



**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 des mécanismes de**  
**résistance des isolats de *Candida albicans***  
**vis-à-vis de la chlorhexidine**

**Présenté par : M<sup>lle</sup>. TAMER Amina**

**M<sup>lle</sup>. HALIMI Fatiha**

**Soutenue publiquement le 28 /06/2016**

**Devant le jury :**

<b>HAMANI Houari</b>	<b>Maitre de conférences B</b>	<b>Président</b>
<b>ADLI Djallal Eddine Houari</b>	<b>Maitre de conférences B</b>	<b>Examineur</b>
<b>HALLA Nouredine</b>	<b>Maitre assistant A</b>	<b>Encadreur</b>

**Année Universitaire : 2015-2016**



### *Remerciment*

*Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou loi à la réalisation de ce présent mémoire, en particulier :*

*Notre encadreur monsieur **HALLA Noureddine***

*À qui m'a proposé le présent sujet ainsi pour son aide et ses conseils tout de l'élaboration de ce travail.*

*Mr **Hamani Houari**, maitre de conférences à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay tahar – Saida- d'avoir accepté d'être président de jury.*

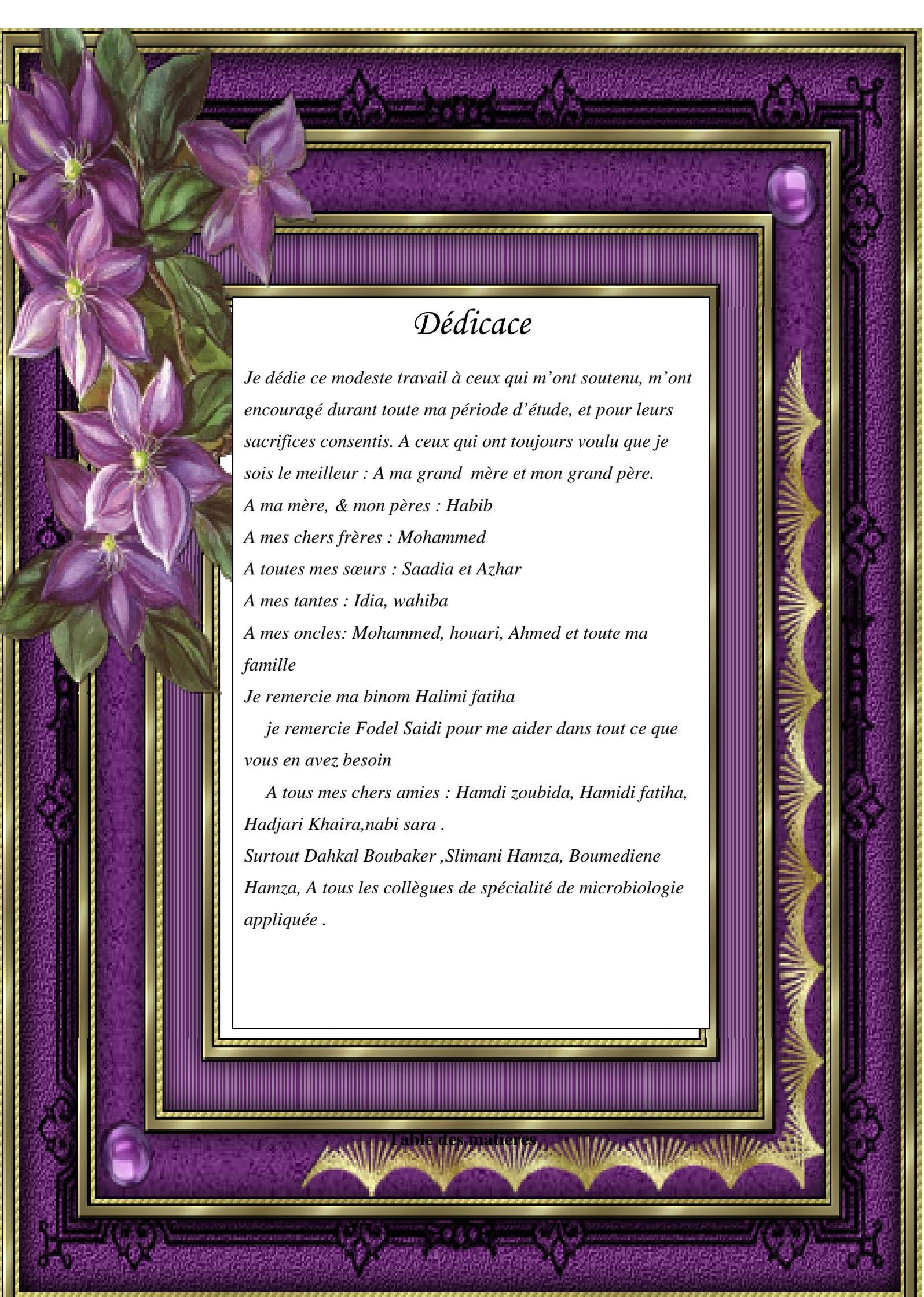
*Mr. **ADLI Ajallal eddine houari** maitre de class A à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay tahar –Saida- d'être examinateur.*

*Sans oubliée tous les professeur dans le département de biologie dans l'université Dr. MOULAYTAHAR –Saida-*

*Ne nous voudront pas dissocier de ces remerciements les membres du laboratoire de biologie de nouveau site 2000 a Saida*

*À tous les collègues de la promotion de master 2 microbiologie appliquée*





## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui m'ont soutenu, m'ont encouragé durant toute ma période d'étude, et pour leurs sacrifices consentis. A ceux qui ont toujours voulu que je sois le meilleur : A ma grand mère et mon grand père.*

*A ma mère, & mon pères : Habib*

*A mes chers frères : Mohammed*

*A toutes mes sœurs : Saadia et Azhar*

*A mes tantes : Idia, wahiba*

*A mes oncles: Mohammed, houari, Ahmed et toute ma famille*

*Je remercie ma binom Halimi fatiha*

*je remercie Fodel Saidi pour me aider dans tout ce que vous en avez besoin*

*A tous mes chers amies : Hamdi zoubida, Hamidi fatiha, Hadjari Khaira, nabi sara .*

*Surtout Dahkal Boubaker ,Slimani Hamza, Boumediene Hamza, A tous les collègues de spécialité de microbiologie appliquée .*

<b>Résumé.....</b>	<b>/i/</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>/ii/</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>/iii/</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>/iv/</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>01</b>
<b>PAETIE1 : synthèse bibliographique.....</b>	<b>04</b>
<b>CHAPITRE 1 : <i>Candida albicans</i>.....</b>	<b>05</b>
1. Introduction.....	06
2. Classification et découverte.....	06
3. Organisation cellulaire et moléculaire.....	07
3.1 Structure intracellulaire.....	07
3.2 paroi.....	08
3.3 L'espace périplasmique.....	15
3.4 La membrane plasmique.....	15
3.5 Les organites intracellulaire.....	16
4 Habitat.....	16
5 Morphologie et reproduction chez <i>C. albicans</i> .....	17
5.1 Reproduction asexuée.....	17
5.2 Reproduction sexuée.....	18
5.3 Forme de résistance.....	19
6 Caractères biologiques de <i>Candida albicans</i> (EUZEBY.,1994).....	19
6.1 Milieu de vie.....	19
6.2 pH.....	19
6.3 Température.....	20
6.4 Nutrition.....	20
7 Caractères physiologiques de <i>Candida albicans</i> (EUZEBY.,1994).....	21
8 Caractères sérologiques .....	22

<b>Chapitre2: Chlorhexidine.....</b>	<b>23</b>
1. Historique.....	24
2. Définition.....	24
3. Structure chimique.....	25
4. Propriétés physico-chimiques .....	25
5. Mécanisme d'action et pharmacodynamie.....	27
a) Spectre d'action.....	27
b) Mode d'action.....	27
c) Facteurs de variation de l'activité.....	28
d) Résistances.....	28
6. Effet attendus de la chlorhexidine.....	30
6.1 Effets antiplaque.....	30
6.1.1 Effet antibactériens.....	30
6.1.2 Effet cariostatiques.....	31
6.1.3 Effet antifongique sur Candida albicans.....	31
7. Facteurs d'interaction.....	31
7.1 Principal : ph.....	31
7.2 Secondaires.....	32
7.2.1 Fluorure de sodium.....	32
7.2.2 Laurylsulfate de sodium.....	32
7.2.3 Calcium.....	33
7.2.4 Composition salivaire.....	33
8. Effets indésirables de la Chlorhexidine.....	33
8.1 Sensation de sécheresse buccale.....	33
8.2 Gonflement des parotides.....	34
8.3 Altération du gout.....	34
8.4 Infection virales.....	34

8.5 Coloration.....	34
9. Toxicité de Chlorhexidine.....	35
<b>PARTIE 2 : Matériel et méthodes .....</b>	<b>36</b>
1. Matériel.....	37
2. Méthodes.....	37
2.1 Prélèvement.....	37
2.2 Isolement.....	38
2.3 Identification.....	39
2.3.1 Examen macroscopique .....	39
2.3.2 Examen microscopique.....	39
2.3.3 Test de blastèse.....	39
2.3.4 Test de chlamydosporulation.....	39
2.3.5 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par La méthode des micro-dilutions sur milieu liquide.....	40
2.3.6 Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF).....	43
2.3.7 Dosage de l'ergosterol membranaire de 3 souches de <i>Candida albicans</i> .....	43
<b>PARTIE 3 : Résultats et discussion.....</b>	<b>47</b>
1. Prélèvement, isolement et identification de <i>Candida albicans</i> .....	48
2. observation macroscopique .....	50
3. observation microscopique .....	50
4. Test de Blastèse .....	50
5. Test de chlamydosporulation.....	50
6. Étude de la résistance de <i>Candida albicans</i> .....	51
7. Dosage de l' ergostérol.....	53
<b>PARTIE 4 : Conclusion générale .....</b>	<b>58</b>
Conclusion.....	59
Fiche technique.....	61
Référence bibliographiques.....	62
Annexe.....	74

## Table des figures

<b>Figure n° 01</b> : Les différents constituants de la paroi fongique. (Diamond R., Atlas of fungal Infections, Ed.1999).....	08
<b>Figure n° 02</b> : Organisation moléculaire de la paroi de <i>Candida albicans</i> (D ‘après Ruiz-Herrera,FEMS Yeast Res.,2006).....	09
<b>Figure n° 03</b> : Structures chimiques de la chitine (a), des $\beta$ -1,3/1,6 glucanes (b) et d’une protéine GPI(c). Les protéines GPI sont riches en résidus Sér/Thr, avec un ou plusieurs sites de N-glycosylation,indiquant que ces protéines pourraient être fortement glycosylées. Le domaine hydrophobe N-terminal (peptide signal) et le domaine C-terminal GPI sont notés (Ruiz-Herrera <i>et al.</i> ,2006) .....	11
<b>Figure n° 04</b> : Structure schématique du mannane de <i>C. albicans</i> . D’après Poulain et al.(ponton <i>et al.</i> ,1993).....	14
<b>Figure n°05</b> : Principales étapes de la N-glycosylation. D’après Dean (Dean.,1999).....	14
<b>Figure n°06</b> : Morphologie de Candida et de <i>C. albicans</i> . L : blastospores et blastospores bourgeonnantes, B : amas de blastospores, F : filaments mycéliens , C : chlamydozspores caractéristiques de <i>C. albicans</i> .D’après Segretain et al.( Segretain <i>et al.</i> ,1987).....	18
<b>Figure n°07</b> : Reproduction sexuée chez <i>C. albicans</i> impliquant obligatoirement deux étapes, l’homozygotie du locus MTL et le switch des cellules whiteen opaque. D’après Heitman (Heitman, J.2006).....	19
<b>Figure n°08</b> : Structure chimique de la Chlorhexidine (Geais, 2006).....	25
<b>Figure n°09</b> : l’ensemencement des tubes inclinée.....	28
<b>Figure n°10</b> : les 2 dillutions de la Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	41
<b>Figure n °11</b> :Remplissage de microplaque.....	42
<b>Figure n °12</b> : utilisation de la microplaque (La méthode des micro-dilurion sur milieu liquide RPMI) .....	42

<b>Figure n°13</b> : Formation de tube germinatif caracteristique de <i>Candida albicans</i> sous microscope optique l'objectif x40.....	50
<b>Figure n°14</b> : Formation de chlamydozoospores caracteristique de <i>Candida albicans</i> sous microscope optique l'objectif x40.....	51
<b>Figure n° 15</b> : Histogramme représentant les CMI et CMF et CMF/CMI de <i>Candida albicans</i> (mg/ml).....	53
<b>Figure n°16</b> : le courbe de dosage de l'ergostérol de souche n° 04.....	55
<b>Figure n°17</b> : courb de dosage de l'ergostérol de souche n° 22.....	55
<b>Figure n° 18</b> : courb de dosage de l'ergostérol de souche de référence 10250 ATTC.....	56

### Liste des abreviation

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BS</b>	Bouillon Sabourand
<b>CMF</b>	Concentration Minimale Fongicide
<b><i>C.albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>DO</b>	densité optique
<b>GS</b>	Gélose sabourand
<b>mm</b>	millimètre
<b>µl</b>	microlitre
<b>ml</b>	milliliter
<b>min</b>	Minute
<b>µg</b>	microgramme
<b>pH</b>	Potentiel d'Hydrogène
<b>PCB</b>	pomme de terre carotte bille
<b>%</b>	Pourcentage
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institut

## Résumé

Les conservateurs antimicrobiens sont des substances d'origine naturelle ou synthétique, capable de limiter ou d'inhibées la croissance microbienne, *Candida albicans* est l'une des levures commensales peut être pathogène pour l'homme. Dans ce cadre nous avons entrepris ce travail qui consiste à l'étude de la résistance de *Candida albicans* isolée à partir des cavités buccales vis à vis de la chlorhexine fréquemment utilisée en produits cosméceutiques ,dont il ressort que le taux d'ergostérol membranaire est élevé N°04 ( $11.13\% \pm 2.873$ ) chez les souches sauvages sensibles avec une CMI égale 0.39 mg, tandis qu'il est inférieur chez les souches de référence ATTC 102509 qui présentent un taux d'ergostérol ( $9.62\% \pm 2.305$ ) avec une CMI de 12,5 mg/ml, et très inférieur chez les souches la plus résistances N°22 ( $1.86\% \pm 0.234$ ) avec une (CMI =25 mg/ml).

À la lumière de ces résultats on peut conclure que la résistance de *Candida albicans* à la chlorhexidine est probablement liée au changement de la composition en ergostérol membranaire.

Mots clé : *Candida albicans* , chlorhexidine , l'ergostérol membranaire.

## Abstract

The antimicrobial preservatives are natural or synthetic substances capable of limiting or inhibited microbial growth, *Candida albicans* is a commensal yeast can be pathogenic for humans. In this context we have undertaken this work which involves the study of *Candida albicans* resistance isolated from the oral cavities to chlorhexine commonly used in cosmetics, showing that the membrane ergosterol is high No. 04 ( $11.13\% \pm 2.873$ ) in susceptible wild strains (MIC = 0.39 mg), while it is lower in reference strains ATCC 102509. a one ergosterol rate ( $9.62\% \pm 2.305$ ) with (MIC = 12.5 mg / ml), and much lower in the more resisters # 22 strains ( $1.86 \pm 0.234\%$ ) of (MIC = 25 mg / ml).

in the light of these results we can conclude that the resistance of *Candida albicans* to chlorhexidine is probably related to changes in membrane composition ergosterol.

