

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaïb d'Aïn-Témouchent



Département de Biologie
Faculté des Sciences de la Nature et de vie

Mémoire

En vue de l'obtention de diplôme de

Master

En Biologie Option Microbiologie Appliquée

Présenté par :

M^{me} Mabrouk Saadia

M^{me} Belhenini Amina Oum Elhabib

Thème :

Etude de l'effet de la conservation des souches microbiennes sur leur potentiel de formation de biofilms

Soutenu le : 26 JUIN 2019

Devant le jury composé de :

Président	: M ^{me} BENTABET LASGAA Nesrine	MCB	C.U d'Aïn Témouchent
Examineur	: M ^{me} BEKKAL BRIKCI- BENHABIB Ouassila	MAB	C.U d'Aïn Témouchent
Encadrant	: M ^r SEGHIR Abdelfatteh	MCA	C.U d'Aïn Temouchent

Année Universitaire : 2018/2019

Liste des Figures

Figure 1 :Exemples d'un biofilm formé sur une surface métallique d'un système d'eau industriel vue par Micrographieélectronique.....	5
Figure 2 :Micrographie électronique à balayage d'un biofilm de staphylocoque formé sur la surface interne d'un dispositif médical.....	5
Figure 3 :Morphologies coloniales de <i>Candida albicans</i>	7
Figure 4 :Morphologie de <i>Candida sp</i>	7
Figure 5 :Principales phases de formation des biofilms de <i>Candida albicans</i> sur une surface inerte (disques de cathéter) , avec l'imagerie électronique correspondante chaque phase	9
Figure 6 : Biomasse des biofilms de <i>Candida sp.</i> formés sur milieu TSB.....	17

Liste des abréviations

PBS : Phosphate Buffered saline « Tampon Phosphate Salé

RPMI : Roswell Park Memorial Institut

TSB : Bouillon Tryptone Soja

CV : Crystal violet

DO : Densité Optique

Sommaire

Introduction	1
Première partie : Synthèse Bibliographique	3
Deuxième partie : Matériel et Méthodes	14
- Formation de biofilm.....	15
-Mesure de la biomasse	15
Troisième partie : Résultats et Discussion	16
Quatrième partie : Conclusion Générale	20
Cinquième partie : Références bibliographiques	22
Sixième partie : Annexes	29

الملخص :

تلعب الكائنات الحية الدقيقة دوراً مهماً في مجال الصحة العمومية ، إذ إن مجموعة معتبرة منها تعتبر معدية لذلك تستلزم ضرورة حفظ عينات منها قصد دراستها , تخزين العينات يجب أن يضمن الحفاظ على جميع خصائص السلالات طوال مدة حفظها و في هذا السياق ، قمنا بإجراء هذه الدراسة لتقييم تأثير الحفظ على تكوين غشاء حيوي .
تم عزل سلالات *Candida sp* من مستشفى تلمسان الجامعي و حفظها في درجة 04 مئوية منذ 2012 و النتيجة التي تم الحصول عليها أظهرت أن سلالاتنا حافظت على قدرتها على تشكيل الأغشية الحية .

الكلمات المفتاحية : أغشية حيوية , حفظ, *Candida sp*.

Résumé :

Certains microorganismes sont des agents infectieux d'où la nécessité de les étudier, ce qui nécessite leur conservation au niveau des laboratoires. La conservation doit garder leur viabilité et leurs propriétés.

Dans ce contexte nous avons entrepris cette étude qui a pour objectif, l'évaluation de l'effet de la conservation sur le pouvoir de former un biofilm.

Les souches de *Candida sp*.isolées du CHU de Tlemcen, étaient conservées à 4 C° depuis 2012 ,et les résultats obtenus ont montré que nos souches ont gardé le pouvoir de formation de biofilm malgré la longue durée de conservation.

Mot clé : conservation, biofilm, *candida sp*.

SUMMARY :

Some microorganisms are infectious agents from which the need to study them, which requires their conservation at the laboratory level. Conservation must maintain their viability and properties.

In this context we have undertaken this study which aims to evaluate the effect of conservation on the power to form a biofilm.

The strains of *Candida sp*.isolated from university hospital of Tlemcen conserved at 4 ° C since 2012 and the results obtained showed that our strains retained the biofilm formation capacity after a long conservation period,

Keyword: conservation, biofilm, *candida sp*.

Dédicaces

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

*À mes très chers parents qui m'ont soutenue tout au long de ma vie ainsi qu'à
mes frères.*

A toute ma famille

A toute la promotion du master Microbiologie Appliquée.

A tous les techniciens de laboratoire.

A mon binôme.

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

SAADIA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A ma chère mère et grand-mère. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour et le soutien dont elles m'ont comblé durant ces années d'études.

Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mon mari **YOUCEF** qui ma soutenue tout au longue de ce travail, et à mes sœurs **SARAH** et **SABRIN**

A ma belle-famille et toute la famille

A tous les techniciens de laboratoire

A mon binôme **SAADIA** et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

AMINA OUM EL HABIB

Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, Le tout Puissant pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

Nous tenons tout particulièrement à remercier chaleureusement, **M^RSEGHIR Abdelfatteh** Maître de conférences Classe A au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie au centre universitaire d'Ain Témouchent , de nous avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail, pour ses conseils précieux et ses orientations scientifiques, nous lui adressons notre profonde reconnaissance.

Nous adressons nos remerciements à **M^{me} BENTABET LASGAA, Nesrine** Maître de conférences classe B au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie au centre universitaire d'Ain Témouchent , pour l'honneur quelle nous a fait en acceptant de présider le jury de cette soutenance.

Nous remercions vivement **M^{me} BEKKAL BRIKCI- BENHABIB Ouassila** Maitre assistante classe B au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, au centre universitaire d'Ain Témouchent pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Introduction

Introduction :

Les micro-organismes tel que les virus, les bactéries, les mycètes, les protozoaires et certaines algues constituent la majorité de la biomasse (**Catherine et al.,2012**) et peuplent tous les environnements ce qui les met en contact directe avec l'homme (**Catherine, 2011**).

Ces micro-organismes peuvent d'une part, nous être bénéfique et avoir de nombreuses utilités dans le domaine pharmaceutique, énergétique et agro-alimentaire [(**Seddiki, 2015**) ; (**Nicklin et al.,2000**)].

D'autre part certains sont responsables de toxi-infections alimentaires ou des infections nosocomiales qui posent un véritable problème de santé publique du fait de leur fréquence, leur gravité et leur coût socioéconomique (**Zerrouk,2013**).

Pour les micro-organismes le mode privilégié de leur prolifération est la vie en communauté (**Catherine et al.,2012**). Cette communauté est enrobée d'une matrice hydratée, riche en polymères extracellulaires, et en contact avec une surface « biofilm »(**David et al.,2012**). C'est le cas des levures opportunistes appartenant au genre *Candida*, notamment *Candida albicans*, l'espèce la plus virulente de ce genre et de certaines bactéries pathogènes (**Yang, 2003**).

Parmi les aspects de la prévention contre ces infections, l'étude, la manipulation des souches, leur isolement, leur purification et leur conservation pour l'exploitation ultérieure sont des étapes incontournables (**Seddiki, 2015**).

La conservation étant primordial elle doit préserver les caractères naturels des souches testés afin d'assurer l'aboutissement des déférents tests microbiologique. C'est dans cette optique que nous envisageons dans ce présent travail l'effet de la conservation des souches *Candida sp.* sur leur capacité à former le biofilm.

Synthèse Bibliographique

Pendant la majeure partie de l'histoire de la microbiologie, les micro-organismes ont été principalement définis comme source de maladies infectieuses responsable de plus de décès dans le monde entier (**Donlon, 2002**).

Le contrôle des micro-organismes est un enjeu majeur dans le secteur industriel et médical car ils sont reconnus pour être la source de lourds problèmes économiques et sanitaires. [(**Malek, 2013**) ;(**Simon et al ., 2007**)].

