

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

Centre Universitaire Belhadj Bouchaib 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 Biochimie

Présenté par :

M^{me} SAHLI Safaa Ahlem

M^{me} DISSA Ahlem

Thème

*Evaluation de l'effet de différents tampons ajoutés
à un milieu de culture sur la croissance
microbienne.*

Soutenu le : 26 JUILLET 2019

Devant le jury composé de :

Président : M ^{me} BRIXI-GORMAT-BENMANSOUR Nassima	MCB	C.U d'AïnTémouchent
Examineur : M ^{me} BEKKAL BRIKCI- BENHABIB Ouassila	MAB	C.U d'Aïn-Témouchent
Encadrant : M ^R SEGHIR Abdelfatteh	MCA	C.U d'Aïn-Témouchent

Année Universitaire : 2018/2019

Résumé

Les infections nosocomiales représentent un véritable problème de santé publique, les levures peuvent adhérer aux implants médicaux et s'organiser en structures multicellulaires dites "Biofilms".

La distinction entre une simple contamination et une infection du cathéter est primordiale pour une meilleure prise en charge de ces levures. Malheureusement, actuellement il n'existe pas de techniques rapides et fiables pour ces études. Dans ce contexte nous avons entrepris cette étude qui consiste à évaluer, d'une part, le pouvoir de souches de *Candida sp.* à former des biofilms. D'autre part, de tester l'effet des solutions tampons sur la formation de ces structures microbiennes qui seront mis en évidence par la méthode de cristal violet.

Les résultats obtenus ont montré la capacité des quatre souches de *Candida sp.* à former les biofilms, dont la quantité est plus importante en présence du tampon.

Mots clés : *Candidas sp.* Cathéters, biofilms, infectivité.

ملخص

عدوى المستشفيات تطرح مشكلا حقيقيا بالنسبة للصحة العمومية لما لها من خطورة تمكنها من ان تلتصق بالأدوات الطبية وتنظم في بناء متعدد الخلايا يسمى أغشية حيوية رغم هذا لا توجد في الوقت الراهن أي طريقة تسمح بالكشف والتفريق بين مجرد الإصابة الفطرية والعدوى المرتبطة بالقسطرة

في هذا السياق، قمنا بهذه الدراسة، والتي تهدف للتحقيق، اولاً، من مدى قدرة سلالات *Candidas sp.* على تشكيل الأغشية الحيوية، وثانياً، لاختبار تأثير التحاليل العازلة على تكوين الأغشية الحيوية التي تتم بواسطة طريقة البنفسج البلوري
Cristal Violet

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها قدرة سلالات المبيضات الأربعة على تشكيل الأغشية الحيوية، كما بينت النتائج ان كمية الاغشية كانت أكبر مع وجود المحلول العازل

الكلمات المفتاحية: قسطرة، المبيضات، الأغشية الحيوية، العدوى

Summary

Nosocomial infections represent a real public health problem; yeasts can adhere to medical implants and organize themselves into multicellular structures called "Biofilms".

The distinction between a simple contamination and an infection of the catheter that promote the formation of biofilms. Unfortunately, there are currently no fast and reliable techniques for these studies. In this context, we undertook this study, which consists of evaluating, on the one hand, the power of *Candida sp.* to form biofilms. On the other hand, to test the effect of buffer solutions on the formation of these microbial structures that will be highlighted by the crystal violet method.

The results obtained showed the capacity of the four strains of *Candida sp.* to form the biofilms, the quantity of which is greater in the presence of the buffer.

Keywords: *Candida sp.*, biofilms, catheters, infectivity

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma mère, ce travail est le fruit de tes efforts, des longues années de sacrifices auxquels tu as Consentis.

J'ai en mémoire la ferme volonté que t'animait de me voir réussir dans mes études.

Je ne trouverai jamais assez de mots pour t'exprimer toute ma gratitude et mon affection.

A mon père, ce travail est le tien. Tu m'as aidé et encouragé, tu as rempli ton devoir envers nous, tu nous as mis dans le droit chemin.

A ma grande mère, à mes frères, à mon marié pour son soutien à chaque moment et son encouragement.

A mon binôme, je dédie ce travail pour notre amitié de 18 ans.

A mes copines Inayet et Jawida

Safaà

Dédicaces

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

A ma mère à qui je ne saurais exprimer ma profonde gratitude, à son regard si pétillant et sa complicité si profonde.

A mon père qui n'a jamais cessé de me soutenir matériellement et moralement pour que je puisse avoir une bonne formation et surtout être la meilleure et à qui je voudrais exprimer mes affections.

A mes sœurs : Sihem, Nacera, Hakima, Safaa et mon frère Yacine.

A mon époux avec qui je me sens plus forte et plus confiante chaque jour. Merci de m'avoir changé les idées quand il le fallait, merci de ta patience, de ton encouragement, de ton soutien.

A mon binôme et ma chère amie Safaa.

Ainsi ma copine Inayet.

Ahlem

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Notre remerciements vont à nos chers parents qui ont toujours été là pour nous et qui ont nous donner la force pour réaliser ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre encadreur Mr. SEGHIR Abdelfattah, 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 pour sa patience, sa disponibilité et surtout pour ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous tenons tout particulièrement à remercier chaleureusement Mme BRIXI-GORMAT-BENMANSOUR Nassima, Maître de conférences Classe B et responsable de master Biochimie au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie au centre universitaire d'Ain Témouchent, qui nous a fait l'honneur de présider le jury. Nous lui exprimons notre haute considération

Nous remercions vivement Mme BEKKAL BRIKCI- BENHABIB Ouassila , Maître assistante Classe B au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, au Centre Universitaire de Ain Temouchent, qui nous fait l'honneur de faire partie de ce jury

Nous tenons à remercier tous nos enseignants qui nous ont accompagnés durant notre parcours universitaire

Nous remercie également le responsable du laboratoire Mr. Rahmani Khaled pour son aide et ses conseils.

