. N., Panduwawala, C. P., & Samaranayake, L. P. (2019). Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. *Oral Diseases*, 25(2), 363-371. <https://doi.org/10.1111/ODI.12899>
- Barman, A., Gohain, D., Bora, U., & Tamuli, R. (2018). Phospholipases play multiple cellular roles including growth , stress tolerance , sexual development , and virulence in fungi. *Microbiological Research*, 209(7), 55-69. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.012>
- Bashir, M., Umar, A. B., & Bilyaminu, M. (2020). Determination of Bacteria associated with Urinary Catheters from Patients Suffering from Urinary Tract Infections. *Dr. Sulaiman Al Habib Medical Journal*, 2(1), 20. <https://doi.org/10.2991/dsahmj.k.200220.001>
- Becerra-Bolaños, Á., Domínguez-Díaz, Y., Trujillo-Morales, H., Cabrera-Doreste, S., Padrón-Ruiz, O., Valencia-Sola, L., Ojeda-Betancor, N., & Rodríguez-Pérez, A. (2025). Assessing infection related to short-term central venous catheters in the perioperative setting. *Scientific Reports*, 15(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/S41598-025-85836>

- Belhocine, M., Bourzami, R., Dergal, F., Oukel, L., Ammari, A., Benladghem, Z., Haouzi, A., & Bouktab, S. (2023). Physical, chemical and antibacterial properties of 1-methyl-3-(4-vinylbenzyl) imidazol-3-ium chloride ionic liquid: Experimental and ab-initio analysis. *Journal of Molecular Structure*, 1271, 133955. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133955>
- Benahmed, A. (2025). *Étude des infections polymicrobiennes au centre hospitalo- universitaire de Tlemcen*. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid.
- Benahmed, A., Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Tani, Z. Z. B. A.-K., Aissaoui, M., Kendil, W., Merabet, D. H., Lakhal, H., & Boucherit, K. (2023). In vitro evaluation of biofilm formation by *Candida parapsilosis* and *Enterobacter cloacae*. Scanning electron microscopy and efficacy of antimicrobial combinations study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 107(1), 116003. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2023.116003>
- Benahmed, A., Seghir, A., Dergal, F., Chiali, A., Boucherit-Otmani, Z., & Ziani-Chérif, C. (2025). Study of interaction in dual-species biofilm of *Candida glabrata* and *Klebsiella pneumoniae* co-isolated from peripheral venous catheter using Raman characterization mapping and machine learning algorithms. *Microbial Pathogenesis*, 199(1). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107280>
- Benladghem, Z., Seddiki, S. M. L., Dergal, F., Mahdad, Y. M., Aissaoui, M., & Choukchou-Braham, N. (2022). Biofouling of reverse osmosis membranes: assessment by surface-enhanced Raman spectroscopy and microscopic imaging. *Biofouling*, 38(8), 852-864. <https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2139610>
- Bergeron, A. C., Seman, B. G., Hammond, J. H., Archambault, L. S., Hogan, D. A., & Wheeler, R. T. (2017). *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interact to enhance virulence of mucosal infection in transparent zebrafish. *Infection and Immunity*, 85(11), 11-23. https://doi.org/10.1128/IAI.0047517/SUPPL_FILE/ZII999092198SM5.MOV
- Blackman, L. D., Qu, Y., Cass, P., & Locock, K. E. S. (2021). Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents. *Chemical Society Reviews*, 50(3), 1587-1616. <https://doi.org/10.1039/D0CS00986E>

- Bodelón, G., Montes-García, V., Pérez-Juste, J., & Pastoriza-Santos, I. (2018). Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy for label-free analysis of *P. aeruginosa* Quorum Sensing. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8(5), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00143>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.MYCMED.2011.07.006>
- Bouza, E., Burillo, A., & Muñoz, P. (2002). Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(5), 265-274. <https://doi.org/10.1046/J.1469-0691.2002.00385.X>
- Bras, G., Satala, D., Juszczak, M., Kulig, K., Wronowska, E., Bednarek, A., Zawrotniak, M., Rapala-Kozik, M., & Karkowska-Kuleta, J. (2024). Secreted Aspartic Proteinases: Key Factors in *Candida* Infections and Host-Pathogen Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9), 54-70. <https://doi.org/10.3390/ijms25094775>
- 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. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.1987.00370050069012>
- Busch, J. D., Vens, M., Mahler, C., Herrmann, J., Adam, G., & Ittrich, H. (2017). Complication Rates Observed in Silicone and Polyurethane Catheters of Totally Implanted Central Venous Access Devices Implanted in the Upper Arm. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 28(8), 1177-1183. <https://doi.org/10.1016/J.JVIR.2017.04.024>
- Cai, D., Neyer, A., Kuckuk, R., & Heise, H. M. (2010). Raman, mid-infrared, near-infrared and ultraviolet–visible spectroscopy of PDMS silicone rubber for characterization of polymer optical waveguide materials. *Journal of Molecular Structure*, 976(1-3), 274-281. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2010.03.054>
- Carolus, H., Van Dyck, K., & Van Dijck, P. (2019). *Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome. *Frontiers in Microbiology*, 10(4). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02162>

- Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2008). In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nature Protocols*, 3(12), 1909-1924. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.192>
- Cleaver, L., & Garnett, J. A. (2023). How to study biofilms: technological advancements in clinical biofilm research. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(4), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1335389>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition M07-A9*. Clinical Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility testing of yeast. *Clinical Laboratory Standards Institute*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100*. Clinical Laboratory Standards Institute.
- Costa, C. R., Jesuino, R. S. A., de Aquino Lemos, J., de Fátima Lisboa Fernandes, O., e Souza, L. K. H., Passos, X. S., & do Rosário Rodrigues Silva, M. (2010). Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. *Mycopathologia*, 169(2), 91-98. <https://doi.org/10.1007/S11046-009-9232-6>
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95. <https://doi.org/10.1038/SCIENTIFICAMERICAN0178-86>
- Croitoru, C., & Roata, I. C. (2020). Ionic liquids as antifungal agents for wood preservation. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184289>
- Cruz, C., & Ciach, A. (2021). Phase Transitions and Electrochemical Properties of Ionic Liquids and Ionic Liquid-Solvent Mixtures. *Molecules*, 26(12), 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules26123668>
- Darlane, C., Cornu, J. N., Esteve, E., Cordel, H., Egrot, C., Traxer, O., & Haab, F. (2015). Fungal infections and ureteral material: How to manage? *Progres en Urologie*, 25(6), 306-311. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2015.01.015>

- Di Martino, P. (2018). Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiology*, 4(2), 274-288. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.2.274>
- Diagne, S., Mbengue, M., Ouchen, H., Keita, N., Ba, B., Faye, M., Lemrabott, A. T., Ka, E. H. F., & Niang, A. (2022). Infections liées aux cathéters tunnésés d'hémodialyse : étude rétrospective aux centres publics de Dakar de 2017 à 2020. *Néphrologie & Thérapeutique*, 18(5), 442. <https://doi.org/10.1016/J.NEPHRO.2022.07.111>
- Doit, C., Biran, V., & Aujard, Y. (2015). Infections nosocomiales en néonatalogie. *Infections néonatales*, 1(27), 91-106. <https://doi.org/10.1016/b978-2-294-74135-7.00009-7>
- Dongol, Y., Dhananjaya, B. L., Shrestha, R. K., & Aryal, G. (2014). Pharmacological and Immunological Properties of Wasp Venom. *Pharmacology and Therapeutics*, 1(4), 44-58. <https://doi.org/10.5772/57227>
- Du, Q., Ren, B., Zhou, X., Zhang, L., & Xu, X. (2022). Cross-kingdom interaction between *Candida albicans* and oral bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13(1), 911623. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.911623/XML>
- Dühring, S., & Schuster, S. (2024). Studying mixed-species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* using evolutionary game theory. *PLoS ONE*, 19(3), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297307>
- Dutton, L. C., Jenkinson, H. F., Lamont, R. J., & Nobbs, A. H. (2016). Role of *Candida albicans* secreted aspartyl protease Sap9 in interkingdom biofilm formation. *1(1)*, 1-12. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw005>
- Egorova, K. S., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017). Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chemical Reviews*, 117(10), 7132-7189. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>
- El-houssaini, H. H., Elnabawy, O. M., Nasser, H. A., & Elkhatib, W. F. (2019). Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. *Microbial Pathogenesis*. 3(128), 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.028>