Les microorganismes sont à l'origine des infections qualifiées nosocomiales dans le milieu intra-hospitalier ou d'autre établissement de soins qui peuvent être diffusés par différentes voies, soit acquise, par voie aérienne ou favorisées par l'écologie microbienne locale (**Simon et al ., 2007**). Ces derniers présentent un problème majeur de santé, elle sont responsable d'une mortalité, et d'un surcoût lié notamment à l'augmentation de la durée de séjour (**David et al ., 2000**).

Ces micro-organismes peuvent se servir de l'utilisation des implants médicaux, essentiellement les cathéters et les sondes urinaires, que leur utilisation a connu un essor important ces dernières années (**Boo et al., 2005**). Ces implants offrent aux microorganismes la possibilité de se trouver sous la forme **sessile** : attaché sous forme de biofilm (**Clutterbuck, 2007**).

Les biofilms sont le résultat de la fixation et du développement des micro-organismes sur des surfaces biologiques ou synthétiques. Les microorganismes fixés synthétisent une matrice polymérique et forment ainsi un film de quelques micromètres à quelques millimètres d'épaisseur possédant différentes architectures et organisations (**Géraldine, 2010**) et sa formation dépend de plusieurs facteurs tel que la nature et la propriété physico-chimique de la surface d'adhésion, et le nombre de microorganisme (**Donlan, 2001**).

Les estimations suggèrent que jusqu'à 80 % de tous les microorganismes dans l'environnement existent dans des communautés structurées en biofilms (**Donlan, 2002**).

D'après **Chalvet de Rochemonteix (2009)**, le passage d'un mode de vie planctonique (libre) à un mode de vie communautaire (Biofilm) est un processus dynamique et complexe qui est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotypes (**Géraldine, 2010**).

Les cellules des biofilms sont radicalement différentes de leurs homologues planctoniques, elles sont plus résistantes aux agents antifongiques et aux défenses immunitaires de l'hôte (**Gilbert *et al*, 1997**). Ces organismes sessiles prédominent dans la plupart des problèmes et processus environnementaux industriels et médicaux intéressant les microbiologistes (**Costerton,1995**).

Les biofilms microbiens (Fig. 1, et Fig. 2) peuvent se former dans la nature mais aussi dans un hôte. Ces dernières années, le rôle des biofilms microbiens dans la médecine humaine a été de mieux en mieux compris: on estime à présent que près de 65% des infections humaines ont une étiologie du biofilm (**Christopher,2008**) développées à partir de sutures, lentilles de contact ,cathéters et prothèses orthopédiques ,ils sont aussi à l'origine d'infections chroniques comme la mucoviscidose les ostéomyélites et les endocardites (**David *et al.*,2012**).

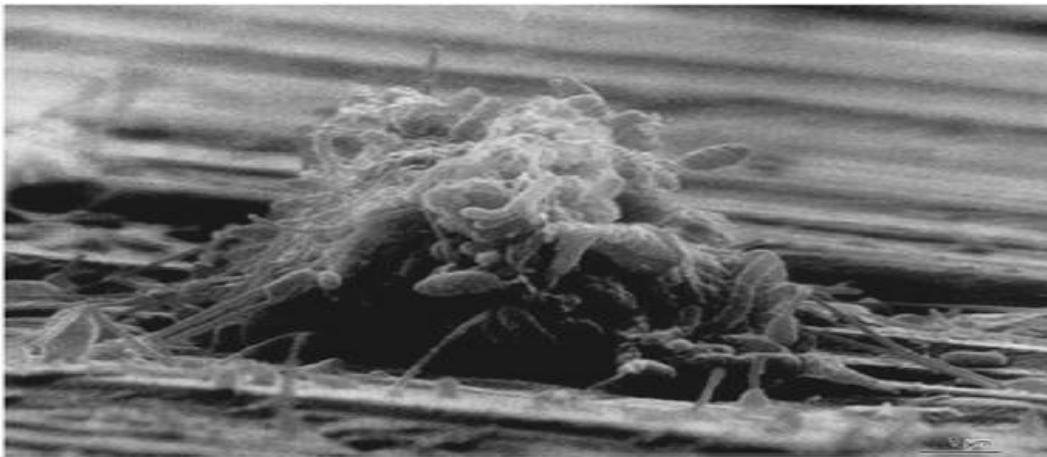


Figure 1: Exemples d'un biofilm formé sur une surface métallique d'un système d'eau industriel vue par Micrographie électronique (**Donlan, 2002**).

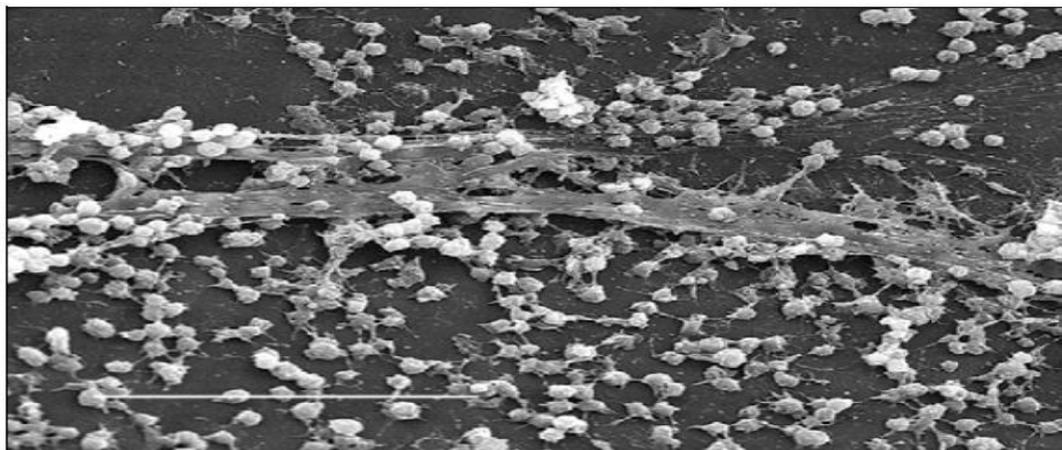


Figure 2 : Micrographie électronique à balayage d'un biofilm de staphylocoque formé sur la surface interne d'un dispositif médical (**Donlan, 2002**).

La communication entre les cellules ou « le quorum sensing » est fondamentale dans la formation de biofilm microbien, elle permet d'éviter une surpopulation inutile, de contrôler la compétition pour les nutriments et des implications importantes dans les processus infectieux en particulier la dissémination (**Grinand,2012**).

Bien que la majorité des infections soient causées par des bactéries, les infections fongiques sont de plus en plus communes, en particulier celles causées par des espèces du genre *Candida*, y compris *Candida albicans* (**Li, 2003**). Ce genre occupe le quatrième rang des agents infectieux responsables de septicémies nosocomiales en termes de fréquence, et le premier en termes de mortalité (**Edmond et al ., 2014**).

L'infection existe sous deux formes : l'une **superficielle** (cutanée, digestive et génito-urinaire), l'autre disséminée ou **septicémique** (candidose profonde ou candidémie).

En Algérie, les travaux de **Boucherit-Atmani et al (2011)**, **Seddiki et al (2013)** et **Seghir et al (2014)**, s'intéressent à l'étude des infections fongiques liées aux cathéters, les résultats ont révélé l'implication de *Candida sp.* dans ce type d'infections dont le taux de mortalité des patients avoisine les 40% (**Chandra et al .,2001**).

Il s'agit d'une levures de petites tailles de 2 à 5µm , globulaires, ovoïdes ou cylindriques, non pigmentées, non capsulées à bourgeonnement multilatérale productrices ou non de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture(Fig. 3) (**Fitzpatrick et al., 2006**). Cette levure cosmopolite, opportuniste a la phylogénie suivante (**James,2006**):

Règne : Champignon Phylum : *Ascomycota*

Classe : *Hemiascomycètes*

Ordre : *Saccharomycétales*

Famille : *Candidaceae*

Genre : *Candida*

Ce genre comprend environ 350 espèces, seules quelques-unes sont rencontrées en pathologie humaine (**Williams et al., 2011**), essentiellement il s'agit de *Candida albicans*, *Candida glabrata* *Candida parapsilosis*, *Candida famata*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* [(**Odds, 2010**) ;(**Seghir et al.,2014**)].