Nous remercions vivement les étudiants de la promotion de Master Microbiologie ,et tout particulièrement Mme Mabrouk Saadia ,pour leur aide durant toute la période de la préparation de ce travail

AHLEM / SAFAA

Sommaire

Introduction	2
Première partie : Synthèse bibliographique	4
1. Généralités	4
2. Les différents étapes de formation d'un biofilm	5
3. Les facteurs favorisant la formation du biofilm	6
A. Les caractéristiques de la surface	6
B. Les caractéristiques des micro-organismes	6
C. Les caractéristiques du milieu	7
1. PH	7
4. Milieu de culture	7
5. Description des espèces pathogènes de <i>Candida</i>	8
1. <i>Candida albicans</i>	8
2. <i>Candida glabrata</i>	9
3. <i>Candida parapsilosis</i>	9
Deuxième partie : Matériel et Méthode	11
1. Matériel biologique:	11
2. Evaluation de la capacité des souches isolées à former un biofilm:	11
1. Formation de biofilm	11
2. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet.....	12
Troisième partie : Résultats et discussion	14
1. Evaluation de la formation de biofilm chez les souches candida isolée cathéter :	14
2. Formation de biofilm:	15
Quatrième partie : Conclusion générale	20
Cinquième partie : Références bibliographiques	22
Sixième partie : Annexes	32

Liste des figures

Figure N°1 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm par <i>Candida albican</i> à la surface d'un cathéter.....	06
Figure N°2 : Morphologie de <i>Candida albicans</i>	09
Figure N°3 : principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques.....	11
Figure N°4 : Biomasse des biofilms formés sur TSB par la méthode du Crystal violet (avec et sans tampon).....	15

Liste des photos

Photo N°1 : comptage des <i>candidas sp.</i> par la cellule de thomas.....	32
---	----

Liste des abréviations

- CHU** : Centre Hospitalier Universitaire
- CV** : Cristal Violet
- DO** : Densité Optique
- MOPS** : 3-(N-morpholino) Propan sulfonic acid
- PBS** : Phosphate Buffered Saline ‘‘ Tampon Phosphate Salé ’
- PRMI** : Roswell Park Memorial Institute medium
- QS** : Quorum Sensing
- EPS** : Extracellulaire Polymérie Substances
- TCP** : culture de tissu en plaque
- TSB** : Trypticase Soja Broth

Introduction

Introduction

Les microorganismes sont composés majoritairement des Bactérie et des Archée, mais également d'eucaryotes unicellulaires tels que certains champignons et protozoaires (**Pace, 2006**).

La plupart des micro-organismes (bactéries et champignons) dans la nature optent pour un mode de vie en communautés qui se trouvent fixées sur un support plutôt qu'être libre et isolées dans le milieu environnemental (**Fillox et Valet ,2003**).

L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet aux microorganismes de s'installer et de coloniser un environnement comme les tissus vivant et les dispositifs médicaux (**Espinasse et al., 2010**). Notons qu'une proportion importante des infections microbiennes qui touchent les humaines sont associées à la formation de biofilm [(**Douglas, 2003**) ; (**Shircliff et al., 2009**)].

Les infections contractées au niveau des hôpitaux, dues aux biofilms, sont de plus en plus fréquentes et représentent un véritable problème de santé publique (**Phaeuf et Gadbois, 2010**).

Parmi les différentes études des microorganismes au laboratoire nous citons l'étude des facteurs physicochimiques qui peuvent influencer le processus d'adhésion, maturation et la restructuration des microorganismes tels que le PH du milieu environnant et l'hydrophobicité de la surface cellulaire (**Beloin et Ghigo, 2005**).

Le pH est un facteur important, qui doit être pris en compte lors de l'étude de l'adhésion des microorganismes pour former les biofilms. Les données disponibles montrent que le pH optimal pour l'attachement des espèces de *Candida sp.* varie de 6 à 7 et est fonction du site corporel concerné [(**Sobel et al., 1981**) ; (**Wagner et Ottesen, 1982**)].

En Algérie, des travaux réalisés au sein du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique, montrent que les levures du genre *Candida sp.* sont les champignons les plus souvent isolés à partir des dispositifs médicaux. En effet, selon **Boucherit-Atmani et ses collaborateurs (2011)**.

L'objectif de cette étude est la mise au point que des milieux biologiques sont des milieux tamponnés. En effet, il est important que le pH d'un milieu biologique soit stable. Le pH joue un rôle majeur sur la stabilité de croissance des microorganismes et il agit sur leur activité.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1. Généralités

L'hôpital est un des lieux à risque d'infection, le regroupement dans un même lieu des malades atteints des maladies souvent graves. Une infection est dite nosocomiale IN si elle apparaît après la sortie de l'établissement et si elle était absente à l'admission à l'hôpital ; un délai d'au moins 48 heures après l'admission est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire (**Rossignol, 2007**).

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

Les micro-organismes dont les levures sont les formes les plus simples de la vie et ils constituent la majorité de la biomasse vivante. Le biofilm est la principale forme de vie microbienne, en conséquence il est de plus en plus étudié en tant que système d'organisation communautaire pour ces micro-organismes [(**Briandet et al., 2012**) ; (**Mann & Wozniak, 2012**) ; (**Wagner et al., 2010**)].

Les biofilms ont été décrits pour la première fois au cours du dix-septième siècle par Van Leeuwenhoek qui a examiné les « animalcules » de sa plaque dentaire. Ce n'est que dans les années 40 que les travaux de **Claude Zobell** vont aboutir à l'élaboration du concept de l'adhésion bactérienne. **Zobell** a remarqué que le développement des colonies de micro-organismes marines a lieu préférentiellement sur une surface (**Zobell, 1943**). Cette observation a été ensuite étendue à une variété de systèmes microbiens par **le groupe de Costerton**, qui a démontré que la majorité des micro-organismes (99,99 %) se trouvent sous forme de biofilms et que ces micro-organismes dites sessiles diffèrent profondément de leurs équivalentes planctoniques. (**Costerton et al., 1978**). Une simple recherche de publications avec le mot clé « biofilms » montre que les recherches sur les biofilms ont explosé à partir des années 2000 (**Lawrence et al., 1991**).

Les biofilms sont à l'origine d'infections contractées en milieu hospitalier, le plus souvent en rapport avec l'utilisation de dispositifs médicaux [(**Burin Des Roziers, 2002**) ; (**De Chalvet De Rochemonteix, 2009**)], Ces micro-organismes peuvent être considérés comme un ciment moléculaire composé d'un réseau matriciel polysaccharidique excrété par les microorganismes et dans lequel ces derniers vont vivre en communauté (**Poissy, 2015**).

Synthèse bibliographique

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

Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut aussi réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, tels que les facteurs de virulence extracellulaires [(Clutterbuck, 2007) ; (Irie, 2008)].

Deux molécules sont impliquées dans ce système de communication chez les levures *Candidas*, il s'agit du tyrosol et du farnésol.

2. Les différentes étapes de formation d'un biofilm :

La formation d'un biofilm microbien est un phénomène extrêmement complexe, nécessite plusieurs étapes et se déroule selon une séquence bien établie [(Botto, 2003) ; (Haras, 2005)] (Figure N°1).

Premièrement, Les molécules, organiques ou inorganiques, présentes dans un milieu aqueux, sont attirées vers les surfaces et forment le film conditionnant qui semble nécessaire pour l'adhésion des bactéries sur une surface (Palmer et al., 2007).

En seconde temps, en milieu liquide ou exposé à l'humidité et en présence d'un film conditionnant, les microorganismes planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles) (Hoiby et al., 2011). Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher. Cette étape est influencée par des conditions environnementales. [(Branger et al., 2007 ; Pecastaings, 2010 ; Muller et Guaguere, 2014)].