- Eltwisy, H. O., Twisy, H. O., Hafez, M. H. R., Sayed, I. M., & El-Mokhtar, M. A. (2022). Clinical Infections, Antibiotic Resistance, and Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. *Microorganisms*, 10(6), 1130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061130>
- Ermolaev, V. V., Arkhipova, D. M., Miluykov, V. A., Lyubina, A. P., Amerhanova, S. K., Kulik, N. V., Voloshina, A. D., & Ananikov, V. P. (2022). Sterically hindered quaternary phosphonium salts (Qpss): Antimicrobial activity and hemolytic and cytotoxic properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 86. <https://doi.org/10.3390/ijms23010086>
- Erum, R., Samad, F., Khan, A., & Kazmi, S. U. (2020). A comparative study on production of extracellular hydrolytic enzymes of *Candida* species isolated from patients with surgical site infection and from healthy individuals and their co-relation with antifungal drug resistance. *BMC Microbiology*, 20(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/S12866-020-02045-6/FIGURES/3>
- Fakih, M. G., Bufalino, A., Sturm, L., Huang, R. H., Ottenbacher, A., Saake, K., Winegar, A., Fogel, R., & Cacchione, J. (2022). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, central-line-associated bloodstream infection (CLABSI), and catheter-associated urinary tract infection (CAUTI): The urgent need to refocus on hardwiring prevention efforts. *Infection control and hospital epidemiology*, 43(1), 26-31. <https://doi.org/10.1017/ICE.2021.70>
- Farag, M. R., & Alagawany, M. (2018). Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 279, 73-83. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.11.007>
- Faria, R. A., & Bogel-Lukasik, E. (2015). Solubilities of pharmaceutical and bioactive compounds in trihexyl(tetradecyl)phosphonium chloride ionic liquid. *Fluid Phase Equilibria*, 397, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.03.053>
- Fernandes, L., Fortes, B. N., Lincopan, N., & Ishida, K. (2020). Caspofungin and Polymyxin B Reduce the Cell Viability and Total Biomass of Mixed Biofilms of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, 11, 573263. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573263>

- Fernandes, M. M., Carvalho, E. O., Correia, D. M., Esperança, J. M. S. S., Padrão, J., Ivanova, K., Hoyo, J., Tzanov, T., & Lanceros-Mendez, S. (2022). Ionic Liquids as Biocompatible Antibacterial Agents: A Case Study on Structure-Related Bioactivity on *Escherichia coli*. *ACS Applied Bio Materials*, 5(11), 5181-5189. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00615>
- Fernandes, R. A., Monteiro, D. R., Arias, L. S., Fernandes, G. L., Carlos, A., Delbem, B., & Barros, D. (2016). Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*, 7014, 329-338. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1144053>
- Filho, A. M. S., Ventura, C. G., Criado, P. R., Del Negro, G. B., Freitas, R. S., Luiz, O. C., Giudice, M. C., Neto, E. D., & Benard, G. (2017). Hemodialysis and Kidney Transplantation as Predisposing Conditions to Onychomycosis. *Nephron*, 137(1), 38-46. <https://doi.org/10.1159/000475674>
- Fourie, R., Ells, R., Swart, C. W., Sebolai, O. M., Albertyn, J., & Pohl, C. H. (2016). *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interaction, with focus on the role of eicosanoids. *Frontiers in Physiology*, 7(2), 177869. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2016.00064/XML>
- Fu, J., Zhang, Y., Lin, S., Zhang, W., Shu, G., Lin, J., Li, H., Xu, F., Tang, H., Peng, G., Zhao, L., Chen, S., & Fu, H. (2021). Strategies for Interfering With Bacterial Early Stage Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 675843. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.675843/BIBTEX>
- Fukuoka, K., Furuichi, M., Ito, K., Morikawa, Y., Watanabe, I., Shimizu, N., & Horikoshi, Y. (2018). Longer duration of urinary catheterization increases catheter-associated urinary tract infection in PICU. *Pediatric Critical Care Medicine*, 19(10), E547-E550. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000001628>
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 122-143. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.122-143.2000>
- Gharaghani, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Hardani, A. K., & Zarei Mahmoudabadi, A. (2021). Pediatric candiduria, epidemiology, genotype distribution and virulence factors of *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis*, 160(1), 105173. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2021.105173>

- Girndt, M. (2020). Hygiene in nephrology. *Nephrologie*, 15(5), 321-331. <https://doi.org/10.1007/S11560-020-00447-1/TABLES/2>
- Gomes, L. C., & Mergulhão, F. J. (2017). SEM analysis of surface impact on biofilm antibiotic treatment. *Scanning*, 2017, 2960194. <https://doi.org/10.1155/2017/2960194>
- Gominet, M., Compain, F., Beloin, C., & Lebeaux, D. (2017). Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 125(4), 365-375. <https://doi.org/10.1111/APM.12665>
- Gourari-Bouzouina, K. (2024). *Etude des altérations mixtes Candida sp./ bactéries Gram positives chez les enfants atteints de mucoviscidose dans l'ouest Algérien*. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid.
- Gourari-Bouzouina, K., Boucherit-Otmani, Z., Seghir, A., Baba Ahmed-Kazi Tani, Z. Z., Bendoukha, I., Benahmed, A., Aissaoui, M., & Boucherit, K. (2024). Evaluation of mixed biofilm production by *Candida spp.* and *Staphylococcus aureus* strains co-isolated from cystic fibrosis patients in northwest Algeria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 109(3), 116321. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2024.116321>
- Gram, H. C. J. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin*, 10(15), 234-235. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1209285>
- Guo, H., Zhang, L., He, H., & Wang, L. (2024). Risk factors for catheter-associated bloodstream infection in hemodialysis patients: A meta-analysis. *PLOS ONE*, 19(3), e0299715. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0299715>
- Hammond, S. M. (1977). Biological Activity of Polyene Antibiotics. *Progress in Medicinal Chemistry*, 14(3), 105-179. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70148-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70148-6)
- Han, M., Dang, Y., & Han, J. (2024). Denoising and Baseline Correction Methods for Raman Spectroscopy Based on Convolutional Autoencoder: A Unified Solution. *Sensors*, 24(10), 3161. <https://doi.org/10.3390/S24103161>

- Hanlon, E. B., Manoharan, R., Koo, T. W., Shafer, K. E., Motz, J. T., Fitzmaurice, M., Kramer, J. R., Itzkan, I., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (2000). Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine & Biology*, 45(2). <https://doi.org/10.1088/0031-9155/45/2/201>
- Hartman, R. E., Freyer, C. W., Athans, V., McCurdy, S. R., & Frey, N. V. (2023). Central line-associated *Rhizobium radiobacter* bloodstream infection in two allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 14(3), 1-16. <https://doi.org/10.1177/10781552231161826>
- Hattori, T., Kubo, A., Oguri, K., Nakano, H., & Miyazaki, H. T. (2012). Femtosecond laser-excited two-photon fluorescence microscopy of surface plasmon polariton. *Japanese Journal of Applied Physics*, 51(4), 04DG03. <https://doi.org/10.1143/JJAP.51.04DG03/XML>
- Ho, C. S., Jean, N., Hogan, C. A., Blackmon, L., Jeffrey, S. S., Holodniy, M., Banaei, N., Saleh, A. A. E., Ermon, S., & Dionne, J. (2019). Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning. *Nature Communications*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12898-9>
- Hogan, C. A., Watz, N., Budvytiene, I., & Banaei, N. (2019). Rapid antimicrobial susceptibility testing by VITEK®2 directly from blood cultures in patients with Gram-negative rod bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 94(2), 116-121. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2019.01.001>
- Huang, L., Li, S., Jiang, R., Lei, S., Wu, J., Huang, L., & Zhu, M. (2024). Glucocorticoid use and parenteral nutrition are risk factors for catheter-related *Candida* bloodstream infection: A retrospective study. *Asian Biomedicine*, 18(3), 109-115. <https://doi.org/10.2478/ABM-2024-0016>
- Isigi, S. S., Parsa, A. D., Alasqah, I., Mahmud, I., & Kabir, R. (2023). Predisposing Factors of Nosocomial Infections in Hospitalized Patients in the United Kingdom: Systematic Review. *JMIR public health and surveillance*, 9(1). <https://doi.org/10.2196/43743>
- Jarvis, R. M., & Goodacre, R. (2008). Characterisation and identification of bacteria using SERS. *Chemical Society Reviews*, 37(5), 931-936. <https://doi.org/10.1039/b705973f>

- Jiang, C., Li, Z., Zhang, L., Tian, Y., Dong, D., & Peng, Y. (2016). Significance of hyphae formation in virulence of *Candida tropicalis* and transcriptomic analysis of hyphal cells. *Microbiological Research*, 192, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.003>
- Jung, P., Mischo, C. E., Gunaratnam, G., Spengler, C., Becker, S. L., Hube, B., Jacobs, K., & Bischoff, M. (2020). *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence*, 11(1), 1453-1465. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1836902>
- Kadosh, D. (2019). Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 52(3), 27-34. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2019.04.005>
- Kadry, A. A., El-ganiny, A. M., El-baz, A. M., & El-baz, A. M. (2018). Relationship between Sap prevalence and biofilm formation among resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *African Health Sciences*, 18(4), 1166-1174.
- Kamath, P., Paul, S., Valdes, J., Gil, J., Solis, M., Higa, A., & Davis, S. C. (2024). In vitro analysis of interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* treated with silver sulfadiazine in wound infections. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 6(3), 1-5. <https://doi.org/10.1093/JACAMR/DLAE075>
- Karbysheva, S., Di Luca, M., Butini, M. E., Winkler, T., Schütz, M., & Trampuz, A. (2020). Comparison of sonication with chemical biofilm dislodgement methods using chelating and reducing agents: Implications for the microbiological diagnosis of implant associated infection. *PLoS ONE*, 15(4), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231389>
- Keleştemur, S., & Çulha, M. (2017). Understanding and Discrimination of Biofilms of Clinically Relevant Microorganisms Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Applied Spectroscopy*, 71(6), 1180-1188. <https://doi.org/10.1177/0003702816670916>
- Kendil, W., Dergal, F., Tefiani, I., Mahdad, Y. M., Benladghem, Z., Ziani-Cherif, C., & Seddiki, S. M. L. (2024). Improvement of a low-cost protocol for a simultaneous comparative evaluation of hydrolytic activity between sessile and planktonic cells: *Candida albicans* as a study model. *Biofouling*, 40(7), 431-445. <https://doi.org/10.1080/08927014.2024.2376637>