Keywords : *Candida albicans* , chlorhexidine, antifungal activity, membrane ergosterol

ملخص،

المواد الحافظة المضادة للجراثيم هي مواد طبيعية أو اصطناعية قادرة على الحد من نمو الجراثيم أو تحول دون، المبيضات في هذا السياق قمنا بها هذا العمل الذي ينطوي .البيض هو الخميرة المتعايشة يمكن أن يكون المسببة للأمراض للإنسان التي يشيع استخدامها chlorhexine على دراسة المبيضات البيضاء معزولة عن تسوس الأسنان عن طريق الفم ل في السلالات البرية ( $11.13\% \pm 2.873$ ) في مستحضرات التجميل، وتبين أن إرغوستيرول غشاء مرتفع رقم 04 ملغ)، في حين تقل نسبة في سلالات إشارة أي تي سي سي 102509. معدل إرغوستيرول واحد ( $MIC = 0.39$ ) الحساسية ملغ / مل)، وأقل من ذلك بكثير في المزيد من المقاومات # 22 سلالات ( $MIC = 12.5 \pm 1.86$ ) مع ( $MIC = 2.305 \pm 9.62\%$ ) ( $MIC = 25 \pm 0.234\%$ ) من في ضوء هذه النتائج يمكننا أن نستنتج أن المقاومة من المبيضات البيضاء إلى الكلور هيكسيدين ربما يرجع إلى التغيرات في إرغوستيرول تكوين الغشاء

الكلمات المفتاحية المبيضات البيضاء، الكلور هيكسيدين، والنشاط المضادة للفطريات، غشاء إرغوستيرول

# **Introduction générale**

## Introduction

L'étiologie bactérienne des maladies parodontales est admise 50ans. Les travaux LOE et al en 1965 ont entre autre permis de donner un caractère infection à cette maladie .

L'évolution des techniques a permis de distinguer une approche bien distincte et complémentaire dans la prise en charge de ces maladies parodontales : une approche chimique.

Cette approche chimique peut utilisée : les produits cosmétiques qui ajoutent le conservateur antimicrobien pour éviter la contamination et pour réduire la prolifération microbienne.

De nombreuses études ont montré l'efficacité de la chlorhexidine pour inhiber la formation de plaque et combattre l'inflammation en odontologie. Sa structure de bisdiguamide symétrique lui procure ses propriétés antibactériennes .celle –ci à tendance à engendrer des colorations à la foi dentaires et des muqueuses à moyen et long terme.

Dans les vingt dernières années, peu d'études ont été réalisées concernant la sensibilité de *Candida albicans* vis-à-vis de la chlohéxidine. D'abord, les effets de chlohéxidine sur *Candida albicans*, *Candida glabarata* et *Saccharomyces cervisiaeen* en 1992 par **Hiom, et ses** collaborateurs, en suite **Barrett-bee et al.**, ont vérifié l'action de déstabilisation membranaire de cet agent antimicrobien en 1994. Une année après **Hiom** et ses collaborateurs ont testé la réaction du dégagement de la chlorhéxidine diacétate par *Saccharomyces cervisiae*, *Candida albicans*, et *Candida glabarata*, et le rôle possible de la paroi fongique dans la modification de la réponse cellulaire au chlorhéxidine.

En 2002, **Suci et al.**, ont étudié l'action de la chlorhéxidine digluconate vis-à-vis des formes levures et filamenteuses des biofilms de *Candida albicans*. La dernière étude réalisée en 2009 par **Christopher et al.**, sur la sensibilité du biofilm de *Candida albicans* vis-à-vis de la chlorhéxidine.

Malgré la présence d'agents conservateurs antimicrobiens, les nuisances microbiennes demeurent fréquentes. Cela est du au développement d'une résistance vis-à-vis de ces derniers. C'est pourquoi, nous avons entrepris notre travail qui consiste à étudier la résistance d'une levure commensale et peut être pathogène : *Candida albicans* isolées à partir des

cavités buccales à un conservateur antimicrobien utilisé dans les produits cosmétiques, la chlorhexidine.

# **Synthèse**

## **bibliographie**

Chapitre 1 :

*Candida albicans*

## 1. Introduction

*Candida albicans* est une levure polymorphique commensale de la cavité buccale et du tractus digestif qui peut entraîner des infections sévères particulièrement chez les patients immunodéprimés. A l'état commensal, la levure se présente sous forme de blastospores, alors qu'à l'état pathogène ces formes sont généralement observées en association avec des éléments filamenteux. Le processus de filamentation s'accompagne de modifications de la composition biochimique et antigénique de la paroi. Ce champignon possède ou peut exprimer plusieurs facteurs de pathogénicité. Ces particularités fongiques incluent la production et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, les modifications morphologiques et fonctionnelles résultant de la transition de la forme levure à la forme mycélienne.

## 2. Classification et découverte

Au cinquième siècle avant Jésus Christ, Hippocrate fut le premier à parler d'infection fongique en décrivant le muguet (**Ainsworth., 1986**). Ce ne fut qu'en 1839, en Allemagne, que le jeune conférencier Bernhard (von) Langenbeck publia pour la première fois la description d'une levure, de type mycète, comme agent étiologique d'une candidose orale (**Knoke & Bernhardt., 2006**). Pendant un siècle après sa découverte, la levure du muguet fut le sujet d'une étude taxonomique controversée. Le mycète connut divers noms, dont les plus proches de la nomenclature actuelle furent *Oidium albicans* (**Robin.,1853**), *Saccharomyces albicans* (**Reess., 1877**) ou *Monila albicans* (**Zopf., 1890**). Sa position taxonomique fut clarifiée en 1923 par les travaux de Christine Marie Berkhout qui introduira dans sa thèse le terme *Candida albicans* (**Berkhout., 1923**). Ainsi, elle différencie pour la première fois les levures médicales de celles végétales. Le nom est dérivé de l'expression latine *toga candida* qui était utilisée pour décrire les robes blanches portées par les membres du Sénat romain (**Calderone., 2002**). Depuis, cette classification est devenue *nomen conservandum* et fut adoptée internationalement en 1939 dans le cadre du 3<sup>ième</sup> Congrès International de Microbiologie de New York (**Samson., 1990**).

*C. albicans*, levure considérée asexuelle jusqu'à récemment, fut classée au début dans la division des deutéromycètes (*fungi imperfecti*). En effet, la présence des caractéristiques sexuelles était nécessaire pour l'appartenance à la division des ascomycètes. Cependant, la comparaison des séquences des acides nucléiques, ainsi que des caractéristiques phénotypiques non sexuelles, ont permis de l'intégrer ultérieurement dans la division des ascomycètes (**Taylor., 1995**). Les deutéromycètes ne sont plus reconnus présentement comme un taxon. De plus, en 2000, deux laboratoires de recherche ont démontré, par des approches expérimentales différentes, l'existence d'un cycle sexuel (mating) chez *C. albicans* . (**Hull et al., 2000; Magee & Magee., 2000**).

Empire	Eucaryote (Eukaryota)
Rang/Règne	Champignon (Fungi)
Embranchement/Division/Phylum	Ascomycètes (Ascomycota)
Sous-embranchement/Sous-division/Sous-phylum	Saccharomycotina
Classe	Saccharomycetes
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Saccharomycetaceae
Genre	Candida
Espèce	Albicans ( <b>Jones et al., 2004</b> )

### 3. Organisation cellulaire et moléculaire :

#### 3.1 Structure intracellulaire :

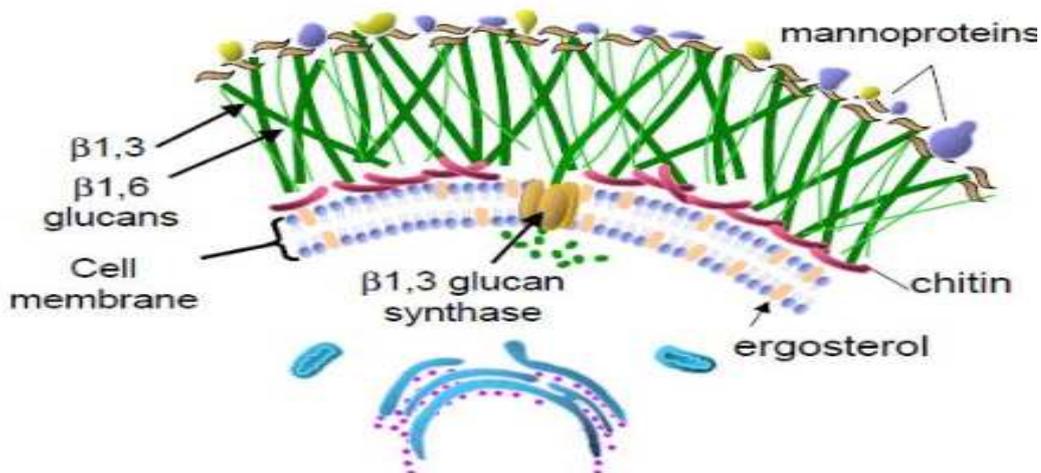
*Candida albicans* possède tous les organites intracellulaires caractéristiques des eucaryotes :

- Un noyau, délimité par une double membrane nucléaire, en renferment huit chromosomes (**chu et al ., 1993**).
- Un nucléole.
- Un réticulum endoplasmique.
- Un appareil de Golgi.
- Des mitochondries.
- Des vacuoles à inclusions notamment lipidiques (**Dupont B ., 1985**)

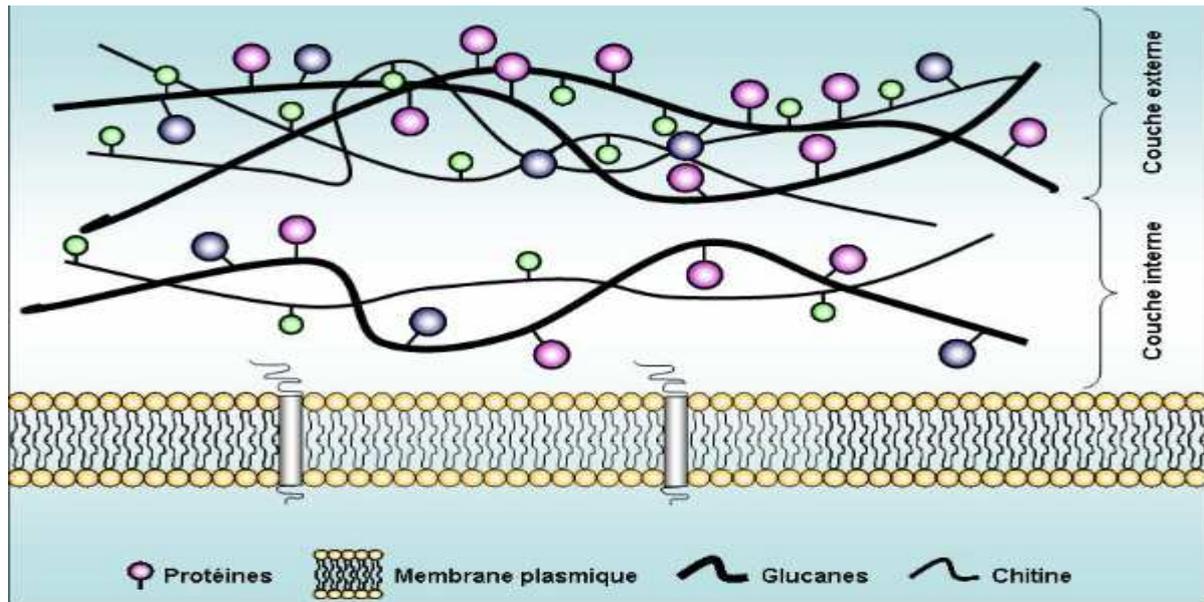
La seule structure différenciant la levure d'une cellule eucaryote « classique » est la présence d'un système vaculo-vésiculaire, évoluant en relation avec le cycle cellulaire et la division (Barelle *et al.*, 2006), et impliquée en majeure partie dans la synthèse de la paroi (Poulain *et al.*, 1995).

### 3.2 paroi :

Initialement, la paroi de *Candida albicans* était considérée comme une structure inerte assurant la protection et la rigidité du protoplasme. Désormais, il est établi que la paroi est un composant essentiel pour de nombreux aspects biologiques et pathogéniques de *Candida albicans* (Casone, 1989, Ruis-herrera *et al.*, 2006), la paroi cellulaire agit comme une membrane imperméable et maintient les caractéristiques morphologiques de la levure, c'est aussi cette paroi, partie la plus externe de la cellule, qui permet les premières interactions physiques entre le microorganisme et son environnement, hôte compris. 80 à 90% de la composition de la paroi de *Candida albicans* est représentée par des carbohydrates (Lopes Ribot *et al.*, 2004). En particulier, 3 constituants de base représentent la majorité des polysaccharides de la paroi.



**Figure n° 01 :** Les différents constituants de la paroi fongique. (Diamond R., Atlas of fungal Infections, Ed.1999).



**Figure n° 02 :** Organisation moléculaire de la paroi de *Candida albicans* (D 'après Ruiz-Herrera, FEMS Yeast Res., 2006)

