



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



Université Dr. MOULAY TAHAR-Saida-
Faculté des sciences
Département de Biologie

Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des
Plantes (LBPVBP)

Mémoire présenté en vue l'obtention du diplôme:

Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Contribution à l'étude de l'effet préventif des
huiles essentielles du *Thymus vulgaris* contre
la formation de biofilms chez *Candida albicans***

Présenté par : M^{elle} DADDI Soumaya

M^{elle}. HAMDI Zoubida

Soutenu publiquement le /06/2016

HAMANI Houari

Maitre de conférences B

Devant le jury :

Président

SEGHIR Abdelfettah

Maitre de conférences B

Examinateur

HALLA Noureddine

Maitre assistant A

Encadreur

Année Universitaire : 2015-2016

Remerciements

Louange à Allah, seigneur de l'univers, le tout puissant et miséricordieux, qui nous inspire et nous comble de bienfaits, on lui rend grâce.

*On tient à remercier tout particulièrement **M^r HALLA Nouredine** maître assistant classe –A- au Département de Biologie, Faculté des sciences de l'Université Dr. Moulay Taher –Saida-, pour avoir accepté de guider notre travail tout au long de son élaboration et pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter nos réflexions.*

*On tient également à remercier notre maître et juge **M^r Dr. HAMANI Houari**, Maître de conférences classe B au Département de Biologie, la Faculté des Sciences Dr Moulay Tahar -Saida- d'avoir accepté de présider notre jury de mémoire.*

*Nous tenons à remercier aussi **M^r Dr. SEGHIR Abdelfettah**, Maître de conférences classe B au Département de Biologie, la Faculté des Sciences Dr Moulay Tahar -Saida- pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nos vifs remerciements vont également à **M^r Dr. SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib** et tous nos enseignants.*

*A nos promotions de biologie et à tous les membres du Laboratoire de biologie, surtout **M^{me} Belghali Fouzia** de sa gentillesse, son écoute et ces conseils.*

Dédicace

À l'honneur de mes adorables parents qui étaient avec leur soutien moral et matériel derrière toutes mes réussites depuis l'école primaire jusqu'à ce jour ;

Ces parents qui ont donné le mieux d'eux même et n'ont ménagé aucun effort pour m'inculquer une éducation dont je suis très fière, qui m'ont appris le courage et la patience devant les situations difficiles ;

Ces mêmes parents qui ont semé en moi le sens de civisme et l'amour patriotique de notre chère mère l'Algérie, doivent être fiers de moi aujourd'hui pour la modeste réalisation que je viens d'exposer devant vous ;

À mes sœurs, à mon frère et leurs petites familles.

À mes amis, je pense aussi à tous ceux qui sont restés plus ou moins longtemps à mes côtés et qui ont rendu l'ambiance fort-sympathique, pour les bons moments passés ensemble et pour leur amitié.

Soumeya et Zoubida

Résumé

Le domaine de l'infectiologie a été bouleversé au cours des 25 dernières années par l'augmentation considérable du nombre d'infections contractées à l'hôpital (infections nosocomiales). Ces dernières, sont liées essentiellement aux dispositifs médicaux tels que les cathéters et les sondes urinaires qui favorisent la formation des biofilms.

Dans ce contexte nous avons entrepris cette étude au niveau de l'hôpital HAMDEN BAKHTA de Saida, qui consiste à isoler des souches de *Candida albicans* à partir de cathéters directement après leurs excisions des patients et de vérifier, d'une part, leur pouvoir à former des biofilms, d'autre part, de tester leur résistance vis-à-vis de fluconazole, l'antifongique le plus utilisé en milieu clinique et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Sur 34 prélèvements, 6 souches de *Candida albicans* ont été isolées. Il ressort de cette étude que les tests antifongiques de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à un effet inhibitrice vis-à-vis les cellules sessiles à une concentration entre 0.19 et 0.39 mg/ml, mais les cellules planctoniques sont résistantes à cette concentration, et concernant le fluconazole, *C. albicans b* est résistante au cette antifongique par contre *C. albicans ATCC 10231* est sensible.

Mots clés: *Candida albicans*, cathéters, biofilms, fluconazole, huiles essentielles, *Thymus vulgaris*.

SUMMARY

The field of infectious diseases was upset over the last 25 years by the considerable increase in the number of infections acquired in hospital (nosocomial infections). The latter, are linked mainly to medical devices such as catheters and urinary catheters that promote the formation of biofilms.

In this context we undertook this study at the hospital HAMDEN BAKHTA of Saida, which is to isolate strains of *C. albicans* from catheters worn directly after excision from patients and, first, checking their powers to form biofilms, secondly, to test their resistance against fluconazole and the essential oil of *Thymus vulgaris*.

From 34 samples, 6 strains of *C. albicans* were isolated. It appears from this study that the antifungal fluconazole tests and the essential oil of *Thymus vulgaris*. The essential oil of *Thymus vulgaris* an inhibitory effect on sessile cells at a concentration between 0.19 and 0.39 mg / ml, but the planktonic cells is resistant to this concentration, and on fluconazole, *C. albicans b* is resistant to this antifungal against *C. albicans ATCC 10231* is sensitive.

Keywords: *Candida albicans*, catheters, biofilms, fluconazole, Essential oil, *Thymus vulgaris*

الملخص

لقد ارتفع مستوى الأمراض المعدية على مدى السنوات الخمس والعشرين الأخيرة بسبب الزيادة الكبيرة في عدد الإصابات المكتسبة في المستشفيات (عدوى المستشفيات). حيث ارتبط هذا الأخير، في المقام الأول بالأجهزة الطبية مثل القسطرة والقسطرة البولية التي تشجع على تكوين الأغشية الحيوية.

في هذا السياق قمنا بهذه الدراسة بمستشفى "حمدان بختة" بولاية سعيدة، بحيث عزلنا سلالات من القسطرات مباشرة بعد نزعها من المرضى، ثم تحققنا من قدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية، واختبرنا قدرتها على مقاومة المضاد الحيوي فلوكونازول وكذلك الزيوت الطيارة للزعر.

لقد قمنا بعزل 6 سلالات للخميرة *Candida albicans* من أصل 34 عينة، بهدف معرفة مدى قدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية و مدى تأثير الزيوت الطيارة لنبات الزعر على تشكيل هذه الأغشية الحيوية. ومن خلال دراستنا تبين أن لزيت الزعر تأثير كابت على تشكيل هذه الأخيرة بتركيز يتراوح ما بين 0.19 و 0.39 ملغ / مل في حين أن خلايا العوالم قاومت هذا التركيز، أما بالنسبة ل *C. albicans b* فقد قاومت الفلوكونازول و *C. albicans ATCC 10231* لم تقاومه.

الكلمات المفتاحية: *Candida albicans*، القسطرة، الأغشية الحيوية، فلوكونازول، الزيوت الطيارة، الزعر.

SOMMAIRE

Résumé	[i]
Liste des tableaux	[ii]
Liste des figures	[iii]
Liste des abréviations	[iv]
Introduction générale	1
PARTIE I : synthèse bibliographique	3
Chapitre I: Généralités sur <i>Candida albicans</i>.....	4
1. Introduction.....	5
2. Définition.....	6
3. Morphologie.....	7
3.1. La première forme	7
3.2. La deuxième forme	8
3.3 La troisième forme	8
4. Croissance	11
5. Les constituants cellulaires de <i>C. albicans</i>	11
5.1. La paroi	12
5.2. Les manno protéines	12
5.3. Les Glucanes	12
5.4. La chitine	12
6. Le quorum sensing	13
7. Génome	14
8. Les Candidoses	15
8.1. Les candidoses superficielles	16
A. Les candidoses digestives	16
1. La candidose orale	16
2. La candidose au niveau de la muqueuse oesophagienne	16
3. La candidose au niveau de la muqueuse gastro-intestinale	16
B. La candidose orale et VIH	16
C. Les candidoses uro-génitales	17
D. Les candidoses cutanées et unguéales	17
1. l'intertrigo des grands plis	17
2. l'intertrigo des petits plis	17
E. Les candidoses cutanéomuqueuses chroniques	17
8.2. Les candidoses profondes	18
Chapitre II : Les biofilms fongiques	19
1. Généralité	20

2. Le biofilm de <i>C. albicans</i>	20
3. Structure des biofilms	21
4. Formation du biofilm de <i>Candida albicans</i>	22
5. La résistance des biofilms aux antifongiques	27
Chapitre III : La plante étudiée <i>Thymus vulgaris</i>	28
1. Généralités	29
2. Description botanique de la plante	29
2.1. Tige	29
2.2. Feuilles	30
2.3. Racines	30
3. Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	31
4. Les huiles essentielles	31
5. Composition chimique	32
6. Effets antimicrobiens	33
Partie expérimentale	34
PARTIE II : Matériel et Méthodes	35
I. Extraction des huiles essentielles	36
I.1 Matériel végétale	36
I.2. Procédure d'extraction des huiles essentielles.....	36
I.3 Décantation	38
II. Prélèvements, isolement et identification de <i>Candida albicans</i>	38
II.1 Prélèvements	38
II.2 Isolement et purification	40
II.3 Identification	40
II.3.1 Examen macroscopique	40
II.3.2 Examen microscopique	40
II.3.3 Test de blastèse	40
II.3.4 Microculture sur le milieu PCB	41
III. Evaluation du potentiel à former les biofilms des souches étudiées.....	41
III.1. Détermination des CMI et SCMI	42
III.1.1. Détermination des CMI	42
III.1.1.1 Détermination des CMI de l'antifongique huile essentielle de <i>thymus vulgaris</i> ..	42
III.1.1.1.1. Préparation des solutions des huiles essentielles	42
III.1.1.1.2. Préparation de l'inoculum	42
a. Préparation de pré-culture	42
b. Préparation de la suspension	43
III.1.1.1.3. Utilisation de la microplaque (la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide).....	43
III.1.1.1.4. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)	44
III.1.1. Détermination des SCMI	44
a. Préparation des souches	45

b. Formation des biofilms	45
c. Test antifongique	45
c.1. Antifongique fluconazole	45
c.2. Antifongique huile essentielle <i>Thymus vulgaris</i>	46
PARTIE III : Résultats et discussion	49
I. Extraction des huiles essentielles	50
I.1. Caractéristiques des huiles essentielles.....	50
I.2. Rendement en huile essentielle	50
II. Prélèvements, isolement et identification de <i>Candida albicans</i>	50
II.1. Choix de la souche	50
II.2. Choix de prélèvement	51
II.3. Résultats de prélèvement	51
II.1 Examen macroscopique de la souche	53
II.2 Examen microscopique	54
III. Détermination des CMI de l'antifongique huile essentielle de <i>thymus vulgaris</i>	55
III.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales fongicides (CMF)	55
III.2. Etude de l'effet antifongique des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i>	58
IV. Evaluation du potentiel à former les biofilms des souches étudiées	59
IV.1. Détermination des SCMI	60
IV.2. Détermination des SCMI de l'antifongique huile essentielle de <i>thymus vulgaris</i>	63
Conclusion générale	64
Références bibliographiques	67
Annexe	77

Liste des figures

Figure 1	Pseudohyphes et chlamydospores par microscopie en contraste de phase ente <i>C. albicans</i> (grossissement original X 320) (Radford <i>et al.</i> , 1994).	7
Figure 2	Différentes formes morphologiques de <i>C. albicans</i> (Staib et Morschhauser, 2007).	9
Figure 3	Morphologie coloniale de <i>C. albicans</i> (Rustchenko <i>et al.</i> , 2007).	10
Figure 4	Organisation moléculaire de la paroi de <i>C. albicans</i> (Ruiz, 2006).	13
Figure 5	Biofilm candidal sur cathéter, dans la lumière interne (A) et sur la face externe (Lewis, 2008).	21
Figure 6	Image à la microscopie électronique à balayage d'un biofilm fongique de <i>Candida albicans</i> × 1100 (B) (Seddiki et coll, 2013).	21
Figure 7	les différentes phases de la formation des biofilms microbiens (Baillie, 2000).	25
Figure8	Développement du biofilm de <i>Candida albicans</i> sur les surfaces inertes (Perumal, 2007).	26
Figure9	Modèle de développement de biofilms de <i>Candida albicans</i> (Haras, 2005).	27
Figure10	Aspects morphologiques de <i>Thymus vulgaris</i> L (Iserin, 2001).	30
Figure11	Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Hernandez, 2005)	37
Figure12	Décantation de l'huile essentielle par ampoule à décanter (Lima <i>et al.</i> , 2004).	38
Figure13	cathéters dans le Bouillon Sabouraud	39
Figure14	Utilisation de la microplaque (la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide) pour la détermination des CMI	44
Figure15	Utilisation de la microplaque (la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide) pour la détermination des SCMI	47
Figure16	Examen macroscopique de <i>c. albicans</i>	53
Figure17	l'observation microscopique de <i>c. albicans</i>	54
Figure18	Résultats des CMI et CMF de l'huile essentielle	57
Figure19	tests de sensibilité à fluconazole des souches de références et des souches isolées	61
Figure20	les résultats des tests de sensibilité à l'antifongique l'huile essentielle <i>Thymus vulgaris</i> des cellules sessiles.	63

La liste des tableaux

Tableau1	Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i> (Morales, 2002)	31
Tableau2	Teneur en polyphénols (en µg EAG/mg d'extrait) dans l'infusion aqueuse du <i>Thymus vulgaris</i> (Kulišić et al., 2006)	32
Tableau3	Nombres de prélèvements et de souches de <i>Candida albicans</i> isolées dans chaque service	52
Tableau 4	la nature du huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis les souches étudiées	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BS	Bouillon Sabouraud
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO	Dimethylsulfoxyde
EPS	polysaccharides extracellulaires
FESEM	Field Emission Scanning Electron Mycroscopy
H	Heure
HE	Huile Essentielle
IN	Infection Nosocomiale
INLC	Infection Nosocomiale Liée aux Cathéters
KCl	Chlorure de potassium
MARS	Morphogenic Autoregulatory Substance
MEB	Microscope Electronique à Balayage
Mg	Miligramme
ml	Milliliter
NaCl	Chlorure de Sodium
PBS	Phosphate Buffered Saline “ Tampon Phosphate Salé ”
PCB	pomme de terre, carotte, bile
QS	Quorum Sensing
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SCMI	Sessile Concentration Minimale Inhibitrice
SDC	Salt-Dextrose Complete
µg	Microgramme
µl	Microlitre

Introduction
générale

Les levures pathogènes, et plus particulièrement celles du genre *Candida* (principalement *Candida albicans*), sont à l'origine d'infections diverses dont les formes les plus graves contractées à l'hôpital ont vu leur nombre augmenter de façon importante au cours des 25 dernières années (**Trickwe et al., 2002**). Parmi les facteurs de risque des candidoses nosocomiales, la formation de biofilms sur différentes sortes d'implants, des cathéters ou des salles d'intervention est reconnue comme un problème majeur (**Mermella et al., 2001**). Ces structures tri- dimensionnelles constituées de cellules levuriformes et filamenteuses présentent une forte réduction de la sensibilité à la plupart des agents antifongiques disponibles en clinique et constituent donc une source d'échecs thérapeutiques et de récives (**Gudlaugsson et al., 2003**).

Les traitements actuels sont souvent très couteux et manquent d'efficacité (**Perlroth et al., 2007**). Parmi les causes de ce manque d'efficacité, on peut citer la résistance de la levure aux antifongiques employés, les doses plutôt fongistatiques que fongicides et les graves effets secondaires engendrés par la thérapie, dus aux cibles visées qui sont communes au pathogène eucaryote et l'homme (**Berman et Sudbery, 2002**). Il est donc nécessaire de mieux comprendre l'épidémiologie et la physio- pathologie des candidoses, et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques si l'on veut, à terme, être en mesure de réduire l'incidence et les conséquences de ces infections.

C'est dans ce cadre là que notre étude a été entreprise au niveau de l'hôpital **Hamden Bakta (saida)**. Elle consiste à rechercher et à isoler les levures de *Candida albicans* à partir des cathéters, directement après leurs ablations et de vérifier leurs pouvoirs à former des biofilms, et en fin de tester leur résistance vis-à-vis de fluconazole et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* en calculant les Concentrations Minimales Inhibitrices « CMI » et les Sessiles Concentrations Minimales Inhibitrices « SCMI » (des biofilms) selon différents protocoles.

Chapitre I :
Généralités sur
Candida albicans

1. Introduction :

Depuis une vingtaine d'années, la fréquence des infections fongiques a fortement augmenté au niveau des hôpitaux. Plusieurs microorganismes sont à l'origine de ces infections nosocomiales, le genre *Candida* est le plus incriminé. Il est en effet responsable de plus de 17 % des infections nosocomiales fongiques (**Gauzif et Colt, 2003**). *Candida* est un genre de levures qui compte près de 200 espèces et qui regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices (exemple *Candida albicans*) ou non (exemple *Candida glabrata*) de filaments et donnant des colonies blanches et crémeuses en cultures (**Alem, 2006**).

Le genre *Candida* se présente actuellement comme un groupe complexe, hétérogène, rassemblant un nombre variable de champignons lévuriformes (**Alem, 2006**). Ce sont des microorganismes «opportunistes» diversement adaptés au parasitisme, c'est-à-dire normalement saprophytes et inoffensives mais qui peuvent devenir pathogènes lorsque l'organisme hôte présente des conditions favorables (intrinsèques ou extrinsèques) (**Develoux et Bretagne, 2005**).

Les levures du genre *Candida* apparaissent macroscopiquement sous forme de colonies blanches à crémeuses. Suivant l'espèce en question, leur texture peut être pâteuse, lisse, brillante, sèche, ridée ou terne. Les caractères microscopiques diffèrent grandement selon l'espèce. Toutes produisent des blastoconidies, rondes ou allongées, et la plupart des pseudohyphes qui peuvent être longs, incurvés ou ramifiés. Certaines espèces présentent des formes de résistances appelées chlamydozoospores (**Csank, 2000**).