- Kerek, Á., Szabó, Á., & Jerzsele, Á. (2024). Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Pasteurella multocida* Isolates from Clinical Cases of Waterfowl in Hungary between 2022 and 2023. *Veterinary Sciences*, 11(5), 194. <https://doi.org/10.3390/VETSCI11050194/S1>
- Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 478-482. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>
- khelissa, S. O., Jama, C., Abdallah, M., Boukherroub, R., Faille, C., & Chihib, N. E. (2017). Effect of incubation duration, growth temperature, and abiotic surface type on cell surface properties, adhesion and pathogenicity of biofilm-detached *Staphylococcus aureus* cells. *AMB Express*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0492-0>
- Kiche, R., Bourzami, R., Ouksel, L., Belhocine, M., Boudjema, L., & Dergal, F. (2025). A comprehensive exploration of structural, vibrational, optical, thermal and corrosion inhibition properties of trihexyl(tetradecyl)phosphonium dicyanamide ionic liquid: Experimental and theoretical methods. *Journal of Molecular Liquids*, 417(1), 126659. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2024.126659>
- Kim, J., & Chin, Y. W. (2023). Antimicrobial Agent against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Monitored Using Raman Spectroscopy. *Pharmaceutics*, 15(7), 1-19. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071937>
- Kneipp, J., Kneipp, H., McLaughlin, M., Brown, D., & Kneipp, K. (2006). In vivo molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates. *Nano Letters*, 6(10), 2225-2231. <https://doi.org/10.1021/NL061517X>
- Knepper, B. C., Wallace, K., & Young, H. (2020). CAUTI and CLABSI in Hospitalized COVID-19 Patients. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(1), S178-S178. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa439.405>
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology* 2017 15:12, 15(12), 740-755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>

- Kriem, L. S., Wright, K., Ccahuana-Vasquez, R. A., & Rupp, S. (2021). Mapping of a Subgingival Dual-Species Biofilm Model Using Confocal Raman Microscopy. *Frontiers in Microbiology*, 12(4), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.729720>
- Kulshrestha, A., & Gupta, P. (2025). Control of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* dual species interkingdom biofilm development via SAP5 inhibition. *Future Microbiology*, 20(12):779-791. <https://doi.org/10.1080/17460913.2025.2539011>
- Kumar, R., Saraswat, D., Tati, S., & Edgerton, M. (2015). Novel Aggregation Properties of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase Sap6 Mediate Virulence in Oral Candidiasis. *Infection and Immunity*, 83(7), 2614-2626. <https://doi.org/10.1128/IAI.00282-15>
- Kumar, R., Shukla, P. K., & Eastwood, D. C. (2010). Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. *Fungal Biology*, 114(2-3), 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.12.003>
- Lade, H., & Kim, J. S. (2023). Molecular Determinants of β -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): An Updated Review. *Antibiotics*, 12(9), 1362. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12091362>
- Lee, K. H., Park, S. J., Choi, S. J., Uh, Y., Park, J. Y., & Han, K. H. (2017). The influence of urinary catheter materials on forming biofilms of microorganisms. *Journal of Bacteriology and Virology*, 47(1), 32-40. <https://doi.org/10.4167/jbv.2017.47.1.32>
- Letica-Kriegel, A. S., Salmasian, H., Vawdrey, D. K., Youngerman, B. E., Green, R. A., Furuya, E. Y., Calfee, D. P., & Perotte, R. (2019). Identifying the risk factors for catheter-associated urinary tract infections: A large cross-sectional study of six hospitals. *BMJ Open*, 9(2), e022137. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-022137>
- Li, Q., Hu, Y., & Zhang, B. (2022). Phosphonium-based ionic liquids as antifungal agents for conservation of heritage sandstone. *RSC Advances*, 12(4), 1922-1931. <https://doi.org/10.1039/d1ra09169g>
- Li, X., Liu, H., Lin, J., Bai, J., & Ding, J. (2001). Study of Serum Fluorescence and Raman Spectra for Diagnosis of Cancer. *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine*, 44(3), 124. https://doi.org/10.1364/ECBO.2001.4432_124

- Li, Y., Petrova, O. E., Su, S., Lau, G. W., Panmanee, W., Na, R., Hassett, D. J., Davies, D. G., & Sauer, K. (2014). BdlA, DipA and Induced Dispersion Contribute to Acute Virulence and Chronic Persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens*, 10(6), e1004168. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004168>
- Liu, L., Xue, B., Niu, M., Chen, L., Yang, Y., Xu, B., & Zhang, L. (2024). Recent advances in anti-infective catheters for preventing catheters associated urinary tract infections. *Chemical Engineering Journal*, 499, 156333. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2024.156333>
- Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89-121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
- Magnan, C., Morsli, M., Salipante, F., Thiry, B., Attar, J. El, Maio, M. Di, Safaria, M., Tran, T. A., Dunyach-Remy, C., Ory, J., Richaud-Morel, B., Sotto, A., Pantel, A., & Lavigne, J. P. (2024). Emergence of multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in neonatal intensive care unit in Southern France, a genomic study. *Emerging Microbes and Infections*, 13(1), 1-14. <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2353291>
- Mahmood, A., Almasrouri, M. A. A., & Hussain, A. (2019). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and use of tunneled hemodialysis catheters. *Qatar Medical Journal*, 2019(2), 86. <https://doi.org/10.5339/QMJ.2019.QCCC.86>
- Małek, M., Paluchowska, P., Bogusz, B., & Budak, A. (2017). Caracterización molecular de aislamientos de *Candida* de pacientes en cuidados intensivos en Cracovia, Polonia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.03.005>
- Marincu, I., Bratosin, F., Bogdan, I., Dumitru, C., Stoica, C. N., Csep, A. N., Mederle, N., Fericean, R. M., Mederle, A. O., Prathipati, R., Chicin, G. N., Mavrea, A., Barata, P. I., & Bota, A. V. (2023). Concurrent *Sphingomonas paucimobilis* and *Mycobacterium tuberculosis* Meningitis in an Immunocompromised Patient: A Rare Case Report and Comprehensive Review of Literature. *Medicina*, 59(4), 687. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA59040687>
- Marol, S., & Yücesoy, M. (2008). Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses*, 51(1), 40-49. <https://doi.org/10.1111/J.14390507.2007.01435>

- Maruthamuthu, M. K., Raffiee, A. H., De Oliveira, D. M., Ardekani, A. M., & Verma, M. S. (2020). Raman spectra-based deep learning: A tool to identify microbial contamination. *MicrobiologyOpen*, 9(11), 1-8. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1122>
- Mashaly, G. E. S., & Zeid, M. S. (2022). *Candida albicans* Genotyping and Relationship of Virulence Factors with Fluconazole Tolerance in Infected Pediatric Patients. *Infection and Drug Resistance*, 15, 2035. <https://doi.org/10.2147/IDR.S344998>
- Mekonnen, H., Seid, A., Fenta, G. M., & Gebrecherkos, T. (2021). Antimicrobial resistance profiles and associated factors of *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection among patients admitted at Dessie comprehensive specialized Hospital, NorthEast Ethiopia. A cross-sectional study. *PLoS ONE*, 16(11), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257272>
- Metelytsia, L. O., Hodyna, D. M., Semenyuta, I. V., Kovalishyn, V. V., Rogalsky, S. P., Derevianko, Y. K., Brovarets, V. S., & Tetko, I. V. (2022). Theoretical and Experimental Studies of Phosphonium Ionic Liquids as Potential Antibacterials of MDR *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040491>
- Miller, L. M., Clark, E., Dipchand, C., Hiremath, S., Kappel, J., Kiaii, M., Lok, C., Luscombe, R., Moist, L., Oliver, M., & MacRae, J. (2016). Hemodialysis tunneled catheter-related infections. *Canadian Journal of Kidney Health and Disease*, 3(1). <https://doi.org/10.1177/2054358116669129>
- Mohammadi, F., Safasepehr, H., Hashemipour, S., & Mirzadeh, M. (2021). Evaluation of proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* strains isolated from the mouth of patients with controlled and uncontrolled diabetes mellitus in Qazvin province: Short Communication. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 28(4), 402-407. <https://doi.org/10.32592/JBIRJANDUNIVMEDSCI.2021.28.4.108>
- Mora, F., Ballaz, S., Castillo, I., Ramirez, H., & Fernández-Moreira, E. (2025). In vitro Tolerance of *Staphylococcus haemolyticus* and *Candida albicans* Biofilms to Dalbavancin and Anidulafungin. *Anti-Infective Agents*, 23(4), 54-58. <https://doi.org/10.2174/0122113525326372240828105906>