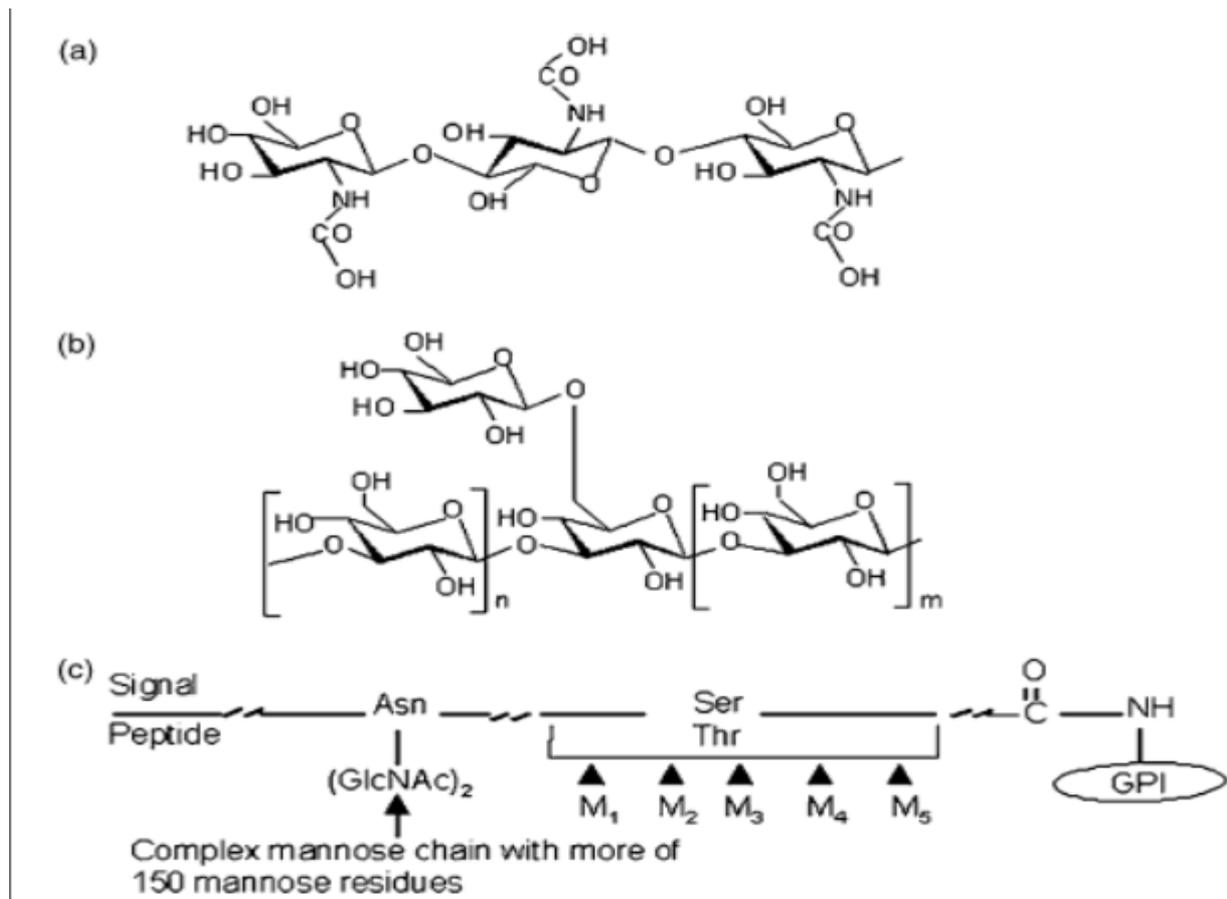
A- des polymères ramifiés de glucose branchés en  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$  1,6 ( $\alpha$ -glucanes) (Ruiz.herrera *et al.*, 2006). La composition de la paroi en  $\alpha$ -glucanes varie en fonction de l'état morphologie de la levure. En effet, elle s'élève à 30 – 39 % de  $\alpha$ -1,3- glucanes pour 43-53% de  $\alpha$ -1,6-glucanes chez les blastospores et les mycelium, alors que ces proportions sont inversées dans le cas de tubes germinatifs (Ruiz.herrera *et al.*, 2006). Ces  $\alpha$ -glucanes, représentent d'un point de vue quantitatifs 47 à 60 % du poids sec de la paroi. Ce sont donc les constituant majeurs. Ces glucanes constituent la structure de la paroi. Ils forment un squelette rigide, grâce à l'existence de liaisons glucosidiques avec la chitine (Surarit *et al.*, 1988), et procurent de fortes propriétés physique à la cellule. les glucanes peuvent être sécrétés dans le sang des patients infectés ou ils exercent une toxicité pouvant aller jusqu'au choc anaphylatique. De plus, les glucanes de *Candida albicans* peuvent inhiber directement les fonction des monocytes et celles des cellules T de façon indirecte, ce qui suggère leur rôle prédominant dans le développement de la candidose (Nakagawa *et al.*, 2003).

B- les polymères de mannose (mannanes) associés à des protéines par des liaisons covalentes (gluco[manno]protéines). Ce sont, avec les  $\alpha$ -glucanes, les constituant majeurs de la paroi, puis qu'ils représentent environ 40% des polysaccharides et sont les principaux participants à la formation de la matrice de la paroi (Calderone *et al.*, 1991/ Shepherd., 1987). Le terme « mannane » fait aussi référence au principal composant soluble et immunogène présent dans

la couche externe de la paroi, phosphomannoprotéine ou encore phosphopeptidomannane. Cette fraction de la paroi comprend principalement des homopolymères de D-mannose, 3 à 4 % de protéines, et 1 à 2 % de phosphates. A ce titre l'organisation générale des mannoprotéines de *Candida* ressemble étroitement à celle de *Saccharomyces cerevisiae* (**Chaffin et al ., 1998**) . Les polymères de mannose sont liés à la protéine par un résidu asparagine, thréonine ou sérine. Les mannanes sont des édifices complexes de masse moléculaire élevée, constitués de résidus mannose liés en  $\alpha$  -1,6,  $\alpha$  -1,2,  $\alpha$  -1,3 (**poulain et al .,1995**), ces résidus sont reconnus par le récepteur mannose, récepteur de l'immunité innée (PRRS « Pattern Recognition Receptors»), implique dans la fixation et la phagocytoses de nombreux pathogènes. Les mannanes comprennent également des motifs oligomannosidiques tels que le  $\beta$ -1,2 mannane, qui permet de différencier les sérotypes A et B de *Candida albicans* (**Ruis.herrera et al.,2006**).

C- La chitine (Figure 3, a) est un composé relativement mineur (0,6 à 2 %) de la paroi (**Schaller et al., 1999**) et se situe dans la couche interne de la paroi visible en microscopie (Figure 3, a).C'est un polysaccharide linéaire fait de plus de 2000 unités de N-acétylglucosamine (GlcNAc) associées par des liaisons  $\beta$ -1,4 (**Chaffin et al.,1998**). Les chaînes de chitine sont associées par des liaisons hydrogène pour former des microfibrilles composées de 20 à 400 chaînes. La synthèse de la chitine implique une réaction de transglycosylation des résidus GlcNAc du substrat universel UDP-N-acétylglucosamine qui allonge la chaîne polysaccharidique. Cette réaction est réalisée par les chitine synthases et requiert un métal divalent, classiquement  $Mg^{+2}$ . La chitine synthase est accumulée dans le cytosol de *C. albicans* à l'intérieur de microvésicules spécialisées, les chitosomes, responsable du transfert de l'enzyme de son site de synthèse à son site d'action (**Bartnicki.,2006**).

La chitine constitue la trame pariétale pour l'incorporation de nombreuses protéines diverses qui peuvent être attachées à la paroi de manière covalente ou qui résident à l'intérieur de cette structure telle que les protéines qui peuvent être extraites par les détergents .(**Bartnicki.,2006**).



**Figure n° 03 :** Structures chimiques de la chitine (a), des  $\beta$ -1,3/1,6 glucanes (b) et d'une protéine GPI(c). Les protéines GPI sont riches en résidus Sér/Thr, avec un ou plusieurs sites de N-glycosylation, indiquant que ces protéines pourraient être fortement glycosylées. Le domaine hydrophobe N-terminal (peptide signal) et le domaine C-terminal GPI sont notés (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

D- Les glucanes : *C. albicans* ne contient pas d' $\alpha$ -glucanes. La paroi de *C. albicans* contient uniquement des  $\beta$ -glucanes. Ce sont les polysaccharides les plus abondants de la paroi fongique et se situent dans la couche interne de la paroi visible en microscopie (Figure 3, a). Ils comptent pour 50-60 % de la masse totale de la paroi. Ils forment une chaîne principale composée de polymères de glucose liés par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -1,3 et/ou  $\beta$ -1,6 (Reiss *et al.*, 1992)

(Figure 3, b).

Les  $\beta$ -1,3-glucanes non branchés ont une structure microfibrillaire comme le révèle la microscopie électronique. La paroi de *C. albicans* contient des  $\beta$ -1,3 et des  $\beta$ -1,6 glucanes

mais aucune liaison intrachaîne  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6. L'existence d'une liaison covalente entre les  $\beta$ -1,6 glucanes et la chitine par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique à la position 1 du glucose et 6 du N-acétylglucosamine a été démontrée chez *C. albicans* (**Surarit et al.,1988**). Les glucanes, les complexes de  $\beta$ -glucanes sont relargués dans le milieu de culture et apparemment aussi dans le sang des patients infectés. Ils sont encore à l'étude pour être utilisés dans le diagnostic des candidoses invasives (**Pazos et al.,2006**) même si l'essentiel de ce diagnostic se fait par la recherche des mannanes circulants.

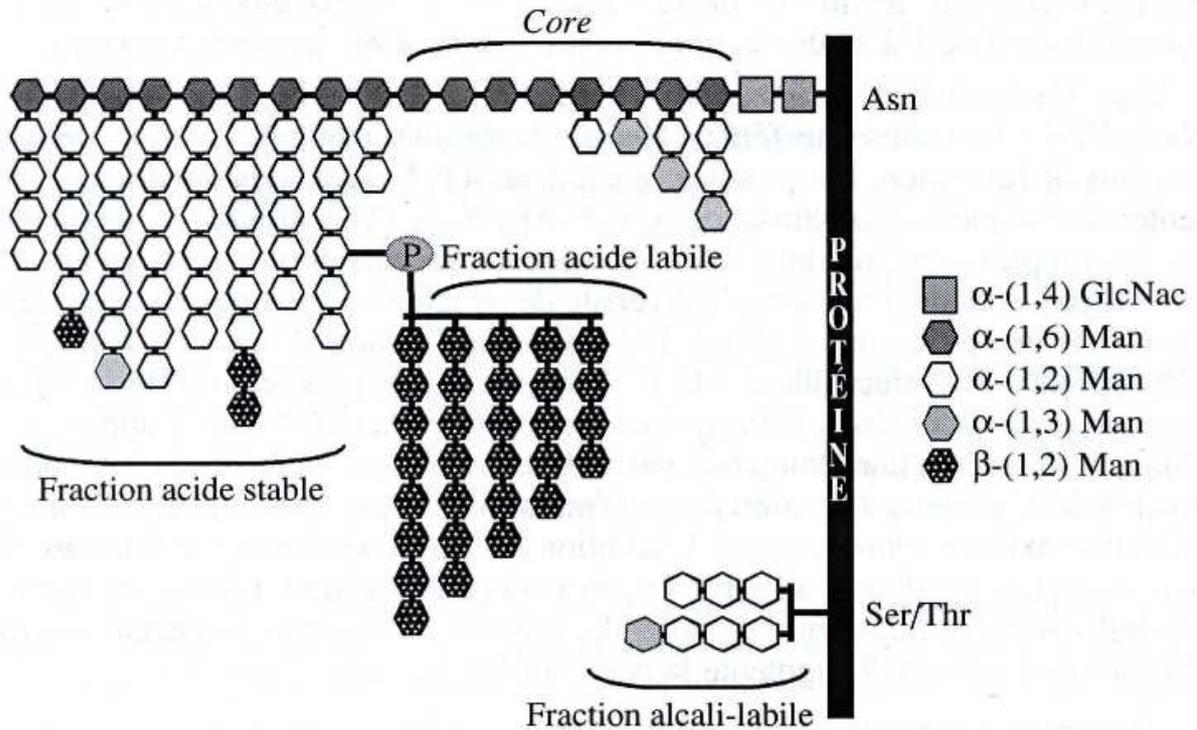
E- Les protéines (6 à 25%) : certaines interviennent en tant qu'unités structurales au niveau des mannoprotéines. La paroi contient également un certain nombre de protéines ayant une activité enzymatique. En particulier la N-acétylglucosamidase, la phosphatase acide, la protéinase, la glucanase et la chitinase (**caffin et al.,1998**). Ces protéines peuvent être sécrétées ou non en fonction du stade de la cellule et des on environnement. L'identification des protéines de la paroi de *C. albicans* a rapidement progressé depuis quelques années en raison de l'introduction de trois nouvelles approches méthodologiques: le séquençage complet du génome de *C. albicans*, l'analyse in silico du génome grâce aux programmes et algorithmes et les techniques d'analyse protéomique extrêmement sensibles (en particulier la spectrométrie de masse). Selon Ruiz-Herrera et al.( **Ruis.herrera et al., 2006**), les «véritables protéines» liées à la paroi sont N- et/ou O-glycosylées et possèdent d'autres caractéristiques spécifiques telles que la présence d'un motif glycosyl phosphatidylinositol (GPI) ou de répétition interne spécifique. Chez *C. albicans*, les véritables protéines sont liées aux  $\beta$  - glucanes et à la chitine des couches internes. A l'inverse de ces «véritables protéines», les analyses spectrométriques ont révélé la présence de quelques protéines non glycosylées dans la paroi de *C. albicans* (**Pitarch et al.,2006**), dont la présence et les mécanismes de rétention restent obscures. Cependant, quelques études récentes ont montré la présence et une potentielle fonction de ces protéines liées de façon non covalente non seulement chez *C. albicans* (**Chaffin et al., 1998/ Pitarch et ., 2002/ Urban et al.,2003/ Urban et al.,2005**) mais aussi chez *Saccharomyces cerevisiae* et même chez des plantes (**Slabas et al .,2004**).

Environ 6 à 25 % de la paroi sont constitués des protéines notamment de mannoprotéines, ou de phosphopeptidomannanes généralement appelés mannanes (**Chaffin et al.,1983/ Reiss et al.,1992**).

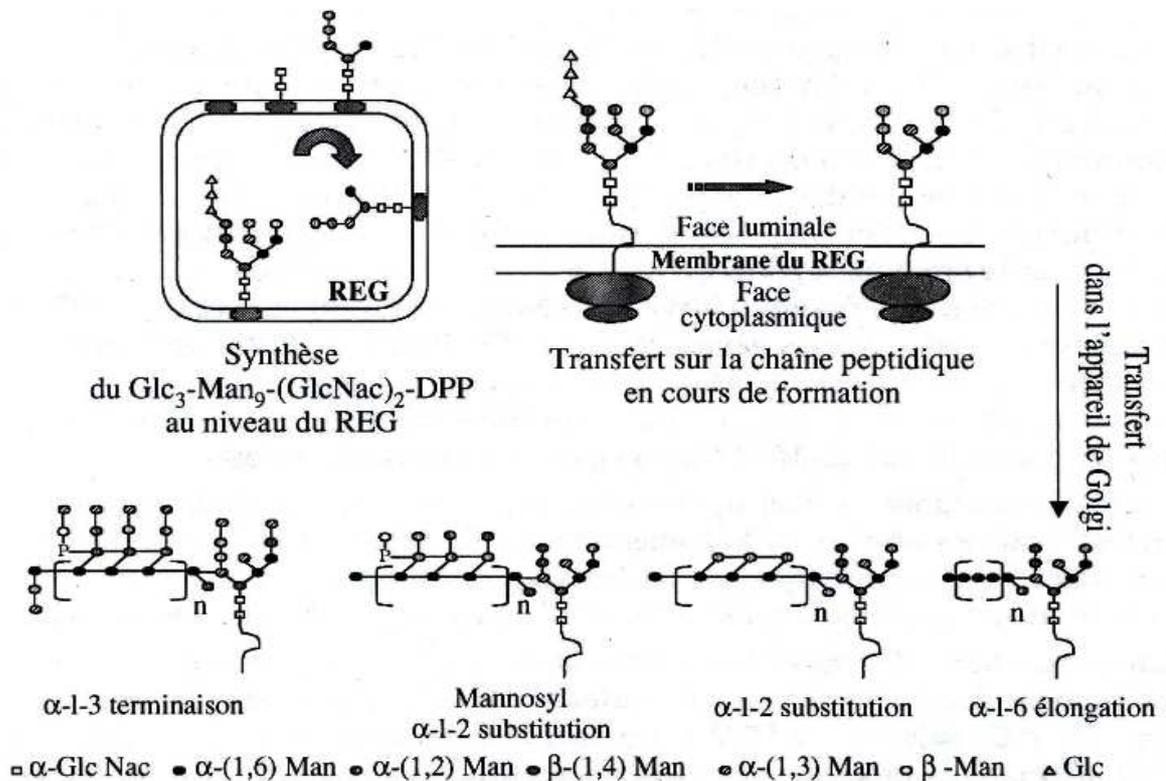
Le terme mannane ne se rapporte qu'à la partie glycosylée de ces glycoconjugués. Les mannoprotéines sont nombreuses à la surface de la paroi de *C. albicans* (Figure 3, a), ainsi qu'au niveau de la cicatrice de bourgeonnement (**Horisberger et Clerc.,1988**). Elles sont également présentes dans les couches internes de la paroi comme l'ont montré différentes

techniques utilisant le marquage par la Concanavoline A ou par des anticorps (**Kapteyn et al.,2000/ Marcilla et al.,1999/ Tronchin et al.,1981**). La partie mannane des mannoprotéines représentent 30 à 40 % des polysaccharides de la paroi de *C. albicans*. Les mannanes, dont la structure est présentée dans la Figure 4, sont des polymères de mannoses liés en  $\alpha$ -1,6,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,2 et  $\beta$ -1,2. Les deux mécanismes de N-et O-glycosylation permettent de lier les polysaccharides à la protéine (**Ernst et prill.,2001/ prill et al .,2005**). La N-glycosylation génère la formation d'édifices moléculaires très complexes et hautement ramifiés. Le transfert du glycane sur la protéine se produit en bloc. L'axe principal est composé de mannopyranosides liés en  $\beta$ -1,6.