La troisième étape est caractérisée par la formation de micro-colonies composées à la fois des microorganismes pionniers qui se divisent et des microorganismes qui s'attachent sur le biofilm en formation. Le stade de maturation correspond au développement des micro-colonies et à la structuration du biofilm. Les espaces séparant les micro-colonies deviennent les canaux du biofilm à l'intérieur desquels les fluides nutritifs peuvent circuler. Certains microorganismes peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces (Roux et Ghigou, 2006).

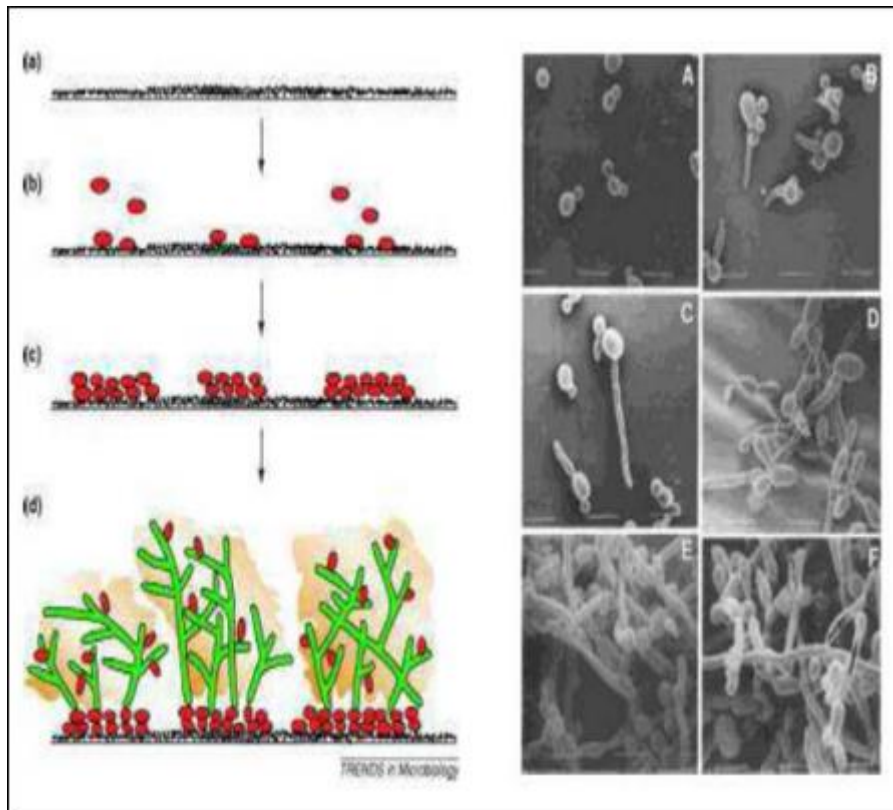


Figure N°1: Les différentes étapes de formation d'un biofilm par *Candida albican* à la surface d'un cathéter. (Douglas, 2003).

3. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels : la surface, le milieu et les microorganismes (Branger et al., 2007).

A/Les caractéristiques de la surface :

La rugosité, les propriétés physicochimiques et la formation préalable d'un film protéique sur une surface influencent l'attachement des microorganismes à cette surface et par conséquent la formation d'un biofilm. [(Klein, 2011 ; Bellifa, 2014 ; Donlan et Costerton, 2002 ; Wirtanen et al.1995)].

B/.Caractéristiques des microorganismes :

La plupart des microorganismes sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influencent l'attachement des microorganismes sur une surface ; moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. [(Liesse Iyamba, 2012 ; Bellifa, 2014)], Cette association stable avec la surface s'établit grâce

Synthèse bibliographique

à des structures adhésives telles que des adhésines filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule,...) (**Perrin, 2009**).

Tous les microorganismes n'ont pas la même capacité à coloniser les surfaces et de grandes différences existent au sein d'une même espèce microbienne (**Kukavica-Ibrulj, 2007**).

C/ Les caractéristiques du milieu :

Comprenant les conditions environnementales telles que : la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, etc.) [(**Marchal, 2010 ; Lappin-Scott et al., 1992**)].

1. pH :

Le pH peut varier au cours de la distribution du fait d'une évolution de la concentration du CO₂ dissous (augmentation par aération dans le réservoir par exemple). L'adhésion des microorganismes au support est fortement influencée par le pH (**Gordon et al., 1981**).

Plusieurs essais en laboratoire ont prouvé que la majorité des micro-organismes se développent mieux à pH neutre ou légèrement alcalin [(**Bornet, 1989**). **Stanley (1983)**] avait montré que la fixation des micro-organismes peut varier selon le pH et qu'elle est généralement maximale à l'optimum métabolique. Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur PKa [(**Wu et al., 1994, Hamadi et al., 2004, Gaboriaud et al., 2006**)] ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion. [(**Hamadi et al., 2004 ; Boutaleb, 2007**)].

4. Milieu de culture :

Le mode de culture est une caractéristique importante qui peut modifier fortement l'adhésion des organismes. Le pH, l'osmolarité, la concentration en fer et l'oxygène sont importants à considérer dans le processus de formation des biofilms (**O'Toole et al., 2000**).

La température de croissance est aussi un facteur important d'accumulation du biofilm, elle affecte non seulement l'activité métabolique et enzymatique des microorganismes, mais aussi certains paramètres physico-chimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) [(**Briandet et al., 1999**). (**Cappello et al., 2006**)].

Synthèse bibliographique

ont montré qu'une élévation de la température de culture provoque une augmentation de la capacité d'adhésion de microorganisme par l'augmentation de l'hydrophobicité de sa surface.

Les conditions nutritives rencontrées dans le milieu affectent le devenir et le mode de vie d'une population microbienne (**Balestrino, 2006**). En effet, dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**).

5. Description quelques espèces pathogènes de *Candida sp.* :

Selon **Williams et ses collaborateurs (2011)**, ce genre comprend environ 350 espèces. Toutefois, seules quelques-unes sont rencontrées en pathologie humaine, il s'agit essentiellement de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* (**Odds, 2010**).

5.1. *Candida albicans*

Morphologiquement, *Candida albicans* est une levure aérobie non capsulée, non pigmentée qui peut mesurer de 3 à 15 µm. Elle se reproduit de façon asexuée par bourgeonnement multilatéral, formant ainsi des colonies blanches crémeuses lisses sur gélose (**Benkirane, 2014**).

Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes, appartient à la division des Ascomycètes, de l'ordre des Saccharomycetales, de la famille des Saccharomycetaceae mitosporiques (**Develoux et Bretagne, 2014**).