- Moskovicz, V., Ben-El, R., Horev, G., & Mizrahi, B. (2021). Skin microbiota dynamics following *B. subtilis* formulation challenge: an in vivo study in mice. *BMC Microbiology*, 21(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02295-Y/FIGURES/4>
- Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., Höfs, S., Gratacap, R. L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Förster, T. M., Hebecker, B., Kasper, L., Vizcay, G., Iancu, S. I., Kichik, N., Naglik, J. R. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, 532(7597), 64-68. <https://doi.org/10.1038/NATURE17625>
- Mukherjee, P. K., & Chandra, J. (2004). *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*, 7(4-5), 301-309. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2004.09.002>
- Nag, M., & Lahiri, D. (2021). Analytical Methodologies for Biofilm Research. *Springer Protocols Handbooks*. <https://www.springer.com/gp/book/9781071613771>
- Naglik, J. R., Gaffen, S. L., & Hube, B. (2019). Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Current Opinion in Microbiology*, 52(1), 100. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2019.06.002>
- Nailis, H., Kucharikov, S., Řičicová, M., Van Dijck, P., Deforce, D., Nelis, H., & Coenye, T. (2010). Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: Identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiology*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-114/TABLES/2>
- Napolitani, M., Troiano, G., Bedogni, C., Messina, G., & Nante, N. (2019). *Kocuria kristinae*: An emerging pathogen in medical practice. *Journal of Medical Microbiology*, 68(11), 1596-1603. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001023>
- Neji, M., Hajji Najjar, M., Ben Hamida, F., Barbouch, S., & Abderrahim, E. (2021). Infection liée aux cathéters d'hémodialyse : étude descriptive d'une série de 160 patients. *Néphrologie & Thérapeutique*, 17(5), 360. <https://doi.org/10.1016/J.NEPHRO.2021.07.026>

- Nirmala, B., Manhas, P. L., Jadli, M., Sharma, R., Manhas, H., & Omar, B. J. (2024). A novel dual-staining method for cost-effective visualization and differentiation of microbial biofilms. *Scientific Reports*, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/S41598-024-80644-3>;SUBJMETA=1647,326,631;KWRD=BIOLOGICAL+TECHNIQUES,MICROBIOLOGY
- Noverr, M. C., & Huffnagle, G. B. (2004). Regulation of *Candida albicans* Morphogenesis by Fatty Acid Metabolites. *Infection and Immunity*, 72(11), 6206-6210. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6206>
- Nunes, B., Cagide, F., Borges, F., & Simões, M. (2024). Antimicrobial activity and cytotoxicity of novel quaternary ammonium and phosphonium salts. *Journal of Molecular Liquids*, 401(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124616>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Oliveira, W. F., Silva, P. M. S., Silva, R. C. S., Silva, G. M. M., Machado, G., Coelho, L. C. B. B., & Correia, M. T. S. (2018). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infection*, 98(2), 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>
- OMS (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Organisation Mondiale de la Santé. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>
- OMS (2022). *Rapport mondial sur la lutte anti-infectieuse : résumé d'orientation*. Organisation Mondiale de la santé. <https://www.who.int/fr/publications/i/item/global-report-on-infection-prevention-and-control--executive-summary>
- OMS (2020). *Protocole d'enquête sur la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) – Les X premiers cas et contacts*. Organisation Mondiale de la santé. <https://iris.who.int/handle/10665/332166>
- Otto, M. (2018). Staphylococcal Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 1-17. <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0023-2018>

- Özalp Gerçek, G., Yardımcı, F., & Aydınok, Y. (2019). Central Line–Associated Bloodstream Infections in Children With Hematologic and Oncologic Diseases: First Prevalence Results From a University Hospital. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, 36(5), 327-336. <https://doi.org/10.1177/1043454219844226>
- Pahlow, S., Meisel, S., Cialla-May, D., Weber, K., Rösch, P., & Popp, J. (2015). Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89, 105-120. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.04.006>
- Pendleton, J. N., & Gilmore, B. F. (2015). The antimicrobial potential of ionic liquids: A source of chemical diversity for infection and biofilm control. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(2), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.02.016>
- Pereira-Ribeiro, P. M. A., Cabral-Oliveira, G. G., Olivella, J. G. B., Motta, I. C. de M., Ribeiro, F. C., Nogueira, B. A., Santos, L. S. dos, Sued-Karam, B. R., & Mattos-Guaraldi, A. L. (2022). Biofilm formation, multidrug-resistance and clinical infections of *Staphylococcus haemolyticus*: A brief review. *Research, Society and Development*, 11(11), e228111133605. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i11.33605>
- Pereira-Ribeiro, P. M. A., Sued-Karam, B. R., Faria, Y. V., Nogueira, B. A., Colodette, S. S., Fracalanza, S. E. L., Duarte, J. L. M. B., Júnior, R. H., & Mattos-Guaraldi, A. L. (2019). Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus*. *Future Microbiology*, 14(9), 789-799. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0230>
- Pereira, R., dos Santos Fontenelle, R. O., de Brito, E. H. S., & de Moraes, S. M. (2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11-22. <https://doi.org/10.1111/JAM.14949>
- Phuengmaung, P., Chongrak, C., Saisorn, W., Makjaroen, J., Singkham-in, U., & Leelahavanichkul, A. (2024). The Coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans* Enhanced Biofilm Thickness but Induced Less Severe Neutrophil Responses and Less Inflammation in Pneumonia Mice Than *K. pneumoniae* Alone. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12157. <https://doi.org/10.3390/IJMS252212157>

- Pichardo-Molina, J. L., Frausto-Reyes, C., Barbosa-García, O., Huerta-Franco, R., González-Trujillo, J. L., Ramírez-Alvarado, C. A., Gutiérrez-Juárez, G., & Medina-Gutiérrez, C. (2007). Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers in Medical Science*, 22(4), 229-236. <https://doi.org/10.1007/S10103-006-0432-8/METRICS>
- Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley, F. L., Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols*, 3(9), 1494-1500. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.141>
- Pierce, C. G., Vila, T., Romo, J. A., Montelongo-Jauregui, D., Wall, G., Ramasubramanian, A., & Lopez-Ribot, J. L. (2017). The *Candida albicans* biofilm matrix: Composition, structure and function. *Journal of Fungi*, 3(14), 1-8. <https://doi.org/10.3390/jof3010014>
- Pietrocola, G., Campoccia, D., Motta, C., Montanaro, L., Arciola, C. R., & Speziale, P. (2022). Colonization and Infection of Indwelling Medical Devices by *Staphylococcus aureus* with an Emphasis on Orthopedic Implants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5958. <https://doi.org/10.3390/IJMS23115958>
- Pitiriga, V., Bakalis, J., Kampos, E., Kanellopoulos, P., Saroglou, G., & Tsakris, A. (2022). Duration of central venous catheter placement and central line-associated bloodstream infections after the adoption of prevention bundles: a two-year retrospective study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 11(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/S13756-022-01131-W/TABLES/4>
- Podstawka, E., Ozaki, Y., & Proniewicz, L. M. (2004). Part I: Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of amino acids and their homodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Applied Spectroscopy*, 58(5), 570-580. <https://doi.org/10.1366/000370204774103408>
- Pohl, C. H. (2022). Recent Advances and Opportunities in the Study of *Candida albicans* Polymicrobial Biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 836379. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.836379/XML>
- Polke, M., Hube, B., & Jacobsen, I. D. (2015). *Candida* survival strategies. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.002>