Il est fixé sur la protéine par liaison covalente au niveau d'une asparagine, grâce à un dimère de N- acétylglucosamine. L'ensemble constitue un noyau central, supportant des ramifications latérales formées de mannopyranosides liés en  $\alpha$ -1,2, terminées parfois par de courtes séquences de mannoses liés en  $\alpha$ -1,3 et  $\beta$ -1,2. Plusieurs chaînes N-glycosylées peuvent ainsi être liées à une seule et même protéine augmentant significativement sa masse moléculaire. Les étapes de la N-glycosylation sont résumées dans la Figure 6. La O-glycosylation génère des structures simples, constituées de courtes chaînes non ramifiées de mannoses liés en  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$ -1,2 et branchées à un résidu hydroxyl d'une sérine (Sér) ou d'une thréonine (Thr). Les glycoconjugués O-glycosylés présentent des chaînes linéaires composées de une à sept unités de D-mannose liés en  $\alpha$ -1,2, terminées par des résidus mannose liés en  $\alpha$ -1,3. Les mannanes sont les composants antigéniques majeurs des levures. Les principaux déterminants antigéniques du mannane sont déterminés par la longueur des chaînes latérales, la position des liaisons  $\alpha$ -1,3 et les liaisons phosphodiester.



**Figure n° 04:** Structure schématique du mannane de *C. albicans*. D'après Poulain et al.(ponton et al.,1993).



**Figure n° 05 :** Principales étapes de la N-glycosylation. D'après Dean (Dean.,1999).

Parmi les protéines de la paroi de *C. albicans*, les protéines GPI sont les plus importantes, quantitativement, et comptent pour environ 88 % de toutes les protéines liées de façon covalente à la paroi. Ces protéines sont liées par l'intermédiaire des -1,3/-1,6 glucanes (90%) ou par la chitine (10%) (**Marcilla et al.,1991**). Les protéines GPI sont riches en résidus Sérine et Thréonine et sont largement O-glycosylées (Figure 3, c). La composition protéique de la paroi varie énormément entre les différents stades morphologiques de la levure telles que les formes blastospore, pseudohyphes ou mycélium (**Klis et al.,2001/ Sohn et al.,2003/ Urban et al.,2003**) . De plus, le profil d'expression des protéines de la paroi varie significativement dans le mycélium obtenu par l'action de différents stimuli (**Sohn et al.,2003**). Une régulation appropriée de l'architecture de la surface cellulaire est essentielle pour l'adhérence et la colonisation de l'hôte. La structure polysaccharidique de base de la paroi, glucanes et chitine, est très similaire entre le champignon pathogène *C. albicans* et le non pathogène *S. cerevisiae*. Ainsi, l'une des principales différences entre les champignons pathogènes et non pathogènes réside la plupart du temps dans la composition en protéine de la paroi spécifique d'espèce. De plus, l'altération de cette composition peut entraîner une baisse de la virulence de *C. albicans*. Ceci est vrai pour la protéine Hwp1 (**Braun et al.,2000/ Lotz et al.,2004/ Sharkey et al.,1999/ Staab et al.,2004/Staab et al.,1999/Tsuchimori et al.,2000**), dont la suppression de l'expression conduit à une baisse d'adhérence et de la virulence de la levure.

### 3.3 L'espace périsplasmique :

Il est situé entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique et est le site d'activité de diverses enzymes digestives et d'enzymes participant à la synthèse de la paroi (**Manning, et Mitchell.,1980**).

### 3.4 La membrane plasmique :

Elle est constituée de deux feuillettes membranaires. Elle assure un rôle de transport actif d'acides aminés, d'oses et de différents ions, ainsi qu'un rôle passif dans la régulation de flux moléculaires servant à maintenir la pression osmotique. Cette membrane est également impliquée dans les processus de transport des molécules et de biosynthèse des constituants de la paroi. (**Manning, et Mitchell.,1980**).

**3.4.1 L'ergostérol** (ergosta-5,7,22-trién-3 $\beta$ -ol), est un stérol cristallin synthétisé par des levures à partir de sucres ou dérivé de l'ergot du seigle. Il est transformé en vitamine D<sub>2</sub> par exposition aux rayons ultraviolets.

L'ergostérol est converti en viostérol par la lumière ultraviolette, puis en ergocalciférol, qui est une forme de la vitamine D<sub>2</sub>

C'est un composant des membranes des cellules fongiques, remplissant la même fonction que le cholestérol chez les cellules animales (not. contrôle de la fluidité, précurseur d'autres molécules). La présence de l'ergostérol dans les membranes de cellules fongiques couplée à son absence dans les membranes des cellules animales en fait une cible pour des fongicides.

L'ergostérol est également employé en tant que fluidifiant dans les membranes de cellules de quelques protistes, comme les trypanosomes. C'est le principe de l'utilisation de quelques fongicides contre la maladie du sommeil en Afrique occidentale.

L'amphotéricine B est un fongicide ciblant cet ergostérol. Elle se lie à l'ergostérol et crée un canal dans les membranes fongiques par où s'échappent des ions (principalement K<sup>+</sup> et H<sup>+</sup>) et des molécules, tuant la cellule. L'amphotéricine B a été remplacée par des agents plus sûrs dans la plupart des circonstances mais est toujours employée, en dépit de ses effets secondaires, pour des infections fongiques représentant un danger pour la vie.

### 3.5 Les organites intracellulaires :

Dans le cytoplasme, tous les organites cellulaires classiques sont présents : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, noyau, vacuoles digestives. Seul le contenu protéique et notamment l'activité enzymatique varie en fonction du stade morphologique surtout durant la germination (**Manning, et Mitchell .,1980**).

## 4. HABITATS :

L'espèce *Candida albicans* est ubiquitaire : on le retrouve comme agent commensal du tractus digestif, la cavité buccales et urinaire dans les glandes et de l'oropharynx. Elle se développe dans les zones de transpiration, comme l'aisselle, les aisselles, les zones interdigitaux, et sur les endroits brûlés ou écorchés, nez, poumon, anus et les poils), dans gorge, des ongles,

de la peau, des voies vaginales (du col du vagin et de la vulve -vaginite. Elle peut aussi se propager dans le système sanguin (septicémies), ou se développer dans les viscères comme le foie et la rate.

C'est aussi courant de l'érythème fessier du nourrisson. Bien des organes vitaux comme le cœur, ou des **lésions viscérales** et encore plus rares quand elle habit dans le sable des plages, même arrosé d'eau de mer (**Chabasse D et al**).

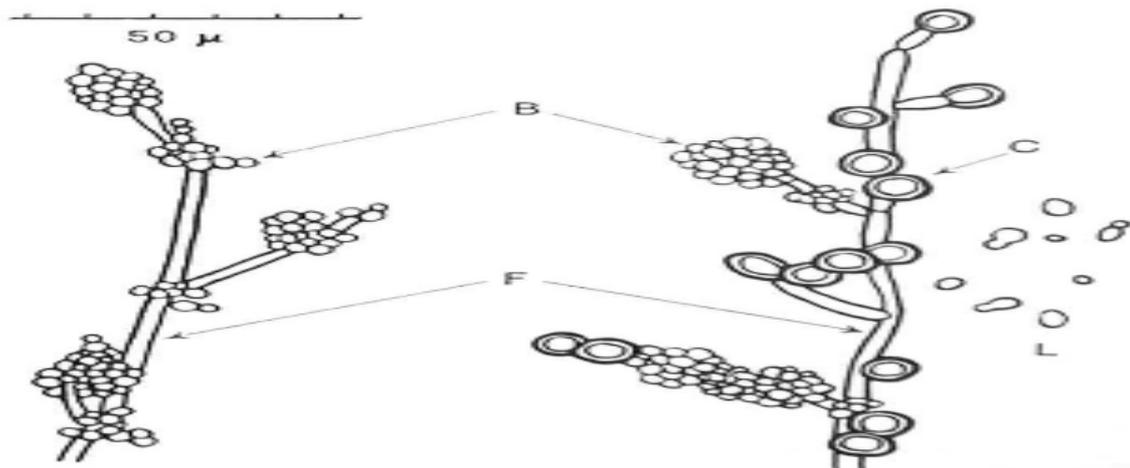
### 5. Morphologie et reproduction chez *C. albicans* :

Les levures du genre *Candida* se présentent sous forme de blastospores (blastoconidies). Ce sont de petites cellules de 2 à 5 µm par 3 à 7 µm, globulaires, ovoïdes ou cylindriques selon l'espèce.

#### 5.1 Reproduction asexuée

Le mode de multiplication de *C. albicans* est principalement de type asexué excepté pour *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae* pour ne citer que les plus connues. La multiplication est assurée par bourgeonnement de la blastospore à un pôle particulier de la cellule, donnant naissance, après division du noyau par simple mitose et septation de la cellule, à une blastospore fille qui se dissocie ultérieurement de la blastospore mère (**Odds, F. C.,1979**).

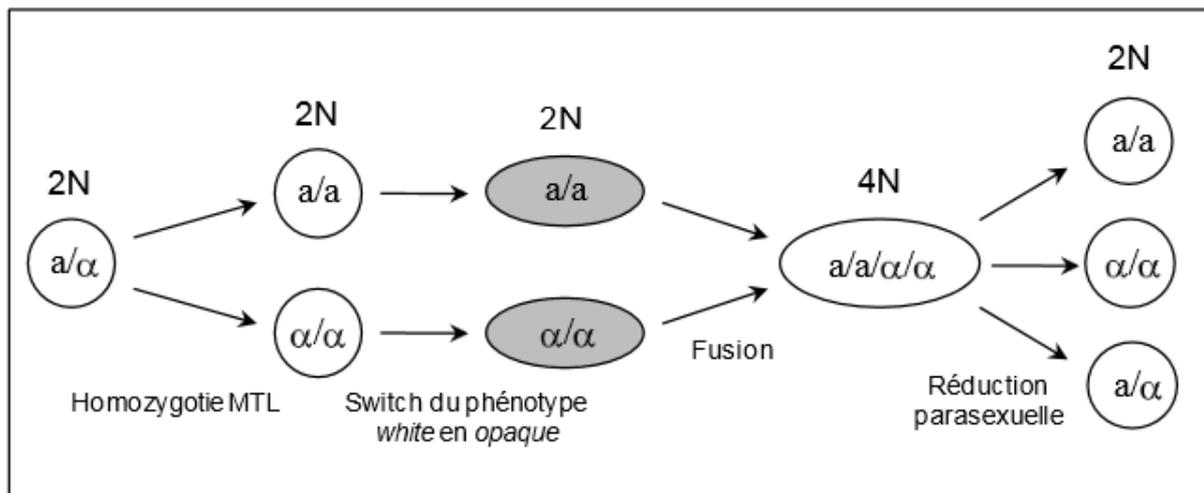
Sous certaines conditions (température, pH, composition du milieu de culture), la séparation ne se produit pas à la suite de la septation. Les cellules restent attachées les unes aux autres et forment une chaîne plus ou moins ramifiée appelée pseudomycélium. Toutes les levures du genre *Candida* sont capables de former un pseudomycélium excepté *C. glabrata*. Les conditions favorisant la formation de pseudomycélium favorisent également la formation de mycélium vrai chez *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*. Ce deuxième mode de multiplication végétative consiste en une croissance apicale, conduisant tout d'abord à la formation d'un tube germinatif puis d'un filament mycélien. Le filament mycélien se présente sous la forme d'articles cellulaires cylindriques uninucléés et séparés par des cloisons ou septa incomplets avec persistance d'un pore central assurant la continuité cytoplasmique (**Odds, F. C.,1979 / Odds, F. C.1985 / Umazume et al.,1995**)



**Figure n°06:** Morphologie de *Candida* et de *C. albicans*. L : blastospores et blastospores bourgeonnantes, B : amas de blastospores, F : filaments mycéliens , C : chlamydozoospores caractéristiques de *C. albicans*. D'après Segretain et al. (Segretain *et al.*, 1987).

## 5.2 Reproduction sexuée :

*C. albicans* a été considéré pendant très longtemps comme un champignon diploïde asexué. Mais depuis la découverte du Mating Type Locus (MTL) et des conditions nécessaires à la reproduction de *C. albicans*, a été établi un cycle parasexuel (reproduction et réduction du génome mais sans méiose) comme possible modèle de reproduction sexuée de *C. albicans* (Johnson, A. 2003) (Figure 07). En analysant le génome de *C. albicans*, une région similaire au MTL de *S. cerevisiae* a été identifiée montrant ainsi que *C. albicans* porte les deux allèles du MTL et que c'est un diploïde  $a/\alpha$  (Hull, C. M., and A. D. Johnson., 1999). Les souches homozygotes pour le locus MTL sont compétentes pour le mating. La Co-incubation des souches auxotrophiquement complémentaires  $a/a$  et  $a/\alpha$  produit des tétraploïdes Prototrophiques via la fusion intercellulaire (Hull, C. M *et al* 2000/ Magee, B. B., and P. T. Magee. 2000 ). Puis une réduction chromatique (sans méiose et donc sans brassage génétique par simple perte aléatoire de chromosome) permet de revenir au stade diploïde. Récemment, des études sur le mating et la transition phénotypique white-opaque ont montré que les cellules de phénotype opaque présentaient une capacité mille fois supérieure de développer ce type de sexualité (Miller, M. G., and A. D. Johnson. 2002). Ce switch semble donc nécessaire pour que *C. albicans* puisse établir une reproduction sexuée. Même si l'existence de ce cycle n'a pas encore été prouvée chez *C. albicans*. (Miller, M. G., and A. D. Johnson. 2002)



**Figure n°07:** Reproduction sexuée chez *C. albicans* impliquant obligatoirement deux étapes, l'homozygotie du locus MTL et le switch des cellules white en opaque. D'après Heitman (Heitman, J.2006).