Le nombre d'espèces pathogènes est relativement réduit, seulement une dizaine ont été reconnues pathogènes pour l'homme, en raison de leur faculté d'adaptation à la température de 37°C ; *Candida albicans* est la levure la plus souvent impliquée mais les espèces non *albicans* sont de plus en plus souvent responsables dans la genèse des candidoses. Leur émergence reflète, au moins partiellement, une pression antifongique, visant à éliminer prioritairement *Candida albicans* (**Walken, 2007**).

2. Définition :

Candida albicans (*C. albicans*) est une levure non pigmentée, non capsulée (Develoux et Bretagne., 2005), aérobie, diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (Chu *et al.*, 1993) productrice de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture (Develoux et Bretagne., 2005) se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (chu *et al.*, 1993): cette levure pour se multiplier va bourgeonner et d'une levure appelée cellule mère, elle va donner naissance à une cellule fille qui sera identique à elle même par bourgeonnement (Whiteway et Bachewich, 2007).

C. albicans est un champignon unicellulaire eucaryote retrouvé à la surface de la plupart des muqueuses humaines, commensale des muqueuses digestives, et saprophyte de la flore vaginale (Hot et colt, 2007).

Elle peut exister en tant que cellule de levure, hyphes ou pseudohyphes (Walken, 2007). C'est un champignon dimorphique, lorsque ce microorganisme adhère à une surface, il forme un biofilm ce qui implique des changements considérables dans la forme (phenotypic switching) et la fonction (Alem et cou, 2006).

C. albicans est l'espèce la plus fréquente des *Candida* pathogènes, elle est retrouvée dans 80% des infections superficielles à *Candida*, et 60% des infections profondes. On appelle candidose (superficielle ou profonde) la pathologie ainsi provoquée. C'est donc une espèce parmi d'autres du genre *Candida*, mais qui émerge le plus, sans doute parce qu'elle possède des facteurs de virulence (Whiteway & Bachewich, 2007).

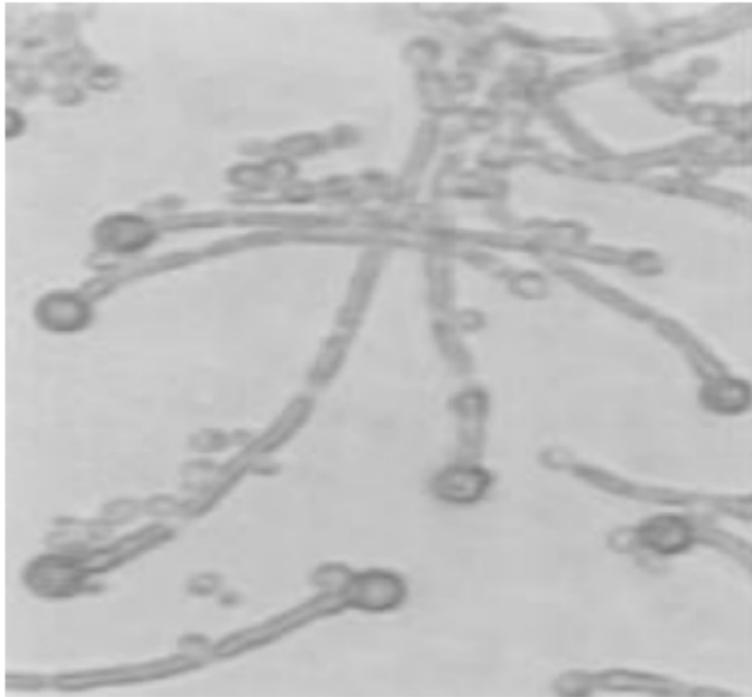


Figure 1 : Pseudohyphes et chlamydospores par microscopie en contraste de phase ente *C. albicans* (grossissement original X 320) (Radford *et al.* , 1994).

3. Morphologie :

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 μm , et elle est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *C. albicans* (Buffo *et al.*, 1984) .

C. albicans est une levure particulière car *polymorphique* (possède plusieurs formes). La morphologie est très importante pour les facteurs de virulence (Whiteway et Bachewich, 2007).

3.1. La première forme est la forme levure (= « yeast », levure unicellulaire qui bourgeonne, c'est l'aspect que l'on voit au microscope).

3.2. La deuxième forme qui est très importante aussi est le pseudofilament. Ici au lieu de se diviser en formant une cellule fille, de temps en temps elle va former un pseudo-filament: un tube extrêmement long qui n'a pas des tout tendances à se séparer de la cellule mère, et pour constituer ce tube, la levure va encore mettre en place tout un système de gènes et de protéines qui vont synthétiser les constituants nécessaires pour l'élaboration de ce tube germinatif. Mais attention, ce ne sont pas des filaments : ce sont juste des levures allongées qui sont collées les unes aux autres (donc non séparées) (**Whiteway et Bachewich, 2007**) mesurant de 500 à 600 μm de longueur et de 3 à 5 μm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien [(**Sudbery, 2001**) ;(**Sudbery, 2004**)]. Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants (**Barelle, 2006**).

3.3 La troisième forme est la forme filament vrai = HYPHE, à mycélium (bords parallèles) et septum (paroi vraie) : il s'agit de vraies cellules avec noyau et organites. La cellule mère donne un tube. Ce tube va se cloisonner en formant de vraies cloisons, les parois vont devenir parallèles et la croissance apicale va se produire. Seul *C. albicans* possède cette forme (la forme pseudo-filament (ou encore pseudohyphe) sans séparation des cellules filles et sans vraies cloisons et la forme filament mycélien avec des bords parallèles et des septums) (**Whiteway & Bachewich, 2007**). La forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *C. albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte. (**Gow, 2002**).

Toutes ces formes de *C. albicans* vont donner en culture le même aspect (pousse rapidement en 24 à 48 heures) : une culture d'une levure avec des petites colonies blanches. La forme de filament est retrouvée dans les tissus (par exemple lors d'une candidose pulmonaire) et il peut être difficile de faire la différence avec des champignons filamenteux comme *Aspergillus*. (**Whiteway & Bachewich., 2007**).

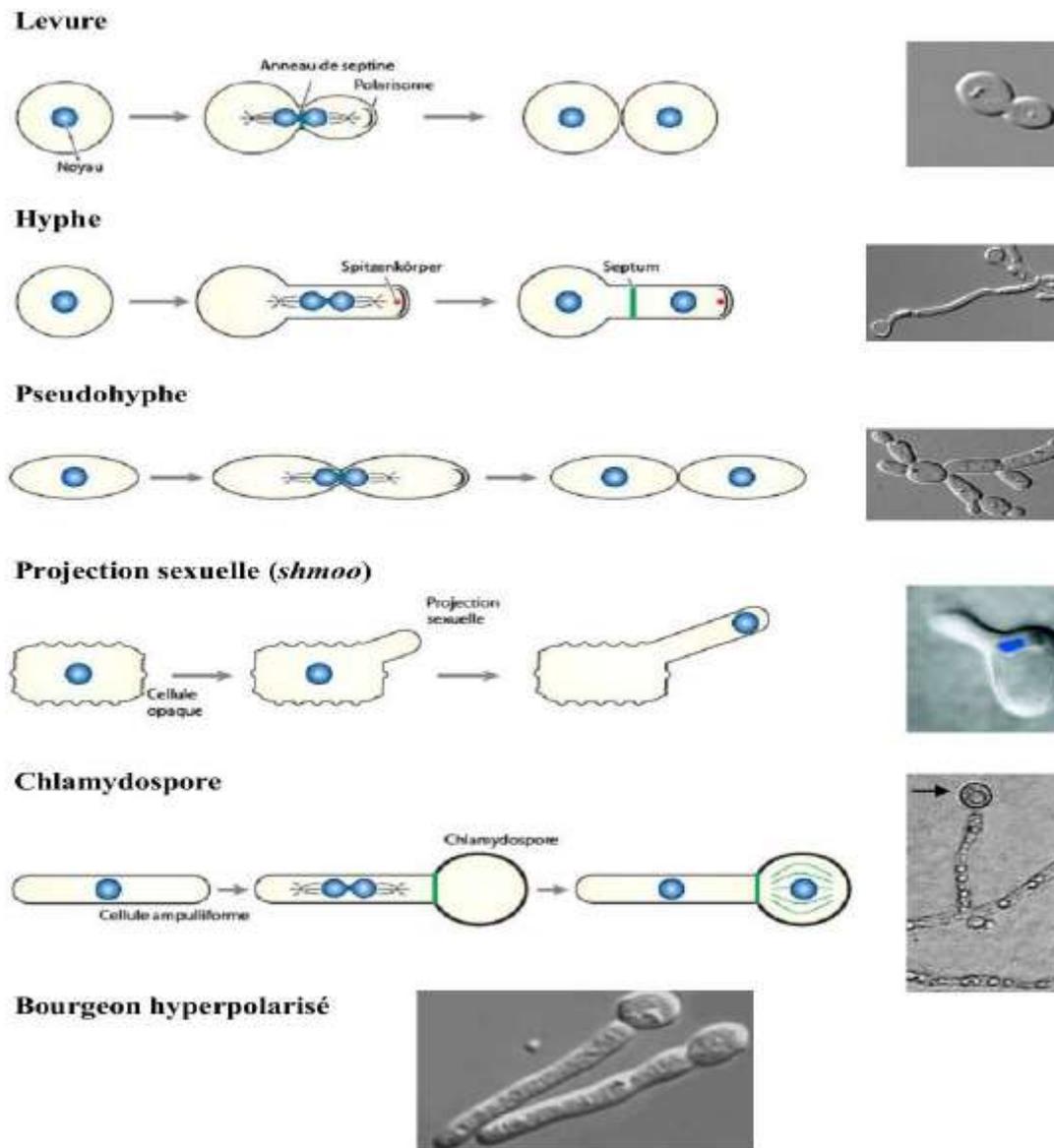


Figure 2 : Différentes formes morphologiques de *C. albicans* (Staib & Morschhauser, 2007).

Morphologie coloniale et commutation phénotypique :

Comme *C. albicans* est capable de croître sous plusieurs formes morphologiques, elle produit sur milieu solide des colonies présentant une grande diversité des phénotypes. On peut rencontrer des colonies lisses, chevelues, plissées, étoilées, en anneau, pointillées, crépelées, en chapeau, etc. Quelques exemples sont montrés dans la Figure 5 (a, b, c et d). Jusqu'à l'heure actuelle 384 morphologies coloniales ont été

décrites (**Rustchenko et al ., 2007**), quoique seulement 5 à 8 phénotypes sont le plus souvent rencontrés (**Radford et al., 1994**).

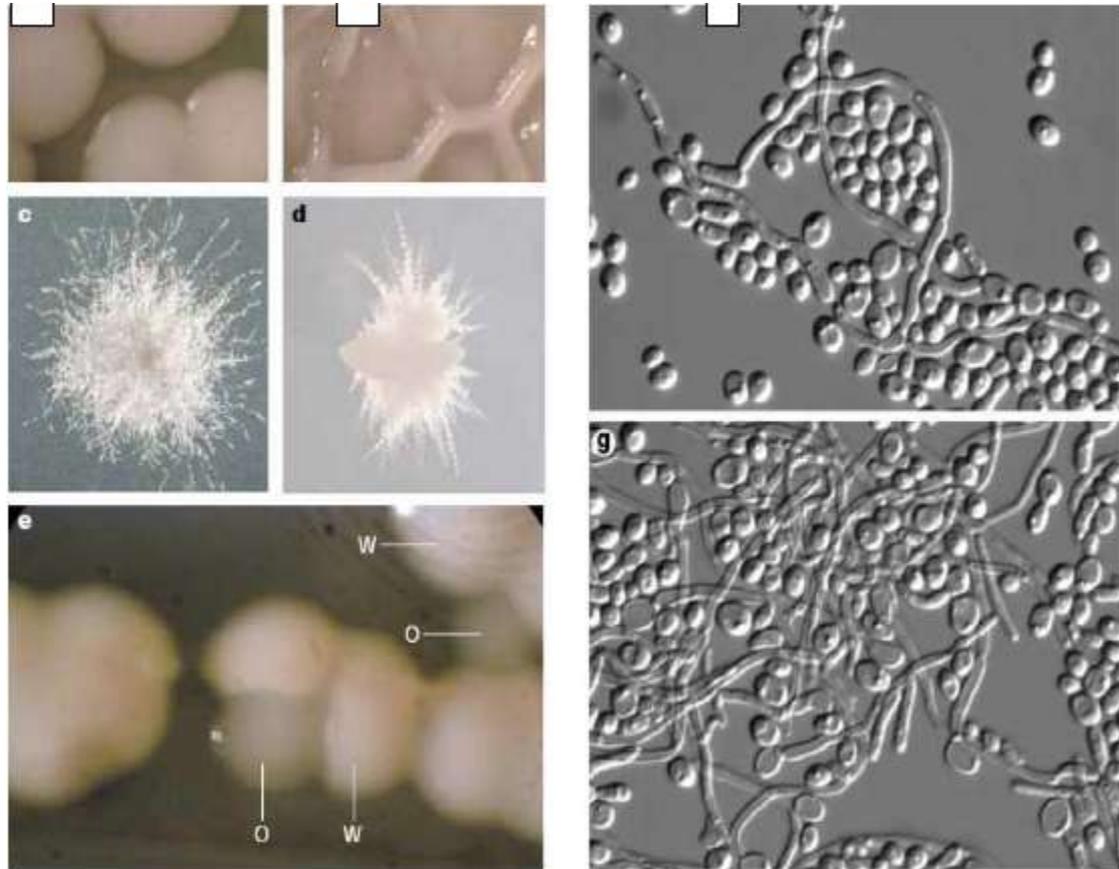


Figure 3 :Morphologie coloniale de *C. albicans* (Rustchenko et al ., 2007).

Une seule souche peut présenter plusieurs morphologies coloniales sur différents milieux ou suite à la commutation phénotypique. a– Colonies lisses sur milieu SDC (Salt-Dextrose Complete); b– Colonie plissée sur milieu Spider; c– Colonie chevelue sur milieu lait-Tween; d – Colonie incorporée dans une matrice de milieu riche en sucrose; e – Commutation phénotypique white-opaque sur milieu SDC, W – colonies en phase blanche, O – colonies en phase opaque; f, g – Les colonies plissées, chevelues et incorporées sont formées d’un mélange des blastospores, pseudohyphes et hyphes. Les photos montrent des populations cellulaires dérivant des différentes portions d’une colonie plissée (**Berman & Sudbery, 2002**)

4. Croissance :

Notoire pour sa grande capacité d'adaptation, *C. albicans* croît sur des milieux de culture définis, riches ou pauvres, contenant des sources de sel (exemple : chlorure de sodium), de carbone (exemple : glucose), d'azote (exemple : sels d'ammonium) et de phosphate, et nécessite la présence de biotine. La levure se développe dans des conditions de pH variant entre 2 et 8 et dans un intervalle de température de 20 à 40°C, sa température optimale étant 37°C. Son temps de génération maximal est de 0.3 à 0.4 heures⁻¹, dans un milieu de culture synthétique. Étant donné que chez les mammifères la concentration en CO₂ est presque 150 fois (5%) plus élevée que dans l'air atmosphérique (0.036%), *C. albicans* est exposée à des concentrations très variables de dioxyde de carbone pendant son cycle de vie (**Bahn & Muhlschlegel, 2006**). Lors d'infections superficielles cutanées, comme la peau est en équilibre avec l'atmosphère, la levure doit s'adapter à des taux de CO₂ plus bas que lors d'invasions d'autres tissus de l'hôte (**Frame et al ., 1972**). Le pathogène est un anaérobie facultatif et il est au moins quatre fois plus résistant au traitement antifongique en condition anaérobie qu'en aérobie (**Dumitru et al ., 2004**).

5. Les constituants cellulaires de *C. albicans*

C. albicans possède tous les organites intracellulaires caractéristiques des eucaryotes :

- un noyau, délimité par une double membrane nucléaire, et renfermant huit chromosomes (**Chu et al., 1993**)
- un nucléole.
- un réticulum endoplasmique.
- un appareil de Golgi...

La seule structure différenciant la levure d'une cellule eucaryote « classique » est la présence d'un système vaculo-vésiculaire, évoluant en relation avec le cycle cellulaire et la division (**Barelle et al., 2006**) et impliqué en majeure partie dans la synthèse de la paroi (**Poulain et al., 1989**)

5.1. La paroi :

La paroi cellulaire de cette levure est sous forme d'une bicouche constituée par une couche interne squelettique et une couche protéique entourant la précédente. Malgré l'architecture moléculaire similaire des blastospores et des hyphes de *C. albicans*, la composition en protéines reste variable et dépend fortement des conditions environnementales (Thein *et al.* , 2006). La paroi cellulaire de *C. albicans* est composée de 4 éléments principaux:

5.2. Les manno protéines, qui représentent environ 40 % de la biomasse de la paroi cellulaire.

5.3. Les Glucanes :

- Les β -1,3 -glucane forme un réseau tridimensionnel dont la liaison hydrogène stabilisée permet de garder des fibrilles parallèles à la surface cellulaire.

- Les β - 1,6- glucane permettent d'interconnecter les manno protéines aux chaînes (3-1,3- glucanes et à la chitine.

5.4. La chitine qui se trouve en faible quantité est composé d'un enroulement de β -1,4 acétyl glucosamine. La chitine, lorsqu'elle se lie à β -1,3-glucane, renforce ce réseau (Thein *et al.* , 2006).