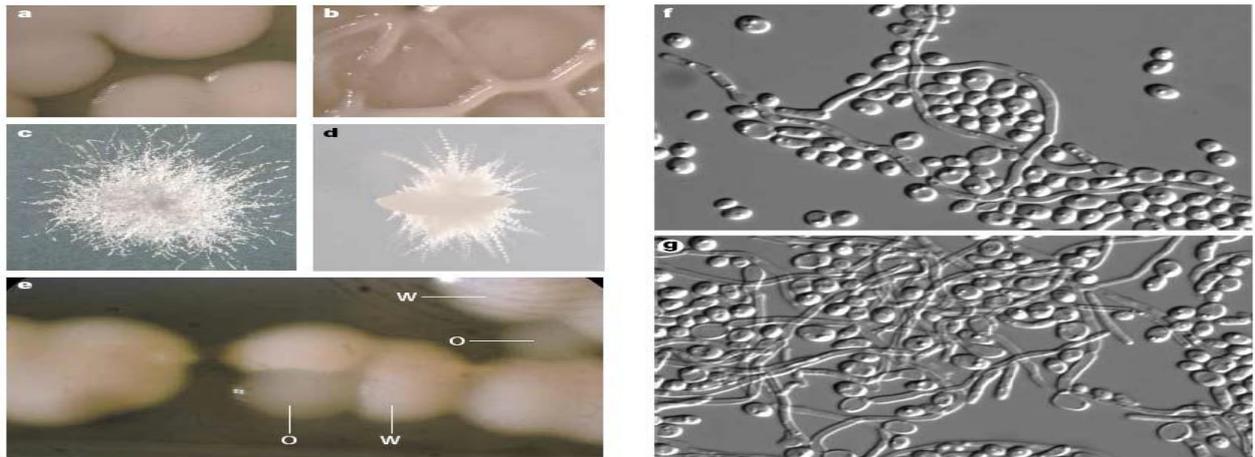


Figure 3 : Morphologies coloniales de *C. albicans* (Berman et Sudbery, 2002).

Candida sp. peut avoir trois morphologies cellulaires distinctes (Fig. 4), blastospore (forme levure) pseudohyphe et hyphe (forme filamenteuse) ,cette morphologie évolue progressivement passant de la levure à la pseudohyphe à l'hyphes (Thompson *et al.*, 2011).

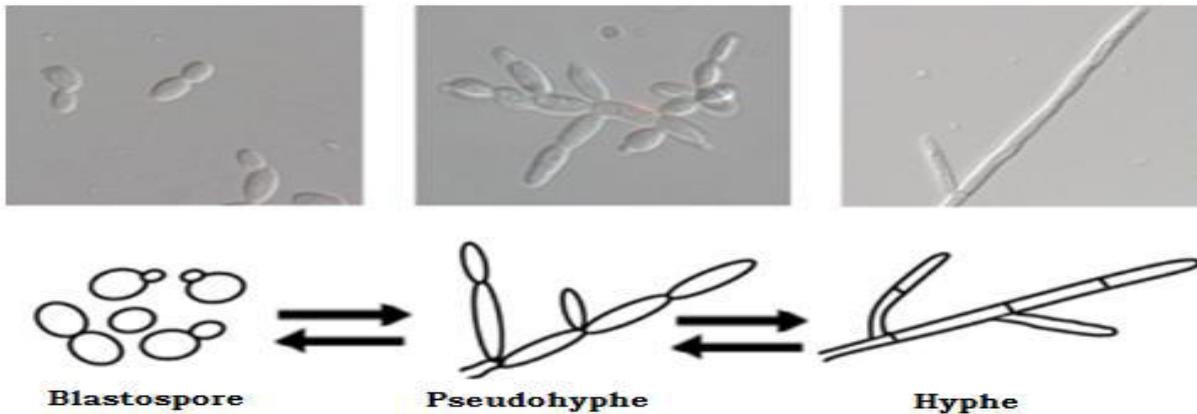


Figure 4 : Morphologie de *Candida sp.* (Thompson *et al.*, 2011).

La forme levure (blastospore) est constituée de cellules rondes qui se reproduisent par bourgeonnement alors que les Pseudohyphes sont des chaînes plus ou moins ramifiées formées par des cellules filles rester attachées les unes aux autres issus de la division cellulaire des blastospores (Thompson *et al.*, 2011).

De nombreuses espèces de *Candida sp.* sont capables de former des levures et des pseudohyphes,seul trois espèces étroitement apparentées phylogénétiquement (*Candida tropicalis*, *C.dubliniensis* et *C. albicans*) sont connus pour former des hyphes .

En termes d'agressivité, les blastospores sont adaptées à la dissémination des levures, alors que les formes filamenteuses sont susceptibles de favoriser l'invasion d'où leur virulence (**Chauhan et al., 2006**)

Selon **Jabra-Rizk (2004)**, la formation du biofilm se déroule en trois phases de développement(Fig5) ; phase d'adhésion (de 0 à 11 heures), phase intermédiaire (de 12 à30 heures) et la phase de maturation (de 30 à 72 heures).

L'adhésion : Pour coloniser une surface, les cellules fongiques doivent d'abord assurer leur adhesion a cette dernière, c'est l'étape la plus importante dans la formation de biofilm, et la première étape du processus d'infection (**Haynes, 2001**). Elle est divisée en deux étapes :

-Attachement réversible : C'est l'adhésion initiale, ou la blastospore peut facilement se détacher (**Baillie et Douglas, 1999**).

-Attachement irréversible : C'est une adhésion forte à la surface, caractérisée par un regroupement en amas avec formation d'une matrice polysaccharidique (**Baillie et Douglas, 2000**). Cette dernière permet la protection des cellules au sien de biofilm contre les effets antimicrobien et un moyen de piéger les nutriments [(**Boyd et Chakrabarty, 1994**) ;(**Davies et Geesey, 1995**)].

Phase intermédiaire : Le biofilm entame son développement en assurant la multiplication par bourgeonnement des souches et la formation d'une couche basale de micro-colonies de levures (**Baillie et Douglas, 2000**) . La matrice extra cellulaire apparait sous une forme d'un voile couvrant les souches *Candida sp.* contrairement au début de sa formation qui donne un aspect trouble (**Al-Fattani et Douglas, 2006**).

La phase de maturation : à ce stade la population se retrouve sous une forme dense complètement emprisonnée par la matière extra cellulaire (**Seddik et al., 2014**) .Le biofilm mature est organisé en une bicouche, la couche de base formée par des blastospores (levure ovoïde) et la couche supérieure qui est ramifiée plus épaisse formée par les hyphes (**Hawser et Douglas, 1994**).

Ces trois grande phase se complète par une quatrième : la dispersion des cellules filles de biofilm qui vont à leur tour coloniser d'autre surface et former un nouveau biofilm ou causer des infections systématiques complexes [(**Pace et al., 2006**) ; (**Irie et Parsek, 2008**)].