Elle se caractérise par un polymorphisme et se présente selon quatre formes morphologiques différentes :

- la forme blastospore ronde ou ovalaire.
- La forme pseudo-hyphes ou pseudo-mycélium composée d'une chaîne de Cellules identiques en longueur mais qui diffèrent en quantité de cytoplasme (**Barelle et al., 2006**).
- La forme hyphes ou mycélium vrai, spécifique à l'espèce *Candida albicans*, qui est une forme indispensable à l'adhérence et à l'invasion des tissus de l'hôte [(**Stokes et al., 2007**) ; (**Asmundsdóttir et al., 2009**)]. Ainsi, le biofilm qui abrite *Candida albicans* se compose d'un réseau dense de levures et des formes filamenteuses (hyphes et pseudohyphes) (**Alem et al., 2006**).

Synthèse bibliographique

- La forme chlamydospore à paroi épaisse, produite uniquement par *Candida albicans* et *Candida dubliniensis*, deux espèces pathogènes très proches (Staub et Morschhauser, 2007).

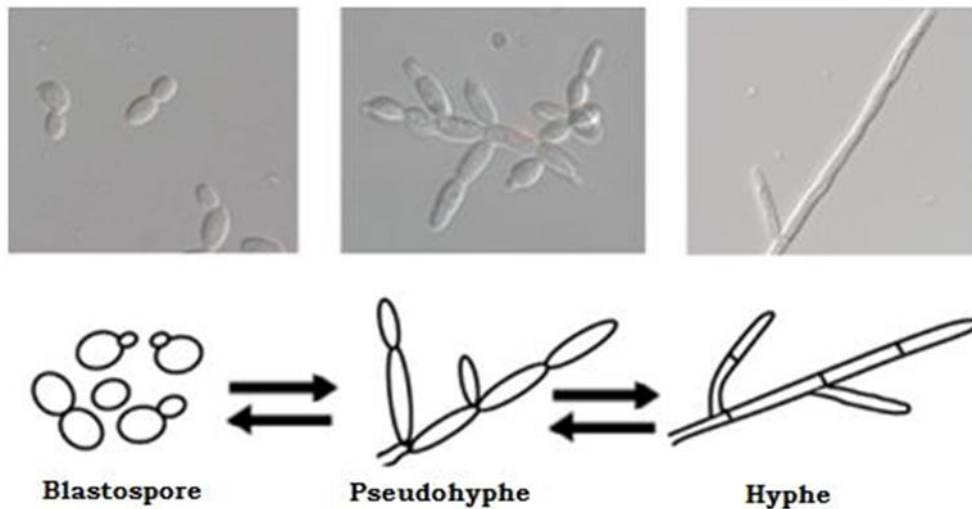


Figure N°2 : Morphologie de *Candida albicans* (Thompson et al. 2011)

C'est une levure commensale des muqueuses digestives et vaginales. 50 à 70% des individus en bonne santé seraient porteurs de cette levure. Son caractère dimorphique tenace qui correspond à sa capacité de changer de forme (transitions morphologiques entre la forme levure et la forme hyphe) [(Samaranayake et al., 2005) ; (Irimés et al., 2008)].

5.2. *Candida glabrata*

C'est une levure saprophyte de la flore normale de l'homme. Malgré qu'elle soit incapable de produire des formes filamenteuses, elle est considérée comme agent opportuniste responsable de candidémies, d'infections de l'appareil urinaire et de candidoses profondes [(Vandeputte et al., 2008) ; (Ahmad et al., 2014)].

5.3. *Candida parapsilosis*

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

Matériel et Méthode

Matériels 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. matériel biologique :

Les souches ont été collectées des prélèvements effectués entre février et août 2012 des services de chirurgie générale (A et B) et de cardiologie du CHU de Tlemcen (**Seghir et al, 2015**).

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

D'une souche *candida albicans*, d'une souches de *candida glabrata* et 02 souches de *candida parapsilosis*.

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

2.1 Formation de biofilm :

20 ml de précultures dans le milieu Sabouraud liquide sont réalisées à partir des souches de levures isolées des cathéters prélevés. Après 16 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes, la suspension est centrifugée à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec mélange de 1000 ml contenant PBS (tampon phosphate salé) à pH 7,4 0,1M, puis resuspendu dans le milieu de culture choisi pour former le biofilm (sabouraud liquide + tampon K₂HPO₄ à pH 7.4) à raison de 10⁶ cellules/ml (**Pierce et al, 2008 (modifie)**).

Dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, 100 µL de la suspension levurienne sont additionnés, la plaque est scellée puis mise à incuber à 37°C pendant 48 heures.

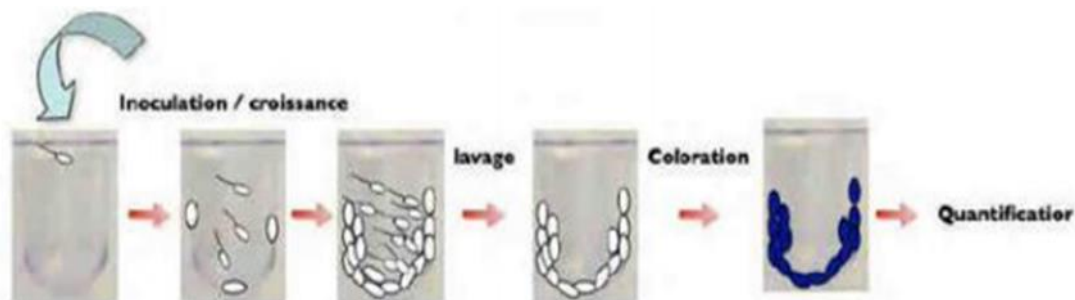


Figure N°3 : principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques
(**Laurent, 2011**).

2.2. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet :

La technique de coloration au Crystal violet mesure la quantité de biomasse à l'intérieur du biofilm (**Christensen et al., 1985**). Le Crystal violet se lie aux molécules extracellulaires chargées négativement, tels que les molécules de la surface cellulaire ou les polysaccharides de la matrice exopolymérique des biofilms (**Li et al., 2003**). Après la formation de biofilms, le milieu est aspiré et les puits sont lavés 3 fois avec du PBS (pH 7,4 0,1M) stérile pour écarter les cellules planctoniques et/ou les cellules non adhérentes.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Evaluation de la formation de biofilm chez les souches *Candida sp.* isolée cathéter :

La capacité d'une souche à former un biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreux microorganismes, dont les levures *Candida sp.*

Le rôle pathogène des biofilms est maintenant bien établi dans de nombreuses infections chroniques et infections sur matériel, leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques en font de véritables problèmes de santé publique il serait donc intéressant pour les laboratoires de microbiologie médicale de disposer d'une technique universelle, permettant d'étudier *in vitro* la capacité d'une souche à former un biofilm [(**oliverira et cunha mde,2010 ;sandberg et al.,2009 ;tote et al.,2008**)].

Les souches étudiées proviennent des prélèvements à partir des cathéters et l'objectif de ce travail a été donc, l'évaluation *in vitro* de la capacité des souches isolées à former les biofilms, ainsi que l'effet des solutions tampons sur leur croissance.