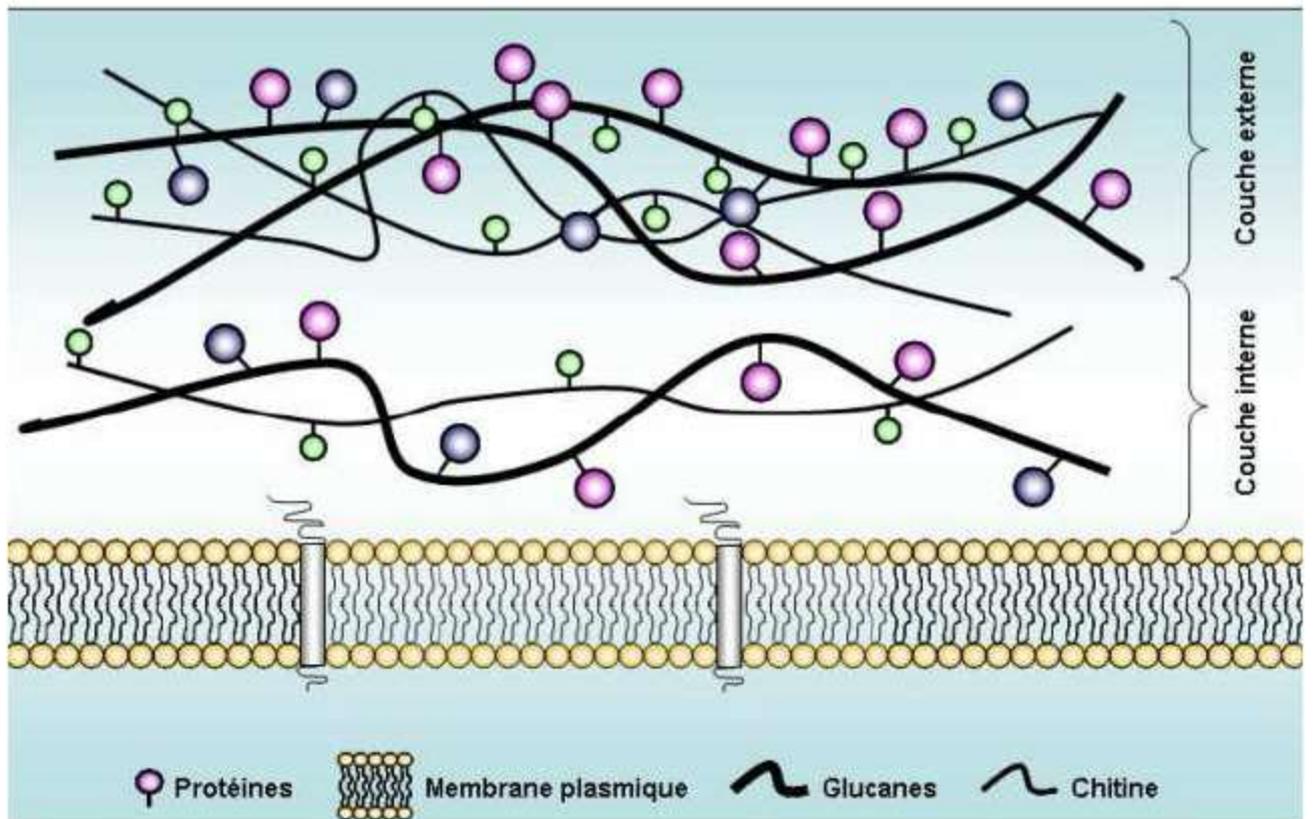


Figure 4 : Organisation moléculaire de la paroi de *C. albicans* (Ruiz, 2006).

6. Le quorum sensing :

Défini pour la première fois en 1994 (Fuqua *et al.*, 1994), est un mécanisme de régulation contrôlant l'expression de gènes particuliers au sein d'une population microbienne, en fonction de la densité cellulaire de celle-ci (nombre de cellules par unité de volume). Il repose sur la capacité des microorganismes à communiquer avec leurs congénères en utilisant des signaux moléculaires. (Jayaraman et Wood, 2008).

En 1983, Kevin, Hazen et Jim Cutler furent les premiers à isoler une substance morphogénétique autorégulatrice (MARS, Morphogenic Autoregulatory Substance), produite efficacement par *C. albicans* à des hautes densités cellulaires (2×10 cellules/mL). MARS réprime la germination, sans inhiber la croissance cellulaire. Pourtant, la structure chimique de cette molécule demeure encore inconnue à l'heure actuelle (Hazen et Cutler, 1983). Depuis la découverte de MARS, plusieurs

molécules de quorum sensing ont été identifiées chez *C. albicans*: le farnésol et l'acide farnésolique, le tyrosol et l'acide 3(R)-hydroxy-tétradécanoïque (**Hornby et al ., 2001**)

7. Génome :

Malgré son importance médicale et scientifique, le progrès dans l'élucidation du génome de *C. albicans* a été relativement lent comparé aux autres microorganismes. Ce fait est dû en partie aux difficultés rencontrées lors de l'utilisation de la génétique comme approche expérimental d'étude. Comme ce pathogène est diploïde et possède un cycle sexuel incomplet, les analyses génétiques conventionnelles ne sont simplement pas applicables. Malgré tous ces obstacles, les chercheurs ont développé, pendant les derniers 20 ans, des stratégies alternatives. Ainsi, à l'heure actuelle, plusieurs approches expérimentales sont disponibles pour l'étude de *C. albicans*, y compris les profilages génétiques à grande échelle [(**Noble et Johnson, 2007**);(**Kabir et Hussain, 2009**)].

La séquence complète du génome diploïde de *C. albicans* a été récemment publiée (**Jones et al ., 2004**). La levure possède 8 paires de chromosomes, le plus grand étant appelé R et les suivants étant numérotés de 1 à 7 selon une taille décroissante. Son génome correspond approximativement à 16 Mb (haploïde) et code environ 6 400 gènes 22 dont 774 sont spécifiques au *Candida*, avec une fonction majoritairement inconnue [(**van het Hoog et al., 2007**);(**Kabir et Hussain, 2009**)]. Le code génétique de *C. albicans* présente une particularité : le codon CUG code une sérine et non pas une leucine et il est retrouvé au moins une fois dans environ deux tiers des gènes (**Odds et al., 2004**).

Beaucoup de gènes sont conservés chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* est basé sur cette similarité, les mécanismes de plusieurs processus biologiques ont été découverts chez *C. albicans* (**Biswas et al., 2007**). Cependant, le génome de *C. albicans* est très dynamique, avec des translocations, délétions et duplications chromosomiques courantes, ce qui rend difficile la découverte de la fonction de ses gènes. Ainsi, il n'y a pas deux souches de laboratoire qui possèdent un caryotype identique, même si elles dérivent de la même souche parentale. L'hypothèse courante de l'instabilité du génome de *C. albicans* est qu'elle permet à la levure pathogène d'acquérir la diversité

génétique nécessaire pour survivre dans différentes niches environnementales [(Rustchenko, 2007);(Kabir et Hussain, 2009)].

Pour faciliter la recherche sur la biologie moléculaire de cette levure, la communauté scientifique a mis en place une base de données centralisée, accessible via Internet (**The Candida Genome Database; <http://www.candidagenome.org>**). Ici on retrouve une grande quantité d'informations sur les gènes et la séquence génomique de *C. albicans*. Toutes les données sont collectées et organisées à partir de la littérature scientifique actuelle (**Costanzo et al., 2006**).

L'isolat clinique SC5314 (**Fonzi et Irwin, 1993**) est la souche de *C. albicans* la mieux caractérisée, utilisée dans la majorité des études de virulence, de susceptibilité antifongique et dans les analyses moléculaires et biochimiques. De ce fait, elle a été choisie pour le projet de séquençage de génome (**Jones et al., 2004**). SC5314 a été isolée d'un patient présentant une infection généralisée à *C. albicans* (**Odds et al., 2004**). La levure appartient à la classe prédominante des souches apparentées de *C. albicans*, classification déterminée par l'analyse des empreintes d'ADN des souches (**Soll et Pujol, 2003**). Cette classe représente environ 40% de tous les isolats du monde entier. SC5314 est hautement susceptible à tous les agents antifongiques cliniques et elle est très virulente dans les modèles animaux infectés par *C. albicans* (**Odds et al., 2000**).

8. Les Candidoses

Les candidoses, dues aux levures du genre *Candida*, sont les infections opportunistes les plus fréquentes, et leur fréquence a doublé entre les années 80 et 90. En effet, elles représentent désormais plus de 80% des infections à levures. Parmi les candidoses, l'infection par *C. albicans*, commensal du tractus digestif humain, est la plus commune et représente plus de 60% des levures isolées chez l'homme. Ainsi, *Candida albicans* est responsable d'infections qui, par leur fréquence et leur gravité, se situent au premier rang des infections fongiques [(**Bodey et al., 2002**) ; (**Samaranayake et al., 2004**)].

Au niveau clinique, les candidoses peuvent être classées en deux groupes :

- les candidoses superficielles
- les candidoses profondes.

8.1. Les candidoses superficielles

Les candidoses superficielles sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Elles peuvent atteindre les surfaces épidermiques et les muqueuses telles que la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, les intestins, le système urinaire, et la muqueuse vaginale: (Bodey *et al.*, 2002) ; (Samaranayake *et al.*, 2004) :

A. Les candidoses digestives :

Ce sont les affections les plus représentées. C'est au niveau de l'intestin et de l'estomac, les plus importants réservoirs de *Candida albicans*, que se multiplient les levures. Ceci entraîne des troubles digestifs qui peuvent devenir chroniques: aigreurs, douleurs œsophagiennes, douleurs stomacales, diarrhées, constipation, colite intestinale. Parmi les affections digestives on distingue :

1. La candidose orale : manifestation la plus fréquente des candidoses, concerne à la fois les sujets non immunodéprimés et les sujets immunodéprimés, avec un caractère de gravité systématique chez ces derniers. L'intérêt porté à cette infection s'est accru ces dernières années, car elle constitue l'une des manifestations orales de l'infection par le VIH, mais elle peut aussi survenir chez des patients leucémiques ou cancéreux.

2. La candidose au niveau de la muqueuse œsophagienne : cliniquement, elle se traduit par une dysphagie douloureuse, un pyrosis et une sensation de brûlure au passage des aliments.

L'examen révèle des membranes blanchâtres reposant sur une muqueuse très inflammatoire.

3. La candidose au niveau de la muqueuse gastro-intestinale: elle intéresse tout l'intestin, de l'estomac au colon. Les lésions se présentent comme un muguet intestinal avec des ulcérations. Elle se manifeste par des douleurs abdominales atypiques, des nausées et des vomissements.

B. La candidose orale et VIH :

Parmi les infections opportunistes du malade VIH+, les candidoses oropharyngées sont les plus fréquentes: plus de 80 % des patients VIH+ développent une candidose orale à un stade quelconque de la maladie (**Le Breton**) Elle peut être un signe révélateur de la maladie, être récurrente et s'aggraver par extension à l'œsophage.

C. Les candidoses uro-génitales : La vulvo-vaginite est une affection extrêmement fréquente chez la femme. En effet, on estime qu'environ 75% des femmes en activité génitale feront un épisode de candidose vulvo-vaginale. Les symptômes les plus évocateurs sont l'existence de leucorrhées abondantes blanchâtres, d'aspect granuleux, et d'un prurit vulvaire souvent intense. Le point de départ d'une telle infection reposerait sur un dysfonctionnement hormonal ou immunitaire local. La récurrence de la candidose vulvo-vaginale est un phénomène assez fréquent. Le caractère récidivant des infections candidosiques chez la femme est susceptible d'induire, lors de traitements répétés, des phénomènes de résistance aux traitements passant par l'émergence de souches moins sensibles.

D. Les candidoses cutanées et unguéales : Ces candidoses des plis se manifestent par un érythème, associé à un enduit crémeux blanchâtre, et sont souvent prurigineuses. Elles sont favorisées par l'obésité, l'humidité et la macération, ainsi que le manque d'hygiène. On distingue classiquement deux grands types :

- 1. l'intertrigo des grands plis :** concerne les plis inguinaux, axillaires, abdominaux, sous-mammaires, inter fessiers...
- 2. l'intertrigo des petits plis :** concerne les plis interdigitaux palmaires, plus rarement les plis interdigitaux plantaires.

Les onyxis et périonyxis candidosiques siègent préférentiellement aux mains. *C. albicans* pénètre d'abord le bourrelet péri-unguéal et provoque un périonyxis. L'onyxis fait habituellement suite au périonyxis. La contamination se fait le plus souvent à partir d'un réservoir chez l'individu même (**Samaranayake et al., 2004**)

E. Les candidoses cutané-muqueuses chroniques :

Ces candidoses sont relativement rares et peuvent toucher des enfants dans les premières années de leur vie. Ces affections chroniques touchent principalement les muqueuses buccales, les ongles et la peau .

8.2. Les candidoses profondes

Les candidoses profondes, encore appelées systémiques, recouvrent les septicémies à *Candida* et les affections viscérales profondes dont le point de départ est le plus souvent une dissémination hémotogène. Rares il y a quelques années, elles surviennent surtout chez des patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs, dans les services de réanimation médicale ainsi que dans les unités d'onco-hématologie. A ce titre, elles occupent désormais le 4^{ème} rang des infections nosocomiales en Europe (**Samaranayake *et al.*, 2004**) et aux Etats-Unis (**Bodey *et al.*, 2002**).

Chapitre II :
Les biofilms
fongiques

1. Généralité

Un biofilm est une communauté de différents micro-organismes aérobies ou anaérobies (bactéries, champignons, algues, protozoaires, etc.) qui se caractérisent par des cellules fixées les unes aux autres, l'ensemble ainsi formé étant lui-même fixé à une surface non toxique (bois, verre, plastique, métal sauf cuivre, poisson, etc.), dans toutes les positions d'orientation de la surface, dans un milieu où l'humidité est au-dessus du point de saturation ou bien dans un milieu aquatique. Les micro-organismes sécrètent une matrice complexe de substances exopolymériques appelés classiquement EPS, sécrétion dans laquelle serait impliqué le système de « Quorum Sensing ». La matrice est composée essentiellement de polysaccharides et polyprotéines qui se regroupent et facilitent l'adhésion à la surface. L'ensemble de micro-organismes et les exopolymères forment souvent une couche protectrice visqueuse et développent une résistance aux méthodes de désinfection chimique, physique et parfois de détachement mécanique (Sailer, 2003).

2. Le biofilm de *C. albicans*

C. albicans est l'espèce fongique la plus souvent associée à la formation des biofilms. La levure est capable de développer des biofilms sur presque tous les implants médicaux, des cathéters vasculaires et pacemakers aux prothèses dentaires et lentilles de contact (Kojic et Darouiche, 2004). Les études estiment que plus de 45 millions de dispositifs médicaux sont implantés chaque année aux États-Unis et au moins 50% des toutes les infections hospitalières sont associées à ces implants (Beloin *et al.*, 2008). Dans 1 à 60% de cas il y a développement d'une infection après l'introduction d'un dispositif médical et les espèces de *Candida* sont responsables d'environ 20% de ces infections (Kojic et Darouiche, 2004). De plus, *C. albicans* peut coloniser des différents tissus de l'hôte, comme par exemple l'endothélium des valves cardiaques ou la muqueuse vaginale, conduisant ainsi au développement des endocardites ou des vaginites (Douglas, 2003).

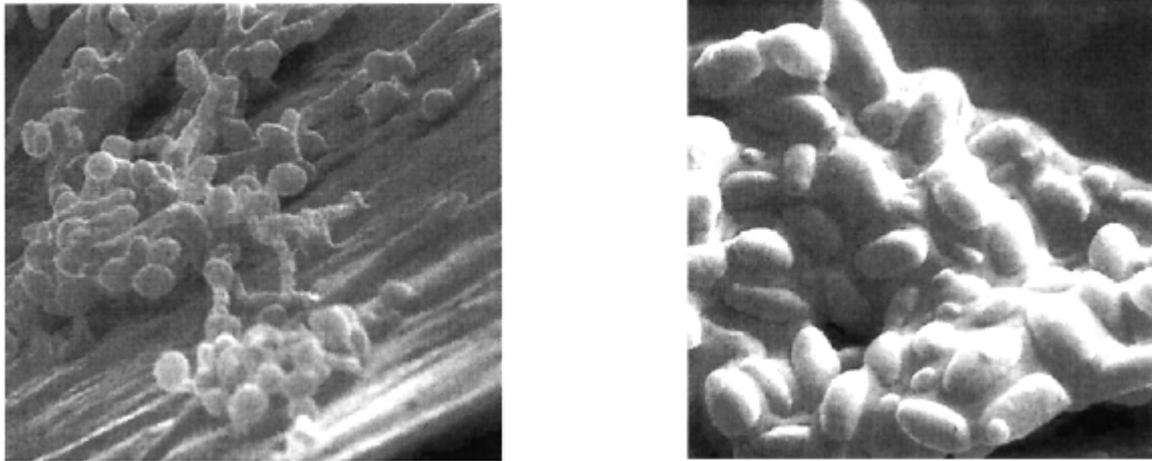


Figure 5 : Biofilm candidal sur cathéter, dans la lumière interne (A) et sur la face externe (B) (Lewis,2008).

3. Structure des biofilms :

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

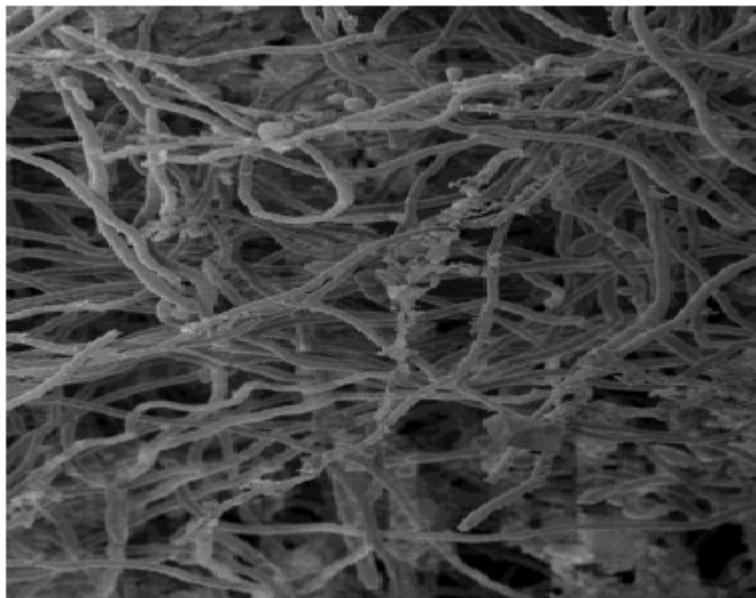


Figure 6 : Image à la microscopie électronique à balayage d'un biofilm fongique de *Candida albicans* $\times 1100$ (B) (Seddiki et coll, 2013).