- Ponde, N. O., Lortal, L., Ramage, G., Naglik, J. R., & Richardson, J. P. (2021). *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Critical reviews in microbiology*, 47(1), 91-111. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>
- Potocki, L., Depciuch, J., Kuna, E., Worek, M., Lewinska, A., & Wnuk, M. (2019). FTIR and raman spectroscopy-based biochemical profiling reflects genomic diversity of clinical *Candida* isolates that may be useful for diagnosis and targeted therapy of candidiasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 1-9. <https://doi.org/10.3390/ijms20040988>
- Powell, L. M., Choi, S. J., Grund, M. E., Demkowicz, R., Berisio, R., LaSala, P. R., & Lukomski, S. (2024). Regulation of *erm*(T) MLSB phenotype expression in the emergent emm92 type group A *Streptococcus*. *Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00062-3>
- Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 20(1), 7-14. <https://doi.org/10.1080/00362178285380031>
- Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 792-798. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.03.028>
- Qian, W., Wang, W., Zhang, J., Liu, M., Fu, Y., Li, X., Wang, T., & Li, Y. (2020). Sanguinarine inhibits mono- and dual-species biofilm formation by *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* and induces mature hypha transition of *C. albicans*. *Pharmaceuticals*, 13(1), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ph13010013>
- Quinet, B. (2006). Abord veineux de longue durée : épidémiologie, diagnostic, prévention et traitement des complications infectieuses. *Archives de Pédiatrie*, 13(6), 718-720. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2006.03.104>
- Rahman, M. S., Islam, M. S., Amin, M. R., Khan, M. A. S., & Akter, S. (2020). Clinical and Microbiological Evaluation of Bloodstream Infections in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis: A Study in Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University, Dhaka, Bangladesh. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 7-19. <https://doi.org/10.36348/sjmps.2020.v06i01.002>

- Rajendran, R., May, A., Sherry, L., Kean, R., Williams, C., Jones, B. L., Burgess, K. V., Heringa, J., Abeln, S., Brandt, B. W., Munro, C. A., & Ramage, G. (2016). metabolism with biofilm heterogeneity by transcriptome mapping. *Nature Publishing Group*, 7, 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep35436>
- Rajendran, R., Robertson, D. P., Hodge, P. J., Lappin, D. F., & Ramage, G. (2010). Hydrolytic Enzyme Production is Associated with *Candida albicans* Biofilm Formation from Patients with Type 1 Diabetes. *Mycopathologia*, 170(4), 229-235. <https://doi.org/10.1007/S11046-010-9319-0>,
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, 2012(1), 1-14. <https://doi.org/10.1155/2012/528521>
- Ramage, G., Walle, K. V., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2001). Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3234-3240. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3234-3240.2001>
- Ramos, L. de S., Barbedo, L. S., Braga-Silva, L. A., Santos, A. L. S. dos, Pinto, M. R., & Sgarbi, D. B. da G. (2015). Protease and phospholipase activities of *Candida spp.* isolated from cutaneous candidiasis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(2), 122-125. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2014.01.003>
- Rana, S., Kumar, K., Singh, M., Lal, R., Limited, L. P., & Limited, L. P. (2019). Optimization of protocol for DNA isolation from filamentous fungi and its identification. *International journal of basic and applied research*, 8(5), 225-231.
- Ranjan, A., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2018). Tipping the Balance: *C. albicans* Adaptation in Polymicrobial Environments. *Journal of Fungi*, 4(3), 112-120. <https://doi.org/10.3390/JOF4030112>
- Rao, A. S., Shekar, M., Raghuveer, C. V., & Karunasagar, I. (2014). RAPD-PCR typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Peripheral Venous Catheters. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2(5), 462-465.

- Raoofi, S., Kan, F. P., Rafiei, S., Hosseinipalangi, Z., Mejareh, Z. N., Khani, S., Abdollahi, B., Talab, F. S., Sanaei, M., Zarabi, F., Dolati, Y., Ahmadi, N., Raoofi, N., Sarhadi, Y., Masoumi, M., Hosseini, B. sadat, Vali, N., Gholamali, N., Asadi, S., Ghashghaee, A. (2023). Global prevalence of nosocomial infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 18(1), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274248>
- Rebiahi, S. A., Rahmoun, M., Seddiki, S. M. L., Kadi, K., Belhadji, F., Chabni, N., & Kunkel, D. (2014). Infections nosocomiales causées par *Staphylococcus aureus* producteur de biofilm dans l'unité de néonatalogie de l'établissement hospitalier spécialisé mère-enfant de Tlemcen, Algérie. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 27(5), 228-235. <https://doi.org/10.1016/J.JPP.2014.08.008>
- Rebrošová, K., Šiler, M., Samek, O., Růžicka, F., Bernatová, S., Holá, V., Ježek, J., Zemánek, P., Sokolová, J., & Petráš, P. (2017). Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13940-w>
- Rebrošová, K., Šiler, M., Samek, O., Růžicka, F., Bernatová, S., Ježek, J., Zemánek, P., & Holá, V. (2019). Identification of ability to form biofilm in *Candida parapsilosis* and *Staphylococcus epidermidis* by Raman spectroscopy. *Future Microbiology*, 14(6), 509-518. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0297>
- Reddy, G. K. K., & Nancharaiah, Y. V. (2020). Alkylimidazolium Ionic Liquids as Antifungal Alternatives: Antibiofilm Activity Against *Candida albicans* and Underlying Mechanism of Action. *Frontiers in Microbiology*, 11(4), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00730>
- Relucenti, M., Familiari, G., Donfrancesco, O., Taurino, M., Li, X., Chen, R., Artini, M., Papa, R., & Selan, L. (2021). Microscopy methods for biofilm imaging: Focus on sem and VP-SEM pros and cons. *Biology*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biology10010051>
- Rodrigues, M. E., Gomes, F., & Rodriguez, C. F. (2020). *Candida spp./Bacteria Mixed Biofilms*. *Journal of Fungi*, 6(5), 1-29. <https://doi.org/10.3390/jof6010005>
- Rodriguez, L., Zhang, Z., & Wang, D. (2023). Recent advances of Raman spectroscopy for the analysis of bacteria. *Analytical Science Advances*, 4(3-4), 81-95. <https://doi.org/10.1002/ansa.202200066>

- Rohilla, R., Raina, D., Singh, M., Pandita, A. K., & Patwal, S. (2021). Evaluation of *Sphingomonas paucimobilis* as an emerging nosocomial pathogen in a teaching hospital in Uttarakhand. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(5), 617. <https://doi.org/10.18502/IJM.V13I5.7425>
- Rossi, C. C., Ahmad, F., & Giambiagi-deMarval, M. (2024). *Staphylococcus haemolyticus*: An updated review on nosocomial infections, antimicrobial resistance, virulence, genetic traits, and strategies for combating this emerging opportunistic pathogen. *Microbiological Research*, 282(5), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127652>
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571-586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Sakita, K. M., Faria, D. R., Silva, E. M. da, Tobaldini-Valério, F. K., Kioshima, E. S., Svidzinski, T. I. E., & Bonfim-Mendonça, P. de S. (2017). Healthcare workers' hands as a vehicle for the transmission of virulent strains of *Candida spp.*: A virulence factor approach. *Microbial Pathogenesis*, 113, 225-232. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.10.044>
- Samaranayake, Y. H., Cheung, B. P. K., Yau, J. Y. Y., Yeung, S. K. W., & Samaranayake, L. P. (2013). Human Serum Promotes *Candida albicans* Biofilm Growth and Virulence Gene Expression on Silicone Biomaterial. *PLOS ONE*, 8(5), e62902. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0062902>
- Samaranayake, Y. H., Dassanayake, R. S., Jayatilake, J. A. M. S., Cheung, B. P. K., Yau, J. Y. Y., Yeung, K. W. S., & Samaranayake, L. P. (2005). Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Medical Microbiology*, 54(6), 583-593. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.45762-0>,
- Seddiki, S., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., & Kunkel, D. (2015). Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida sp.* Formation des biofilms et résistance. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.003>

- Seddiki, S. M. L. (2021). *Introduction aux biofilms microbiens [Introduction to microbial biofilms]*. Connaissances et savoirs. https://librairie.publibook.com/sciences-technique-informatique/460-introduction-aux-biofilms-microbiens-9782342356847.html?search_query=seddiki&results=1
- Seddiki, S. M. L., Boucherit-Otmani, Z., Bettoui, A. R., Boucherit, K., Taleb, M., & Kunkel, D. (2015). Nosocomial Fungal Infectivities: In Vivo Formation of *Candida* Biofilms on Catheters Surfaces. *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2(3), 38-43.
- Seghir, A. (2015). *Recherche de biofilms mixtes sur cathéters veineux périphériques au CHU de Tlemcen*. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid.
- Seghir, A., & Boucherit, K. (2015). Évaluation du potentiel de formation de biofilms mixtes entre *Candida albicans* et quelques espèces bactériennes isolées de cathéters vasculaires périphériques au CHU de Tlemcen . Première étude en Algérie. *Journal de Mycologie Medicale*, 25(2), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.001>
- Severn, M. M., Williams, M. R., Shahbandi, A., Bunch, Z. L., Lyon, L. M., Nguyen, A., Zaramela, L. S., Todd, D. A., Zengler, K., Cech, N. B., Gallo, R. L., & Horswill, A. R. (2022). The Ubiquitous Human Skin Commensal *Staphylococcus hominis* Protects against Opportunistic Pathogens, 13(3). https://doi.org/10.1128/MBIO.00930-22/SUPPL_FILE/MBIO.00930-22-S0010.DOCX
- Shah, A. A., Alwashmi, A. S. S., Abalkhail, A., & Alkahtani, A. M. (2025). Emerging challenges in *Klebsiella pneumoniae*: Antimicrobial resistance and novel approach. *Microbial Pathogenesis*, 202(1), 107399. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107399>
- Shamim, A., Ali, A., Iqbal, Z., Mirza, M. A., Aqil, M., Kawish, S. M., Siddiqui, A., Kumar, V., Naseef, P. P., Alshadidi, A. A. F., & Saheer Kuruniyan, M. (2023). Natural Medicine a Promising Candidate in Combating Microbial Biofilm. *Antibiotics*, 12(2), 299. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12020299>
- Sharma, V. K., Gupta, J., Mitra, J. B., Srinivasan, H., Sakai, V. G., Ghosh, S. K., & Mitra, S. (2024). The Physics of Antimicrobial Activity of Ionic Liquids. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 15(27), 7075-7083. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCLETT>