Résultats et discussion

2. Formation de biofilm :

Les 4 souches ont été testées pour leur capacité de produire du biofilm *in vitro*. Ceci par la méthode quantitative de coloration au Crystal violet sur microplaque 96 puits en polypropylène.

Pour la formation des biofilms *in vitro*, nous avons utilisé le milieu de culture Tryptic Soy Broth (TSB) en présence et en absence du tampon K_2HPO_4 .

La figure N°4 regroupe les densités optiques relatives aux quantités des biofilms.

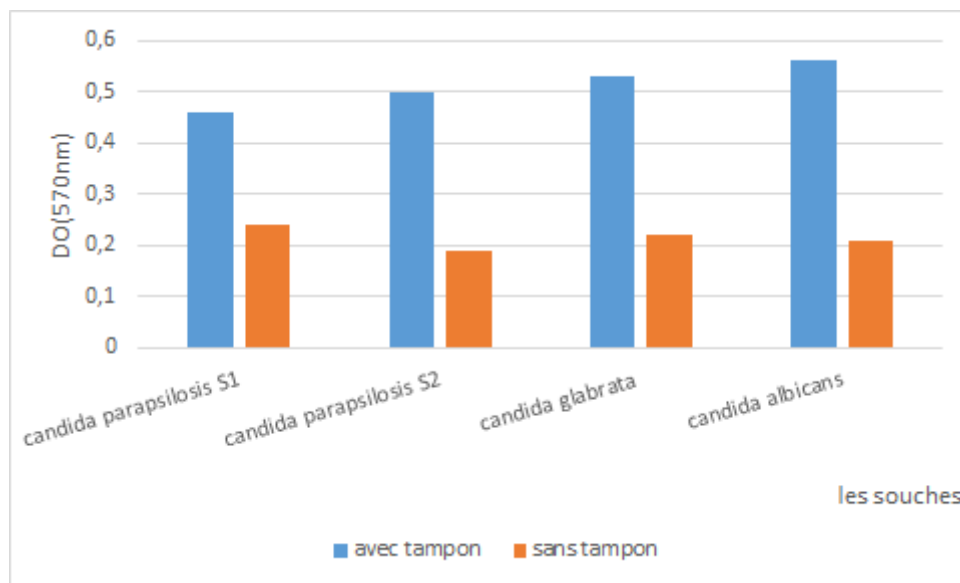


Figure N°4 : Biomasse des biofilms formés sur TSB par la méthode du Crystal violet (**avec et sans tampon**).

Nous remarquons sur la figure N°4 que toutes les souches de *Candida sp.* que nous avons testées ont formé les biofilms. Néanmoins, la biomasse des biofilms formés varie en fonction de la présence du tampon dans le milieu, des souches et de l'espèce. En effet, *Candida albicans* et *Candida glabrata* possèdent un potentiel relativement élevé pour former des biofilms avec une densité optique d'environ (0,56 ; 0,53) quand le milieu est tamponné. Par ailleurs, les deux *Candida parapsilosis* S1 et S2, ont présenté un potentiel de formation de biofilms moindre avec des absorbances comprises entre 0,46 et 0,5. Cependant les biomasses ont été inférieures quand le milieu de culture ne contenait pas de tampon, les absorbances n'ont pas dépassées 0,24.

Résultats et discussion

Discussion :

Les infections liées aux cathéters sont la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients hospitalisés et les biofilms microbiens sont associés à 90% de ces infections. Les biofilms de *Candida sp.* associés à un cathéter peuvent entraîner des infections du sang avec une incidence approximative d'un épisode pour 100 hospitalisations **(DiDone et al., 2011)**

Certains résultats prouvent que 100% des isolats cliniques de *Candida sp.* forment les biofilms sur tous les dispositifs médicaux implantés chez l'homme **[(Cuellar-Cruz et al., (2012) (Ferreira et al ;(2013)].**

Il a été montré que 86% de *C. parapsilosis* isolées du sang étaient capables de former des biofilms **(Shin et al., 2002)**. Une autre étude a révélé que 59% des isolats de sang produisent des biofilms, contre 39% des isolats de la peau **(Ruzicka et al., 2007)**. En revanche, d'autres travaux ont montré que seulement 21,8% des isolats sanguins étaient capables de former des biofilms **(Tumbarello et al., 2007)**

En effet, la production maximale de biofilm chez cette levure nécessite l'union d'une multitude de conditions optimales parmi lesquelles le pH du milieu de culture **(Ziad Y., Hayoun K. 2016)**.

Une association similaire entre l'augmentation du pH et la production de biofilm a également été démontré chez les levure **(Di Bonaventura et al., 2007)** . **Hamadi et al (2012)** ont montré que le phénomène d'adhérence quantitative des microorganismes au verre est largement affecté par le pH du milieu. Par ailleurs, les travaux de **Kumamoto en 2002**, ont montré que *C. parapsilosis* est capable de former des biofilms, et leur présence lors de l'infection est associée à des taux de mortalité plus élevés par rapport aux cellules planctoniques. Les biofilms de *C. parapsilosis* se composent exclusivement de blastopores (structure simple) avec un minimum de matrice extracellulaire **(Blankenship et Mitchell, 2006)**. Par contre, les études de **kuhn et al., (2002)** explique que *C. parapsilosis* produit qualitativement et quantitativement moins de biofilms .Plusieurs auteurs indiquent que la formation de biofilms dépend de la méthode d'étude **[(Shin et al., 2002) ; (Hasan et al., 2009)].**

Candida parapsilosis affiche un taux important de formation de biofilms sur PVC et Teflon, ce qui n'est le cas de cette étude, vu que nous avons utilisé des microplaques en polystyrène. Il est important de noter que la formation des biofilms par chaque espèce de *Candida sp.* dépend du support utilisé **[(Hawser et Douglas, 1994 ; Hasan et al., 2009)].**

Résultats et discussion

Une association similaire entre l'augmentation de pH et la production de biofilm (**Di Bonaventura et al., 2007**).

Il a été démontré que la composition du milieu influait sur la capacité des microorganismes à produire biofilm dans des conditions *in vitro* ; en particulier la présence de glucose dans le milieu de croissance.

Le milieu TSB a tous une teneur élevée en glucose (2.5 g / l et 1.8 g / l, respectivement). La croissance abondante des espèces de *Candida sp.* dans un milieu riche en glucose et ses implications cliniques ont déjà été rapportées (**Samaranayake et MacFarlane 1985, Samaranayake et al., 1986**).

D'autre part, les acides aminés ne sont pas des constituants du bouillon TSP et ils ont une riche teneur en peptone et en glucose. Cette teneur élevée en glucose peut favoriser la croissance planctonique de *Candida sp.* (**Kucharíková et al., 2010, 2011**)

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

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

La production de biofilm *in vitro* dépend d'un certain nombre de facteurs physiques et chimiques, tels que la composition de la culture, température, PH et l'oxygène. [(**Harjai et al., 2005** ; **Di Bonaventura et al, 2007** ; **Hošťacká et Čížnár, 2007**)].