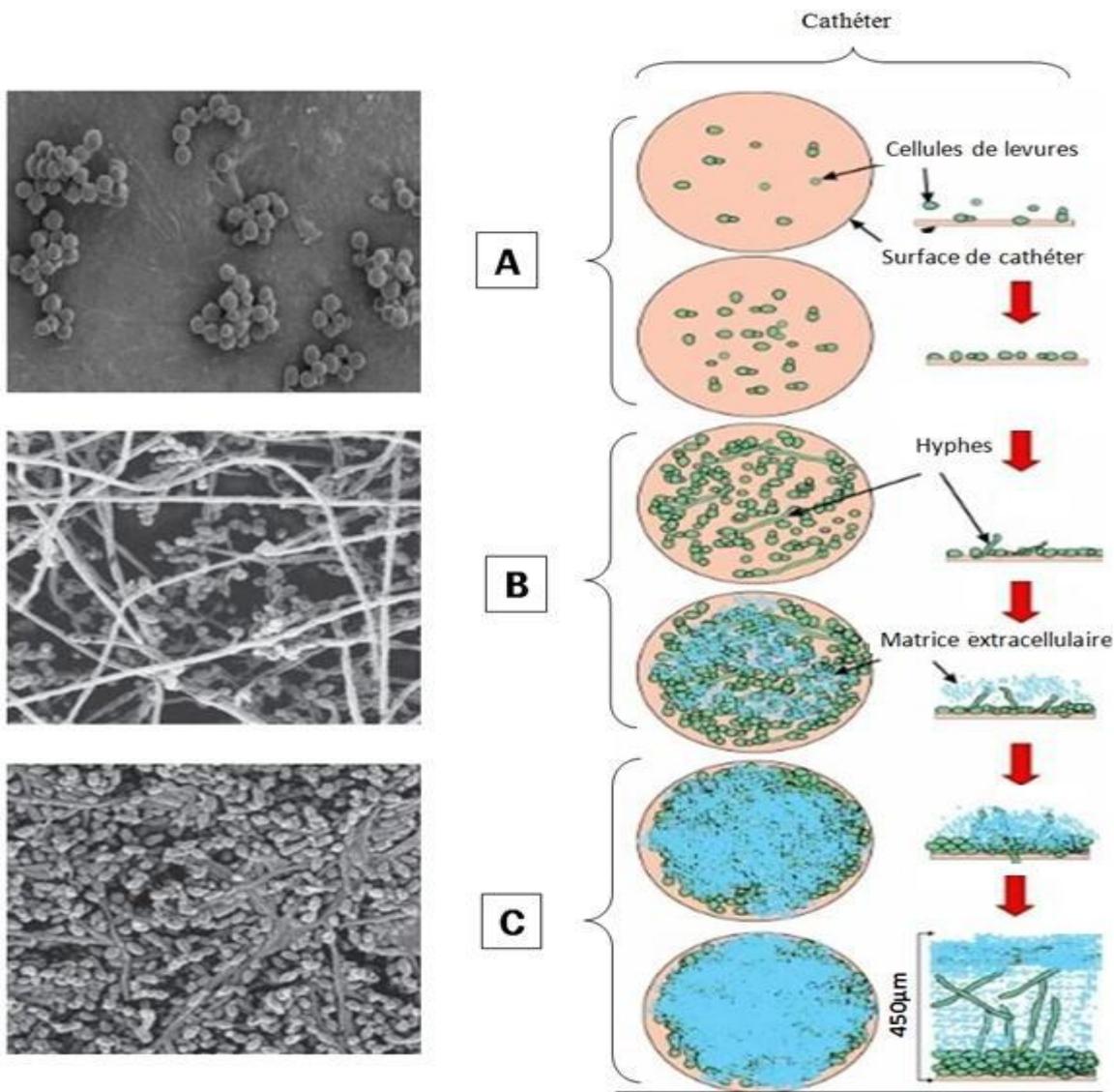


Figure N° 5 : Principales phases de formation des biofilms de *Candida albicans* sur une surface inerte (disques de cathéter) (Chandra *et al.*, 2001), avec l'imagerie électronique correspondante à chaque phase (Ramage *et al.*, 2009). A : Phase d'adhésion B : Phase intermédiaire C : Phase de maturation.

Candida sp. sont souvent saprophytes et non pathogènes pour l'individu normal, mais profitent d'une altération des défenses immunitaires de l'hôte pour proliférer. De ce fait, les échecs thérapeutiques résultent plus du terrain favorable de l'hôte que de l'agressivité des espèces fongiques impliquées (Haynes, 2001).

Récemment, **Seddiki *et al* (2013)**, ont défini l'infectivité fongique des cathéters comme étant le degré d'altération des cathéters par les cellules fongique, distinguée en 03 types :

-La contamination : présence d'une culture microbienne positive mais non significative (seuil de signification égale à 10^3 cellule/ml) de l'extrémité distale des cathéters. (**Carriere et Marchandin., 2001**).

-La colonisation : se définit par une culture positive de l'extrémité distale des cathéters en quantité significative (**Carriere et Marchandin., 2001**).

-L' infection : l'infection des cathéters est défini par la présence d'un syndrome septique et d'une culture significative positive de l'extrémité distale des cathéters (**Carriere et Marchandin., 2001**)

De nombreux facteurs de virulence sont associés à leur pathogénèse dont les principaux sont (**Tableau 1**) :

-Les adhésines : des biomolécules favorisant l'adhérence aux cellules de l'hôte.

-Les protéases aspartiques et les phospholipases, des enzymes hydrolytiques sécrétées par la levure (**Calderon et Fonzi, 2001**).

-La transition morphologique et la commutation phénotypique jouent aussi un rôle important dans la virulence de ce pathogène (**Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009**).

Tableau 1 : Facteurs majeurs favorisant l'infection candidosique (Perlroth *et al.*, 2007)

Facteurs	Exemples
Déficits immunitaires	Physiologiques (nouveau-nés, personnes âgées) ou acquis (infections à VIH, malignités)
Facteurs endocriniens	Grossesse, contraceptifs oraux, diabète, hypothyroïdie maladie d'Addison
Facteurs nutritifs	Hydrates de carbone, déficits en fer et en vitamines
Hyposialies endogènes	Syndrome de Sjögren
Facteurs génétiques	Candidoses chroniques familiales
Agents antimicrobiens	Antibiotiques à large spectre, antiseptiques
Traitements immunosuppresseurs	Corticothérapie, thérapie antitumorale
Hyposialies exogènes	Toxicomanies, radiothérapies, traitements Psychotropes
Facteurs mécaniques	Traumatismes, prothèses dentaires
Implants médicaux	Cathéters, tubes endothoraciques, valves cardiaques artificielles prothèses articulaires

Le traitement de la candidose repose sur les antifongiques, les plus utilisés sont : les polyènes (Amphotéricine B), les triazolés (fluconazole, itraconazole, voriconazole et posaconazole) et les échinocandines (caspofungine et micafungine) pour les mycoses systémiques. Les candidoses superficielles sont traitées par des imidazoléstopiques (ANOFEL, 2014).

Cependant les antifongiques sont moins efficaces contre les biofilms de *candida sp*, cela a été mis en évidence dès 1994 par Hawser et Douglas.

Selon les travaux de Boucherit-Atmani *et al* (2011), les tests antifongiques de l'amphotéricine B (AmB) ont montrés clairement que les cellules sessiles de *C. albicans* sont beaucoup plus résistantes que leurs homologues planctoniques (cellules en suspension), cette résistance augmente au cours des différentes phases de la formation des biofilms jusqu'à ce qu'elle atteigne son seuil à la phase de maturation (48 heures).

L'impact clinique et économique des infections dues aux biofilms a contribué après vingt années de recherche de dégager plusieurs axes originaux exploitables pour le développement des moyens de lutte contre les biofilms :

-Inhiber l'adhérence initiale :

C'est d'empêcher la formation du biofilm en inhibant l'adhérence initiale et en maintenant les micro-organismes dans un état isolé et sensible au système immunitaire et aux antibiotiques (**Singh et al .,2002**).Le blocage des étapes précoces du développement du biofilm peut s'effectuer soit en ciblant l'interaction entre les adhésines et leurs substrats, soit en bloquant la biogenèse des structures d'adhérence elle-même (**korea et al ., 2011**).