### 5.3 Forme de résistance :

Dans certaines conditions de culture, et seulement chez *C. albicans* et *C. dubliniensis*, on peut voir apparaître sur les filaments mycéliens, de grosses spores, rondes ou ovales, à paroi épaisse, de 6 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre : ce sont des chlamydospores, considérées comme des formes de résistance de la levure. (Odds, F. C.,1979)

## 6. Caractères biologiques de *Candida albicans* (Euzéby.,1994)

### 6.1 Milieu de vie :

Toutes les espèces du genre *Candida* sont aérobies. Il vit exclusivement sur les muqueuses, mais il peut cependant survivre dans le milieu extérieur: 7 à 8 semaines sur le sable des plages, même arrosé d'eau de mer. Mais il est détruit par le lavage du linge, la stérilisation du matériel médical et des cathéters. (Euzéby.,1994)

### 6.2 pH:

In vivo, l'acidité gastrique ou vaginale n'altère pas sa vitalité. En effet, la croissance est possible pour des pH allant de 3 à 7. En revanche, en milieu alcalin, l'assimilation des nutriments par les *Candida* est inhibée. (Euzéby.,1994)

### 6.3 Température :

Croissance entre 20°C et 30° C pour la majorité des levures. Les espèces pathogènes sont capables de croître à 37 ° C. (Euzéby.,1994)

### 6.4 Nutrition :

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, c'est à dire qu'ils sont incapables de synthétiser leurs molécules carbonées à partir du dioxyde de carbone atmosphérique. Ils vivent donc aux dépens de la matière organique préformée .Le passage des substances se fait par absorption (Koenigh.,1995 ).

➤ Besoin en carbone:

Il utilise le carbone du glucose, du maltose, du saccharose, du galactose, du xylose, du tréhalose, du 2-cétogluconate, du méthyl-glucoside, et de la N-acétyl- glucosamine. Les capacités d'assimilation diffèrent selon les espèces et servent ainsi pour leur détermination. L'auxanogramme du carbone permet donc d'identifier une espèce selon sa capacité à assimiler certains sucres comme seule source de carbone.( Grillotr .,1995).

➤ Besoin en azote :

Il a besoin d'une source d'azote. Pour apprécier les besoins du champignon en dérivés azotés, on réalise l'auxanogramme de N où la source est un sel d'ammonium autre que le nitrate ( Grillotr.,1995).

➤ Besoin en vitamines:

Les vitamines du groupe B (notamment la biotine = vit B8= vit H) mais aussi la thiamine (vit BI), et la vitamine B5, sont indispensables à la croissance et sont souvent incorporées dans les milieux de croissance ( Grillotr.,1995).

➤ Besoin en fer :

C'est un élément indispensable à la croissance du *Candida*. En effet, comme chez toute cellule vivante, le fer et d'autres métaux lourds, constituent chez les champignons un facteur de croissance essentiel. Une surcharge en fer a été décrite au cours d'infections bactériennes mais aussi fongiques.

En effet, la plupart des champignons (*Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*...) secrètent des sidérophores, composés de faible masse moléculaire, possédant une très haute affinité pour l'ion ferrique.( Grillotr.,1995).

### 7. Caractères physiologiques de *Candida albicans* (Euzeby.,1994).

Les différentes espèces de *Candida* se distinguent par leurs caractères nutritionnels et biochimiques. Nous nous intéresserons plus particulièrement à *Candida albicans*, qui est la levure pathogène la plus fréquemment rencontrée.

- Cette espèce possède la propriété de fermenter le glucose et le maltose, mais pas le lactose, ni le raffinose, ni le saccharose. La fermentation du tréhalose est irrégulière. Les capacités fermentaires des diverses espèces vis à vis des différents sucres sont également utilisées dans un but de taxonomie: c'est l'étude de la fermentation des sucres (**DUPONT B.,1985**) appelée «zymogramme». Certaines levures sont capables de réduire les sels de tétrazolium et de les transformer en un composé coloré: le formazan, qui, incorporé dans la levure, va colorer la colonie: *Candida tropicalis* sera colorée en violet; *Candida albicans* restera blanc.( **Koenigh.,1995**)
- *Candida albicans* n'est pas inhibé par l'actidione. L'actidione ou cycloheximide est un inhibiteur des moisissures saprophytes comme les *Aspergillus* et de certaines levures. L'ajout d'actidione dans un milieu de culture sert alors de caractère d'identification. La résistance à l'actidione est par ailleurs un test utilisé dans de nombreuses galeries d'identification.
- *Candida albicans* réduit le sulfite de bismuth (milieu de Nickerson - Cator).
- Il possède une activité proline-amino-peptidase, histidine-amino-peptidase, glucosidase et N-acétyl--D galactosaminidase.
- *Candida albicans* n'élabore pas d'uréase.
- *Candida albicans* produit une protéase kératolytique, capable de digérer la couche cornée de l'épiderme, d'où la pathogénécité du champignon lorsqu'il est présent à la surface de la peau.

## 8. Caractères sérologiques :

Au cours des infections fongiques, des constituants fongiques sont libérés dans le milieu extérieur. Certains d'entre eux sont solubles, immunogènes et peuvent être décelés dans diverses humeurs de l'organisme: il s'agit d'antigènes fongiques solubles **(Dupont B.,1985)** .

- I. Ce sont surtout les mannanes pariétaux que l'on cherche à purifier par chromatographie d'affinité ou par l'intermédiaire de la concanavoline A, lectine qui fixe spécifiquement les résidus alpha glucose et alpha mannose **.(Dupont B.,1985)**. Ces épitopes oligomannosidiques de la surface pariétale du champignon sont des éléments de la variabilité antigénique de *Candida albicans* que nous reverrons dans la deuxième partie. **(Euzéby J.,1994)**

D'après leurs caractères antigéniques et notamment la nature des peptido- mannanes pariétaux, on considère 2 sérotypes de *C. albicans* :

-  Le sérotype A (courant en Amérique et en Europe),
  -  Le sérotype B (Afrique) **(Koenigh.,1995)**.
- II. Ces deux groupes sont définis grâce à leurs antigènes de surface et ont été identifiés par une technique d'agglutination en tube de la levure entière.
  - III. Du point de vue de leur pathogénicité, les deux sérotypes sont identiques. Parmi les 78 fractions antigéniques découvertes par Axelsen, on trouve aussi la candidine, qui est un antigène métabolique contenant surtout des mannanes et un pourcentage d'azote de l'ordre de 1, 5%. **(Euzéby J.,1994)**

Chapitre 2 :

**LA CHLORHEXIDINE**

## 1. Historique

La Chlorhexidine a été développée dans les années quarante par l'*Imperial Chemical Industries*, en Angleterre, et commercialisée en 1954 comme un antiseptique de la peau (Mathur et Setur ,2011). Plus tard, l'antiseptique fut utilisé dans divers domaines comme la chirurgie, l'obstétrique, la gynécologie ; L'utilisation en dentisterie a été introduite comme pré-désinfection avant chirurgie ou traitement endodontique (Gomes et Viama,2013) ; La Chlorhexidine est une molécule rentrant dans la composition de très nombreux médicaments. Son principal intérêt est d'être un très bon « antiseptique à large spectre ». En d'autres termes, la Chlorhexidine peut lutter contre de très nombreux types de bactéries.

La Chlorhexidine est principalement utilisée pour soigner des affections de la peau (plaies, actes chirurgicaux ...) et de la bouche (caries dentaires, gingivites ...). On la retrouve aussi dans des collyres, mais elle peut déclencher des allergies en cas de port de lentilles de contact. Réalisé en collaboration avec des Professionnels de la santé et de la médecine, sous la direction du docteur Pierrick HORDE.

## 2. Définition

La chlorhexidine est largement utilisée comme antiseptique, en particulier dans les liquides pour lavage des mains et les produits oraux mais également comme désinfectant et conservateur, cela est lié en particulier à un large spectre d'action, tolérance pour la peau, et une basse irritation (**Gerald et Russell, 1999**).

La chlorhexidine et ses sels ont l'avantage d'agir longtemps sur les dents et les muqueuses buccales, sans pénétrer dans le corps. On la retrouve dans les pâtes dentifrices ou dans les bains de bouche. Elle a montré une action bactéricide immédiate et une action bactériostatique prolongée. La chlorhexidine est utilisé dans les produits cosmétiques à des concentrations comprises entre 0.01 et 0.1% (**Gorman et Scott, 2004**).

### 3. Structure chimique

La Chlorhexidine est une molécule de synthèse ; Elle a une structure de bisdiguamide ; En effet la guanine par oxydation dans la guanidine ; La condensation de deux guanidines donne un biguanide ; Ces deux molécules sont reliées par un pont hexaméthylène avec deux cycles 4-chlorophényle terminaux. Terminalf. Ressources Terminologiques en Langue Française.

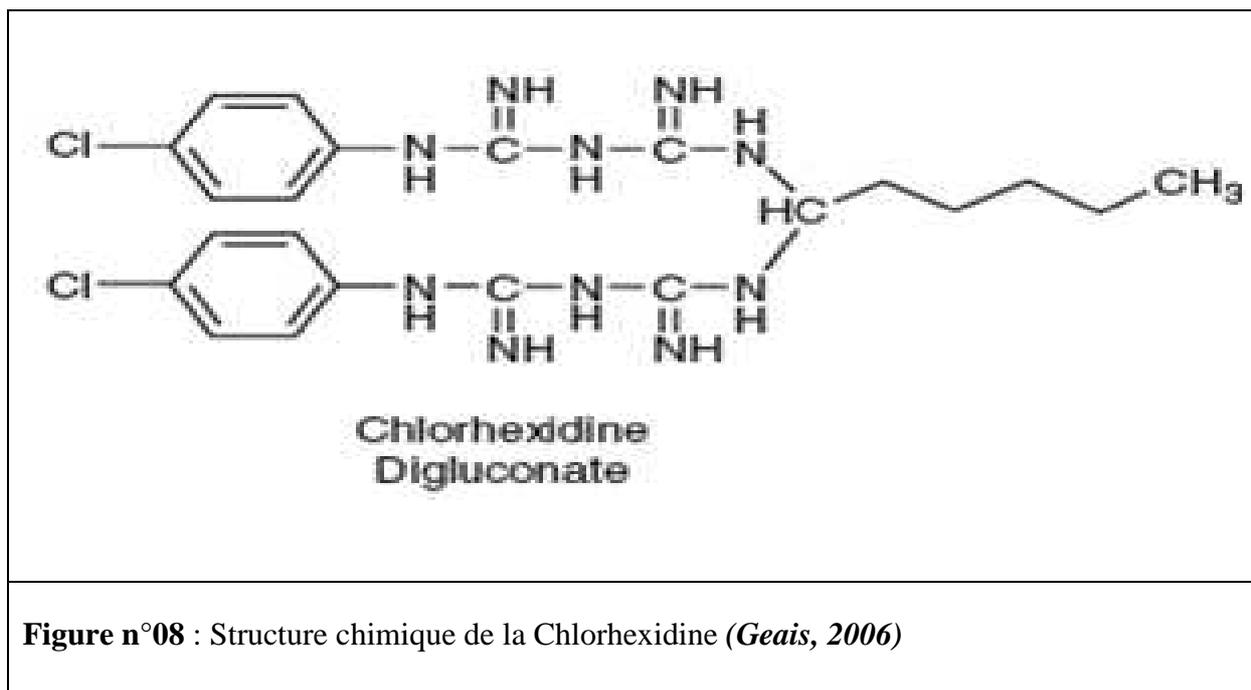


Figure n°08 : Structure chimique de la Chlorhexidine (Geais, 2006)

### 4. Propriétés physico-chimiques :

La Chlorhexidine est une base avec de fortes charges bicationiques ce qui lui confèrent une haute interactivité » avec les anions (Bascones et al .2005)cette molécule est plus stable sous forme de base libre. Le diacétate et le dichlorhydrate sont peu solubles dans l'eau tandis que le digluconate est très soluble (D.M.Foulkes1973).L'hydroxyapatite seule est incapable de capter et de retenir la Chlorhexidine après un bain de bouche.Cependant, l'hydroxyapatite de l'émail est toujours recouverte par un film protecteur de glycoprotéines salivaire .On peut donc considérer que les mucines présentes à la surface dentaire jouent un rôle significatif dans la rétention de la Chlorhexidine D.M.Foulkes1973.Une étude de L.G. HJELIORD et G.ROLLA(1973)a montré que l'absorption de la Chlorhexidine était largement supérieure à 50 000 En revanche, cette captation est quasiment nulle pour des poids moléculaires inférieur

à 20 000. Ces auteurs émettent l'hypothèse que la Chlorhexidine était retenue aux surfaces des tissus buccaux par des liaisons électrostatiques. Les molécules de Chlorhexidine liées seraient ensuite remplacées progressivement par compétition par des ions calcium présents dans la salive. Sa capacité de se lier autant avec les protéines restant en solution qu'avec celle qui précipitent est une des raisons qui expliquerait sa rémanence malgré les flux salivaires.

Ainsi, il faut noter que la plaque est inhibée jusqu'à 24h après exposition à la Chlorhexidine (**Rolla et al., 1971**). Les chercheurs **JENSEN et CHRISTENSEN (1971)** ont détecté une concentration antibactérienne suffisante jusqu'à 5h après introduction en bouche. **BP NESVOLL, LOKKEN et ROLLA (1974)** ont constaté une rétention de la Chlorhexidine de 30% immédiatement après un rinçage par un bain de bouche. La nature cationique de la Chlorhexidine permet à celle-ci de se combiner aux composés anioniques tels que les groupes carboxyles, phosphates présents dans l'alimentation ou bien les protéines salivaires.

**Tableau N°01** : Propriétés chimiques de la chlorhexidine (**Geis., 2006**)

Nom chimique	Bis (p-chlorophenyldiguanido) hexane
Noms commerciaux	Hibitane, Novalsan, Rotasept, Sterilon, Hibiscrub, Arlacide
Type de composé	Biguanide
Aspect	Poudre cristalline blanche
Odeur	Inodore
pH optimal	5 à 8
Stabilité	Instable au-dessus de 70°C
Compatibilité	Compatible avec les cations ; Incompatible avec les anions, gommes, savons, anions inorganiques, alginates, carboxyméthylcellulose.

## 5. Mécanisme d'action et pharmacodynamie

### a. Spectre d'action

La Chlorhexidine est active sur les **bactéries GRAM+** et sur la **plupart des bactéries GRAM-**. Par contre son activité est moindre sur les bactéries A.A.R.(Alcool-Acido-Résistantes) et sur les endospores **CUZEL et al.** Ont montré qu'il existait une grande dispersion des résultats lorsque l'on désire connaître les C.M.I.(Concentration minimale inhibitrice), (**Carlotti D.N., et Maffart .,1996**).

La plupart des études ont abouti à un pourcentage de bactéries tuées supérieur à 80 %. Son action importante et rapide semblerait encore être accélérée en présence d'.alcool. En fonction de la concentration utilisée, la Chlorhexidine peut être uniquement bactériostatique (**Carlotti et Maffart., 1996**).

La Chlorhexidine est efficace sur un grand nombre de bactéries. **Certaines souches de *Pseudomonas, Serratia et Proteussp.* ont été reconnues résistantes** avec une augmentation importante des C.M.I. (**MARIS, 1990**).

D'après **Carlotti et Maffart (1996)**, GHANNOUM et HOLBROOK ont montré que la Chlorhexidine était fongistatique sur les levures pour des concentrations allant de 0,4 à 50 mg. Une concentration minimale de 1 %, ou mieux comprise entre 2 et 4 % serait nécessaire pour être efficace contre les *Malassezia* (**Mason, 1993 et Scott., 1995**).