- She, P., Liu, Y., Wang, Y., Tan, F., Luo, Z., & Wu, Y. (2020). Antibiofilm efficacy of the gold compound auranofin on dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida sp.* *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 88-101. <https://doi.org/10.1111/jam.14443>
- Shirtliff, M. E., Peters, B. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS microbiology letters*, 299(1), 1-8. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2009.01668.X>
- Silva, S., Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2017). *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *Journal of Fungi*, 3(1), 1-14. <https://doi.org/10.3390/jof3010008>
- Simões, M., Pereira, A. R., Simões, L. C., Cagide, F., & Borges, F. (2021). Biofilm control by ionic liquids. *Drug Discovery Today*, 26(6), 1340-1346. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.031>
- So, B., Kim, J., Jo, J. K., & So, H. (2024). Recent developments in preventing catheter-related infections based on biofilms: A comprehensive review. *Biomicrofluidics*, 18(5), 1-19. <https://doi.org/10.1063/5.0195165/3316469>
- Sophonsri, A., Kelsom, C., Lou, M., Nieberg, P., & Wong-Beringer, A. (2023). Risk factors and outcome associated with coinfection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter baumannii*: a descriptive analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1231740. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2023.1231740/BIBTEX>
- Spiliopoulou, A., Kolonitsiou, F., Vrioni, G., Tsoupra, S., Lekkou, A., & Paliogianni, F. (2022). Invasive *Candida kefyr* infection presenting as pyelonephritis in an ICU hospitalized COVID-19 patient: Case report and review of the literature. *Journal of Medical Mycology*, 32(2), 101236. <https://doi.org/10.1016/J.MYCMED.2021.101236>
- Stamou, A., Pavlopoulos, C., Roumeliotis, S., Samoladas, E., Xatzokos, I., & Kontopoulou, K. (2018). Nonunion Humeral Fracture Infection Caused by *Rhizobium radiobacter* in a 24-Year-Old Healthy Patient: A Rare Case Report. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2018(1), 1-4. <https://doi.org/10.1155/2018/8627165>
- Statistique Canada. (2024). *Catégories d'âge, groupes de cycle de vie*. <https://www.statcan.gc.ca/en/concepts/definitions/age2>

- Štefánek, M., Wenner, S., Borges, V., Pinto, M., Gomes, J. P., Rodrigues, J., Faria, I., Pessanha, M. A., Martins, F., Sabino, R., Veríssimo, C., Nogueira, I. D., Carvalho, P. A., Bujdaková, H., & Jordao, L. (2022). Antimicrobial Resistance and Biofilms Underlying Catheter-Related Bloodstream Coinfection by *Enterobacter cloacae* Complex and *Candida parapsilosis*. *Antibiotics*, 11(9), 1-18. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091245>
- Stewart, P. S. (2015). Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014>
- Suchodolski, J., Feder-Kubis, J., & Krasowska, A. (2017). Antifungal activity of ionic liquids based on (–)-menthol: a mechanism study. *Microbiological Research*, 197(1), 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.008>
- Suchodolski, J., Feder-kubis, J., & Krasowska, A. (2021). Antiadhesive properties of imidazolium ionic liquids based on (–)-menthol against *Candida spp.* In *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms22147543>
- Sujith, A., Itoh, T., Abe, H., Yoshida, K. I., Kiran, M. S., Biju, V., & Ishikawa, M. (2009). Imaging the cell wall of living single yeast cells using surface-enhanced raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(7), 1803-1809. <https://doi.org/10.1007/S00216-009-2883-9/METRICS>
- Suleyman, G., Kassab, R., Gudipati, S., Mayur, R., & Brar, I. (2021). COVID-19 Pandemic and Catheter-associated Urinary Tract Infection Trends. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(1), S486-S487. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab466.976>
- Tang, J. W., Yuan, Q., Wen, X. R., Usman, M., Tay, A. C. Y., & Wang, L. (2024). Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with machine learning algorithms in pathogenic microbial identification: Current trends, challenges, and perspectives. *Interdisciplinary Medicine*, 2(3), 1-20. <https://doi.org/10.1002/INMD.20230060>
- Tefiani, I., Seddiki, S. M. L., Mahdad, Y. M., Boucherit-Otmani, Z., Touil, H. F. Z., & Bessnouci, C. (2020). Hydrolytic activity and biofilm formation in clinical isolates of *Candida albicans*: the effect of changing pH and temperature. *Acta Microbiologica Hellenica*, 65(3), 161-170. <https://www.researchgate.net/publication/351360142>

- Thasneema, K. K., Thayyil, M. S., Rosalin, T., Elyas, K. K., Dipin, T., Sahu, P. K., Krishna Kumar, N. S., Saheer, V. C., Messali, M., & Hadda, T. Ben. (2020). Thermal and spectroscopic investigations on three phosphonium based ionic liquids for industrial and biological applications. *Journal of Molecular Liquids*, 307(4), 112960. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112960>
- Timsit, J. F., Baleine, J., Bernard, L., Calvino-Gunther, S., Darmon, M., Dellamonica, J., Desruennes, E., Leone, M., Lepape, A., Leroy, O., Lucet, J. C., Merchaoui, Z., Mimoz, O., Misset, B., Parienti, J. J., Quenot, J. P., Roch, A., Schmidt, M., Slama, M., Maxime, V. (2020). Expert consensus-based clinical practice guidelines management of intravascular catheters in the intensive care unit. *Annals of Intensive Care*, 10(1), 1-26. <https://doi.org/10.1186/S13613-020-00713-4/TABLES/4>
- Tomlin, H., & Anna, M. (2018). A complex interplay between the extracellular matrix and the innate immune response to microbial pathogens. *IMMUNOLOGY*, 186-201. <https://doi.org/10.1111/imm.12972>
- Tong, N., Zhu, C., Zhang, C., & Zhang, Y. (2016). Study on Raman spectra of aliphatic polyamide fibers. *Optik*, 127(1), 21-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.09.180>
- Torres, M. D. T., Voskian, S., Brown, P., Liu, A., Lu, T. K., Hatton, T. A., & De La Fuente-Nunez, C. (2021). Coatable and Resistance-Proof Ionic Liquid for Pathogen Eradication. *ACS Nano*, 15(1), 966-978. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.0C07642/SUPPL_FILE/NN0C07642_SI_001.PDF
- Touil, H. F. Z. (2023). *Formation et inhibition des biofilms mixtes (Candida albicans/bactéries) isolées des dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen*. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid.
- Trembath, H. E., Caruso, D. M., McLean, S. E., Akinkuotu, A. C., Hayes Dixon, A. A., & Phillips, M. R. (2024). Central Line-Associated Bloodstream Infection Risk Factors in a Pediatric Population. *American Surgeon*, 90(1), 69-74. <https://doi.org/10.1177/00031348231192070>,

- Tsang, C. S. P., Chu, F. C. S., Leung, W. K., Jin, L. J., Samaranayake, L. P., & Siu, S. C. (2007). Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), 1393-1398. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.47303-0/CITE/REFWORKS>
- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2021). Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. In *Antibiotics*, (10) 1, 1-36. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
- Vieira, N. S. M., Oliveira, A. L. S., Araújo, J. M. M., Gaspar, M. M., & Pereiro, A. B. (2021). Ecotoxicity and Hemolytic Activity of Fluorinated Ionic Liquids. *Sustainable Chemistry*, 2(1), 115-126. <https://doi.org/10.3390/suschem2010008>
- Vila, T., Kong, E. F., Montelongo-Jauregui, D., Van Dijck, P., Shetty, A. C., McCracken, C., Bruno, V. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2021). Therapeutic implications of *C. albicans*-*S. aureus* mixed biofilm in a murine subcutaneous catheter model of polymicrobial infection. *Virulence*, 12(1), 835-851. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1894834>
- Villar-Vidal, M., Marcos-Arias, C., Eraso, E., & Quindós, G. (2011). Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(9), 660-665. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.06.009>
- Wang, T. Z., Kodiyanplakkal, R. P. L., & Calfee, D. P. (2019). Antimicrobial resistance in nephrology. *Nature Reviews Nephrology*, 15(8), 463-481. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0150-7>
- Watanabe, Y., Kobayashi, I., Ohnaka, T., & Watanabe, S. (2018). In vitro synthesis of phospholipids with yeast phospholipase B , a phospholipid deacylating enzyme. *Biotechnology Reports*, 18(1), e00250. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00250>
- Wei, G., & Bobek, L. A. (2004). In vitro synergic antifungal effect of MUC7 12-mer with histatin-5 12-mer or miconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 750-758. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh181>
- Wijaya, M., Halleyantoro, R., Kalumpiu, J. F., Wijaya, M., Halleyantoro, R., & Kalumpiu, J. F. (2023). Biofilm: The invisible culprit in catheter-induced candidemia. *AIMS Microbiology*, 9(3), 467-485. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2023025>