-Brouiller les communications et limiter la maturation du biofilm :

Il s'agit d'empêcher la maturation du biofilm en interférant avec les signaux de communication, cela repose sur l'inhibition du *quorum-sensing* en utilisant des analogues structuraux qui réduisent le biofilm (**Landini et al., 2010**).

-Disperser le biofilm :

Différentes approches ont été proposées pour disperser les biofilms infectieux comme l'utilisation d'enzymes capables de dissocier les polymères composant la matrice extracellulaire du biofilm ,bien que cette approche soit particulièrement adaptée aux biofilms développés en contexte industriel ,elle entraîne cependant la libération d'un grand nombre de microorganismes à partir du site contaminé induisant un risque de forte réponse inflammatoire et d'infection systémique aiguë (**Flemming, 2010**).

L'incidence des infections fongiques est en augmentation considérable durant ces dernières années (**Perlroth et al., 2007**), où l'utilisation des implants médicaux a connu un essor important lié aux progrès médicaux, Il est donc nécessaire de mieux comprendre l'épidémiologie et la physiopathologie des candidoses, et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques si nous voulons, à terme être en mesure de réduire l'incidence et les conséquences de ces infections (**David et al.,2012**).

La conservation est utilisée dans les laboratoires pour conserver les différentes espèces microbiennes isolées. L'objectif de la conservation est de garder l'ensemble des propriétés morphologiques, métaboliques, génétique et physiologiques (**Ndour,2013**).

Il existe plusieurs méthodes de conservation telles que la conservation à basse température, lyophilisation et la déshydratation (**Lopez, 2010**).

La réfrigération à des températures en dessous du minimum de croissance entraîne une prolongation continue de la phase de latence jusqu'à ce que la multiplication cesse et la croissance du microorganisme s'arrête (**Doyle et al ., 1997**).

Lors d'une conservation par congélation des souches microbiennes, il est difficile de tenir toutes leur propriétés, et l'action de froid peut induire une diminution de leur viabilité (**Denis et al., 2006**).

C'est dans ce cadre que cette étude a été menée au niveau du laboratoire du centre universitaire de Ain Temouchent, l'objectif est d'évaluer le pouvoir de former un biofilm par des souches de *candidas sp.* isolées à partir des cathéters prélevés du CHU de Tlemcen après leur conservation depuis 2012.

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biologie du Centre Universitaire d'Ain T'émouchent.

Les manipulations décrites ci-dessous, ont été répétées plusieurs fois dans les mêmes conditions.

1. Souches étudiées :

Une collection de souches de *Candida sp.* isolées à partir des cathéters périphérique vénéneux prélevés des services de Cardiologie et de Chirurgie Générale entre Février et Aout **2012** du CHU de Tlemcen, les souches sont conservées à 4°C sur gélose Sabouraud a été le sujet de cette étude (**Seghir,2015**). Il s'agit d'une souche de *candida glabrata*, une souche de *candida albicans* et deux souches de *candida parapsilosis*.

2. Formation de biofilm :

Une pré-culture de *Candida sp.* dans 20mL de milieu sabouraud liquide a été effectuée. Après incubation à 30°C pendant 24 heures, la suspension est centrifugée 3000 g pendant 5 minutes deux à trois fois. Le culot subit un lavage après chaque centrifugation avec le tampon phosphate salé (PBS) à 10 mM et un pH de 7,4 puis resuspendu dans le TSB. Par dénombrement des levures sur cellule de Thoma concentration cellulaire est fixée à 10^6 cellules/ml. En suite 100 µL de cette suspension levuriénne sont déposés dans chaque puits d'une microplaque 96 puits. Qui doit être bien scellée puis placée dans une étuve à 37 °C pendant 48 heures (**Pierce et al.,2008 modifier**).

3. Mesure de la biomasse:

Le Crystal violet se lie aux molécules extracellulaires chargées négativement, tel que les molécules de la surface cellulaire ou les polysaccharides de la matrice exopolymérique des biofilms (**Li et al., 2003**) donc la quantité de biomasse à l'intérieur du biofilm sera mesuré par la technique de coloration au Crystal violet (**Christensen et al., 1985**).

Après la formation du biofilm, le milieu est aspiré et les puits sont lavés 03 fois avec du PBS stérile (10 mM pH 7,4) pour éliminer les cellules planctoniques et /ou les cellules non adhérentes. Pour la fixation du biofilm, 100 µL de méthanol (99%) sont ajoutés. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, les puits sont lavés et remplis par 100 µL d'une solution de Crystal violet (2,5%). Les plaques sont incubées pendant 20 min et le biofilms est libéré par addition de 150 µL d'acide acétique (33%) La densité optique est ensuite lue à 570 à l'aide d'un colorimètre.

Résultats et Discussion

L'incidence des infections fongiques a considérablement augmenté au cours des dernières décennies. Très souvent, ces infections sont associées à la formation de biofilm sur des biomatériaux implantés et / ou des surfaces d'hôtes (**Pierce et al, 2008**).

L'objectif principal de cette étude est de tester la capacité de certaines souches *Candida sp.* à former des biofilms *in vitro* après une longue durée de conservation.

Pour cela nous avons testé le pouvoir de 04 souches appartenant tous au genre *Candida*. Il s'agit d'une souche *Candida albicans*, 02 souches de *Candida parapsilosis*, et une souche de *Candida glabrata* isolées en 2012 du CHU de Tlemcen.

Les résultats relatifs à la formation des biofilms par les souches de *Candida sp.* sont regroupés sur **la figure 6** qui représente les densités optiques proportionnelles aux quantité de biofilms formés par les souches de *Candida sp.* sur milieu TSB.

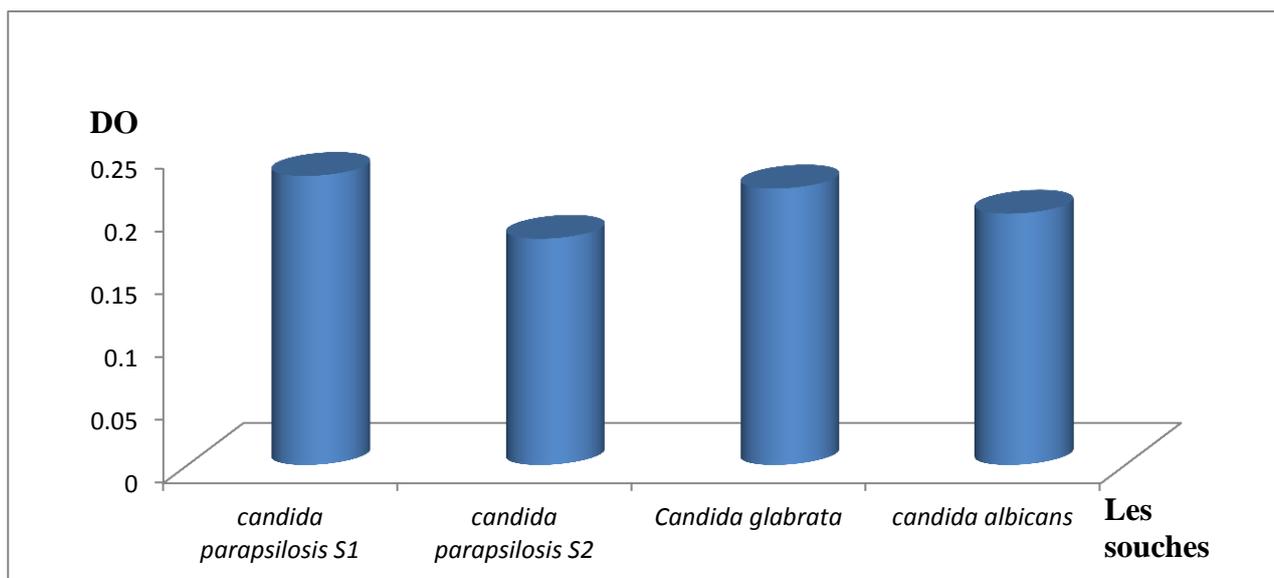


Figure 6 : Biomasse des biofilms de *Candida sp.* formés sur milieu TSB.