Le biofilm n'est pas un milieu homogène, mais un environnement qui présente souvent une architecture complexe, très variable selon les espèces qui le composent et les conditions environnementales (Sutherland, 2001). Son développement est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les micro-organismes. Cette dernière est composée essentiellement d'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur (Kumamoto, 2002).

Nous y trouvons également d'autres composants, tels que l'ADN, l'ARN et les lipides (Sutherland, 2001). La structure du biofilm est fortement influencée par plusieurs paramètres, dont la température et la composition du milieu (Kumamoto, 2002). Ces facteurs affectent plusieurs gènes, qui sont ainsi exprimés différemment lors de la formation du biofilm et de la croissance sous forme planctonique. L'architecture globale du biofilm peut varier aussi selon le substrat sur lequel il est formé et ses états de croissance (García et coll, 2004). De plus, le développement tridimensionnel du biofilm conduit à la création de gradients physico-chimiques. Les régions au centre des agrégats sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le milieu externe sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (Costerton et coll, 1994). Il est important de noter que les biofilms qui abritent *Candida albicans* se composent d'un réseau dense de levures et des formes filamenteuses (hyphes et pseudohyphes) (Seddiki et coll, 2013). Les hyphes sont des éléments essentiels pour assurer l'intégrité de la structure et l'architecture multicouche caractéristique de la maturité des biofilms (Baillie et Douglas, 1999).

4. Formation du biofilm de *Candida albicans*

Si les mécanismes moléculaires exacts diffèrent d'un organisme à un autre, les étapes du développement du biofilm semblent être conservées au sein d'un large éventail de microbes (Kuhn, 2004). La formation des biofilms est un phénomène extrêmement complexe, sa constitution nécessite plusieurs étapes et se déroule selon une séquence bien établie (Chandra et al., 2001a)

Ces étapes comprennent l'attachement des cellules à un substrat, la croissance et l'agrégation des cellules en microcolonies, la maturation et le maintien de l'architecture du biofilm avec l'élaboration du quorum sensing (**Kuhn, 2004**).

La progression d'un biofilm mature de *Candida albicans* est tributaire de l'adhésion cellulaire, de la production d'une matrice extracellulaire et de la transition levure-hyphes (**Nett et Andes, 2006**). L'adhésion joue un rôle majeur tout au long de l'élaboration d'un biofilm à *Candida albicans* (**Seddiki, 2010**).

- Premièrement, les cellules s'accrochent à la surface et se lient les unes aux autres pour la formation d'une couche basale (**Seddiki, 2010**).
- deuxièmement, la liaison des hyphes les uns aux autres pour la stabilisation du biofilm mature (**Solt, 2008**).

Les cellules du biofilm de *C. albicans* adhèrent dans un premier temps à la surface. Cette adhésion est souvent citée comme la première étape du processus d'infection pour le genre *Candida* (**Haynes, 2001**).

La phase d'adhésion est divisée en deux étapes (réversible) et (irréversible) du fait que l'attachement initial à la surface est souvent faible, cette première phase est suivie d'une période de formation de tubes germinaux (**Monds et O'Toole, 2008**).

Au cours de la phase de maturation, la quantité du matériel extracellulaire augmente avec le temps d'incubation, jusqu'à ce que la levure soit complètement enfermée dans cette matière. A ce stade, il est difficile de se concentrer sur la base formée de communauté de cellules couvertes par la matrice (**Chandra et cou. 2001**).

Selon **Ramage et ses collaborateurs** en **2005** la formation du Biofilm se déroule en trois phases de développement

- Phase d'adhésion (6 h) : adhésion au substrat et prolifération des cellules
- Phase intermédiaire (12 h) : agrégation cellulaire. Formation de microcolonies et production de la matrice extracellulaire (EPS)

Phase de maturation (48 h) : transition des cellules de levure vers des formes filamenteuses (pseudohyphes et hyphes) encastrés dans une matrice extracellulaire.

Par contre, selon **Jabra-Rizk (2004)**, ces trois phases se répartissent comme suit

- Phase d'adhésion de 0 à 11h
- Phase intermédiaire de 12 à 30 h
- Phase de maturation : de 30 à 72 h

Au départ (0 à 2 h), la majorité des cellules de *Candida albicans* sont présentes sous forme de levure en adhérant à la surface. Entre 3 et 4 h de distinctes microcolonies apparaissent sur la surface, mais surtout, il n'y a pas de matériel extracellulaire au début de formation du biofilm.

A 11 h, les communautés de *Candida albicans* apparaissent comme des morceaux épais de champignons, en raison de la croissance cellulaire le long de zones de regroupement des surfaces.

La phase intermédiaire de développement est caractérisée par l'émergence de la majorité du matériel non cellulaire (12 à 14 h), qui apparaît comme un voile (film)

couvrant les microcolonies fongiques (**Jabra-Rizk, 2004**)

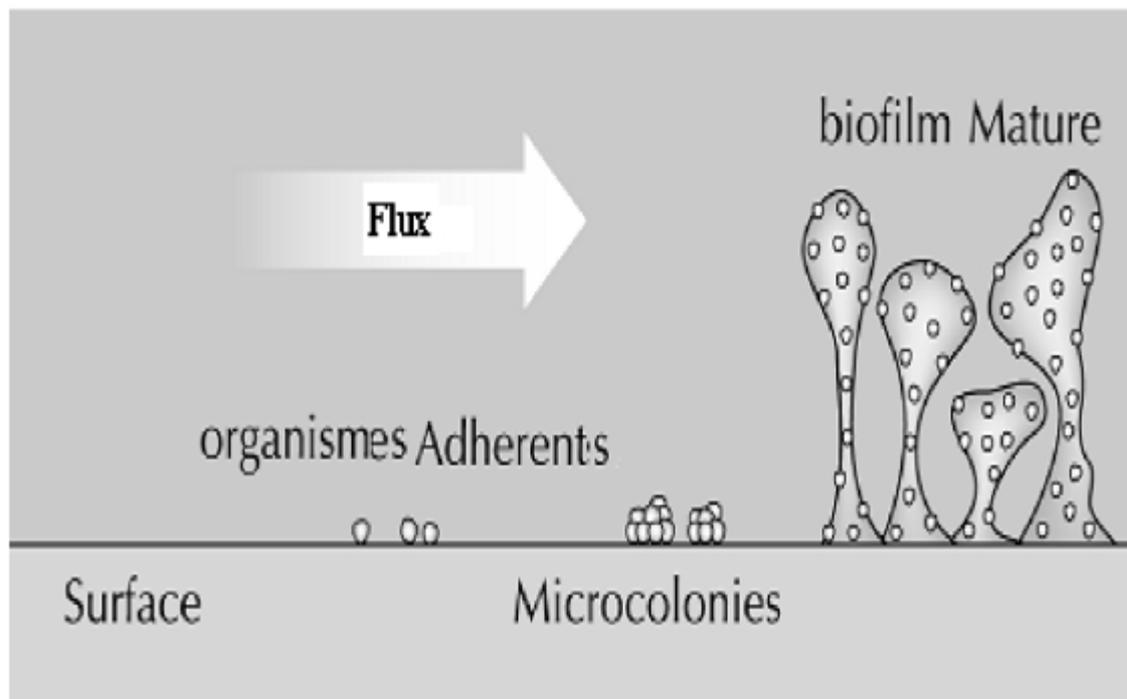


Figure 7 : les différentes phases de la formation des biofilms microbiens (**Baillie, 2000**).

Selon d'autres auteurs, la formation et le développement du biofilm peuvent être divisés en quatre étapes (**Perumal, 2007**).

- l'adhérence des micro-organismes à une surface
- la formation de discrètes colonies et l'organisation des cellules
- la sécrétion de polysaccharides extracellulaires (EPS) et la maturation en une structure en trois dimensions
- la diffusion de la progéniture des cellules du biofilm.

Ces phases de croissance transforment les blastospores cellulaire adhérentes en communautés intégrées dans une matrice polysaccharidique (**Chandra et coll., 2001a**).

De plus, ces étapes se déroulent en cycle et le retour des cellules à la phase planctonique complète le cycle de développement du biofilm (Monds et O'toole, 2008).

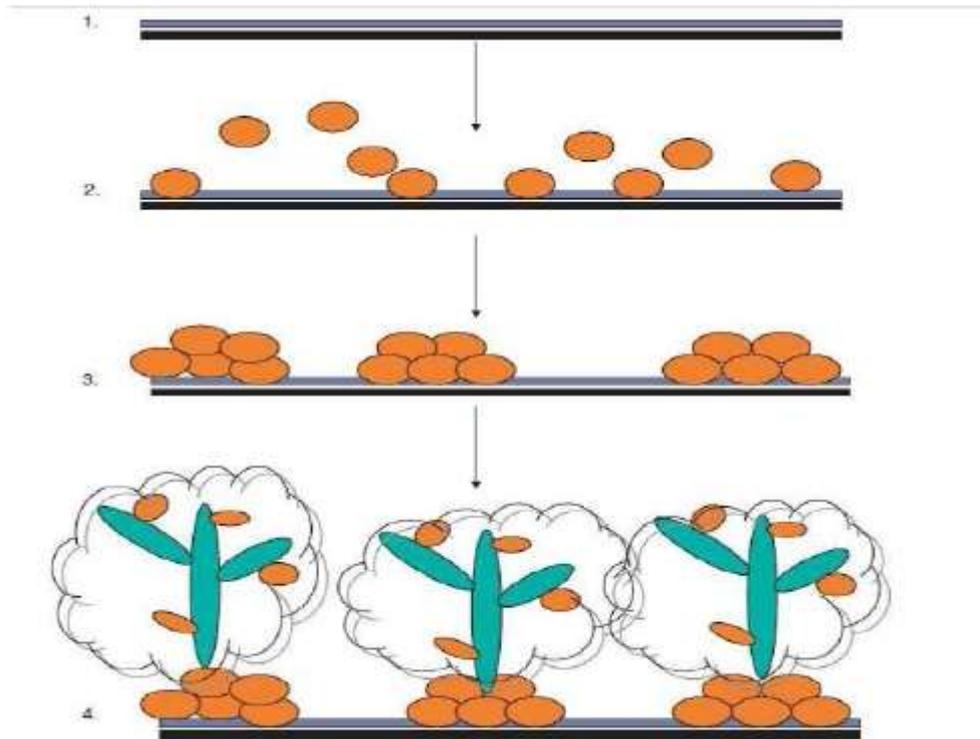


Figure 8 : Développement du biofilm de *Candida albicans* sur les surfaces inertes. (1) surface inerte (bleu) recouverte d'un film de conditionnement, composé essentiellement de protéines de l'hôte. (2) début d'attachement et de colonisation par les cellules de la levure *Candida albicans*(orange). (3) formation de la couche basale, impliquant l'accumulation des levures dans la formation des microcolonies. (4) Extension de l'architecture du biofilm par le développement d'une couche d'hyphes / pseudohyphes (turquoise) qui dépasse la couche de levure intérieure aux confins du biofilm. Le développement des couches d'hyphes se produit simultanément avec le développement de l'épaisse couche de la matrice qui a englouti à la fois les couches d'hyphes et de levure (Perumal, 2007).

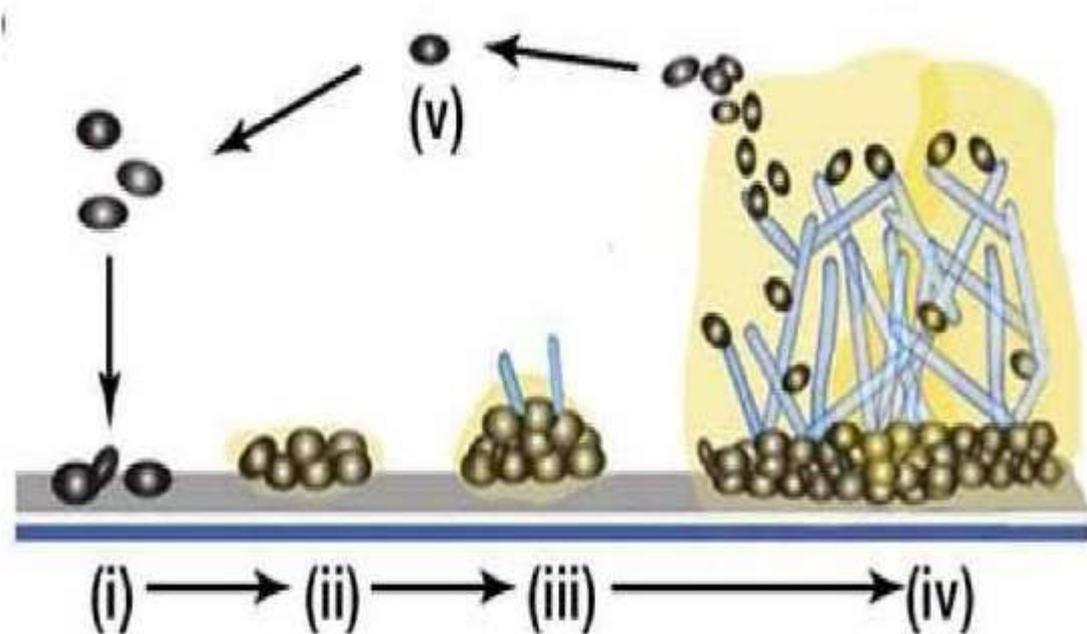


Figure 9 : Modèle de développement de biofilms de *Candida albicans*, cinq étapes sont en général définies: (i) adsorption, (ii) adhésion, (iii) formation de microcolonies, (iv) maturation, (v) dispersion (Haras, 2005).

5. La résistance des biofilms aux antifongiques

La résistance des biofilms impliquant *C. albicans* a été étudiée par de nombreux auteurs **Chandra et coll (2001)** ont étudié la formation de tels biofilms sur des surfaces de polyméthacrylate de méthyle et ont montré que leur résistance vis-à-vis des traitements antifongiques classiques que sont l'amphotéricine B, la nystatine, le fluconazole et la chlorhexidine, s'accroît au fur et à mesure de la formation du biofilm. Ces résultats sont concordants avec ceux observés par d'autres équipes sur des biofilms développés à la surface de cathéters (**Baillie and Douglas 1999**). De nouvelles molécules, telles les echinocandines et les formulations lipidiques de l'amphotéricine B, semblent avoir une activité sur le biofilm candidal (**Kuhn and Ghannoum 2004**). Les recommandations actuelles imposent quasi-systématiquement la dépose du matériel médical car malgré une thérapie antifongique adaptée, le risque de développer une candidose généralisée est important. Les études relevant les cas de candidémie observent une mortalité allant jusqu'à 40% des cas (**Mah, 2001**).

Chapitre III :
La plante étudiée
Thymus vulgaris

1. Généralités :

Le genre *Thymus* est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des *labiées*, avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen (**Morales, 2002**). Comme beaucoup de *labiées* elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue est sans conteste *Thymus vulgaris* L. localement connu « zaatar ». En français et anglais par exemple, on emploie fréquemment le nom du genre (« *thym* » et « *thyme* » respectivement) pour désigner l'espèce *Thymus vulgaris* (**Amiot, 2005**). Le nom « *Thymus* » dérive du mot grec « *thymos* » qui signifie « parfumer » à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (**Pariente, 2001**). L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (**Iserin, 2001**).

Il existe une variation de la production des composés secondaires chez certaines espèces végétales que l'on appelle polymorphisme chimique. Cette variation peut être quantitative ou qualitative. Un grand nombre d'espèces possèdent des individus dont les composés secondaires varient quantitativement d'un individu à un autre. Par contre, les exemples de variation qualitative, c'est-à-dire l'existence de chémotypes au sens strict dont les individus peuvent porter des molécules de nature chimique différentes les un des autres, sont moins fréquents. C'est notamment le cas de *Thymus vulgaris* qui exprime six formes de chémotypes différents, chaque chémotype est nommé suivant le composant principal de son huile essentielle (exemples : thymol (T), carvacrol (C),...) (**Amiot, 2005**).

2. Description botanique de la plante

Appareil végétatif Plante: *herbacée*, souvent velue. C'est un petit sous-arbrisseau vivace, touffu dont les rameaux sont très aromatiques, de 7 à 30 cm de hauteur qui ont un aspect grisâtre ou vert grisâtre (**Dorman , 2000**).

2.1. Tige : elle est généralement quadrangulaire, souvent renflée aux nœuds. Elle est ligneuse à la base, et herbacée supérieurement ou elle devient presque cylindrique. Les tiges ligneuses et très ramifiées sont groupées en touffe ou en buisson très dense. Elles peuvent acquérir, vers leur base, une assez grande épaisseur. Les tiges florifères ne produisent jamais de racines adventives, et sont rampantes, dressées ou redressées,

tortueuses dans leur partie inférieure, velues et blanches tout autour chez les jeunes rameaux (Jordan *et al.*, 2006).

2.2. Feuilles: elles sont très petites, ovales, lancéolées⁸, à bord roulé. En dessous les nervures latérales sont distinctes, obtuses au sommet, ponctuées supérieurement, aux pétioles⁹ extrêmement courts, et blanchâtres à leurs faces inférieures opposées, disposées en paire se croisant d'un nœud à l'autre, dépourvues de stipules¹⁰ et à limbe¹¹ généralement denté (Satil, 2002).

2.3. Racines: les racines sont pivotantes, ce qui permet à la plante d'aller chercher l'eau en profondeur (Jordan *et al.*, 2006).