Les autres champignons nécessitent des concentrations allant de 75 à 500 mg/l. L'action de la Chlorhexidine serait plus rapide sur les levures que sur les dermatophytes et les moisissures. Elle ne possède pas d'effet sporicide (**Murat., 1995**)

Certains auteurs ont prouvé l'efficacité de la Chlorhexidine sur certains virus. En particulier sur le virus H.I.V. qui serait détruit en moins d'une minute par une solution de Chlorhexidine à 0,2% (**Carlotti et Maffart., 1996**).

### b. Mode d'action

La Chlorhexidine exerce son action par le biais d'interactions de ses deux groupements biguanides avec les phospholipides des membranes cellulaires. Il se produit une modification de la perméabilité des membranes des bactéries vis à vis de substances inorganiques (ions

potassium, acides aminés, nucléotides). Indirectement, le fonctionnement des enzymes s'en trouve altéré (**Carlotti et Maffart., 1996**).

Dans un premier temps, la molécule de Chlorhexidine s'adsorbe à la surface grâce à son caractère basique. La quantité absorbée est une concentration dépendante. D'après **CARLOTTI et MAFFART (1996), TONELLI et GJERMO** ont montré qu'il s'ensuit alors une altération de la mobilité électrophorétique par modification de la répartition des charges électriques au niveau de la paroi cellulaire.

Enfin la Chlorhexidine entraîne une solution de continuité et la membrane ne joue plus son rôle de barrière osmotique. Il y a alors fuite de composés intracellulaires. A faible concentration, les composés à faible poids moléculaire (ions potassium et phosphore) s'échappent. Cette fuite est responsable de l'effet bactéricide. A forte concentration, les protéines et les acides nucléiques précipitent .est inhibé, induisant ainsi un effet bactéricide (**Lemarie et Hosgood, 1995 ; Carlotti et Maffart., 1996**).

Le mode d'action de la Chlorhexidine sur les virus et les champignons est inconnu mais il est probablement similaire à celui agissant contre les bactéries. (**Lemarie et Hosgood ., 1995**).

### c. Facteurs de variation de l'activité

Les liquides biologiques (sérum, sang, exsudats) n'altèrent pas ses propriétés

Cependant, elle est inactivée par les dérivés anioniques, par les dérivés chlorés, iodés et mercuriels, par les savons acides, le laurylsulfate de sodium, les alginates et le carboxyméthylcellulose de sodium. Il peut en outre se produire des précipités en présence de borates, de bicarbonates, de carbonates, de chlorites, de citrates, de phosphates et de sulfates. C'est pourquoi lorsque la Chlorhexidine est diluée à l'aide de chlorure de sodium ou de ranger lactate, il se forme un précipité en 2 ou 3 heures, sans toutefois diminuer l'activité de la solution obtenue (**Carlotti et Maffart, 1996 ; Remy et Witz., 1998**).

### d. Résistances

La résistance naturelle est en relation avec la richesse de la membrane externe, en phospholipides pour les bactéries et en cires pour les mycobactéries, qui agit comme une barrière de protection contre les antiseptiques. Cela explique que les bactéries GRAM- sont plus résistantes que les bactéries GRAM+. **Boucherit-Atmani Z., Seddiki S. M. L., Boucherit K., Sari-Belkharoubi L., Kunkel D. (2011)**.

La résistance acquise de nature chromosomique concerne essentiellement les bactéries GRAM-. Les souches résistantes sont obtenues par passages répétés sur un milieu contenant de la Chlorhexidine, ce qui entraîne des changements dans la composition de la membrane externe. **Boucherit-Atmani Z., Seddiki S. M. L., Boucherit K., Sari-Belkharoubi L., Kunkel D. (2011)**

Différents auteurs ont montré qu'il existait chez *Staphylococcus aureus* des gènes de résistance aux antiseptiques, en particulier le gène *qacA* qui code aussi pour la résistance aux ammoniums quaternaires. Par contre, d'après **FLEURETTE (1995), CREMIEUX** a montré que malgré la présence du gène *qacA*, il n'y a pas de modification de l'effet bactéricide de la Chlorhexidine sur ces souches. Les concentrations minimales bactéricides restent dans les valeurs normalement observées mais il faut noter que les concentrations bactéricides sont très élevées par rapport aux concentrations inhibitrices. Ce type de résistance ne semble pas atteindre les bactéries GRAM-.

**Tableau n°02 : Mécanisme de l'action antimicrobienne de la chlorhexidine (Gerald et Russell, 1999)**

Type de microorganisme	L'action de la chlorhexidine
Spores bactériennes	non sporicides, empêche le développement des spores mais pas la germination.
Mycobactérie	Mycobacteristatique (mécanisme inconnu) mais pas mycobactericide.
Bactéries non sporulées	lyse des protoplastes et sphéroplastes; à concentrations élevées cause la précipitation des protéines et des acides nucléiques.
Levures	lyse de protoplaste et la fuite intracellulaire; concentrations élevées cause une coagulation intracellulaire.
Virus	une activité réduite contre plusieurs virus; virus lipide-enveloppés plus sensibles que les virus non enveloppés; effet probablement sur l'enveloppe virale, peut-être la partie lipidique.
Protozoaires	Activité membranaire vis-à-vis <i>A.castellanii</i> (une fuite)

## 6. Effet attendus de la chlorhexidine

### 6.1 Effets antiplaque

Toutes les études traitant de l'effet antiplaque de la Chlorhexidine sont formelles : la Chlorhexidine a bien un effet antiplaque. **MENDIETA et VALLCORBA (1994)** ont montré une action anti-gingivite après deux rinçages par jour pendant 7 jours avec deux solutions différentes à des concentrations de 0.12% et 0.2%. En effet, les effets sur l'inhibition de la plaque étaient significativement augmentés par rapport au groupe contrôle. Les PI (indice de plaque) ont été comparés par deux techniques d'analyse (**PI décrit par Quigley et Heinen 1962, et Silness et Loe en 1964**).

Une autre étude de **K. LORENZ et G. BRUHN (2006)** a montré une diminution significative de l'indice de plaque après rinçage deux fois par jour d'une solution à base de Chlorhexidine versus groupe contrôle pendant trois semaines. Cette étude est arrivée aux mêmes résultats.

Il semblerait que cet effet soit lié à la Chlorhexidine qui empêcherait les liaisons cellules-cellules et cellule et cellules-surfaces par compétition Chlorhexidine-calcium car celui-ci serait impliqué dans les phénomènes de liaison. De ce fait, l'adhésion bactérienne ne peut avoir lieu ce qui empêche leur agglutination (**Rolla et Melson., 1975**).

#### 6.1.1 Effet antibactériens

La Chlorhexidine a des effets sur les bactéries GRAM positifs et les GRAM négatifs, incluant les aérobies et les anaérobies. Cependant, il existe de petites variations de sensibilités entre les différentes familles de bactéries avec une sensibilité augmentée pour les bactéries GRAM+ en comparaison des GRAM- (**Hennesey., 1973**). Aucune résistance significative n'a été décrite même sur des utilisations de longue durée (**Schiott CS., 1976**).

##### 6.1.1.1 A basse concentration

A basse concentration, il y a augmentation de la perméabilité membranaire par modification de la concentration de potassium intracellulaire (**Hugol et Longworth., 1966**).

### 6.1.1.2 A haute concentration

A haute concentration, la Chlorhexidine produit un effet bactéricide par précipitation du cytoplasme bactérien après introduction dans les bactéries de la molécule par voie transmembranaire (Cianco SG., 1994).

### 6.1.2 Effet cariostatiques

Son action antibactérienne diminue les risques d'atteinte carieuse car celle-ci est d'origine bactérienne. Des études visant à l'acidité ont été réalisées. Ainsi, OPPERMAN (1979) a mesuré le pH de la plaque après avoir appliqué une solution à base de sucrose pour constater la diminution du pH. Ensuite, des bains de bouche à base de Chlorhexidine de concentration de 0.05% ont été réalisés. L'augmentation du pH est constatée jusqu'à 4h. On peut aisément en déduire que si la concentration était augmentée pour atteindre la concentration en Chlorhexidine des bains de bouche du marché, l'effet pourrait être prolongé augmentant ainsi les effets cariostatiques de la Chlorhexidine.

### 6.1.3 Effet antifongique sur *Candida albicans*

Habituellement, *Candida albicans* est sous forme de champignon (état saprophyte). Elle est donc inoffensive. Mais sous certaines conditions, elle se transforme en parasite avec l'apparition de filaments et devient pathogène. (Jay et al., 1992).

Des études ont été menées sur l'adhésion de *Candida albicans* au contact des résines acryliques sous l'effet de la Chlorhexidine (Kassab et al., 2000). Celle-ci montre un effet anti-adhérent de la Chlorhexidine sur *Candida albicans* car l'antiseptique agit sur les mécanismes de production des phospholipases à l'origine de son maintien sous sa forme levure. La Chlorhexidine diminue ainsi la forme hyphale (filamenteuse) de la levure et diminue son pouvoir pathogène.

## 7 Facteurs d'interaction

### 7.1 Principal : pH

Une étude menée par Addy et Roberts en 1981 a montré l'influence du pH sur le potentiel antiseptique de la Chlorhexidine. Celle-ci portait sur la fixation de différents antiseptiques dont le digluconate de Chlorhexidine au contact de pastilles de résines polyméthylacrylates. Le potentiel d'adhésion de l'antiseptique montrant une faible désorption est augmentée avec la

diminution du pH environnant par perte des charges négatives de la surface des résines acryliques. Ce phénomène chimique de surface voudrait réduire considérablement la liaison de surface avec les charges positives de l'antiseptique. Cette altération de surface pourrait expliquer la dépendance du pH de l'absorption de la Chlorhexidine et expliquer également la réduction de l'effet antibactérien de ces bains de bouche. Selon cette étude, en dessous d'un pH de 3, l'augmentation de la nature cationique des molécules environnantes est telle que la Chlorhexidine ne peut plus se fixer sur les surfaces dentaires et est éliminée par le flux salivaire. **ADDY et ROBERTS en 1981.**

## 7.2 Secondaires

### 7.2.1 Fluorure de sodium

C'est un composé chimique utilisé dans la fabrication des dentifrices comme source d'ions fluorures. Celui-ci est connu pour ses effets anti-caries. Diverses études ont été publiées afin de connaître l'influence du fluorure de sodium sur les propriétés de la Chlorhexidine. **LORENZ et BRUHN en 2006** ont trouvé des résultats similaires sur la plaque dentaire après rinçage à la Chlorhexidine, suivi avec ou sans brossage avec un dentifrice à base de fluorure de sodium. Les résultats sont similaires pour les études de **Dolles et Gjermo en 1980.**

**Mendieta et Vallcorba en 1994** ont comparé deux bains de bouche à base de Chlorhexidine avec et sans fluorure de sodium. Celui-ci semblerait diminuer l'efficacité de la Chlorhexidine par incorporation du fluor sur la surface dentaire et empêchant ainsi l'antiseptique de se fixer. **Mendieta et Vallcorba en 1994.**

### 7.2.2 Laurylsulfate de sodium

C'est un composé utilisé dans la fabrication des dentifrices pour ses propriétés amphiphiles, donnant ainsi une capacité à créer de la mousse. Les adjuvants, composés anioniques, diminuent les effets cationiques de la Chlorhexidine et diminuent les propriétés antiseptiques de la Chlorhexidine. Les études de **Sheen et OwensW en 2001** ont montré une diminution des colorations induites par la Chlorhexidine avec l'utilisation d'un dentifrice à base de laurylsulfate de sodium. Cependant, cela peut résulter d'une inactivation de l'antiseptique par les

charges anionique contenues dans la plupart du dentifrice. Il est donc préférable d'effectuer les brossages à distance des rinçages avec les bains de bouche (Sheen et Owens., 2001).

### 7.2.3 Calcium

HAUGEN en 1974 a montré que le calcium à trop forte concentration pouvait inhiber le pouvoir antiseptique de la Chlorhexidine.

### 7.2.4 Composition salivaire

La pellicule salivaire est un facteur clé sur les colorations dentaires car sa composition peut varier en fonction des individus. En effet, des variations chimiques et physiques de la pellicule permettent plus ou moins de fixer la Chlorhexidine et les agents chromogènes. Ces effets influencent la structuration de la pellicule par précipitation des glycoprotéines salivaires avec les molécules de Chlorhexidine (Sheen et al., 2001). L'observation des colorations formées sur les surfaces suggèrent un dépôt initial de molécules chromogènes qui se secondent par la prolifération d'îlots aux mêmes endroits. Cette étude a démontré des différences de coloration entre les différents types de salive, mais la cause n'a pas été identifiée. (Nordbo et al., 1971).

La concentration des constituants (protéines, glycoprotéines) dépendent du flux salivaire. En effet, des variations de flux entre individus ont été identifiées. La sécrétion salivaire chez la femme est inférieure par rapport à celle de l'homme (Heintze et al., 1983). Nous savons également que les colorations augmentent lorsque le flux salivaire est inexistant. Cet ensemble pourrait bien expliquer également les différences de coloration entre individus (Sheen et al., 2002).

## 8 Effets indésirables de la Chlorhexidine

### 8.1 Sensation de sécheresse buccale

La Chlorhexidine entraîne des perceptions de sécheresse buccale très aléatoires entre les patients. Ces sensations sont accentuées avec les rinçages aux bains de bouche à base de Chlorhexidine diluée à la concentration de 0.12% (Hepso et al., 1988).

## 8.2 Gonflement des parotides

Des augmentations de volume des parotides peuvent être observées. Celle-ci peuvent être unilatérales ou bilatérales. Cet effet secondaire est extrêmement rare et reste sans explication (**Lindhe.,2010**).

## 8.3 Altération du goût

L'usage de la Chlorhexidine provoque des modifications de perception de goût. En effet, plusieurs auteurs se sont penchés sur cet effet secondaire. Les études de **LANG et al.,1988** ont montré que des sujets utilisant des bains de bouche à base de Chlorhexidine à 0.2%, deux fois par jour constataient un changement de leur perception du goût salé (vérifié par une solution de chlorure de sodium) alors que les autres goûts sucrés amers acides n'étaient pas touchés. Cette dysgueusie était rapidement ressentie dès le début du traitement, Persistait pendant toute la période puis disparaissait à l'arrêt du traitement. Cette modification de perception du goût salé peut être expliquée par la nature cationique de la Chlorhexidine. En effet, elle peut se lier aux molécules anioniques telles que le groupement sulfates, phosphates ou carboxyles. Les liaisons pourraient alors s'établir avec les bourgeons du goût et empêcher la fixation du sodium créant ainsi ce goût salé (**Lang et al.,1988**).

## 8.4 Infection virales

La salive contient beaucoup d'IgAs qui participent activement à la reconnaissance, d'adhésion et liaison aux cellules. Il s'agit de la première ligne de défense de la muqueuse buccale. Les propriétés cationiques de la Chlorhexidine font que celle-ci précipite avec les mucines, considérés comme un réservoir pour ces immunoglobulines, rendant la muqueuse plus sensible aux infections virales (**Oydn et Gjermo.,1982**).

## 8.5 Coloration

Les colorations des dents et des téguments sont les effets secondaires les plus rencontrés chez les patients utilisant la Chlorhexidine.