Les résultats obtenus montrent que les deux souches de *Candida parapsilosis* S₁ et S₂ testées ne possèdent pas le même potentiel à former un biofilm, les DO enregistré sont de 0,23 pour *Candida parapsilosis* S₁ et 0,18 pour *Candida parapsilosis* S₂ alors que les souches *Candida glabrata* et *Candida albicans* ont enregistré des proches de *C.parapsilosis* S₁(0,22 et 0,20 respectivement).

Ces mêmes souches ont montré un potentiel plus important à formé des biofilms dans le RPMI 1640 (Annexe1).les valeurs sont comprise entre (1 et 0,43), la valeur la plus importante a été enregistrée par *Candida parapsilosis* S₁. En effet, d'après **Krom et al (2007)**, les biofilms formés sur milieu RPMI 1640 montrent une biomasse fongique importante.

Nous avons remarqué que toutes les souches de *Candida sp.* testée ont formé les biofilms dans le milieu TSB et même dans l' RPMI, ceci est en accord avec les travaux de l'équipe de **Ferreira (2013)**, qui ont montré que 100% des isolats cliniques de *Candida sp.* forment les biofilms.

Il est décrit que la formation in vitro de biofilm peut varier considérablement d'un milieu de culture à l'autre et la capacité d'une souche à produire du biofilm dans un milieu ne permet pas de prédire sa formation dans un autre milieu (**Naves et al ., 2008**).

Les résultats ont montré également une différence entre les deux milieux ceux-ci peut être expliqué par les travaux de **Grinan(2012)**, qui a montré que la formation des biofilms matures est fortement dépendante de la composition du milieu (Annexes 3 et 4) .La présence de concentrations plus élevées d'acides aminés favorisera une croissance favorable du biofilm selon **Weerasekera (2016)**.

Les résultats de la quantification des biofilms par la méthode du Crystal violet vont dans le le même sens que les résultats de **Kuhn et al (2002)** , **Li et al (2003)** qui ont démontré que cette quantité varie entre les espèces étudiées et entre les souches de la même espèce.

Selon les travaux de **Kumamoto en 2002**, *C. parapsilosis* est capable de former des biofilms, associé à des taux d'infection plus élevés par rapport aux cellules planctoniques.

Contrairement à nos travaux, ceux de **Weems (1992)**, ont montré que *Candida albicans* forme plus de biofilms que les autres souches de ce genre, et le biofilm de *C. parapsilosis* est formé exclusivement de blastospores avec un minimum de matrice extracellulaire et produit qualitativement et quantitativement moins de biofilm. [(**Blankenship et Mitchell, 2006**) ; (**Kuhn et al., 2002**)].

De plus, il ressort de notre étude que nos souches testées ont formé des biofilms et cela malgré la longue durée de conservation, la viabilité des souches durant la période de la conservation s'explique par la basse température qui permet l'arrêt des réactions chimiques, et la présence de nutriments dans le milieu de conservation (**Denis et al, 2006**).

Cependant la variation entre les différentes souches peut être expliquée par les travaux de **Pascal en 2004** qui a montré que la sensibilité des microorganismes au froid et plus particulièrement à la congélation varie en fonction de l'espèce.

Après **Danis et al (2013)** plusieurs facteurs interviennent sur la viabilité des souches microbiennes lors d'une conservation par congélation tel que le milieu, la cinétique de refroidissement, les conditions de stockage (durée-températures) puis les conditions de décongélation.

La formation des cristaux de glace peut endommager les cellules. Ce phénomène est plus important si la pression osmotique à l'intérieur de la cellule est différente de celle du milieu environnant.

Les mécanismes de dommage de glace intracellulaire ne sont pas entièrement connus, mais la destruction physique des membranes, la formation de bulles de gaz et de la perturbation des organites peut en faire partie (**Ben Gattat, 2015**).

Cependant, il est parfois difficile d'assurer le maintien à long terme de toutes les propriétés des souches car le stress subi par les cellules lors d'un choc hypothermique peut provoquer une diminution de leur viabilité et de leurs activités métaboliques au cours d'une conservation par congélation (**Denis et al, 2006**).

Conclusion Générale

Notre objectif principal derrière cette étude c'est d'évaluer l'effet de la conservation sur le pouvoir de formation d'un biofilm, et dans un deuxième temps mesurer la biomasse formée par la méthode de Crystal violet.

Les résultats de cette étude ont montré que la capacité des souches de *Candida sp.* testées à former le biofilm reste importante malgré la durée de la conservation.

La formation la plus significative a été mesurée chez la souche *Candida parapsilosis S₁* dans le milieu TSB avec une DO de 0,23.

Pour compléter ce travail il serait intéressant :

- D'élargir l'étude de l'effet de la conservation sur la viabilité des souches pour couvrir plusieurs conditions de conservation.
- D'étudier un nombre plus important d'espèces et de souches prélevées dans d'autres milieux de cultures.

Références Bibliographiques

1. **Al-Fattani, M.A., Douglas L.J. (2006).** Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drugresistance. *Journal of MedicalMicrobiology*, 55, 999-1008.
2. **Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie(ANOFEL)** 2014.Université Médicale Virtuelle Francophone.
3. **Baillie, G.S., Douglas, L. J.(1999)** .Role of dimorphism in the développment of *Candida albicans* biofilms. *Journal. Medical. Microbiology*. 48(7), 671-679.
4. **Baillie, G.S. and Douglas, L.J. (2000).** Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 46 (3),397-403.
5. **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.
6. **Boyd, A., Chakrabarty, A.M. (1994).** Role of alginate lyase in cell détachement of *Pseudomonas aeruginosa*. *App and Environmental Microbiology*, 60(7),2355–2359.
7. **Boo, T.W., O'Reilly, B.,O'Laery, J. , Cryan B.(2005).** Condidémie in an Irish tiertary referral hospital : Epidemiology and prognostic factors.*Mycoses* ; 48 (4)251-9.
8. **Ben Guettane R (2015).** Effet de quelque cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche de *lactoquoque* isolée à partir de lait caprin.Master acadamique,Université Kasdi Merbeh OUARGLA.
9. **Bermen, J., Sudbery, P. (2002).** *Candida albicans* : une révolution moléculaire fondée sur les leçons de la levure en herbe. *Nature Reviews Genetics* **3** , 918 – 931.
10. **Blankenship, J.R., Mitchell, A.P. (2006)** How to build a biofilm : a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 588-594.
11. **Chalvet de Rochemonteix, A., (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse de doctorat. Faculté de Médecine de Creil. Ecole Nationale Vétérinaire.
12. **Clutterbuck,A.L.,Woods, E.J. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary médecine. *Veterinary. Microbiol.*;121(1-2), 1-17
13. **Costerton, JW1., Lewandowski, Z., Korber, D.R, Lappin-Scott, HM.(1995)** Microbial biofilms. *Annual.Rev.Microbiol.* 49:711-45.19945.

14. Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, A. (2001). Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*; 183(18), 5385-5394.
15. Chauhan, N., Latge J.P., Calderone, R. (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nature Reviews Microbiology*; 4 (6), 435-444.
16. Catherine, Dreanno, Romain Briande, Lisefechner, Miorielle, Naitali. (2012). Biofilm quand les microbes s'organisent, collection carnets de science 8-15.
17. Calderon, R.A., Fozzi Wa. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Fundamental Microbiology* (7); 327-35.
18. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J. J., Baddour. (1985). Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture: a quantitative model for adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22(6).996-1006.
19. Carrière, C., Marchandin, H. (2001). Infection liée aux cathéters veineux centraux. Diagnostic et définition, *Néphrologie* 22(8), 433-437.
20. Catherine, Dupeyron. (2011). L'homme et les micro-organismes. Formation permanente et développement de santé. Créteil, France.
21. Donlan, R.M. (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 277.
22. Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
23. Douglas, L. J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*; 11(1), 30-36.
24. Denis, C., Beal C., Bouix M., Chamba J F., Jamet E., Ogier J C., Panoff J M., Rault A., Thammavongs A. et Thierry A. (2006). Congélation de microorganismes d'intérêt laitier : optimisation des conditions d'adaptation des souches avant congélation et des conditions de remise en culture après congélation. *Les Actes du BRG*, 6 16 : 433- 448.
25. Denis, C., Champomier-vergès, M. C., Zagorec, M., Talon, R., Michel, V. (2013). Critères de sélection des micro-organismes bioprotecteurs. *Flores protectrices pour la conservation des aliments*, 7.
26. Doyle, M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (1997). *Food microbiology : fundamentals and frontiers* Washington DC :ASM Press. P 94.