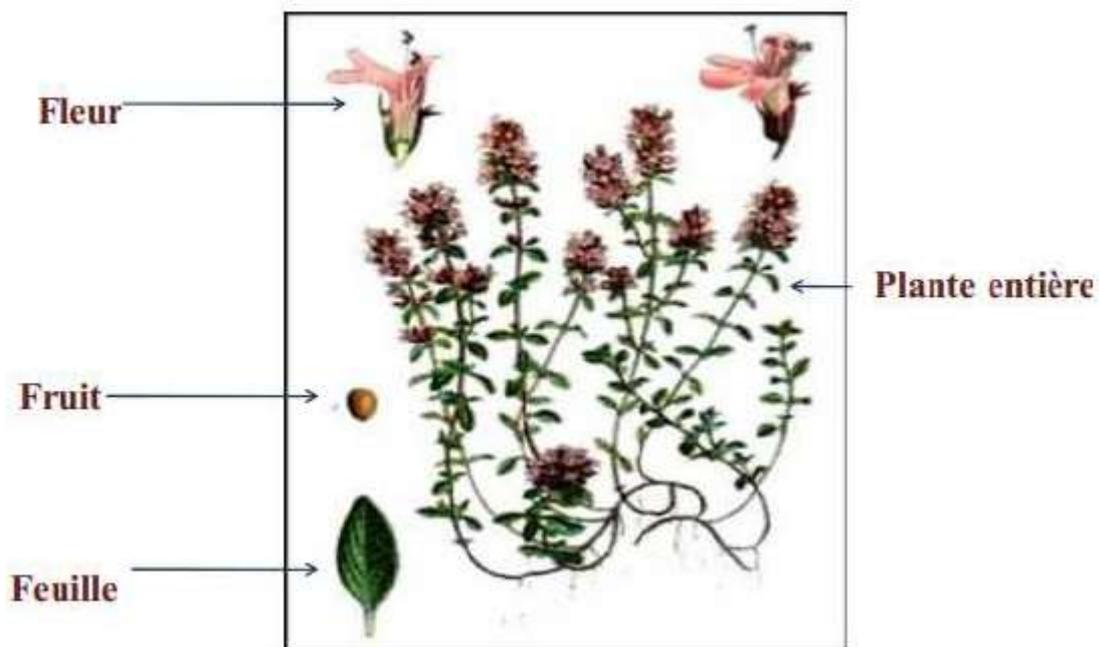


Fig. 10 : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L (Iserin, 2001).

3. Classification botanique de *Thymus vulgaris* : Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (**Morales, 2002**) synthétisée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classification botanique de *Thymus vulgaris*

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> L

4. Les huiles essentielles:

Une huile essentielle est un produit de composition complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux, ou des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverse partie des végétaux. Elles sont concentrées, volatiles, huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur (**Belhadi, 2010**).

Le thymol est un composé aromatique de la famille des phénols. Le thymol est notamment présent en solution dans plusieurs huiles essentielles végétales, en particulier celle du thym. Sous forme solide, le thymol à l'apparence de cristaux sans couleur mais dégageant une odeur très marquée. Le thymol entre dans la composition de divers médicament en raison de son pouvoir antibactérien et antiseptique. Il est aussi efficace contre certains champignons parasites.

On trouve par exemple du thymol dans des médicaments soulageant les aphtes, les irritations de la gorge et les piqûres d'insectes. À noter : le thymol est également employé pour protéger les ruches d'abeille des invasions parasitaires au varroa (type d'acarien) (Burt, 2004).

5. Composition chimique :

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intraspécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimique (Amiot, 2005). La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondants sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1 %), p-cymène (9,1 - 18,5 %), α -terpinène (6,9 - 18,0 %), carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 - 6,2 %). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol (Bouhdid et al., 2006).

Le contenu phénolique total, flavonoïdes, catéchine, et anthocyanine dans l'infusion aqueuse préparée du *thymus vulgaris* a été déterminé par des méthodes spectrophotométriques (Kulišić et al., 2006). Le tableau 2, ci-dessous résume les résultats.

Tableau 2 : Teneur en polyphénols (en μg EAG/mg d'extrait) dans l'infusion aqueuse du *Thymus vulgaris* (Kulišić et al., 2006)

Plante	Phénol totaux	Non-flavonoïdes		Catéchines	Anthocyanines
<i>Thymus vulgaris</i>		5.0	8.3	1.2	6.7

6. Effets antimicrobiens

L'huile essentielle de thym, riche en phénols, est douée de propriétés antibactériennes facilement mises en évidence in vitro (**Bruneton, 1999**). L'huile essentielle de trois plantes dont *Thymus vulgaris* a été testée, par **Bouhdid** et ses collaborateurs (**2006**), pour leur activité antibactérienne, l'huile de *Thymus vulgaris* témoigne d'une activité antibactérienne intéressante sur les bactéries gram positives comme sur les bactéries gram négatives. En effet, L- monocytogènes, souche hautement pathogène, présente une sensibilité élevée à cette huile. Des résultats similaires ont été obtenus par **Ettayebi** et ses collaborateurs (**2000**), qui ont montré que l'activité de l'huile du thym a été plus efficace contre les bactéries gram positive (*S. aureus*, *S. pyogènes* et *S. pneumoniae*) que contre les gram négative (*E. coli* et autre). D'autre part ces mêmes auteurs ont trouvé que cette grande activité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est reliée au thymol qui est majoritaire de cette huile. L'activité antibactérienne de 11 huiles essentielles de plantes aromatiques contre la souche bactérienne *Bacillus cereus* INRA L2104, microbe pathogène développé en bouillon de carotte à 16° C, a été étudiée. Une inhibition totale de la croissance des spores bactériennes a été observée pour l'agent antimicrobien *Thymus vulgaris* (**Valero et Salmerón, 2003**).

En plus de l'activité antibactérienne, des études (réalisées in vitro et in vitro) ont prouvé que l'huile essentielle (surtout le thymol) de *Thymus vulgaris* possède des propriétés antifongiques contre un certain nombre de mycètes. **Reddy et ses collègues (1998)**, dans leur étude, ont montré le potentiel antifongique élevé de l'huile volatile de *Thymus vulgaris* comme agents protecteurs des fruits de fraise (*Fragaria ananassa*) contre la détérioration causée par les mycètes *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonijer*. Une étude similaire réalisée par **Giordani** et ses collaborateurs (**2008**), qui ont examiné les huiles essentielles de quelques plantes aromatiques dont *Thymus vulgaris* pour leurs effets antifongiques contre une espèce de levure *Candida albicans* par la détermination de leurs CMI (3.71 µg/ml).

Nous s'intéressons à étudier l'effet préventif des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* contre la formation de biofilms chez *Candida albicans*. Pour cela, Notre travail consiste les étapes suivantes :

1. Extraction des huiles essentielles.
2. Prélèvements, isolement et identification de *Candida albicans*.
3. Evaluation du potentiel à former les biofilms des souches étudiées et détermination des CMI et SCMI.
4. Etude de l'effet des huiles essentielles *Thymus vulgaris* sur la formation des biofilms chez *Candida albicans* isolées de l'hôpital à Saida.

I. Extraction des huiles essentielles :

I.1. Matériel végétal :

Les échantillons de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de *Thymus vulgaris* ont été récoltés au mois de Mai (2015) à Sétif. Les feuilles ont été pesées, broyées grossièrement et récupérées dans des sacs propres.

I.2. Procédure d'extraction des huiles essentielles :

L'extraction des huiles essentielles (HE) a été effectuée par hydrodistillation. La distillation a été réalisée par ébullition, pendant 3 heures, de 25 g de matériel végétal avec 350 ml d'eau distillé dans un ballon de 500 ml reliée à un réfrigérant (figure 11). Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à la matière sèche.

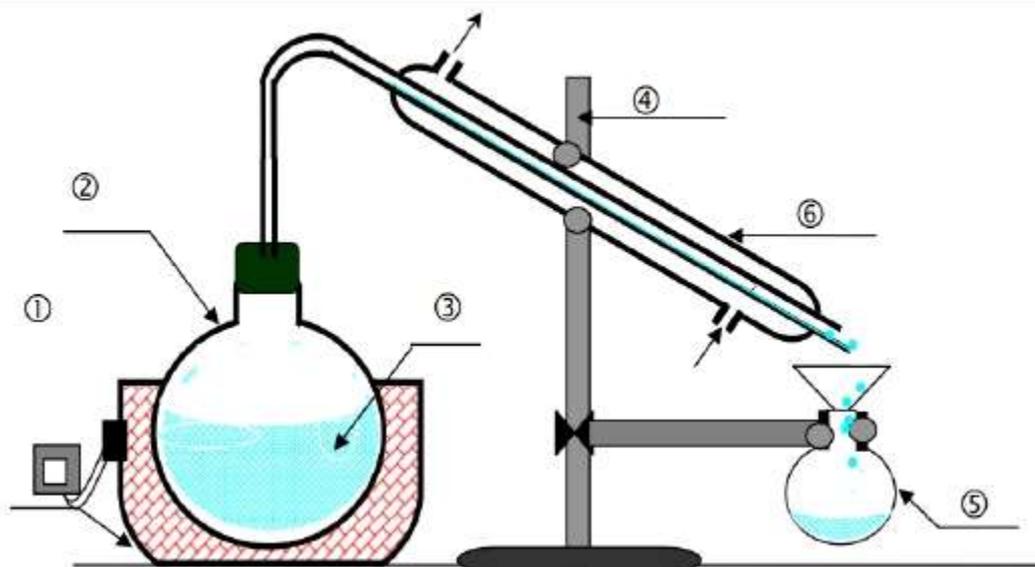


Figure 11 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation des huiles essentielles (Hernandez, 2005)

- 1 : chauffe ballon, 2 : ballon, 3 : matière végétale + eau, 4 : statif, 5 : ballon recette, 6 : réfrigérant

La distillation à l'eau ou «hydrodistillation» signifie que le matériel végétal est en contact direct avec l'eau. Selon **Bruneton (1999)**, l'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont : la calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle. La non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + végétaux) et la modification de l'odeur, de la couleur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation (**Chalchat et al., 1997**).

Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées. Parmi les huiles

extraites par cette méthode, on cite l'huile de menthe, de myrte et de l'herbe à citron (Lima *et al.*, 2004).

I.3. Décantation :

L'opération de décantation, représentée dans la figure 12, a été effectuée à l'échelle laboratoire à l'aide d'une ampoule à décanter. Nous laissons le mélange hétérogène décanter jusqu'à l'obtention des deux phases distinctes ; la phase supérieure dite organique comporte l'huile essentielle et la phase inférieure est la phase aqueuse. L'huile essentielle a été stockée à 4 °C

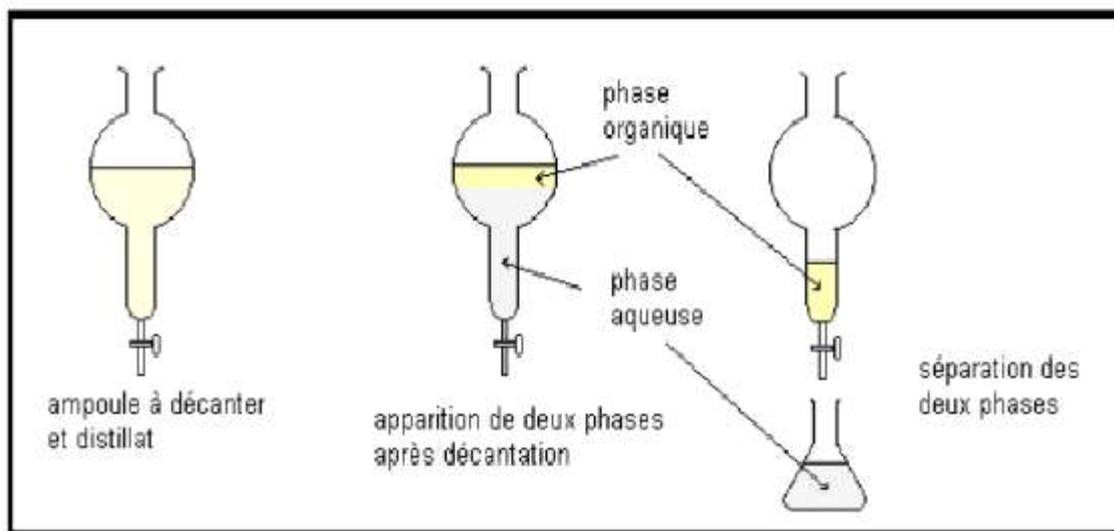


Figure 12 : Décantation de l'huile essentielle par ampoule à décanter (Lima *et al.*, 2004).

II. Prélèvements, isolement et identification de *Candida albicans* :

Notre travail a été réalisé au niveau de : l'hôpital Hamdan Bakta à Saida, au niveau des services de Gynécologie, Pédiatrie et Réanimation.

II.1. Prélèvements :

Les prélèvements ont été effectués entre le 29/01/2016 et le 22/02/2016 au niveau des services de Gynécologie, Pédiatrie et de Réanimation l'hôpital Hamdan Bakta (Saida).

Ces prélèvements ont été réalisés à partir des cathéters depuis 48 heures et plus **selon les recommandations de Quinet (2006)**. Les cathéters utilisés sont pris directement

des patients et mis dans le milieu Saboraud liquide (5 ml). Afin d'éviter toute contamination, les tubes sont ouverts devant une torche, flambés puis vite refermés après coupure des extrémités distales des cathéters à l'aide de ciseaux stériles. Les tubes contenant les échantillons sont agités, marqués et incubés à l'étuve à 30 °C pendant 48 heures **selon la technique décrite par Brun-Buisson et coll., (1987)**



Figure 13 : cathéters dans le Bouillon Sabouraud

I.2. Isolement et purification :

A partir des tubes présentant un trouble, des boîtes de pétri préalablement coulées avec la gélose sabouraud sont ensemencées par stries, puis incubées à 30 °C pendant 48 heures. Ensuite, une colonie est prélevée de la gélose, repiquée dans le milieu sabouraud liquide stérile et incubée à 30 °C pendant 48 heures. Chaque souche pure est ensemencée sur gélose sabouraud inclinée en tube puis incubée à 30 °C pendant 48 heures et conservée à 4 °C.

I.3. Identification :

L'identification des souches isolées à partir des implants médicaux est réalisée selon les tests biochimiques et la microculture.

I.3.1. Examen macroscopique :

Si la présence des colonies blanches et crémeuses en culture (**Develoux et Bretagne, 2005**) se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (**Graser et al., 1996**)

I.3.2. Examen microscopique :

Cette partie a été réalisée par un examen direct à l'eau physiologique. Nous avons déposé une petite quantité de la suspension sur une lame. Après, nous avons ajouté une goutte de l'eau physiologique et déposé une lamelle. La lecture se fait, en parcourant au microscope à l'objectif 10 ou 40, toute la surface de la lamelle.

Si l'examen est positif on observe des éléments unicellulaires, ovoïdes de taille variable qui présentent un ou plusieurs bourgeonnements polaires ou latéraux (**Monsieur, 2001**).

I.3.3. Test de blastèse :

Appelé aussi test de germination ou de Tschadjian. Il consiste à émulsionner une pointe de pipette de levures dans 1 ml de sérum humain, puis à l'incuber à 37 °C pendant 3 à 4 heures. S'il s'agit de *C. albicans*, on observe dans presque 90 % des cas un tube germinatif partant de la levure sans présence de constriction à la base (Drochey et Vieu, 1957)

I.3.4. Microculture sur le milieu PCB :

Une colonie de levures est prélevée puis ensemencée par stries sur gélose PCB (pomme de terre, carotte, bile) en créant de fentes dans la surface de la gélose à l'aide d'un fil de platine. La zone ensemencée est recouverte d'une lamelle couvre-objets stérile ensuite incubée à 25 °C pendant 48 heures. La présence de chlamydospores (spores globuleuses de 10 à 15 µm entourées d'une paroi épaisse) signifie qu'il s'agit dans 95 % des cas de *C. albicans*. (Drochey et Vieu, 1957).

II. Evaluation du potentiel à former les biofilms des souches étudiées

Dans le but de vérifier l'aptitude des souches isolées à former les biofilms, ces dernières sont soumises à l'action d'un agent antifongique pour mettre en évidence une éventuelle résistance des levures sessiles. Ce test consiste à calculer les concentrations minimales inhibitrices «CMI» ainsi que les concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles «SCMI», selon différents protocoles. L'antifongique choisi est le fluconazole et l'huile essentielle de *thymus vulgaris* pour la détermination des SCMI et pour la détermination des CMI nous avons utilisé seulement l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Le pouvoir des souches de *Candida albicans* à former les biofilms est jugé positif si les concentrations minimales inhibitrices calculées selon le protocole de **Ramage et coll, (2001a)** sont supérieures aux concentrations minimales inhibitrices calculées selon le protocole du CLSI (**CLSI-M27-A2 2002**). Les premières, des cellules sessiles, sont dénommées "SCMI", les secondes sont désignées par "CMI" (des cellules planctoniques). Seules les cellules adhérentes aux parois forment des biofilms, celles qui n'ont pas la capacité de les former vont être éradiquées suite au lavage par le PBS. L'activité antifongique de fluconazole et huile essentielle de *thymus vulgaris* est testée sur des souches isolées de différents services, ainsi que deux souches de référence, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* 444 IP.

II.1. Détermination des CMI et SCMI

II.1.1. Détermination des CMI

Les CMI des cellules planctoniques des différentes souches sont déterminées selon la méthode de microdilution décrite par le CLSI (CLSI-M27-A2 2002).

II.1.1.1. Détermination des CMI des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* :

CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A2) est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (CLSI-M27-A2 2002). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes. Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations décroissantes d'huile essentielle. Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le bouillon RPMI (*Roswell Park Memorial Institut*). Nous avons utilisé ce milieu à pH 7,0.