Le pH est un facteur important, qui doit être pris en compte lors de l'étude de l'adhésion des microorganismes pour former les biofilms. Les données disponibles montrent que le pH

Résultats et discussion

optimal pour l'attachement des espèces de *Candida sp.* varie de 6 à 7 et est fonction du site corporel concerné [(Sobel et al., 1981) ; (Wagner et Ottesen, 1982)]

La différence observée liée à la présence du tampon peut être due en partie au pH qui change au cours de la formation du biofilm en absence du tampon comme l'ont montré nos résultats.

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

Conclusion générale

Conclusion générale

Il est désormais reconnu que la formation de biofilm à la surface des dispositifs médicaux implantables comme les cathéters, les valves cardiaques, les sondes urinaires ou encore les prothèses articulaires constitue l'élément clé de la pathogénèse des infections sur implants médicaux.

Les infections sur ces dispositifs médicaux sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité significatives. L'éradication des biofilms dans ce contexte pose des problèmes car si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les microorganismes planctoniques, ils révèlent parfois une efficacité quasiment nulle sur les biofilms.

L'objectif que nous nous sommes fixé pour cette étude est évaluer l'effet des solutions tampon sur la formation de biofilms par des souches de *Candida sp* .Il ressort de cette étude que la quantité des biofilms produites varie en fonction des espèces des souches, ainsi, que la présence d tampon K_2HPO_4 .

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Elargir l'étude épidémiologique qui regroupe pour couvrir d'autres établissements de santé et d'autres dispositifs médicaux.
- Etudier le pouvoir de formation des biofilms par plusieurs souches de *Candida sp*. dans différentes conditions physico-chimiques.

Références bibliographiques

1. **Ahmad, K.M., Kokosar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O.P., Piskur J. (2014).** Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*, 1-7.
2. **Alain Filloux., Isabelle Vallet médecine sciences., (2003),** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne p. 3-124.
3. **Alem, MA., Oteef, MD., Flowers, TH., Douglas, LJ. (2006).** Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell* 5: 1770-1779.
4. **Asmundsdóttir, LR, Erlendsdóttir, H., Agnarsson, BA., Gottfredsson, M. (2009).** The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 576-585.
5. **Balestrino, D. (2006).** Formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* : facteurs impliqués et rôle du quorum-sensing. Thèse doctorat. Université Blaise Pascal. 183 pages.
6. **Barelle, CJ., Richard, ML., Gaillardin, C., Gow, NA., Brown, AJ. (2006).** *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryotic Cell* 5: 359-367.
7. **Bellifa, S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat .Université aboubekr belkaid, Tlemcen.
8. **Beloin, C., Ghigo, JM. (2005).** Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol.*, 13, 16-19.
9. **Benkirane, H. (2014).** Evaluation du Bichrolatex *Albicans*®Versus test De filamentation pour l'identification des levures du genre *Candida*. Thèse de doctorat Université de Mohammed V- Souissi (Maroc).
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. **Bornert, H., (1989).** Contribution à l'étude des biofilms dans réseaux de distribution d'eau d'alimentation. Thèse de doctorat de l'Université de Nancy.
12. **Botto, H. (2003).** Infections urinaires nosocomiales de l'adulte. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 33 223s–244s.

13. **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.
14. **Boutaleb, N. (2007)**. Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.
15. **Branger, A., Richer M-M., Roustel S. (2007)**. Quelque système microbien : les biofilms. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
16. **Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M. N. (1999)**. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 12: 5328.
17. **Briandet, Romain, Fechner, Lise, Naitali, Murielle, & Dreanno, Catherine. (2012)**. *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Editions Quae.
18. **Burin Des Roziers, M. (2002)**. Les biofilms. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.
19. **Cappello, S., Guglielmino, P. P. (2006)**. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 205-207.
20. **Clutterbuck, A.L., Woods E.J. (2007)**. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*;121(1-2), 1-17.
21. **Costerton, J.W., G.G. Geesey, and K.J. (1978)**. Cheng, How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1): p. 86-&.
22. **Cuéllar-Cruz, M., Vega-González, A., Mendoza-Novelo, B., López-Romero, E., Ruiz-Baca E., Quintanar-Escorza, M.A. and Villagómez-Castro, J.C. (2012)**. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31 : 2513-2527
23. **De Chalvet De Rochemonteix A. (2009)**. Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.
24. **Develoux M and Bretagne, S. (2014)**. Candidoses et autres levures. *Maladies infectieuses* 11(2): 8-602-A-10.
25. **Di Bonaventura, G.; Stepanović, S.; Picciani, C.; Pompilio, A.; Piccolomini, R.(2007)**. Effects of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia Microbiol*,52, 86–90.

26. **DiDone, L., Oga, D. & Krysan, D. J. (2011).** A novel assay of biofilm antifungal activity reveals that amphotericin B and caspofungin lyse *Candida albicans* cells in biofilms. *Yeast* 28, 561–568.
27. **Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002).** Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15 : 167- 193.
28. **Douglas, L. J. (2003).** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*; 11(1), 30-36.
29. **Douglas, L.J. (1992).** Mannoprotein adhesins of *Candida albicans*, p. 34-50. In J. E. Bennett, R. J. Hay, and P. K. Peterson (ed.), *New strategies in fungal disease*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
30. **Espinasse, F., Page B., Cottard-Boulle ,B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires* (426), 51-63.
31. **Ferreira, A.V., Prado C.G., CarvalhoK.S., Dias A.L.T. (2013).** *Candida albicans* and Non-*C. albicans* *Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Mycopathologia*, 175: 265–272
32. **Gaboriaud, F., E. Dague, S. Bailet, F. Jorand, J. Duval, et F. Thomas. (2006).** Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as response to pH change, *Colloids and surfaces B*. 52:108-116.
33. **Gordon, A. S., S. M. Gerchakov, et L. R. Udey. (1981).** The effect of polarisation on the attachment of marine bacteria to copper and platinum surfaces. *Can. J. Microbiol.*, 27:698- 703.
34. **Hamadi, F ., Latrache, H., Mabrouki ; M ., Elghmari, A., Outzourhit, A., Ellouali M .et Chtaini A. (2012).** Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 19:1, 73-85, DOI: 10.1163/1568561053066891
35. **Hamadi, F., H. Latrache, A. El Ghmari, M. Ellouali, M. Mabrouki, et N. Kouider. (2004).** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *An. microbiol.*, 54 :213-225.
36. **Haras, D. (2005).** Biofilms et altérations des matériaux : De l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques*, 93, 27–41 Hors Série.