27. **David Lebeaux, Jean-Marc Ghigo. (2012)** .Infection associés aux biofilms. *Revue de médecine et science* ;28 :727-739.
28. **Davies, D.G., Geesey, G.G. (1995)**. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and environmental microbiology*, 61(3), 860-867.
29. **Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N., Wenzel, R. P. (1999)**. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical infectious diseases*, 29(2), 239-244.
30. **Ferreira, A.V., Prado, C.G., Carvalho, R.R. Dias, K.S.T. and Dias A.L.T. (2013)** *Candida albicans* and Non *albicans Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Mycopathologia*; 175 : 265–272.
31. **Flemming, H.C., Wingender, J. (2010)**. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*; 8 :623–633.
32. **Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E., Butler G. (2006)**. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.*, 6(1), 99.
33. **Simon, F., Rebeaudet S., Depinaj, J., Rapp C., Kramer, P., Savini, H., Demortier E (2007)** Maladie infectieuse, le risque nosocomial en Afrique intertropicale. *Med trop* ;68 :73-82
34. **Géraldine L. Klein^{1,2}, Alain Dufour² et Chantal Compère (2010)** De nouvelles voies d'inhibition des biofilms. Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, Université de Bretagne-Sud.
35. **Gilbert, A., Das, J., Foley I (1997)** Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. Department of Pharmacy University of Manchester Oxford Road ; 160-167.
36. **Grinand, N. (2012)**. *Les biofilms à Candida spp: épidémiologie et sensibilité aux antifongiques* (Doctoral dissertation, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Nantes. Faculté de pharmacie, France).
37. **Hawser, S.P. and Douglas L.J. (1994)** Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*; 62(2), 915-921.
38. **Haynes K (2001)**. Virulence in *Candida sp.* *trends in microbiologie* ;9 (12) : 531-596.
39. **Irie, Y., Parsek, M.R. (2008)**. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322: 67- 84.

40. **Jabra-Rizk ,M.A., Falkler, W.A. and Meiller, T.F. (2004)** Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*; 10: 14-19.
41. **James, T.Y.,Kauff F., Schoch, C.L., Matheny P.B ,(2006).** Reconstructing the early evaluation of fungi using a six gene phylogeny.Nature.443 (7113),818-22.
42. **Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., Kozik, A. (2009).**Fungi pathogenic to humans: molecular basesof virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochimica Polonica* 56, 211-224.
43. **Korea, CG, Ghigo, JM., Beloin C. (211).**The sweet connection: solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*. Multiple *E. coli* fimbriaeforma versatile arsenal of sugar-binding lectins potentiallyinvolved in surface-colonisation and tissue tropism. *Bioessays* 2011 ; 33 : 300–31
44. **Krom, B.P., Cohen, J.B., Feser, G.E.M., Cihlar R.L. (2007).** Optimized candidal biofilm microtiter assay. *Journal Microbiol Methods*, 68(2), 421-432.
45. **Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2002).** Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.*, 70(2), 878 - 888.
46. **Kumamoto, C.A. (2002)** *Candida* biofilms. *Current Opinion inMicrobiology*, 5(6), 608 - 611.
47. **Li, x., Yan, Z., Xu J. (2003).** Quantitative variation of biofilm amongstrains in natural populations of *candida albicans*. *Microbiologie*,149 (2),353-62.
48. **Lopez, DI. (2010).** Lyophilisation par moussage du *bifidobacterum longum* Ro 175 :viabilité après déshydratation et stabilité pendant l’entreposage . Université Laval 10-32.
49. **Landini ,P., Antoniani, D., Burgess ,JG., Nijland ,R. (2010).** Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol* ; 86(3), 813–823.
50. **Melek Fadila (2013).**le biofilm en industrie laitière :caractérisation ,facteur de développement et élimination. Faculté de science de la nature et de vie. Université AboubakrBelkaidTelemcen. Thèse de doctoart .
51. **Ndour Ndiayta (2013)** Etude de la viabilité des souches de référence utilisées dans le contrôle microbiologique des anti microbiens(*Escherichia coli*ATCC25922*Pseudomonas aeruginosa*ATCC 27853 et *Enterococcusfaecalis*ATCC 29812)Faculté de Médecine ,de Pharmacie et d’odontologie .Université CHEIKH ANTA DIOP de Dakar.

52. **Nicklin, J., Gramen-cook, K .(2000).** Essentiel en microbiologie. Porte Royal Livre.Paris Chapitre A ,2-3.
53. **Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., ... & Soriano, F. (2008).** Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of applied microbiology*, 105(2), 585-590.
54. **Odds, F.C. (2010)** Molecular phylogenetic and epidemiology of *Candida*. *Future Microbiol .5*, 67-79.
55. **Perlroth, J., Choi, B., Spellberg, B. (2007).** Nosocomial fungal infections: epidemiology diagnosis, and treatment. *Medical Mycology* 45(4), 321-346.
56. **Pace, J.L., Rupp, M.E., Finch, R.G. (2006).** Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Taylor & Francis Group; New York, USA.
57. **Pascal Garry (2004)** La congélation des produits modifie-t-elle les résultats d'analyses microbiologiques ? Bulletin de liaison du CTSCCV/Vol .12. 14(3)5-12.
58. **Pierce,G.C., Priya, U., Amanda, R.T., Floyd L.J., Eilidh M., Gordon R., Jose L. (2008).** A simple and reproducible 96-well plate based method for the formation of fungal biofilms and its application to anti fungal susceptibility testing. *Nature protocols*, 3(9), 1494-1495.
59. **Ramage, G., Mowat, E., Jones B., Williams, C., Lopez-Ribot J. (2009).** Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*; 35 (4),340–355.
60. **Singh, PK., Parsek, MR., Greenberg, EP, Welsh MJ.(2002).** A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 2002 ; 417 : 552–555.
61. **Seddiki S.M.L. (2014).** Evaluation de la formation des biofilms de *Candida sp.* isolé des dispositifs médicaux au CHU de Sidi Belabés. Thèse de doctorat en biologie. Université de Tlemcen.
62. **Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Belkherroubi-Sari, L., & Boucherit, K. (2014).** Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen: épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. *Journal de Mycologie Médicale*, 24(4), e179-e184.
63. **Seddiki S.M.L. (2015).** Cours de la microbiologie générale .Centre universitaire de Naama.

64. **Seddiki, S. M. L., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Bads-Amir, S., Taleb, M., Kunkel, D. (2013).** Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *International journal of general medicine*, 6, 1.
65. **Thompson ,D.S., Carlisle, P.L.,, Kadosh D. (2011).** Coévolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*; 10 (9),1173-1182.
66. **Williams, D.W., Kuriyama, T., Silva S., Malic S., Lewis M.A. (2011).** *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol 2000*, 55(1), 250-265.
67. **Weems, J.J. (1992).** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical infectious diseases*, 14(3), 756-766.
68. **Weerasekera, M. M., Wijesinghe, G. K., Jayarathna, T. A., Gunasekara, C. P., Fernando, N., Kottegoda, N., & Samaranayake, L. P. (2016).** Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(11), 697-702.
69. **Yang, Y.L. (2003).** Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 36(4), 223-228.
70. **Zerrouk, H.(2013).** Evaluation de l'implantation du comité de lutte contre les infections nosocomiales au niveau de centre Hospitalier.Cycle de Master en administration sanitaire et santé publique.Centre collaborateur de l'OMS.