II.1.1.1.1. Préparation des solutions des huiles essentielles :

Nous avons préparé une solution mère (3 ml) dans une éprouvette de 5ml à partir de 600 mg des huiles essentielles (HE) et 60 µl du DMSO. Ce volume a été complété par le Bouillon sabouraud (BS) jusqu'à 3 ml (3000 µl). La concentration de l'HE a été exprimée en mg/ml. Ensuite, nous avons mélangé la solution manuellement et la filtré aseptiquement à l'aide d'un filtre stérile (Burt, 2004).

II.1.1.1.2 .Préparation de l'inoculum :

a. Préparation de pré-culture :

Détermination des CMI des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de la phase exponentielle de la croissance. La réactivation des souches s'effectuée par ensemencement dans un milieu de culture liquide (bouillon sabouraud). Après incubation de 24 heures à 30°C, un deuxième

repiquage est réalisé sur des boîtes de pétri contenant de la gélose sabouraud, puis, incubées à 30°C pendant 48 heures (Hellal, 2011).

b. Préparation de la suspension :

A partir des cultures jeunes sur la gélose sabouraud, nous avons prélevé cinq (05) colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologie stérile, agitées manuellement pendant quelques secondes. L'ajustement de la charge, est réalisé à l'aide d'une cellule Thomas sous un microscope optique (Hellal, 2011).

II.1.1.1.3. Utilisation de la microplaque (la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide) :

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement l'RPMI comme témoin positif (100 µl). Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'huile essentielle dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. Le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans HE). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures (CLSI-M27-A2 2002).

La lecture du résultat s'effectue à l'œil nu à l'aide d'une source de lumière sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme une trouble). [(Espinel-Ingroff et Canton., 2007) ; (Majorosetcoll., 2005)].

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par un ensemencement sur milieu solide (CLSI-M27-A2 2002).

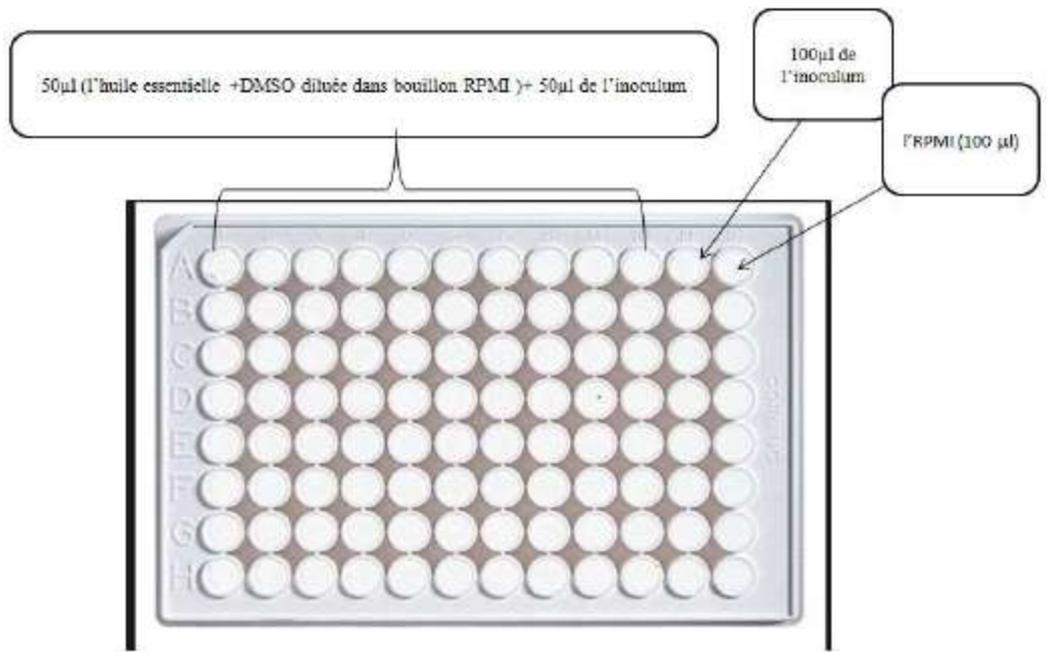


Figure 14: Utilisation de la microplaque (la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide) pour la détermination des CMI

II.1.1.1.4. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par **CANTON et coll, 2003**. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « *Clinical and Laboratory Standards Institute* » (**Espine et Canton, 2007**).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu sabouraud gélose. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (**Majoros et coll, 2005**).

II.1.2.Détermination des SCMI

Pour les cellules sessiles (des biofilms), les SCMI des différentes souches sont déterminées selon la méthode de microdilution décrite par **Ramage et coll, (2001a)**.

a. Préparation des souches

Les souches ont été inoculées avec une anse de platine dans 20 ml du milieu Sabouraud liquide puis placées dans un agitateur sous agitation continue à 130 tours/minutes, 16 heures d'incubation à 30 °C. Dans ces conditions, toutes les souches sont récupérées en phase de bourgeonnement. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 minutes puis lavées deux fois à l'aide du tampon phosphate stérile (PBS) 10 mM, pH 7,4 additionné de 2,7 mM de chlorure de potassium (KCl) et 137 mM de chlorure de sodium (NaCl).

Dans le Sabouraud liquide additionné de 2 % de glucose, les cellules sont réensemencées à une concentration cellulaire de départ égale à 10^6 cellules/ml dénombrée sur cellule de Thomas.

b. Formation des biofilms

Des microplaques de polystyrène pré stérilisées sont utilisées pour la mise en évidence de la formation des biofilms. 100 µl de la suspension de levure est placée dans chaque puits. Les microplaques sont, par la suite, convenablement recouvertes à l'aide du papier aluminium stérile. L'incubation se fait à 37 °C pendant 48 h.

Cette opération est réalisée tout de suite après l'ajustement de la concentration cellulaire de départ de 10^6 cellules/ml.

c. Test antifongique

Après la formation du biofilm, le surnageant est aspiré et les cellules non adhérentes sont soigneusement enlevées par trois lavages successifs avec du PBS stérile. A cette fin, 100 µl du PBS sont ajoutés puis ré-aspirés. Le liquide résiduel du PBS est retiré en utilisant du papier buvard stérile. L'aspiration du surnageant doit être effectuée avec soin pour éviter la destruction des biofilms.

c.1. Premier antifongique : Fluconazole :

Après avoir ajouté dans chaque puits de la microplaque 100 µl du milieu le Sabouraud liquide additionné de 2 % de glucose, nous avons incorporé la solution de fluconazole. pour ce faire, 100 µl d'une solution mère d'antifongique à une concentration de 128 µg/ml sont ajoutés au premier puits. Après homogénéisation du

contenu du puits à l'aide d'une micropipette, nous avons prélevé 100 µl que nous avons ajoutés au deuxième puits et ainsi de suite jusqu'au dernier où le volume récupéré est écarté.

Un témoin négatif et un témoin positif sont préparés en parallèle avec les échantillons. Le témoin négatif correspond à une incubation de fluconazole et dans le milieu de culture en absence de levures. Par contre, le témoin positif consiste à incuber les levures en absence de fluconazole.

Les microplaques ainsi préparées sont scellées et placées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h. Les SCMI ont été déterminées en utilisant la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par **Canton et coll. 2003**. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « *Clinical and Laboratory Standards Institute* » (**Espin et Canton, 2007**).

c.2. Le produit à tester : huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Après avoir ajouté dans chaque puits de la microplaque 100 µl de l'huile essentielle pour chaque souche, une série de dilutions doubles de l'huile essentielle est réalisée. Pour cela,

100 µl des solutions de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sont placés dans chaque puits jusqu'à la fin de la ligne de la microplaque avec des dilutions réalisées dans un ordre décroissant (100 µg/ml à 0.19 µg/ml) à partir d'une solution mère d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* 100µg/ml .

Un témoin négatif et un témoin positif sont préparés en parallèle avec les échantillons. Le témoin négatif correspond à une incubation de solution mère d'huile essentielle et dans le milieu de culture en absence de levures. Par contre, le témoin positif consiste à incuber les levures en absence de solution mère huile essentielle.

Les microplaques ainsi préparées sont scellées et placées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h. Les SCMI ont été déterminées en utilisant la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par **Canton et coll. 2003**. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « *Clinical and Laboratory Standards Institute* » (**Espin et Canton, 2007**).

Figure 15: Utilisation de la microplaque (la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide) pour la détermination des SCMI

Étapes de remplissage de la microplaque :

A : 100 µl de la suspension de levure est placée dans chaque puits

B : pour la détermination des SCMI du fluconazole

C : pour la détermination des SCMI de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

D : 100 µl de Sabouraud liquide additionné de 2 % de glucose est placée dans chaque puits

E : 100 µl du fluconazole est placée dans chaque puits

F : 100 µl de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est placée dans chaque puits

G : 100 µl de Sabouraud liquide additionné de 2 % de glucose est placée dans chaque puits.

I. Extraction des huiles essentielles :

I.1. Caractéristiques des huiles essentielles :

La plante de *Thymus vulgaris* est de la famille des *labiées*, comme beaucoup des huiles essentielles aromatiques, est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (Iserin, 2001).

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* obtenue par hydrodistillation est un liquide visqueux, limpide d'une coloration jaunâtre et à odeur forte .

I.2. Rendement en huile essentielle :

Le rendement R en huile essentielle est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R = [\text{Masse d'huile essentielle (g)} / \text{Masse du matériel végétal utilisé (g)}] \times 100$$

R : Rendements massiques des huiles essentielles

Masse du matériel végétal utilisé : 25 g

Masse d'huile essentielle : 0.92 g

$$R = \frac{0.92}{25} \times 100 = 3.68 \%$$

II. Prélèvements, isolement et identification de *Candida albicans*

II.1. Choix de la souche :

Candida albicans, une levure polymorphe opportuniste, est le pathogène fongique le plus commun chez l'humain. Il est responsable, entre autres, de diverses candidoses orales et de vaginites, deux infections très répandues. Cette levure possède des mécanismes d'adaptation complexes, lui permettant de survivre dans diverses conditions environnantes et de causer une grande variété d'infections (Segal, 2005).

Les études américaines estiment l'incidence annuelle de candidémies à 24 cas sur 100 000 patients, avec une mortalité d'environ 40% (Perlroth *et al.*, 2007).

II.2. Choix de prélèvement :

Il est maintenant acquis que les biofilms formés sur les cathéters veineux centraux par les différentes espèces de *Candida* sont impliqués tant dans l'établissement que dans la persistance des candidoses. Le retrait du cathéter fait d'ailleurs partie des bonnes pratiques dans la prise en charge de ces infections [(Mermella, 2001) ;(Sherertzrj *et al .*, 2001)].

Les candidoses restent de très loin les infections fongiques les plus fréquentes dans le milieu hospitalier. L'espèce *Candida albicans* est l'espèce la plus souvent isolée lors d'une candidémie qui peut avoir comme origine un cathéter colonisé [(Hawser et Douglas, 1995), (Hennequin, 1996)]

II.3. Résultats de prélèvement :

Partant des données ci-dessus, nous avons entrepris cette étude qui consiste à isoler des levures de *Candida albicans* à partir des cathéters usés (cathéters vasculaires) au niveau de trois services de l'hôpital Hamdan Bakhta (Saida).

Le tableau N° 3 regroupe le nombre de prélèvements effectués au niveau des services de Gynécologie, Pédiatrie et Réanimation. Ainsi que le nombre de souches de *Candida albicans* isolées.

34 prélèvements ont été effectués à l'hôpital Hamdan Bakhta (Saida), dont 18 au niveau de service de gynécologie, 6 au service de pédiatrie et 10 au service de Réanimation.

6 souches de *Candida albicans* ont été isolées, représentant 17 ,64 % de l'ensemble des prélèvements. Elles se répartissent dans les différents services comme suit : gynécologie, réanimation et pédiatrie 4, 2 et 0 souches, respectivement.

Tableau N° 3: Nombres de prélèvements et de souches de *Candida albicans* isolées dans chaque service

Service	N ^{bre} de prélèvements	N ^{bre} de souches	Taux (%)
Pédiatrie	6	0	0%
Gynécologie	18	4	22.22 %
Réanimation	10	2	20 %
Total	34	6	

En calculant le taux de souches isolées de *Candida albicans* selon le nombre de prélèvements dans chaque service, le service de Gynécologie vient en premier rang avec 22.22 % suivi du service de réanimation avec 20,00 % puis du service de pédiatrie avec 0.00 %.

Nous constatons que le service qui n'a pas concerné par les contaminations des cathéters par la levure *Candida albicans*, selon le nombre de prélèvement, est le service de pédiatrie avec de taux 0%.

Ces résultats rejoignent ceux de **Wesenberg-Ward et coll., (2005)**, qui mettent en évidence l'importance de la levure *Candida albicans* comme agent étiologique des maladies opportunistes, ainsi, **Alem et coll., (2006)**, ont classé les infections dues à cette espèce au quatrième rang des infections nosocomiales et au troisième rang des infections fongiques liées aux cathéters.

De plus, **Hot et coll., (2007)** confirment que le facteur de risque des infections fongiques reste l'utilisation de cathéters.

Par contre, **Diskin en 2008** a montré que seulement 2,8 % d'infections liées aux cathéters sont causées par la levure *Candida albicans*. En effet, *Candida albicans* peut pénétrer l'organisme humain en s'adhérant à une surface en plastique implantée. (**Wesenberg-Ward et coll., 2005**). La plupart des manifestations de la candidose sont

associés à la formation de biofilms qui se produit sur les surfaces des dispositifs médicaux (Pierce et coll., 2008).

II.1 Examen macroscopique de la souche

L'examen macroscopique montre une colonie blanche, crémeuse, lisse. Certaines souches sont plus rugueuses (Csank, 2000).



Figure 16 Examen macroscopique de *c. albicans*

II.2 Examen microscopique

L'observation microscopique de *Candida albicans* montre des levures rondes ou ovalaires bourgeonnantes (blastospores) et la présence de Pseudomycelium.

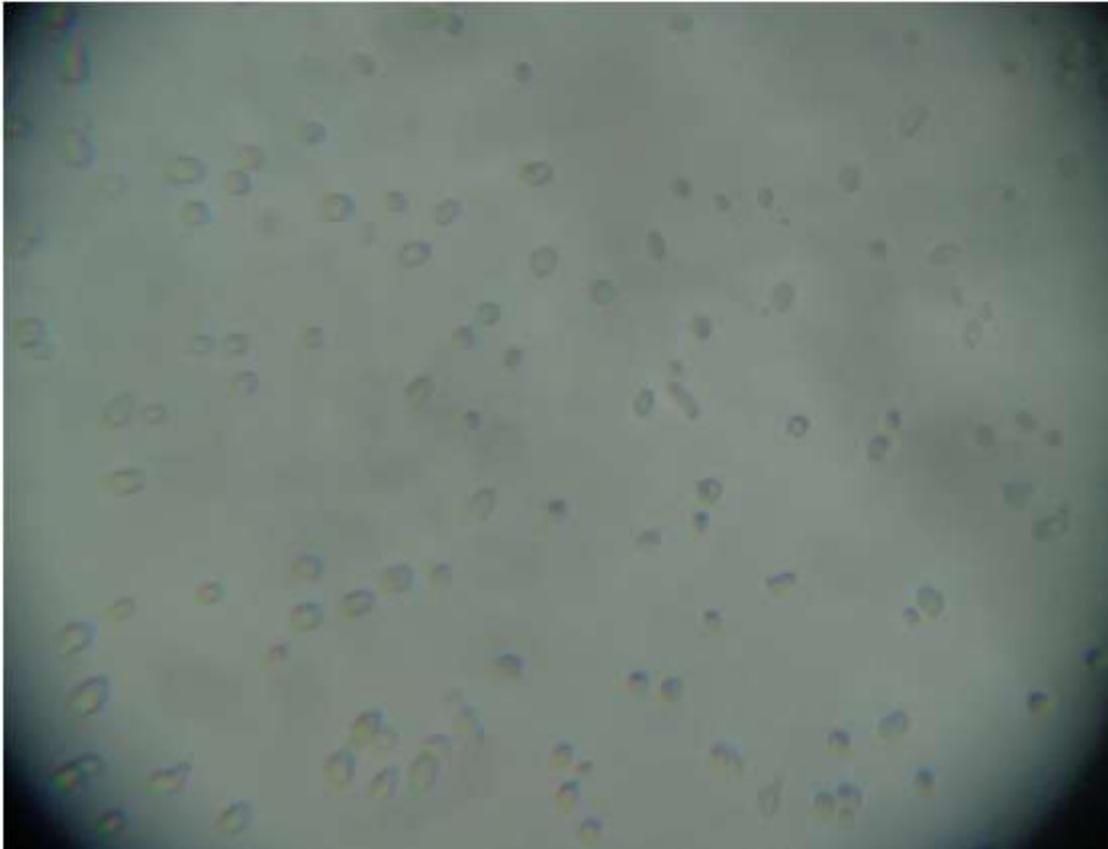


Figure 17 l'observation microscopique de *c. albicans* (G x 100)

En raison de son écologie, *Candida albicans* est la levure la plus fréquemment isolée chez l'homme (66,5% de toutes les levures). Nous chercherons à l'identifier en premier et le plus rapidement possible par quelques méthodes. Certaines levures du groupe des *Candida albicans* présentent la particularité de former des tubes germinatifs, tubes ressemblant à un mycélium mais sans cloisonnement entre la levure et le filament. Ces tubes germinatifs seraient représentatifs de la capacité invasive de *C. albicans*. Les autres levures ne le font pas.

Certaines levures du groupe des *Candida albicans* présentent la particularité de

former des Chlamydospores et un pseudomycélium quand elles sont cultivées sur milieu PAUVRES. Les chlamydospores sont des spores rondes, généralement réfringentes, situées aux extrémités du pseudomycélium. Leur rôle est inconnu car il n'est pas sûr qu'elles puissent redonner des levures.