- Williams, A. N., & MacLea, K. S. (2019). Draft Genome Sequence of *Dermacoccus nishinomiyaensis* TSA37, Isolated from Wood Ash. *Microbiology Resource Announcements*, 8(50), e01370-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01370-19>
- Witchley, J. N., Penumetcha, P., Abon, N. V., Woolford, C. A., Mitchell, A. P., & Noble, S. M. (2019). *Candida albicans* Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection. *Cell Host and Microbe*, 25(3), 432-443. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2019.02.008>
- Yasir, M., Willcox, M. D. P., & Dutta, D. (2018). Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/MA11122468>
- Yu, S., Li, X., Lu, W., Li, H., Fu, Y. V., & Liu, F. (2021). Analysis of Raman Spectra by Using Deep Learning Methods in the Identification of Marine Pathogens. *Analytical Chemistry*, 93(32), 11089-11098. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM>.
- Zahra Zahid, P., Sadia, M., Amna, N., Umar, S., Muhammad Nouman, T., Azka, S., Kashfia, H., Muhammad, W., Muhammad Shahmeer Fida, R., Syed Shayan, G., Seneen, N., & Elyeen, N. (2023). Contemplating Catheter Induced Blood Stream Infections and Associated Risk Factors in Diverse Clinical Settings: A Comprehensive Review. *Journal of Clinical Intensive Care and Medicine*, 8(1), 14-23. <https://doi.org/10.29328/JOURNAL.JCICM.1001044>
- Zawrotniak, M., Bochenska, O., & Karkowska-kuleta, J. (2017). Aspartic Proteases and Major Cell Wall Components in *Candida albicans* Trigger the Release of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(4), 1-21. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00414>
- Zhao, X., Wang, L., Wei, N., Zhang, J., Ma, W., Zhao, H., & Han, X. (2019). Risk factors of health care-associated infection in elderly patients: A retrospective cohort study performed at a tertiary hospital in China. *BMC Geriatrics*, 19(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/S12877-019-1208-X/TABLES/3>
- Zheng, Y., He, L., Asiamah, T. K., & Otto, M. (2018). Colonization of medical devices by staphylococci. *Environmental Microbiology*, 20(9), 3141-3153. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14129>

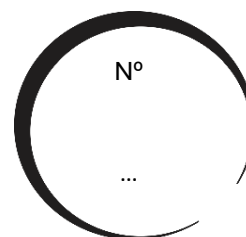
- Zhu, M., Zhu, Q., Yang, Z., & Liang, Z. (2021). Clinical characteristics of patients with *Micrococcus luteus* bloodstream infection in a chinese tertiary-care hospital. *Polish Journal of Microbiology*, 70(3), 321-326. <https://doi.org/10.33073/PJM-2021-030>
- Zhuo, Y., Cheng, H. L., Zhao, Y. G., & Cui, H. R. (2024). Ionic Liquids in Pharmaceutical and Biomedical Applications: A Review. *Pharmaceutics*, 16(1), 151. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16010151>
- Zou, H., Sopasakis, A., Maillard, F., Karlsson, E., Duljas, J., Silwer, S., Ohlsson, P., & Hammer, E. C. (2024). Bacterial community characterization by deep learning aided image analysis in soil chips. *Ecological Informatics*, 81(3), 102562. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2024.102562>

Annexes

Annexe 1. Questionnaire descriptif du prélèvement.



Fiche technique



Patient

Nom :

Sexe : Masculin ☐ Féminin ☐

Age :

T (c°) : PA :

Date d'admission au service :

Motif d'hospitalisation :

Traitement anti-infectieux :

Traitement symptomatique :

Antécédents :

Covid19 : Oui, infection récente ☐

Oui, infection ancienne (>6mois) ☐

Non ☐

Statu vaccinal :

vacciné ☐ Non vacciné ☐

Echantillon :

Date d'échantillonnage : Au cours du traitement ☐ Fin du traitement ☐

Type de dispositif : Cathéter veineux périphérique ☐ Sonde nasale ☐

Cathéter veineux central ☐ Sonde digestive ☐

Sonde urinaire ☐ Sonde d'intubation ☐

Temps de pose : 48h ☐

72h ☐

++ ☐

Remarques :

Annexe 2. Rapport type du résultat d'identification des levures généré par le système VITEK® 2 (bioMérieux)

Informations sur l'identification	Carte :	YST	N° de lot :	2431907203	Péréemption :	15 févr. 2023 12:00 CST
	Terminée le :	1 nov. 2022 09:29 CDT	État :	Final	Heure de l'analyse :	17,98 heures
Origine du germe	VITEK 2					
Germe sélectionné	99% de probabilité		Candida albicans			
	Profil biochimique :	4502546065327771			Fiabilité :	Excellente identification
Germe SRF						
Germes identifiés et tests discriminants :						
Commentaire sur l'ident. :						
Tests à l'encontre						

Détails biochimiques																	
3	LysA	-	4	IMLTa	(-)	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	+	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	+	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARa	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	(+)
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Version de VITEK 2 Systems installée : 08.01
Norme d'interprétation des CMI :
Norm du jeu de paramètres AES :

Politique d'interprétation thérapeutique :
Dernière modification du paramètre AES :

Annexe 3. Rapport type de résultats d'identification des bactéries à Gram positif généré par le système VITEK® 2 (bioMérieux)

Informations sur l'identification	Carte :	GP	N° de lot :	2422072503	Péremption :	30 juil. 2023 13:00 CDT
	Terminée le :	13 oct. 2022 18:05 CDT	État :	Final	Heure de l'analyse :	5,98 heures
Origine du germe	VITEK 2					
Germe sélectionné	93% de probabilité		Staphylococcus haemolyticus			
	Profil biochimique :	070002047730271	Fiabilité :	Très bonne identification		
Germe SRF						
Germes identifiés et tests discriminants :						
Commentaire sur l'ident. :						
Tests à l'encontre						
Staphylococcus haemolyticus NOVO(1),BGAL(15),						

Détails biochimiques																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	-	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

Version de VITEK 2 Systems installée : 08.01
Norme d'interprétation des CMI :
Norm du jeu de paramètres AES :

Politique d'interprétation thérapeutique :
Dernière modification du paramètre AES :

Annexe 4. Rapport type de résultats d'identification des bactéries à Gram négatif généré par le système VITEK® 2 (bioMérieux)

Informations sur l'identification	Carte : GN	N° de lot : 2412239403	Péremption : 13 janv. 2024 12:00 WAT
	État : Final	Heure de l'analyse : 4,53 heures	Terminée le : 7 févr. 2023 05:05 WAT
Origine du germe	VITEK 2		
Germe sélectionné	99% de probabilité Rhizobium radiobacter Profil biochimique : 4601734450200001 Fiabilité : Excellente identification		
Germes identifiés et tests discriminants :			
Commentaire sur l'ident. :			
Tests à l'encontre			

Détails biochimiques																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Version de VITEK 2 Systems installée : 9.02

Norme d'interprétation des CMI :

Nom du jeu de paramètres AES :

Politique d'interprétation thérapeutique :

Dernière modification du paramètre AES :

Annexe 5. Rapport type de résultats du test de sensibilité aux antibiotiques des bactéries à Gram positif généré par le système VITEK® 2 (bioMérieux)

Informations sur l'identification	
Origine du germe	Technicien
Germe sélectionné	Staphylococcus haemolyticus
	Entré le : 14 nov. 2022 22:36 WAT Par : Labadmin
Commentaire sur l'ident. : Un test ICR positif est révélateur d'une résistance inductible aux macrolides, aux lincosamides et à la streptograminine de type B. Cet isolat est présumé résistant à la clindamycine ; cependant, la clindamycine peut tout de même être efficace chez certains patients.	