37. Harjai, K., Khandwaha, R.K., Mittal, R., Yadav, V., GUPTA, Gupta V., SHARMA, S.(2005). Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol.* 50, 99–102 .
38. Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N., Fries, B.C. (2009). Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection*; 11: 753-761
39. Hawser, S.P. and Douglas, L.J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*; 62: 915-921
40. Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. and Bjarnsholt, T. (2011).The clinical impact of bacterial biofilms, *International Journal of Oral Sciences*,Vol. 3 No. 2, pp. 55-65.
41. Hostacka, A., Ciznar, I.(2007). Biofilms formation and response to oxidative stress in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* non-O1 depending on culture media. *Epidemiol.Mikrobiol.Imunol.* 56, 186–190
42. Irimés, C., Séguin, J., Roy S., Barbeau, J. (2008). Investigations on farnesol lower sponsiveness in *Candida albicans*: Influence of CO₂, temperature and expression of selected genes. Abstract Number: B50, 9th Conference on *Candida* and Candidiasis. ASM Conferences, 17-130. New-York.
43. Istivàn, S., Filkor, K., Németh, T., Hamari, Z., Vágvölgyi, C., Gácsér, A., (2011). In vitro interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiology*, 11, 122.
44. Klein, G. (2011). Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale, Bretagne. Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat.Université abou bekr belkaid, Tlemcen.
45. Kucharíková, S, Tournu, H, Holtappels, M, Van, Dijck, P, Lagrou, K. (2010). In vivo efficacy of anidulafungin against mature *Candida albicans* biofilms in a novel rat model of catheter-associated Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.*; 54(10):4474–4475.
46. Kucharíková, S, Tournu, H, Lagrou, K, Van Dijck, P, Bujdáková H. (2011). Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol.*;60(9):1261–1269

47. **Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K. and Ghannoum, M.A. (2002).** Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*; 70 : 878-888
48. **Kukavica-Ibrulj, I. (2007).** Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques l'adhésion bactérienne.36-38
49. **Kumamoto, CA.(2002).** *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5:608—11.
 - a. l'adhésion bactérienne.36-38
50. **Lappin-Scott, H. M., Costerton, J. W., Marrie, T.J. (1992).** Biofilms and biofouling. In J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego. p:277-284.
51. **Lawrence, J.R., et al.,(1991).**Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*. 173(20): p. 6558-6567.
52. **Li X., Yan, Z., Xu, J. (2003).** Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353-362.
53. **Liesse Iyamba, J-M. (2012).**Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
54. **Lynch, A.S., Robertson, G.T. (2008).** Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review of Medicine*, 59, 415-428.
55. **Mann, Ethan, E., & Wozniak, Daniel, J. (2012).** *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 893–916.
56. **Marchal, M. (2010).**Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat .Université de Strasbourg, France Université Laval. Québec, Canada.
57. **Muller, A. et Guaguere, E. (2014).**L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. *Conflicts AFVAC. Médecine interne / maladies infectieuses*. Paris - la Défens.
58. **Odds, F.C. (2010).** Molecular phylogenetic and epidemiology of *Candida*. *Future Microbiol*, 5, 67-79.
59. **Oliveira, A & Cunha, Mde, L. (2010).** Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 3, 260.
60. **O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 54 : 49-79.a.
61. **Pace, JL. Rupp, ME, Finch, RG. (2006).** *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Taylor & Francis Group, CRC Press 1ère Édition. New york. USA.

- 62. Palmer, J., Flint, S., Brooks, J.(2007).** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* . 34 (9): 577-88.
- 63. Pecastaings, S. (2010).** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- 64. Perrin, C. (2009).** Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France
- 65. Phaneuf, M., et Gadbois, Ch. (2010).** Les infections nosocomiales. Agir ensemble pour des milieux cliniques sains et sécuritaire, Inf. M. SC. MAP Infiresources, P: 1-22.
- 66. Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley, Jr., 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.
- 67. Poissy, J. (2015).** Physiopathologie des candidoses invasives. *Réanimation* 24:318-327.
- 68. Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008).** A simple and reproducible 96-well plate-
- 69. Rossignol, G., (2007).** Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité hémolytique et variation phénotypique, thèse Doctorat en Biologie option microbiologie: Université de Rouen, pp 265.
- 70. Roux, Agnès., Ghigo, Jean-Marc, (2006)** Les biofilms bactériens. *Communication*, n°3, p. 261-268.
- 71. Růzicka, F1., Holá, V., Votava, M., Tejkalová, R.(2007).** Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. ;52(3):209-14.
- 72. Samaranayake, LP., Hughes, A., Weetman, DA., MacFarlane, TW.(1986).** Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J Oral Pathol*;15(5):251–254.
- 73. Samaranayake, LP., MacFarlane, TW.(1985).** On the role of dietary carbohydrates in the pathogenesis of oral candidosis. *FEMS Microbiol Lett.*;27(1):1–5

- 74. Samaranayake, Y.H., Ye, J., Yau, J.Y.Y., Cheung, B.P.K., and Samaranayake, L.P. (2005)** In-vitro Method To Study Antifungal Perfusion in Candida Biofilms. *J Clin Microbiol*; 43 : 818–825.
- 75. Sandberg, M.F., Schellmann, D., Brunhofer, G., Erker, T., Busygin, I., Leino, R., Vuorela, P. M., & Fallarero, A. (2009).** Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *J Microbiol Methods* 78. 104-106.
- 76. Shin, J.H., Kee, S.J., Shin, M.G., Kim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.K., Suh, S.P. and Ryang, D.W. (2002)** Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients : Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *Journal of Clinical Microbiology*; 40 : 1244-1248.
- 77. Shirtliff, M.E., Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A. (2009).** Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 299: 1–8.
- 78. Sobel, J.D., Myers, P.G., Kaye, D., Levison, M.E. (1981).** Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases*, 143(1), 76-82.
- 79. Soll, D.R. (2008)** *Candida* biofilms: Is adhesion sexy? *Current Biology*, 18, 717-720.
- 80. Spormann, A.M. (2008).** Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 17-.
- 81. Staib, P., and Morschhauser, J. (2007)** Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* an enigmatic developmental programme. *Mycoses*; 50 : 1–12
- 82. Stanley, P. M., (1983).** Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. Journal of microbiology.* 29:1493-1499.
- 83. Stokes, C., Moran, GP., Spiering, MJ., Cole, GT., Coleman, DC., Sullivan, DJ. (2007).** Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology* 44: 920-931.
- 84.** susceptibility testing. *Nature protocols*, 3(9), 1494.
- 85. Thompson, D.S., Carlisle, P.L. and Kadosh, D. (2011)** Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*; 10 : 1173-1182.
- 86. Tote, K., Vanden, Berghe, D., Maes, L. & Cos, P. (2008).** A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett Appl Microbiol* 46,249-254.