**9 Toxicité de Chlorhexidine :**

La chlorhexidine (et ses sels) est irritante ; les cas de sensibilisation semblent peu nombreux. Cependant, des réactions allergiques sont possibles sous forme d'eczéma, d'urticaire. **(Gerald et Russell., 1999).**

La sensibilité de la peau a été de temps en temps rapportée. En générale, la chlorhexidine est bien tolérée et non-toxique une fois appliquée à la peau ou aux muqueuses et il est un antiseptique préopératoire important **(Gormanet Scott., 2004).**

D'après **CARLOTTI et MAFFART, RIMDOM-SCHIOTT et al.** ont montré que chez L'homme, une ingestion de 2 g par jour pendant 7 jours n'a entraîné aucun effet secondaire. De même un traitement régulier de deux ans par une solution aqueuse de Chlorhexidine à 2% à usage buccal n'entraîne aucune altération des fonctions hépatiques, rénales ou sanguines. Il a simplement été observé une modification de l'écosystème microbien.

# Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de biologie Dr Tahar Moulay , l'objectif de ce travail est de :

- Isolements des souches de *Candida albicans* à partir de la cavité buccale des différentes personnes à différents âges et selon des usages ordinaires ou anarchoiques de dentifrices.
- Identification des souches par la Galrie classique.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la chlorhexidine sur les isolats de *Candida albicans* par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide RPMI .
- Détermination des concentrations minimales fongicides (CMF).
- Extraction et dosage de l'ergostérol membranaire de trois souches de *Candida albicans*.

### 1. Matériel :

Les levures utilisées pour notre étude sont des souches sauvages prélevées à partir des cavités buccales des utilisateurs de bain de bouche et de dentifrice de différentes marques et avec usages anarchique, l'âge de cette personnes se diffèrent entre 10 et 55 ans , cette souches isolées en plus des souches de référence *Candida albicans* 444 IP et ATCC 10250 et ATCC 26790.

Le conservateur antimicrobien utilisé pour l'étude de la résistance des souches sauvages de *Candida albicans* est la chlorhexidine (bain de bouche) Sous forme de digluconate de chlorhexidine à des concentrations 0.05%.

### 2. Méthodes :

#### 2.1.Prélèvement

22 prélèvements ont été effectués entre le 28/01/2016 et le 13/02/2016, à partir des cavités buccales des étudiants au laboratoire de biologie de nouveau site 2000 à l'université Tahar Moulay de Saida et d'autres personnes, ce prélèvement réalisé par écouvillonnage buccal. Les écouvillons sont mis directement dans un tube à essai contenant 5ml du milieu sélectif bouillon avec Gentamicine, Afin d'éviter toute contamination, les tubes sont ouverts devant une torche, flambés puis vite refermés après coupure d'extrémité distale des écouvillons. Les tubes contenant les échantillons sont marqués puis placés dans une étuve à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

### 2.2. Isolement :

À partir des tubes présentant un trouble, nous avonsensemencé se forme de tapés ,des boites de Pétri préalablement préparées avec le milieu sélectif gélose additionnée de gentamicine, les boites sont mises à incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures. Une colonie de cette culture est prélevée, puis placés dans un tube contenant 5ml du milieu sabouraud liquide stérile, l'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 48 heures. L'examen macroscopique des boites montre des colonies blanchâtres ou crémeuses, lisses brillantes.

Chaque souche pure est ensemencée sur gélose sabouraud inclinée en tube puis incubée à 30°C pendant 24 à 48 heures et mise ensuite dans le réfrigérateur à 4°C pour la conservation.



**Figure n°09 :** l'ensemencement des tubes inclinée

### 2.3. Identification :

#### 2.3.1. Examen macroscopique :

Après l'incubation de 48 h on va observer les boîtes pétri qui contiennent de gélose Sabouraud par l'œil nu.

#### 2.3.2. Examen microscopique :

L'observation microscopique de *Candida albicans* à l'état frais on va prendre une suspension bactérienne par pipette pasteur et versée sur une lame stérile et couverte par une lamelle et enfin observée par microscope optique  $\times 40$ .

#### 2.3.3. 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. On effectue un montage d'état frais afin de rechercher des tubes germinatifs caractéristiques de *Candida albicans*. Si le *Candida* est un *C. albicans*, on observe dans presque 90 % des cas un tube de germination partant de la levure sans présence de constriction à la base. **(Drochey et Vieu, 1957)**

#### 2.3.4. Test de chlamydo sporulation

Une colonie de levures est prélevée puisensemencée au centre sur gélose PCB (pomme de terre, carotte, bile) (Composition (en g/L) : Pommes de terre 20,0 - Carottes 20,0 - Bile de bœuf 150 mL - Agar 25,0 - pH 7.2) en créant des fentes dans la surface de la gélose à l'aide d'un fil de platine. La zoneensemencée est recouverte d'une lamelle couvre-objets stérile ensuite incubée à 25 °C pendant 48 heures.

La lecture s'effectue par observation directe au microscope du milieu à l'objectif  $\times 40$ . La présence de chlamydo spores (spores globuleuses de 10 à 15  $\mu\text{m}$  entourées d'une paroi épaisse) signifie qu'il s'agit dans 95 % des cas de *C. albicans*. Par ailleurs s'il y a des pseudofilaments sans présence de chlamydo spores, il s'agit d'une levure du genre *Candida*. **(Drochey et Vieu, 1957).**

### 2.3.5 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par La méthode des micro-dilutions sur milieu liquide :

Nous avons utilisé la méthode décrite en 2002 par *Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 (CLSI)*. C'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 croissantes du conservateur.

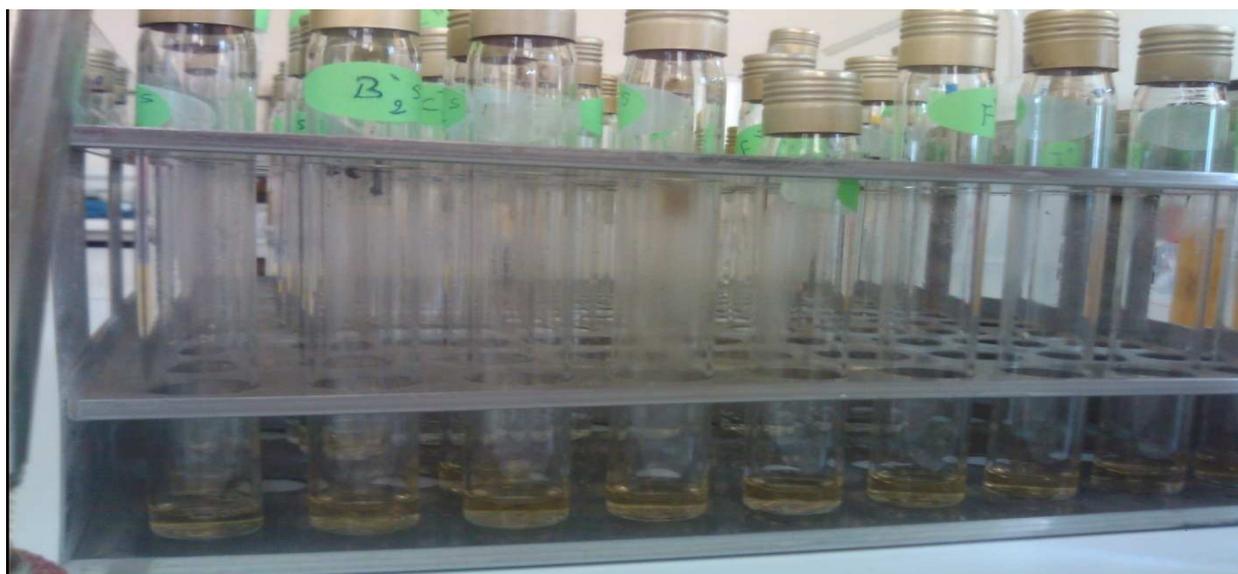
Le milieu de culture utilisé pour cette technique est le Bouillon Sabouraud (BS) à pH 6,7 et le bouillon RPMI

- Préparation de l'inoculum :

Cette test est réalisée le 28/04/2016, a partir d'une culture jeune de *Candida albicans* en boite sur milieu GS , nous avons prélevé 5 colonies d'un meme de diamètre ( 1mm) que nous avons rentrées dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile. La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée de  $10^6$  à  $5 \times 10^6$  cellules/ml par cellule de Thomas . La concentration cellulaire finale est fixée entre  $5 \times 10^2$  à  $2.5 \times 10^3$  cellules/ml. Elle est obtenue par deux dilutions successives dans le milieu de test, une dilution de 1:100, suivie d'une autre dilution de 1:20.

En va prendre 10 tubes a hémolyse dans un portoire en vas remplir 9 tubes par 1 ml de RPMI ,dans un éprouvette prendre 1 ml de RPMI et 1 ml de chlorhexidine avec agitation de cette solution et stérilisé par filtre et versé dans le tube n° 1.

en va prendre 1 ml de cette mélange et nous avons placé dans le tube suivant jusqu'a le tube n° 10 ,



**Figure n°10** : les 2 dilutions de la Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

- Préparation de la microplaque :

Pour obtenir un grand intervalle de dilutions, nous avons inoculé la microplaque par une disposition horizontale, et nous avons utilisé 12 puits pour chaque souche. Pour chaque colonne de la microplaque, nous avons déposé par une micropipette 50µl de milieu de test dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et N°12. Le puits N°11 servira de témoin positif qui contient le milieu de culture RPMI (50µl) et l'inoculum (50µl), et le puits N°12 servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement le milieu de culture comme témoin négatif (100µl) de RPMI. Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution mère de la chlorhexidine dans les puits N°1 et effectuer une dilution au 1/2. Jusqu'au puits N° 10, prendre l'aluminium stérile et emballé les microplaques pour éviter la contamination et incubé à 35± 2 °C pendant 24 heures.

La lecture du résultat s'effectue à l'œil nu à l'aide d'une source de lumière sous la microplaque pour visualiser 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 n °11 :Remplissage de microplaque

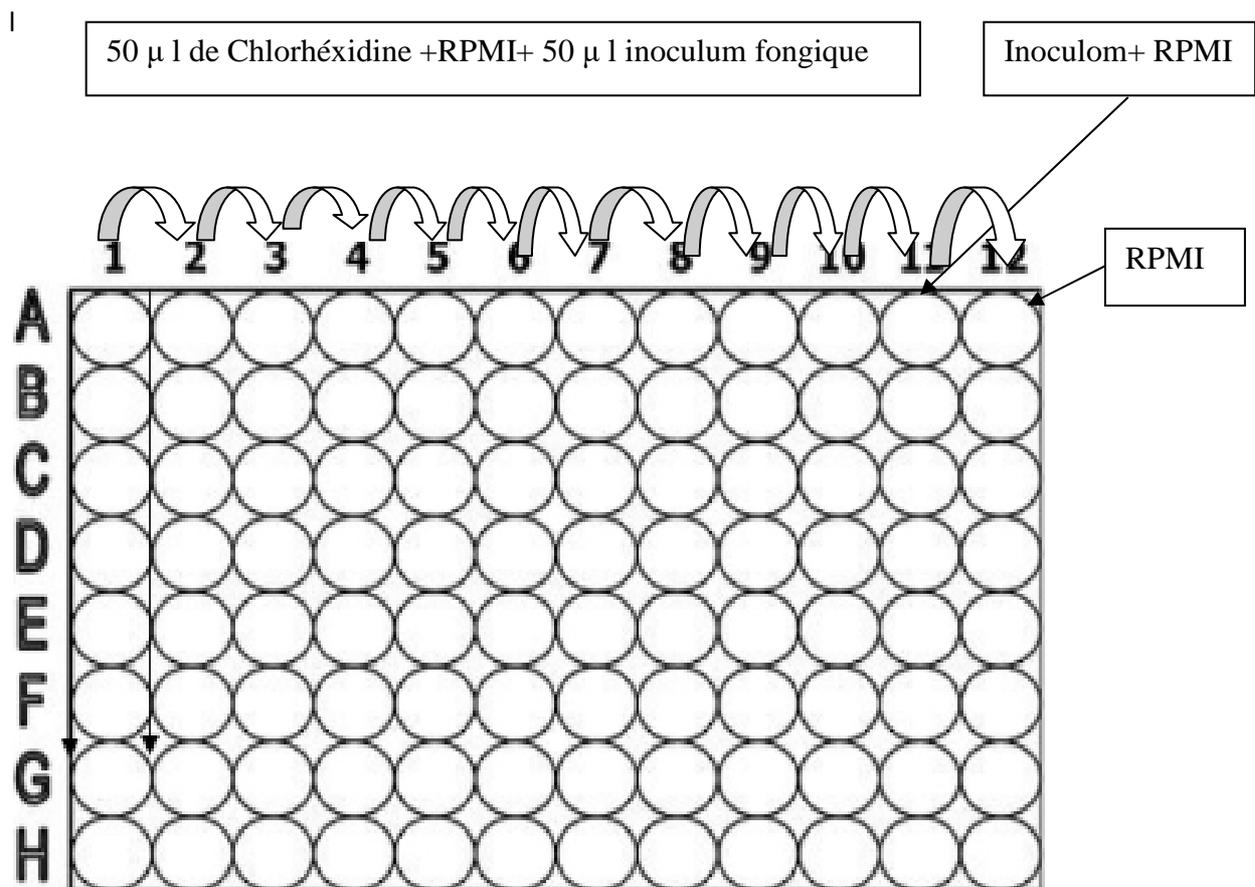


Figure n °12 : utilisation de la microplaque (La méthode des micro-dilution sur milieu liquide RPMI )

### **2.3.6. 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* » (**ESPINELINGROFF et CANTON 2007**).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°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 30 °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**).

### **2.3.7 Dosage de l'ergosterol membranaire de 3 souches de *Candida albicans* :**

pour déterminer la quantité de l'ergosterol membranaire de *Candida albicans* :

On a choisit trois souche la plus préféré parmi les 9 souches de *c.albicans*, qui sont : résistance N° 22, sensible N° 4 et de référence 10250 ATCC et on a traité chaque souche appart avec les même étapes.

Dans une erlenmeyer on a met Une seule colonie de *C. albicans* à partir d'une culture Sabouraud gélose a été utilisée pour inoculer 50 ml de bouillon Sabouraud dextrose contenant une concentration en chlorhexidine égale à la CMI la plus faible. la quantité de la chlorhexidine est comme suite souche N°04 = 3125 µl et 48,8 µl pour la souche N°22 et la souche de référence ATCC 10231 et égale à 1562,25 µl Les cultures ont été incubées pendant 16 h sous agitation à 35 ° C.

D'autre part , les cinq pastilles ont été pesés vides et remplis de 10 ml de suspensions cellulaires.

Les cellules en phase stationnaire ont été récoltées par centrifugation à 2700 tours / min pendant 5 min et lavées une fois avec de l'eau distillée stérile. Le poids net humide du culot cellulaire a été déterminé.

Trois millilitres de solution d'hydroxyde de potassium alcoolique à 25% (25 g du KOH et 35 ml de l'eau distillée stérile, compléter à 100 ml avec l'éthanol à 100%), ont été ajoutés à chaque pastille et mélangés au vortex pendant 1 min.

Les suspensions cellulaires ont été transférées dans des tubes à essai stériles et ont été incubés dans un bain d'eau à 85 ° C pendant 1 h.

Après incubation, les tubes ont été refroidis à température ambiante.

Les stérols ont été ensuite extraits par l'addition d'un mélange de 1 ml d'eau distillée stérile et 3 ml de d'éther de pétrole mélangés pendant 3 min. La couche d'éther de pétrole a été transféré dans un tube à essais et stocké à -20 ° C (24 H au maximum).