III. Détermination des CMI du l'antifongique huile essentielle *thymus vulgaris* :

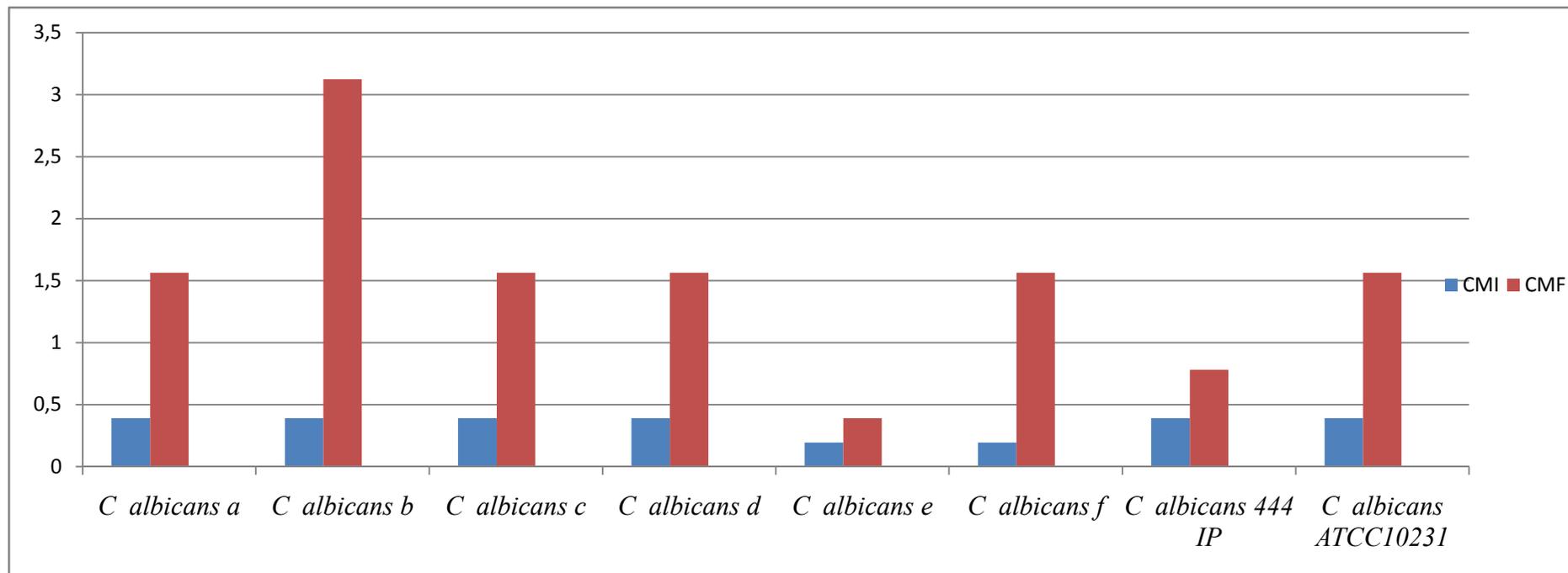
III.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales fongicides (CMF) :

La **figure 18** présente les résultats des CMI et des CMF des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* vis-à-vis de six souches sauvages et deux souches de références *C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* 444 IP.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des HE de *Thymus vulgaris* vis-à-vis de six souches sauvages et deux souches de références *C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* 444 IP est réalisée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide. Nous avons utilisé le milieu de culture : le bouillon RPMI (*Roswell Park Memorial Institut*). Nous avons utilisé ce milieu à pH 7,0.

Les résultats concernant la détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) montre que les HE de *Thymus vulgaris* a un effet inhibiteur très prononcé avec une concentration de 0.3906 mg/ml vis-à-vis *C. albicans a* ,*C. albicans c*, *C. albicans d* , *C.albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* (IPP444), et une concentration de 0.1953 mg/ml vis-à-vis *C. albicans e* et *C. albicans f*.

Concentration mg/ml



Souches testées

Figure18 : Résultats des CMI et CMF de l'huile essentielle des souches fongiques

CMI : concentration minimale inhibitrice CMF : concentration minimale fongicide

III.2. Effet antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* :

Pour déterminer la nature fongicide ou fongistatique de nos huiles essentielles vis-à-vis ces six souches, nous avons calculé le rapport CMF/CMI. Si ce rapport est inférieur ou égal à 2, l'huile est considérée comme fongicide; si ce rapport est supérieur à 2, l'huile est considérée comme fongistatique (Derwiche et coll. 2010).

D'après nos résultats, le rapport CMF/CMI vis-à-vis des deux souches est supérieur à 2, donc, les huiles essentielles du test sont considérées comme fongistatique

Selon les résultats de CMI/CMF :

- l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est de nature fongicide vis-à-vis les souches *C. albicans* 444 IP et *C. albicans e*.
- l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est de nature fongistatique vis-à-vis les souches *C. albicans a*, *C. albicans b*, *C. albicans c*, *C. albicans d*, *C. albicans f*, *C. albicans* ATCC 10231

Tableau N°4 : la nature du huile essentielle de *Thymus vulgaris* vis-à-vis les souches étudiées

Les souches	fongicide	fongistatique
<i>C. albicans a</i>		×
<i>C. albicans b</i>		×
<i>C. albicans c</i>		×
<i>C. albicans d</i>		×
<i>C. albicans e</i>	×	
<i>C. albicans f</i>		×
<i>C. albicans 444 IP</i>	×	
<i>C. albicans ATCC 10231</i>		×

IV. Evaluation du potentiel à former les biofilms des souches étudiées

Selon Ramage et coll. (2001a), l'accroissement des CMI chez les levures par rapport à la méthode du CCLS M27-A témoigne de leur capacité à former des biofilms. C'est pourquoi nous avons entrepris de déterminer les CMI des souches que nous avons isolées suivant les deux méthodes précédentes, celle du CCLS M27-A et celle de Ramage et coll., (2001a). L'ensemble des résultats de tous les tests de sensibilités à l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* des souches de références et des souches isolées.

IV.1 Détermination des SCMI

Sur le Figure N° 19 sont regroupés les résultats des tests de sensibilité à fluconazole des cellules sessiles des souches de références et des souches isolées .

Les SCMI de la souche *C albicans* ATCC 10231 sont de 8µg/ml . Les SCMI de la souche *C albicans* 444 IP , *C. albicans* d et *C. albicans* e sont de 16µg/ml. Les SCMI de la souche *C albicans* a , *C albicans* c et *C albicans* f de 32µg/ml

Les SCMI de la souche *C. albicans* b sont de 64µg/ml. Sur la figure : sont illustrés les résultats des tests de sensibilité à fluconazole des souches de références et des souches isolées

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)

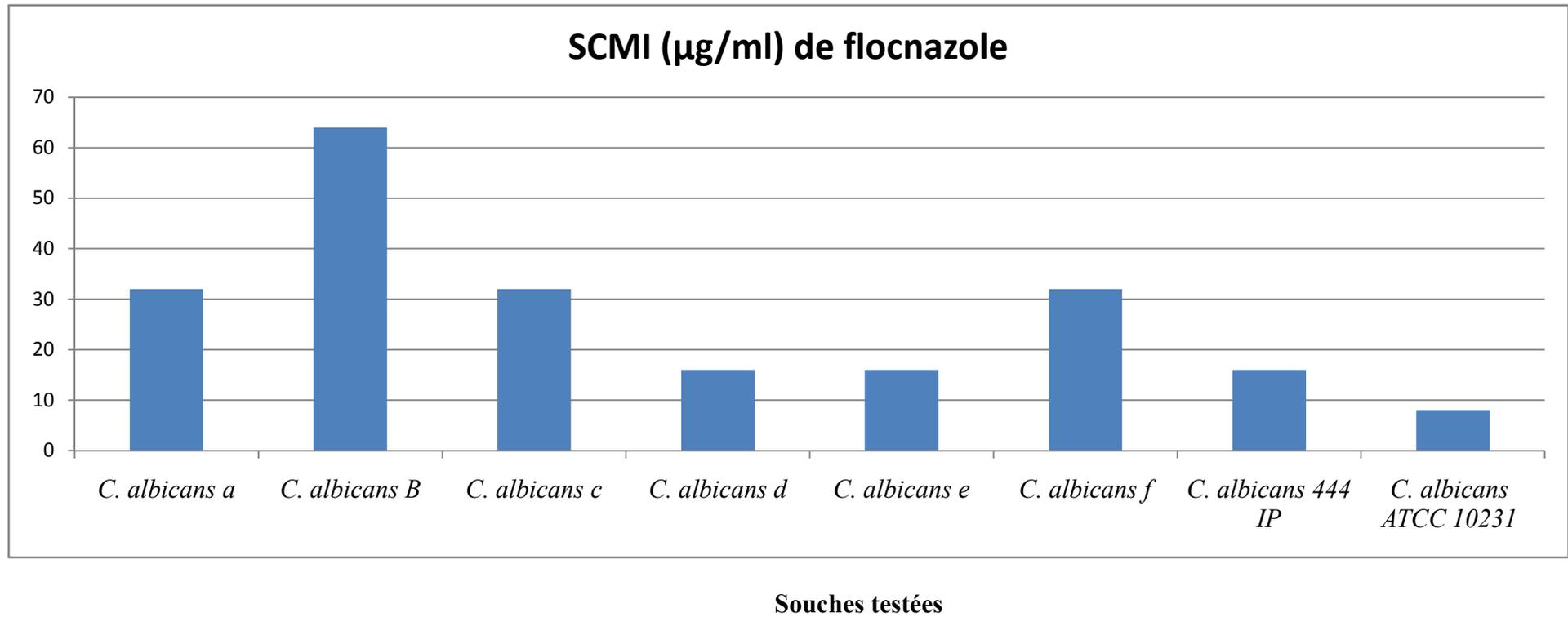


Figure19 : tests de sensibilité à fluconazole des souches de références et des souches isolées

Les cellules sessiles de la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 sont sensible au fluconazole par rapport aux cellules sessiles de la souche de références *C albicans* 444 IP qui est sensible à dose dépendante.

Les cellules sessiles des souches *C albicans* 444 IP , *C albicans a* ,*C albicans c* , *C albicans f* ,*C. albicans d* et *C. albicans e* sont sensibles à dose dépendante au fluconazole. les cellules sessiles de la souche *C. albicans b* sont résistante au fluconazole.

×

IV.2 Détermination des SCMI de l'antifongique huile essentielle *Thymus vulgaris* :

Les résultats des tests de sensibilité à l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* des cellules sessiles des souches de références et des souches isolées sur le Figure.



Figure 20 : les résultats des tests de sensibilité à l'antifongique huile essentielle *Thymus vulgaris* des cellules sessiles.

Selon les résultats de CMI des cellules planctoniques et SCMI de cellules sessiles on distingue que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a un effet inhibiteur au cellules sessiles à une concentration entre 0.19 et 0.39 mg/ml, mais les cellules planctoniques sont résistantes. En tant que constituant majoritaire.

Conclusion
générale

Nous avons étudié l'effet préventif des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* contre la formation de biofilms chez *Candida albicans*. Pour cela, Notre travail consiste les étapes suivantes : extraction des huiles essentielles, prélèvements, isolement et identification de *Candida albicans*, évaluation du potentiel à former les biofilms des souches étudiées et détermination des CMI et SCMI, étude de l'effet des huiles essentielles *Thymus vulgaris* sur la formation des biofilms chez *Candida albicans* isolées de l'hôpital à Saida.

La valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Thymus vulgaris* était de 3.68 %.

La présence de biofilms fongiques associés aux surfaces de dispositifs médicaux implantés, tels que les cathéters, représente un facteur de risque majeur de développer une candidémie. De plus, les levures de ces biofilms ont une sensibilité diminuée aux antifongiques.

L'importance de mener notre étude à l'hôpital Hamdan Bakhta de Saida (Algérie) était d'évaluer le taux de contaminations des cathéters et des sondes par la levure *Candida albicans*, de vérifier son pouvoir à former des biofilms et de tester sa résistance vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, traitement de première ligne des mycoses systémiques ou généralisées.

Il ressort de notre étude que sur les 34 prélèvements effectués, 6 souches de *Candida albicans* ont été isolées, soit un taux de 17.64 %. Elles se répartissent dans les différents services comme suit : gynécologie, réanimation et pédiatrie 4, 2 et 0 souches respectivement, isolées.

Chez 6 souches de *Candida albicans* isolées, le pouvoir de la formation des biofilms est considéré comme positif, la gravité que peut présenter les contaminations des cathéters par cette levure est accentuée par la réponse insignifiante des biofilms au fluconazole. en effet, les cellules planctoniques de *Candida albicans* (formant des biofilms) sont plus résistantes que leurs congénères sessiles concernant l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis de l'huile testée, nous constatons que l'efficacité de cette huile est :

l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est de nature fongicide vis-à-vis les souches *C. albicans* 444 IP et *C. albicans e*

l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est de nature fongistatique vis-à-vis les souches *C. albicans a* , *C. albicans b* , *C. albicans c*, *C. albicans d*, *C. albicans f*, *C. albicans ATCC 10231* .

Nous constatons que aussi l'efficacité fluconazole :

La cellule sessile de la souche de référence *C albicans* ATCC 10231 est sensible au fluconazole par rapport aux cellules sessiles de la souche de références *C albicans* 444 IP qu'est sensible à dose dépendante

Les cellules sessiles des souches *C albicans* 444 IP , *C albicans a* , *C albicans c* , *C albicans f*, *C albicans d* et *C albicans e* est sensible à dose dépendante au fluconazole

la cellule sessile de souche *C. albicans b* sont résistante fluconazole

Selon les résultats de CMI des cellules planctoniques et SCMI de cellules sessiles on distingue que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à un effet inhibiteur au cellules sessiles à une concentration entre 0.19 et 0.39 mg/ml, mais les cellules planctoniques sont résistantes. En tant que constituant majoritaire, le thymol pourrait être considéré comme le responsable du fort pouvoir antifongique de l'huile de *Thymus vulgaris*

*Références
bibliographique*

1. AFNOR (2000): Recueil de normes Françaises "Huiles essentielles", AFNOR,
2. Alem M.A., Oteef M.D., Flowers T.H., Douglas L.J. (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot. Cell*; 5 : 1770 - 1779. DOI : 10.1128/EC.00219-06.
3. Amanda P. and Jonathan S. (2011) Infections fongiques. *Medecine Interne de Netter*; 802-812.
4. Amiot J. (2005) *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire. *Thèse de doctorat- Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier*.
5. Bahn YS & Muhlschlegel FA. (2006). CO2 sensing in fungi and beyond. *Current opinion in microbiology* 9,572-578.
6. Baillie G.S., Douglas L.J. (1999) Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. 48:671–679.
7. Baillie, G. S. and L. J. Douglas (2000). "Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms." *J Med Microbiol* 48(7): 671-9.
8. Balladin D.A; Headley, O. (1999). Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* L inné) herlos. *Renewable Energy*. 17: 523-531.
9. Barelle, C. J., Richard, M. L., Gaillardin, C., Gow, N. A. and Brown, A. J., *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryot Cell* 2006. 5: 359-367.
10. Baudoux D., (2000) L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. Ed Atlantica.
11. Beaucaire G. (1997) Infections nosocomiales. *Epidémiologie, critères dud iagnostic, prévention, principes de traitement. La revue du praticien* ; 47 : 201 - 209. (NosoBase n°3734).
12. Belhadi, 2010 :Mémoire Master Académique, Université kasdi merbah–ouargla -Lutte
13. Beloin C, Roux A, Ghigo JM (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Curr TopMicrobiol Immunol*, 322: 249- 289
14. Benhabib O. (2011) Etude de quelques facteurs de pathogénicité des infections fongiques hospitalières liées au genre *Candida* (Production de biofilm et résistance). Diplôme de magister en biologie moléculaire et cellulaire ;Option Biochimie appliquée. *Faculté des SNVSTU, Université de Tlemcen, Algérie*.
15. Berman J & Sudbery PE. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature reviews* 3,918-930.
16. Biswas S, Van Dijck P & Datta A. (2007). Environmental sensing and signal transduction *Biol Rev* 71,348-376.
17. Bodey, G. P., Mardani, M., Hanna, H. A., Boktour, M., Abbas, J., Girgawy, E., Hachem, R.Y., Kontoyiannis, D. P. and Raad, II, The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med* 2002. 112: 380-385.

18. Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, D.; Skali, N. S. ; Abrini, J. (2006) *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement Congrès International de biochimies, Agadir.* 324-327.
19. Brun-uisson C., Abrouk F., Legrand P. Huet Y. Larabi S. Rapin M. (1987) Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med*; 147 : 873 - 877.
20. Bruneton J. (1999) Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème} Ed Tec&Doc. Paris.
21. Buffo, J., Herman, M. A. and Soll, D. R., A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1984. 85: 21-30.
22. Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253
23. Burt S. A. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review International. *J. Food Microbiol.* 94: 223-253
24. Chabasse D., Robert R., Marot A., Pihet M. (2006) *Candida* pathogène, Lavoisier.
25. Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. (1997) – Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75.
26. Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T., and Ghannoum M.A. (2001a) biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology* ; 183 (18) : 5385–5394.
27. Chu, W. S., Magee, B. B. and Magee, P. T., Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol* 1993. 175: 6637-6651.
28. Chun S. S., Vattem D.A., Lin Y.T., Shetty K. (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process. Biochem.* 40: 809-816.
29. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, 2nd ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA*, 22 (15).
30. Costanzo MC, Arnaud MB, Skrzypek MS, Binkley G, Lane C, Miyasato SR & Sherlock G. (2006). The *Candida* Genome Database: facilitating research on *Candida albicans* molecular biology. *FEMS yeast research* 6,671-684.
31. Costerton J. W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *Journal of bacteriology*, 176(8), 2137.
32. Csank C, Schroppel K, Leberer E, Marcus D, Mohamed O, Meloche S, Thomas DY & Whiteway M. (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infection and immunity* 66,2713-2721.