Résultats Antibiogramme	Carte : AST-P668	N° de lot : 8282421503	Péremption : 13 juil. 2024 12:00 WAT
	État : Final	Heure de l'analyse : 11,57 heures	Terminée le : 14 nov. 2022 16:24 WAT

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Test céfoxitine screen	POS	+	Daptomycine	0,5	S
Oxacilline	>= 4	R	Téicoplanine	8	S
Gentamicine	>= 16	R	Vancomycine	1	S
Kanamycine	>= 64	R	Tétracycline	<= 1	S
Lévofoxacine	>= 8	R	Fosfomycine		
Résistance inductible à la clindamycine	POS	+	Nitrofurantoïne	<= 16	S
Érythromycine			Acide fusidique	16	R
Clindamycine	<= 0,12	*R	Rifampicine	>= 4	R
Quinupristine/dalfopristine	<= 0,25	S	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	<= 10	S
Linézolide	2	S			

*= Modification AES **= Modification Utilisateur

Résultats AES :	Dernière modification : 1 avr. 2021 12:19 WAT	Normes/Phénotype :	Global CLSI-based+Natural Resistance
Niveau de fiabilité :	Concordant		
Phénotypes à vérifier :	BÊTA-LACTAMINES	MODIFICATION DES PLP (mecA)	
	MACROLIDES/LINCOSAMIDES/ STREPTOGRAMINES	MLSb INDUCTIBLE	

Version de VITEK 2 Systems installée : 9.02
 Norme d'interprétation des CMI : Global CLSI-based
 Nom du jeu de paramètres AES : Global CLSI-based+Natural Resistance

Politique d'interprétation thérapeutique : NATURAL RESISTANCE
 Dernière modification du paramètre AES : 1 avr. 2021 12:19 WAT

Annexe 6. Rapport type de résultats du test de sensibilité aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif généré par le système VITEK® 2 (bioMérieux)

Informations sur l'identification	
Origine du germe	Technicien
Germe sélectionné	Pseudomonas aeruginosa
	Entré le : 14 nov. 2022 22:39 WAT Par : Labadmin
Commentaire sur l'ident. : Les antibiotiques suivants sont supprimés de l'analyse : Aztréonam, Les antibiotiques suivant ne sont pas requis: Rifampicine,	

Résultats Antibiogramme	Carte : AST-N222	N° de lot : 6222267103	Péremption : 10 févr. 2024 12:00 WAT
	État : Final	Heure de l'analyse : 10,32 heures	Terminée le : 14 nov. 2022 15:09 WAT

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ticarcilline	>= 128	R	Amikacine	<= 2	S
Ticarcilline/acide clavulanique	>= 128	R	Gentamicine	4	S
Pipéracilline	>= 128	R	Tobramycine	<= 1	S
Pipéracilline/tazobactam	>= 128	R	Ciprofloxacine	<= 0,25	S
Ceftazidime	>= 64	R	Péfloxacin		
Céfépime	>= 64	R	Minocycline		
Aztréonam			Colistine	2	S
Imipénème	2	S	Rifampicine		
Méropénème	<= 0,25	S	Triméthoprim/ sulfaméthoxazole		

Résultats AES :	Dernière modification : 1 avr. 2021 12:19 WAT	Normes/Phénotype :	Global CLSI-based+Natural Resistance
Niveau de fiabilité :	Concordant		
Phénotypes à vérifier :	BÊTA-LACTAMINES	CÉPHALOSPORINASE DE HAUT NIVEAU	

Version de VITEK 2 Systems installée : 9.02
 Norme d'interprétation des CMI : Global CLSI-based
 Nom du jeu de paramètres AES : Global CLSI-based+Natural Resistance

Politique d'interprétation thérapeutique : NATURAL RESISTANCE
 Dernière modification du paramètre AES : 1 avr. 2021 12:19 WAT

Annexe 7. Données cliniques des patients.

Patient	Service	Sexe	Age	Motif d'hospitalisation	Antécédent	Antibiothérapie	Chimiothérapie	Covid-19	Infectivité
1	Hématologie	Féminin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Présence	Présence	Infection ancienne	Contamination
2	Hématologie	Féminin	Aîné	LLC	Pas d'antécédent	Présence	Présence	Infection récente	Contamination
3	Hématologie	Masculin	Adulte	PTI	Diabète, dyslipidémie	Absence	Absence	Infection récente	Colonisation
4	Hématologie	Masculin	Adulte	PTI	Diabète, dyslipidémie	Présence	Absence	Infection récente	Colonisation
5	Hématologie	Masculin	Adulte	LMNH	Pas d'antécédent	Présence	Absence	Pas d'infection	Infection
6	Hématologie	Féminin	Aîné	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Présence	Pas d'infection	Colonisation
7	Hématologie	Féminin	Aîné	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Présence	Pas d'infection	Contamination
8	Hématologie	Masculin	Adulte	PTI	Diabète, dyslipidémie	Absence	Absence	Infection récente	Contamination
9	Hématologie	Masculin	Adolescent	LAL	Pas d'antécédent	Présence	Absence	Pas d'infection	Infection
10	Hématologie	Féminin	Adulte	LAM	Goitre	Présence	Présence	Pas d'infection	Colonisation
11	Hématologie	Masculin	Adulte	LAL	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
12	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Contamination
13	Hématologie	Féminin	Adulte	LAM	Anémie	Absence	Présence	Infection ancienne	Colonisation
14	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Présence	Présence	Pas d'infection	Colonisation
15	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Colonisation
16	Hématologie	Masculin	Adulte	LAL	Pas d'antécédent	Présence	Présence	Pas d'infection	Contamination
17	Hématologie	Masculin	Adulte	LAL	Pas d'antécédent	Absence	Présence	Pas d'infection	Colonisation
18	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
19	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Contamination
20	Hématologie	Masculin	Adolescent	LAL	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
21	Hématologie	Masculin	Adulte	HDK	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Infection récente	Pas d'infectivité
22	Hématologie	Féminin	Adulte	LAM	Goitre	Présence	Présence	Pas d'infection	Infection
23	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
24	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Présence	Présence	Pas d'infection	Colonisation
25	Hématologie	Masculin	Adulte	HDK	Pas d'antécédent	Présence	Absence	Infection récente	Colonisation

26	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Anémie	Absence	Présence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
27	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
28	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Contamination
29	Hématologie	Masculin	Adulte	LAL	Pas d'antécédent	Présence	Présence	Pas d'infection	Colonisation
30	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
31	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Présence	Absence	Infection ancienne	Infection
32	Hématologie	Masculin	Adolescent	LAM	Pas d'antécédent	Présence	Présence	Infection ancienne	Contamination
33	Hématologie	Masculin	Adolescent	LAM	Pas d'antécédent	Présence	Absence	Pas d'infection	Infection
34	Hématologie	Masculin	Adolescent	LAM	Pas d'antécédent	Présence	Présence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
35	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Pas d'antécédent	Absence	Présence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
36	Hématologie	Masculin	Adulte	LAM	Cardiopathie	Présence	Présence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
37	Néphrologie	Féminin	Adolescent	GNMP	Anémie	Absence	Absence	Pas d'infection	Pas d'infectivité
38	Néphrologie	Masculin	Adulte	IR	Diabète HTA	Absence	Absence	Pas d'infection	Colonisation
39	Néphrologie	Féminin	Adulte	IR	Pas d'antécédent	Présence	Absence	Pas d'infection	Contamination
40	Néphrologie	Féminin	Aîné	IR	Diabète HBP goitre	Absence	Absence	Pas d'infection	Infection
41	Néphrologie	Féminin	Adolescent	NL	LES	Absence	Absence	Infection ancienne	Colonisation
42	Néphrologie	Masculin	Aîné	IR	HTA, lithiase rénale	Absence	Absence	Pas d'infection	Colonisation
43	Néphrologie	Masculin	Adulte	IR	Cardiopathie	Absence	Absence	Pas d'infection	Contamination
44	Néphrologie	Masculin	Adulte	NS	HTA	Absence	Absence	Pas d'infection	Contamination
45	Néphrologie	Masculin	Adulte	IR	HTA	Absence	Absence	Pas d'infection	Infection
46	Néphrologie	Masculin	Aîné	IR	Diabète, HTA, dyslipidémie	Absence	Absence	Pas d'infection	Colonisation
47	Néphrologie	Masculin	Aîné	PN	Chirurgie récente	Présence	Absence	Pas d'infection	Infection
48	Néphrologie	Masculin	Aîné	PN	Chirurgie récente	Présence	Absence	Pas d'infection	Contamination
49	Néphrologie	Féminin	Adulte	CCU	Pas d'antécédent	Présence	Absence	Pas d'infection	Colonisation
50	Néphrologie	Masculin	Adulte	IR	Pas d'antécédent	Absence	Absence	Pas d'infection	Infection

* PN : pyélonéphrite (infection bactérienne aiguë ou chronique des reins) ; LAM : leucémie myéloïde aigue ; LES : Lupus Érythémateux Systémique (Maladie auto-immune chronique.) ; CCU : cancer du col de

l'utérus; LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique ; PTI: Purpura Thrombopénique Idiopathique (Maladie auto-immune dans laquelle le système immunitaire détruit les plaquettes) ; LMNH gastrique : Lymphome Malin

Non Hodgkinien; LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique ; HDK: Maladie de Hodgkin (Cancer du système lymphatique); GNMP : Glomérulonéphrite Membrano-Proliférative ; HTA : hypertension artérielle ; DLP :

dyslipidémie ; LR : lésion rénale ; NL : néphrolithiase