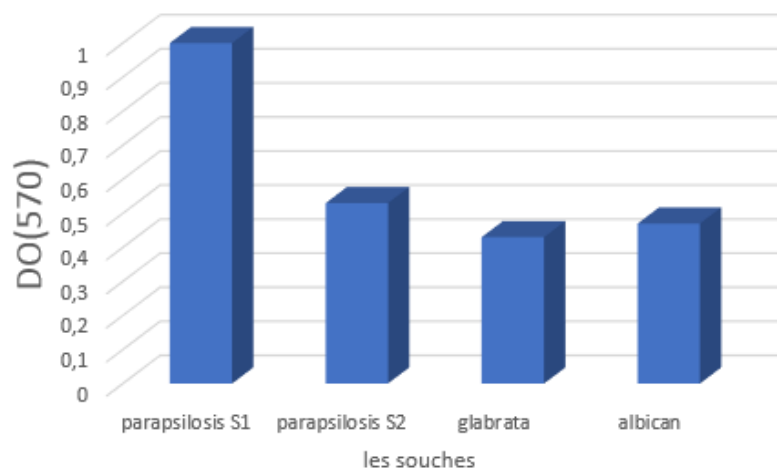
- 87. Tumbarello, M., Posteraro, B., Trecarichi, E.M., Fiori, B., Rossi, M., Porta R., Donati, K. G., La Sorda, M., Spanu, T., Fadda, G., Cauda, R. and Sanguinetti M. (2007)** Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology* ; 45 : 1843-1850
- 88. Vandeputte, P., Pineau, L., Larcher, G., Noel, T., Brèthes, D., Chabasse, D., Bouchara, J.P. (2008).** Molecular Mechanisms of Resistance to 5-fluorocytosine in Laboratory Mutants of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, 171, 11-21.
- 89. Wagner, G., Ottesen, B. (1982).** Vaginal physiology during menstruation. *Annals of internal medicine*, 96(6-Part-2), 921-923.
- 90. Wagner, Michael, Manz, Bertram, Volke, Frank, Neu, Thomas, R., & Horn, Harald. (2010).** Online assessment of biofilm development, sloughing and forced detachment in tube reactor by means of magnetic resonance microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(1), 172–181.
- 91. Walther, A., Wendland J. (2008).** Hyphal Growth and Virulence in *Candida albicans*, *Human and Animal Relationships*; 2nd Edition, *The Mycota VI*.
- 92. Wargo, M.J., Hogan, D.A. (2006).** Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Current opinion in microbiology*, 9(4), 359-364
- 93. Weems, J.J. (1992).** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical infectious diseases*, 14(3), 756-766
- 94. Williams, D.W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., Lewis, M.A. (2011).** *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol 2000*, 55, 250-265.
- 95. Wirtanen, G. (1995).** Biofilm Formation and its Elimination from Food Processing Equipment. *VTT Publications 251*, Espoo: 106.
- 96. Wu, W., R. F. Giese, C. J. van Oss. (1994).** Linkage between ζ -potential and electron donicity of charged polar surfaces. I: Implications for the mechanism of flocculation of particle suspensions with plurivalent counterions. *Colloids surf., A Physicochem. eng. Asp.* 89:241- 252.
- 97. Xu, J., Mitchell, T.G., Vilgalys, R. (1999a).** PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans*. *Molecular Ecology*, 8, 59–73. 222.

Références bibliographiques

- 98. Xu, J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G. (1999b).** Lack of genetic differentiation between two geographic samples of *Candida albicans* isolated from patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Bacteriology*, 181, 1369–1373. 223.
- 99. Xu, J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G. (2000).** Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Ecology*, 9, 1471–1481.
- 100. Ziad, Y., Hayoun, K. (2016).** L'influence des propriétés physicochimiques sur
- 101. Zobell, C.E., (1943).** The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*. 46(1): p. 39-56.

Annexe

Annexe 1 :



Annexe 01 : Biomasse des biofilms formés sur milieu RPMI1640 par la méthode du Crystal violet

Annexe 2 :

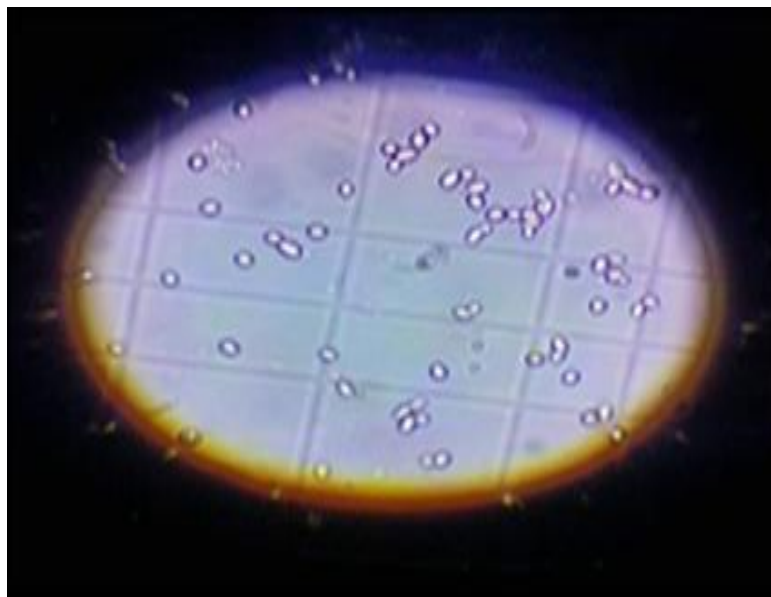


Photo 01 : comptage des *Candidas sp.* par la cellule de Thomas

Annexe 03 : Milieux de culture

➤ Milieu Sabouraud

Peptone	20g
Glucose	20g
Extrait de levure	3g
Eau distillée	1000ml

➤ **milieu sabouraud gélose**

Peptone.....10 g
Glucose massé.....20 g
Agar-agar.....15 g
Eau distillée (qsp).....1 000 ml
PH = 6,0

Annexe 04 : solutions

➤ **Cristal violet (1%)**

Cristal violet..... 1 g
Eau distillée..... 100 ml

➤ **Solution PBS (pH : 7,4)**

Nacl 8 g /l
Kcl0.2 g/l
Na₂HPO₄1.44 g/l
KH₂PO₄.....0.24 g/l
Eau distillée.....1000 ml

➤ **Solution TSB**

Peptone non animal.....20g/l
Glucose2.5g/l
Nacl.....5g/l
K₂hpo₄.....2.5g/l
Eau distillée.....1000ml

➤ **Solution tampon k₂hpo₄**

Kh₂po₄.....77ml
K₂hpo₄.....23ml
PH = 6.6

Annexe 05 : Composition du RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®)

Composants	g/L
Sels inorganiques	
Nitrate de calcium 4H ₂ O	0.1
Sulfate de magnésium (anhydre)	0.04884
Chlorure de potassium	-
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	-
Composants	g/l
Le bicarbonate de sodium	2
Cerveaux de veau (perfusion de 200g)	12.5
Cœur de bœuf (perfusion de 250g)	5.0
Peptone	10.0
Chlorure de sodium	5.0
D(+) Glucose	2.0
Phosphate disodique	2.5