33. Csank C. et Haynes K. (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEUS Microbiol. Lett.* ; 189: 115-120.
34. Derwich E. et al. (2010). Caractéristique physico-chimique des eaux de la nappe alluviale du haut Sebou en aval de sa confluence avec oued Fès, *Larhyss Journal*, n°08, Juin, 101-112.
35. Develoux M. and Bretagne S. (2005) Candidoses and levures diverses. *E MC Maladies Infectieuses*; 2:119-139.
36. Diskin C.J. (2008) Heparin, biofilm, and catheter -related sepsis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 61: 80-81.
37. Dorman H.J.D. & Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 308-316.
38. Douglas LJ. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology* 11,30-36.
39. Drochey E. and Vieu M. (1957) (Biology of *Candida* infections. I. (Laboratory diagnosis; study of 342 strains of *Candida* isolated from pathological specimens). *Sem Hop* ; 33(13/2) : 793 - 807.
40. Dumitru R, Hornby JM & Nickerson KW. (2004). Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 48,2350-2354.
41. Espinel-Ingroff Ana and Cantón Emilia. (2007) Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. In: Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, and Avery C. Goodwin.
42. Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B. D. (2000) Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 183:191-195.
43. Fonzi WA & Irwin MY. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134,717-728.
44. Fournier P. (2011) Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida* *sp.* Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble. Thèse de Doctorat, UFR de Pharmacie de Grenoble, *Université Joseph Fournier, France*.
45. Frame GW, Strauss WG & Maibach HI. (1972). Carbon dioxide emission of the human arm and hand. *The Journal of investigative dermatology* 59,155-159.
46. Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. (2002) Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65: 1545-1560.
47. Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176,269-275.
48. García-Sánchez S., Aubert S., Iraqui I., Janbon G., Ghigo J M., D'enfert C. (2004)

- Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic cell*, 3(2), 536-545.
49. Gauzif R. et col. (2003) faut-il traiter et comment traiter les candidoses en réanimation. ?
Presse Med. 32 (15/03/03) 440 449. *In revue française des laboratoires* N° 352
50. Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J. (2008) Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 79: 199-203.
51. Gloor A.(2009) Antifongogramme : Evaluation de la carte AST-YSOI® sur l'automate Vitek2®. ICHV laboratoire de bactériologie, Sion.
52. Gow, N. A., *Candida albicans* switches mates. *Mol Cell* 2002. 10: 217-218.
53. Graser S., SCASSO. A .Paladini A. Histoplasmosis due to *histoplasma capsulatum* in an italian HIV positive patient returning from the america s. *J Mycol Med* 1996 ; 3 : 239-241.
54. Graser S., SCASSO. A .Paladini A. Histoplasmosis due to *histoplasma capsulatum* in an italian HIV positive patient returning from the america s. *J Mycol Med* 1996 ; 3 : 239-241.
55. Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, T. G. and Vilgalys, R., Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996.93: 12473-12477.
56. Gudlaugsson, Gillespie S, Leek et al. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, 37:1172-1177
57. Haras D. (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques* ; 93 : 27 - 41.
58. Hawser, S. P. and Douglas L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother*; 39 : 2128 - 2131.
59. Haynes K. (2001) Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology*; 9(12): 591 -596.
60. Hazen KC & Cutler JE. (1983). Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *Journal of biochemistry* 94,777-783.
61. Hellal Zohra, (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibatériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extradites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardine pilchardus*). Mémoire magister option ; Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Université Mouloud Mammeri De Tizi-ouzou.
62. Hennequin C. (1996) Epidémiologie des mycoses invasives. L'expérience d'un centre hospitalo-universitaire parisien. *Rev Méd Interne*; I7 : 754 - 760.
63. Hili P., Evans C. S., Veness R. G. (1997) Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulfoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett Appl Microbiol* 24 : 269-275.

64. Horn DL., Neofytos D., Anaissie EL, Fishman J.A., Steinbach WJ., Olyaei AL, Marrka MA., Chang CI-L, Webster KM. (2009) Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*; 48: 1695-703.
65. Hornby JM, Jensen EC, Lisek AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P & Nickerson KW. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology* 67,2982-2992.
66. Hot A., Mittaine B. and Dupont B. (2007) Infections fongiques invasives du grand prématuré. *Journal de Mycologie Médicale*; 17 : 33 - 41.
67. Iserin P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226.
68. Jabra-Rizk M. A., Faikler W. A. and Meuler T F., (2004) fungal biofilms and drug resistance, *emerging infectious diseases*; 10 (1): 14 - 19.
69. Jayaraman A & Wood TK. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual review of biomedical engineering* 10,145-167.
70. Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW & Scherer S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101,7329-7334.
71. Jordan M.J. et al., 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Ind. Crops Prod.*, 24, 253- 263.
72. Kabir MA & Hussain MA. (2009). Human fungal pathogen *Candida albicans* in the postgenomic era: an overview. *Expert review of anti-infective therapy* 7,121-134.
73. Kivanc S., Funda T., Fusun C., Unai C., Hande A., Ozdemir N.F. (2012) Risk factors for candidemia with *non-albicans Candida spp. in intensive care unit patients with end-stage renal disease on chronic hemodialysis*. 11, 325-332.
74. Kojic, E. M. and R. O. Darouiche (2004). "*Candida* infections of medical devices." *Clin microbiol Rev* 17(2): 255-67.
75. Kuhn, D. M. and M. A. Ghannoum (2004). "*Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options." *Curr Opin Investig Drugs* 5(2): 186-97.
76. Kulšić T., Dragović-Uzelac V., Miloš M. (2006) Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.* 44(4) : 485-492.
77. Kumamoto C.A. (2002) *Candida* biofilms. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 608-611.
78. Lawrence J.R., Korber D.R., Hoyle B.D., Costerton J.W., Caldwell D.E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology*, 173(20), 6558-6567.

80. Le Minore L. et Veron M. (1990) Bactériologie médicale, 2ème édition Médecine Sciences Flammarion.
81. Lewis K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current topics in microbiology and immunology* 322, 107-131.
82. Lima C.F., Carvalho F., Fernandes E., Bastos M.L., Santos-Gomes P.C., Fernandes-Ferreira M. and Pereira-Wilson C. (2004)- Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 18(4), 457-465.
83. Mah, T. F. and G. A. O'Toole (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." *Trends Microbiol* 9(1): 34-9.
84. Majoros.,Kyeong W.Y., Anwar M., and Jong H.K. (2005). Effects of the Aqueous Extract from
85. Majoros.,Kyeong W.Y., Anwar M., and Jong H.K. (2005). Effects of the Aqueous Extract from
86. Mermella, Farrbm, Sherertzrj et al. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 32:1249-1272.
87. Mondse, R., and O'Toole, (2008). "Hyaluronan and its potential role in periodontal healing." *dental update* 29(3): 144-148.
88. Monsieur M.(2001) these universite cheikh anta diop de dakar *faculte demedecine, depharmacieet d'odonto-stomatologie* .prevalence des mycoses chez les sujets vivant avec le VIH(Etude menée au CHU de Fann durant la période: 1994-2000) p 100
89. Monsieur M.(2001) these universite cheikh anta diop de dakar *faculte demedecine, depharmacieet d'odonto-stomatologie* .prevalence des mycoses chez les sujets vivant avec le VIH(Etude menée au CHU de Fann durant la période: 1994-2000) p 100
90. Morales, R. (2002) The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme : the genus Thymus*. Ed. *Taylor & Francis, London*. pp. 1-43.
91. Nett JE & Andes DR. (2006). Time course global gene expression analysis of an *in vivo candida* biofilm. *The Journal of infectious diseases* 200, 307-313.
92. Noble SM & Johnson AD. (2007). Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet* 41,193-211.
93. Odds FC, Brown AJ & Gow NA. (2004). *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome biology* 5,230.
94. Odds FC, Van Nuffel L & Gow NA. (2000). Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host. *Microbiology (Reading, England)*146 (Pt 8),1881-1889.

95. Pariente L. (2001) Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2^{ème} Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p.
96. Paris. AFNOR NFT 75- 006. 2000.
97. Paugam A., Baixench M.T., Taeib F., Champagnac C., and Dupouy-Camet J.(2010)Emergence de candidemias à *Candida parapsilosis* à l'hôpital Cochin. Caractérisation des isolats et recherche de facteur de risque; *Pathol-biol* 59 (1) : 44-47.
98. Perloth J, Choi B & Spellberg B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45,321-346.
99. Perloth J, Choi B & Spellberg B. (2007). Nosocomial fungal infections:epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45,321-346.
100. Perumal P., Mekala S. and Chaffin W. L. (2007) Role for Cell Dentry inAntifungal Drug resistance in *candida albicans* biofilms, *antimicrobial agents and chemotherapy* ; 51 (7) : 2454 – 2463. doi : 10.1128/aac.01237-06.
101. Pierce C. G., Uppuluri P., Tristan A. R., Wormley F.L. Jr, Mowat E., Rae G.and Lopez-Ribot J. L. (2008) A simple and reproducible 96-well plate-basedmethod for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing, *Nature Protocols*; 3 (9) : 1494
1500. DOI :10.1038/nprot.2008.141.
102. Poulain, D., Fruit, J., Fournier, L., Dei Cas, E. and Vernes, A., Diagnosis of systemic candidiasis: application of co-counterimmuno-electrophoresis. *Eur J Clin Microbiol* 1986. 5:427-434
103. Quinet B. (2006) Abord veineux de longue durée : épidémiologie, diagnostic,prévention et traitement des complications infectieuses. Session : Abord vux de longue durée. *Archives de pédiatrie*; 13 :714720.DOI:10.1016/j.arcped.2006.03.047.
104. Radford DR, Challacombe SJ & Walter JD. (1994). A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology* 40,416-423.
105. Ramage G., Saville S. P., Thomas D. P., and Lopez Ribot J. L. (2005) *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell* ; 4 (4) : 633 - 638.
106. Ramage G., Walle K.V., Wickes B.L., LopezRibot J.L. (2001) Characteristic of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*, 18(4), 163-170.
107. Reddy M.V. B., Angers P., Gosselin A., Arul J. (1998) Antifungal activity of *Thymus vulgaris essential oil*. *Phytochemistry*. 47(8) : 1515-1520.
108. Rexjh, Walshtj, Sobeljd et al. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, 30:662-678.
109. Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. and Sentandreu, R., Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 2006. 6:14-29.

110. Rustchenko E. (2007). Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS yeast research* 7,2-11.
111. Rustchenko E. (2007). Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS yeast research* 7,2-11.
112. Sailer FC, Meberg BM, Young KD (2003) Betalactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 226: 245- 249
113. Samaranayake, L. P., Fidel, P. L., Naglik, J. R., Sweet, S. P., Teanpaisan, R., Coogan, M. M., Blignaut, E. and Wanzala, P., Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis* 2002. 8 Suppl 2: 151-160.
114. Sarazin A. (2010) Les glycannes pariétaux de levures et leur implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Docteur de l'université Lille 2.
115. Satil F., Dirmenci T. & Tumen G., 2002. Natural situation of commercial *Saccharomyces* species in Turkey. In: 16th National Congress of Biology, September 17, Malatya, Turkey.
116. 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.
117. Seddiki Sidi Mohammed Lahbib. (2010). Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire option: biochimie appliquée. thème : étude de quelques facteurs pathogénicité liés aux infections fongiques hospitalières (production de biofilms et résistance), 15-16.
118. Segal E. (2005). *Candida*, still number one what do we know and where are we going from there? *Mycoses* 48 Suppl 1,3-11.
119. Sherertz J. Shuford J. A., Piper K. E., Steckelberg J. M. and Patel R. (2007) *In vitro* biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* ; 57 : 277 - 281. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2001.09.004.
120. Sherertz J. Shuford J. A., Piper K. E., Steckelberg J. M. and Patel R. (2007) *In vitro* biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* ; 57 : 277 - 281. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2001.09.004.
121. Silva S., Negri M., Henriques M., Oliviera R., Williams D. and Azerodo J. (2011) Adherence and biofilm formation on non *Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 19(5): 241-247.
122. Solt DR, Lockhart SR & Zhao R. (2008). Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* 2, 390-397.

123. Staib P & Morschhauser J. (2007). Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50,1-12.
124. Sudbery, P. E., The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol* 2001. 41: 19-31.
125. Sudbery, P., Gow, N. and Berman, J., The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2004. 12: 317-324.
126. Sutherland I.(2001) The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222-227.
127. Thein, Z.M., Samaranayake, Y. H. et Samaranayake, L.P. 2006. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 51(8): 672-80.
128. Tikhomirov E. (1987) Who programme or the Control Hospital Infection? *Chemiotherapia*; 6(3): 148-151.
129. Togo A., Traore A., Kante L., Coulibaly Y., Diango D., et cou., (2010) Fighting nosocomial infection rates in the general surgery department of the teaching hospital Gabriel Toure in Bamako, Mali. *The Open Biology Journal*; 3: 87-91.
130. Trickwe, Fridkinsk, Edwardsjr et al. *Clin. Infect. Dis.*, 2002, 35:627-630
131. Ultee A., Slump R. A., Steging G. Smid E. J. (2000) Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. of Food Protection*. 620-624.
132. Valero M., Salmerón M.C. (2003) Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus creus* in tyndallized cravot broth. *Inter. J. Food Microbiology* 85: 73-81.
133. van het Hoog M, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D, Hogues H, Cuomo C, Berriman M, Scherer S, Magee BB, Whiteway M, Chibana H, Nantel A & Magee PT. (2007). Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome biology* 8,R52.
134. Vincent J. L., Bihari D. J., Suter P. M., Bruining H. A., White J., Nicolas-Chanoin M.H., Wolff M., Spencer R. C. and Hemmer M. (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) study. *JAMA*; 274 : 639 - 644.
135. Waiker LA, Gow NA, Munro CA. (20 10) Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol*; 47: 117-26.
136. Walker, C. et Sedlacek, M.J. 2007. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, 22:152-61.
137. Wesenberg-Ward K. E., Tyler B. J. and Sears J. T. (2005) Adhesion and biofilm formation of *Candida albicans* on native and Pluronic-treated polystyrene, *Biofilms* 2:63 - 71, Cambridge University Press. DOI :10.1017/S1479050505001687
138. Whiteway M & Bachewich C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology* 61,529-553.

Annexes

Annexe 1: préparation de la solution PBS, pH = 7,4.

PBS = Phosphate Buffered Saline “ Tampon Phosphate Salé ” (10 mM tampon phosphate, 2.7 mM chlorure de potassium, 137 mM chlorure de sodium)

- NaCl :	137 mM
- KCl :	2.7 mM
- Na ₂ HPO ₄ :	10 mM (di-sodium hydrogénophosphate)
- KH ₂ PO ₄ :	1,76 mM (di-hydrogénophosphate)

Compléter à 1l et ajustez pH = 7.4, puis autoclaver à 120 °C pendant 20 minutes et conserver à la température ambiante.

Chandra Mohan. (2003) Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems *Biosciences* ; Cat. No. 524650

Annexe 2 : milieu RPMI-1640 « Roswell Park Memorial Institut »

Sels Inorganiques (g/litre)	Vitamines (g/litre)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O 0.10000	D-Biotine 0.00020
MgSO ₄ (anhydre) 0.04884	Choline Chloride 0.00300
KCl 0.40000	Acide Folique 0.00100
NaHCO ₃ 1.50000	myo-Inositol 0.03500
NaCl 6.00000	Nicotinamide 0.00100
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous) 0.80000	Acide p-Amino Benzoïque 0.00100
Amino Acides (g/litre)	Acide D-Pantothenique 0.00025
L-Arginine (free base) 0.20000	(hemicalcium)

L-Asparagine·H₂O 0.05682

Pyridoxine·HCl 0.00100

L-Aspartic Acid 0.02000

Riboflavine 0.00020

L-Cystine·2HCl 0.06520

Thiamine·HCl 0.00100

L-Glutamic Acid 0.02000

Vitamine B-12 0.000005

L-Glutamine 0.30000

Autres (g/litre)

Glycine 0.01000

D-Glucose 4.50000

L-Histidine (free base) 0.01500

Glutathione (reduit) 0.00100

Hydroxy-L-Proline 0.02000

HEPES 2.38300

L-Isoleucine 0.05000

Rouge de Phénol, Sel Sodium 0.00500

L-Leucine 0.05000

Sodium Pyruvate 0.11000

L-Lysine·HCl 0.04000

*AMERICANE TYPE CULTURE
COLLECTION*

L-Methionine 0.01500

Catalog No. 30-2001

L-Phenylalanine 0.01500

L-Proline 0.02000

L-Serine 0.03000

L-Threonine 0.02000

L-Tryptophan 0.00500

L-Tyrosine·2Na·2H₂O 0.02883

L-Valine 0.02000

Annexe 3 Bouillon Sabouraud :

Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)	10,0
Extrait de levure (Fluka)	3,0
Glucose (Sigma-Aldrich)	20,0
Compléter le volume à	1000 ml par l'eau distillée

pH = 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Annexe 4

Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)	10,0
Extrait de levure (Fluka)	3,0
Glucose (Sigma-Aldrich)	20,0
Compléter le volume à	1000 ml par l'eau distillée

pH = 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Annexe 5: préparation de milieu PCB

Laver, gratter et broyer les carottes par dans un mélangeur. Faire bouillir 40 g des carottes pendant 5 minutes dans 1000 ml d'eau distillée. Filtrer à travers un tissu.

Laver, peler découper les pommes de terre en petits morceaux. Faire bouillir 40 g des pommes de terre pendant 5 minutes dans 1000 ml d'eau distillée. Filtrer à travers un tissu.

). Préparation de milieu :

Extrait de la pomme de terre	250 ml
Extrait de carotte	250 ml
Agar	25 g
Ajuster le pH à	7.2
Compléter le volume à	1000 ml par l'eau distillée

Bouillir le tous jusqu'à la transparence.

Autoclaver pendant 15 minutes à 121°C.

Ajouter 150 ml de la bile de bœuf devant les becs bunsen.

Vitamines (g/litre)

D-Biotine 0.00020

Choline Chloride 0.00300

Acide Folique 0.00100

myo-Inositol 0.03500

Nicotinamide 0.00100

Acide p-Amino Benzoique 0.00100

Acide D-Pantothenique 0.00025