Annexes

Annexe 1 :

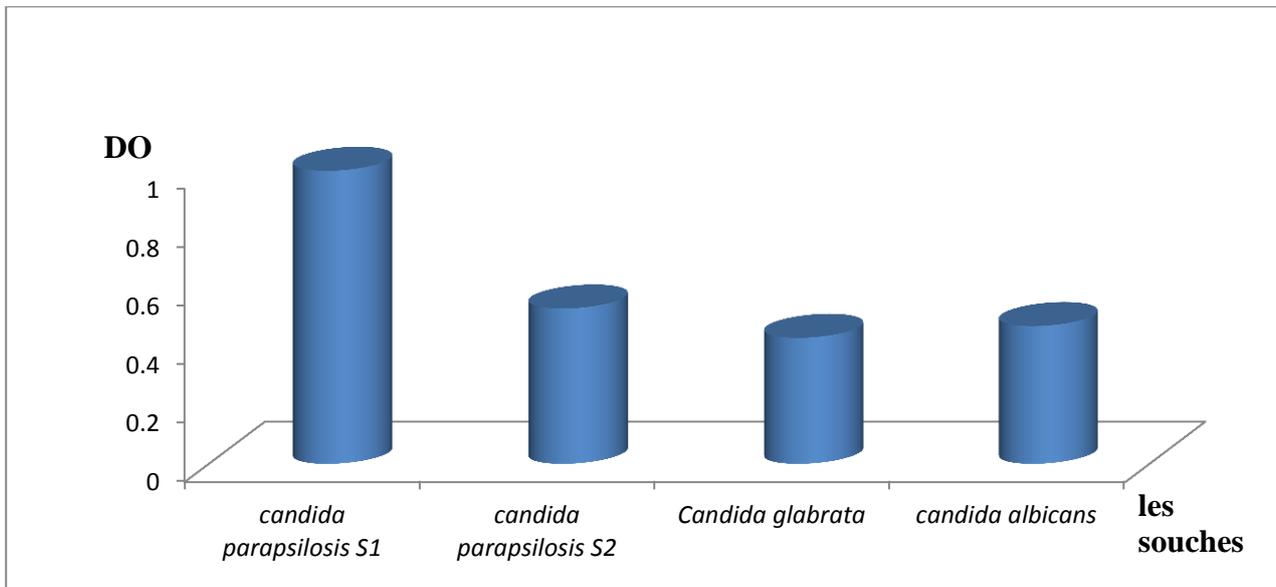


Figure 7 : Biomasse des biofilms de *candida sp.* formés sur milieu RPMI 1640

Annexe 2.1 :

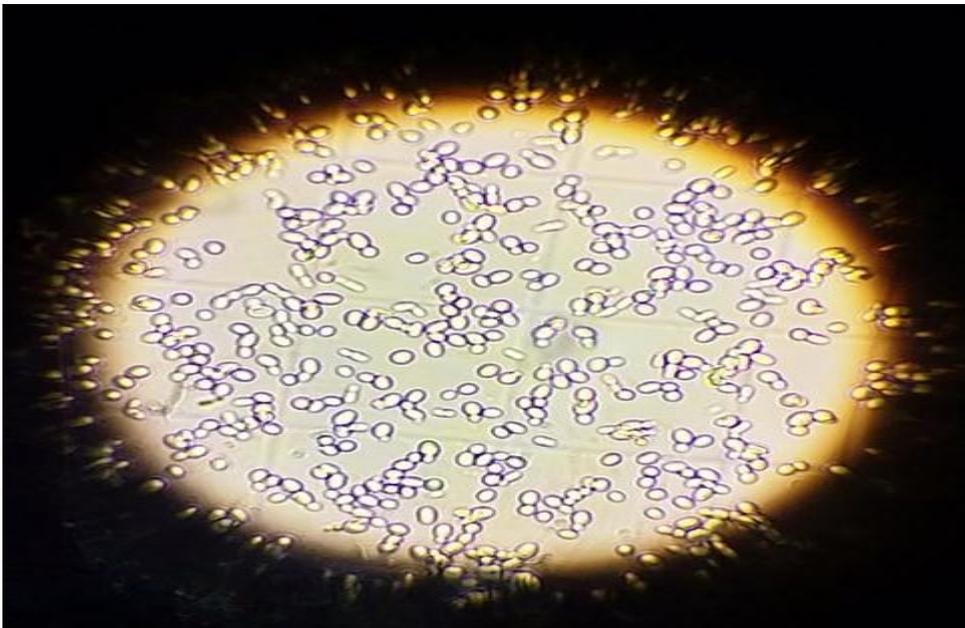


Photo 1 : Aspect de *candida sp.* sur cellule de Thomas vu par microscope électronique G40%.

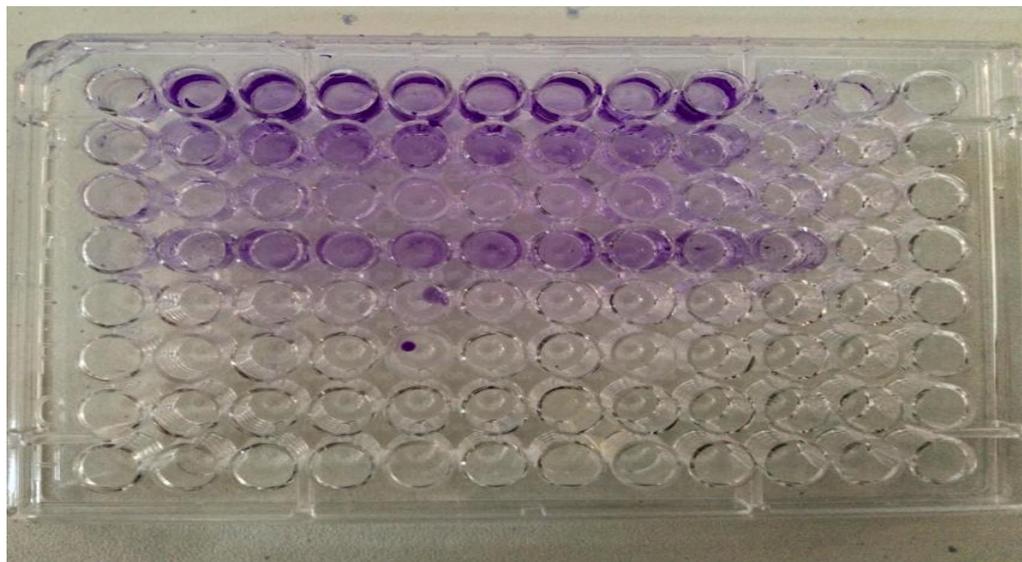
Annexe 2.2 :

Photo 2 : Coloration de biofilm par le cristaie violet sur microplaque 96 puits.

Annexe N°3.1: PBS (phosphate Bufferd Saline)

NaCl..... 137mM

Kcl.....2.7mM

Na₂HPO₄..... 10mM

NaH₂PO₄ 1.76mM

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

Annexe N ° 3.2: Sabouraud liquide

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

Casein peptone5g

Meat peptone 5g

Glucose20g

Eau distillée1000ml

Annexe N°3.3 : Gélose sabouraud

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

Casein peptone... ..5g

Meat peptone 5g

Glucose..... 40g

Agar...15g

Eau distillée.....1000ml

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

Annexe N°3.4 : Crystal violet 1%

Crystal violet1g

Eau distillée100ml

Annexe N° 3.5 : Milieu TSB

Peptone non animal.....20 g/L

Glucose.....2.5g/L

Nacl......5g/L

K₂Hpo₄.....2.5g/L

Eau distillée.....1000ml

Annexe 04 : Composition du milieu RPMI 1640

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