Avant l'analyse, un aliquote de 20 ml d'ergostérol extrait a été diluée cinq fois dans l'éthanol à 100% et scanné par spectrophotométrie entre 230 et 300 nm (**Beth A. et coll., 1999**).

La présence de l'ergostérol et les stérols intermédiaires dans les extraits se présente par les pics caractéristiques.

La quantité de l'ergostérol est calculée comme un pourcentage de poids humide des cellules par l'équation suivante :

$$\% \text{ ergostérol} + \% \text{ 24(28)DHE} = [(A_{281.5}/290) \times F]/\text{culot cellulaire}$$

$$\% \text{ 24(28)DHE} = [(A_{230}/518) \times F]/\text{culot cellulaire}$$

$$\% \text{ ergostérol} = [\% \text{ ergostérol} + \% \text{ 24(28)DHE}] - \% \text{ 24(28)DHE}$$

F : facteur de dilution

24(28) dehydroergosterol[24(28)DHE, a late stérol pathway intermediate]

Calcul :

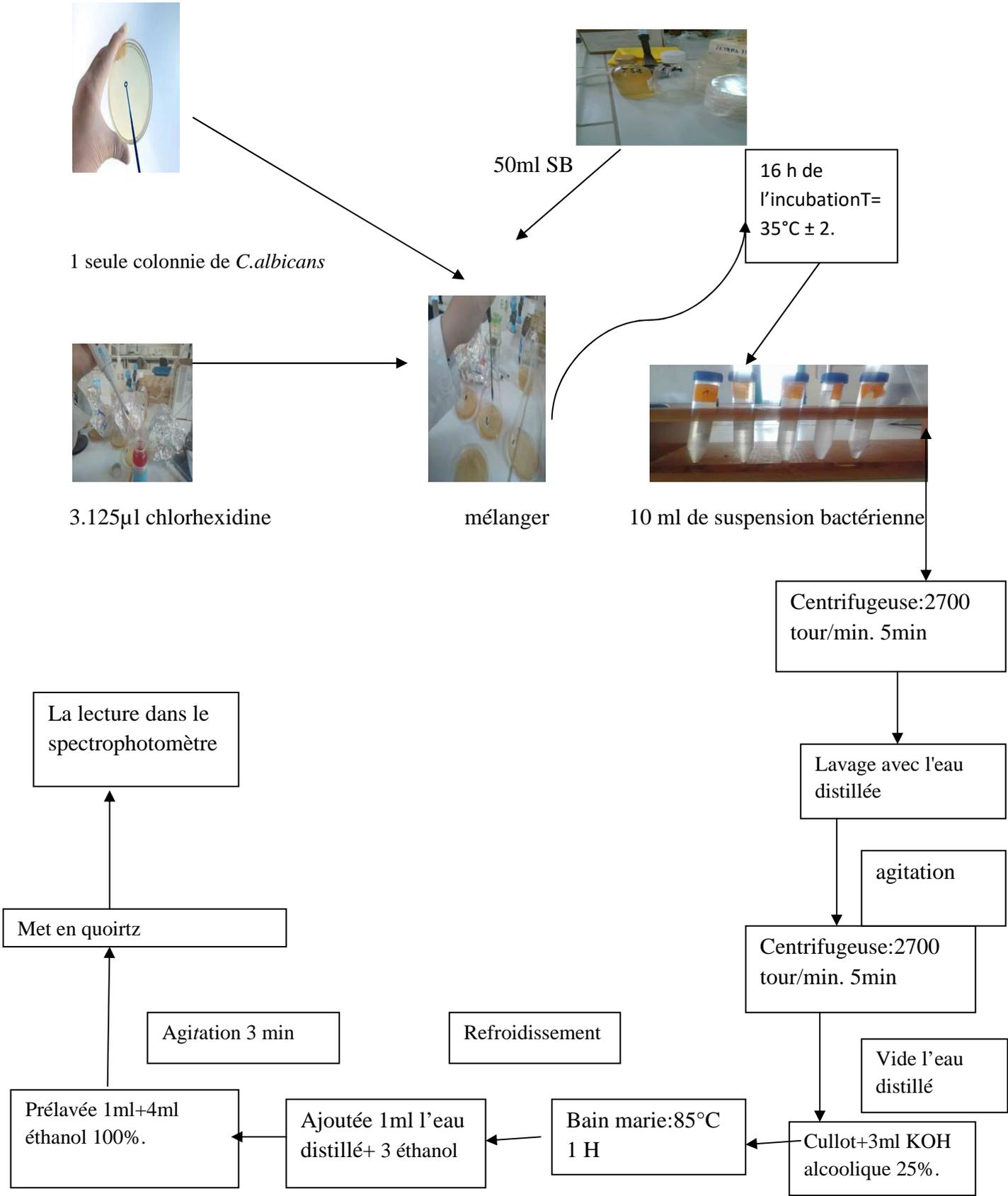
$$A = [\% \text{ ergostérol} + \% \text{ 24(28) DHE}]$$

B=% 24(28) DHE

% ergostérol = [% ergostérol + % 24(28) DHE]- % 24(28)DHE

% ergostérol = A - B

S= la quantité d'ergostérol



Protocole d'extraction d'ergosterole membranaire vis-à-vis de Chlorhexidine.

# Résultats et discussion

## Résultats et discussion

La résistance des microorganismes aux conservateurs antimicrobien n'est pas aussi bien étudié que les antibiotiques, pour cela nous nous sommes intéressés à étudier la résistance de *Candida albicans* isolé à partir des cavités buccales vis-à-vis d'un conservateur antimicrobien, la chlorhexidine.

### 1. Prélèvement, isolement et identification de *Candida albicans* :

Sur un total de 22 prélèvements, 05 souches de *Candida albicans* ont été isolées, ce qui représente 22,72 % de l'ensemble des prélèvements.

Tableau N 03 : résultat de l'isolement des souches isolée dans le gélose sabourand

Numéro de souche	Présence ou absence des colonies dans le gélose sabourant
1	-
2	+
3	-
4	+
5	-
6	-
7	-
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	+
14	-
15	-
16	-
17	+
18	-
19	-
20	-
21	-
22	+

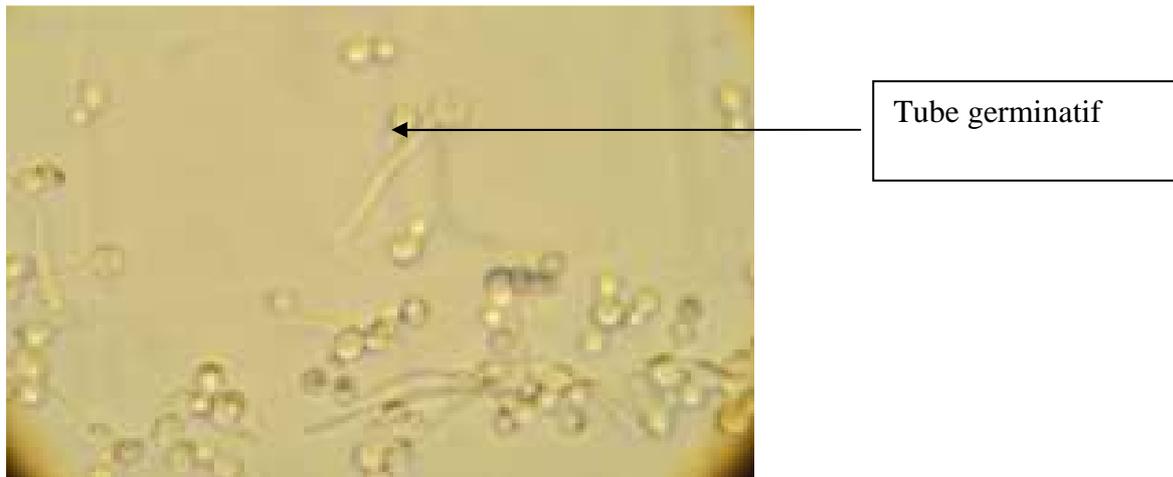
+ : présence des colonies

- : absence des colonies

**2. observation macroscopique** : l'examen macroscopique montre des colonies blanchâtres ou crémeuses, lisses brillantes.

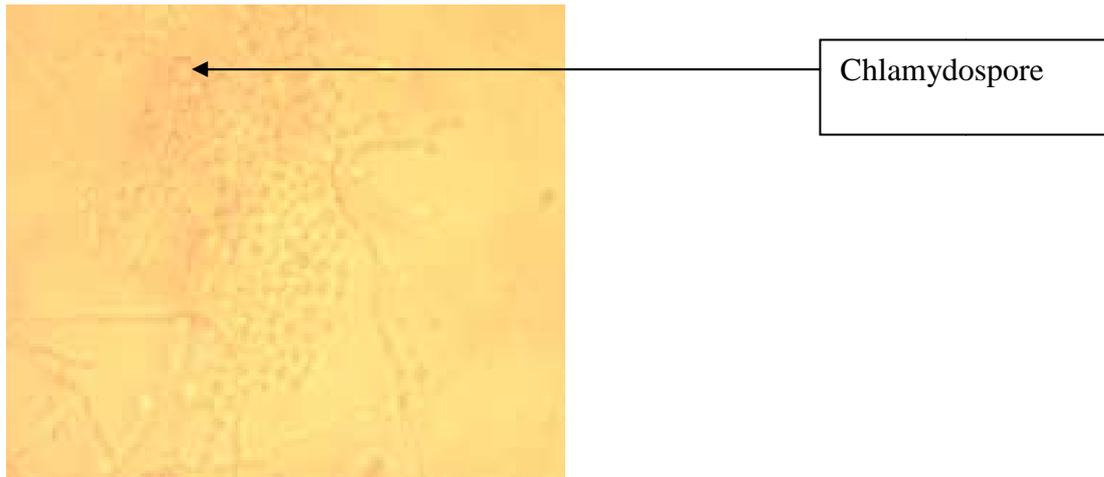
**3. Observation microscopique** : en va observée des levures rondes ou ovalaires Bourgeonnantes (blastospores) et la présence de Pseudomycelium.

**4. Test de Blastèse** : La formation de tubes germinatifs dans un bouillon blastèse (sérum) est l'un des critères d'identification des levures *Candida albicans* (Figure n°13).



**Figure n°13** : Formation de tube germinatif caractéristique de *Candida albicans* sous microscope optique l'objectif x40.

**5. Test de chlamydosporulation** :Après 24h d'incubation à 37°C sur la gélose PCB, les levures du genre candida présentent un pseudomycelium et des blastospores, la levure *Candida albicans*, espèce la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine produit en plus des chlamydospores (spores de 6 à 12 µm à parois épaisses, terminales ou latérales rondes ou ovales) (Figure n° 14).



**Figure n°14:** Formation de chlamydospores caractéristique de *Candida albicans* sous microscope optique l'objectif x40.

### 6. Étude de la résistance de *Candida albicans* :

L'étude de la résistance des souches de *Candida albicans* isolées ainsi que des souches de références (444 IP et ATCC 10231) à été réalisée par la méthode de microdilution sur milieu liquide selon **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-M27-A2, 2002)**, qui permet de déterminer la CMI et CMF du conservateur utilisé (Chlorhexidine) vis-à-vis des souches de levure.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF) de la Chlorhexidine vis-à-vis de nos souches de levure *Candida albicans* :

Nous remarquons que :

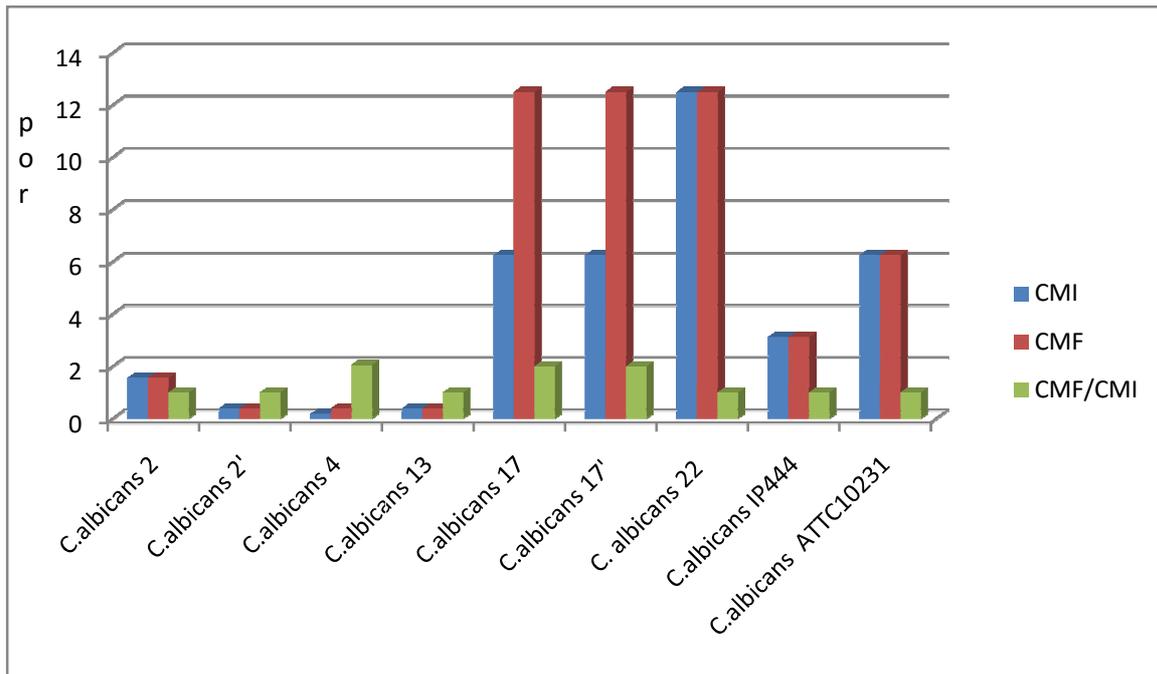
- Les CMI des souches de références sont de 3.12 % pour *Candida albicans* 444 IP, et 6.25 % pour *Candida albicans* ATCC 10231.
- Pour les souches isolées, les CMI sont de 6.25 % pour la souche N° 17 et 0.19 % pour la souche N°4 donc cette valeur est minimale cette souche la plus sensible et atteignent une valeur maximale de 12.5 % pour la souche N° 22. Donc, ce dernière sont les plus résistante à la chlorhexidine par rapport aux autres souches, ce qui nous à poussé à déterminé le taux d'ergosterol membranaire de ces souches.
- Concernant les CMF, sont dans la plus part des souches égalent au CMI, leurs valeurs varient de 0,39% à 12.5%.

**Tableau n°04** :les valeurs de CMI ,BMF et CMF/CMI

Souche	CMI	CMF	CMF /CMI
<i>C.albicans2</i>	1.56	1.56	1
<i>C.albicans2</i>	0.39	0.39	1
<i>C.albicans4</i>	0.19	0.39	2.05
<i>C.albicans13</i>	0.39	0.39	1
<i>C.albicans17</i>	6.25	12.5	2
<i>C.albicans 17'</i>	6.25	12.5	2
<i>C.albicans22</i>	12.5	12.5	1
<i>C.albicans 444 IP</i>	3.12	3.12	1
<i>C.albicans ATTC 10231</i>	6.25	6.25	1

Pour déterminer la nature fongicide ou fongistatique de la chlorhexidine vis-à-vis les souches isolets et souches de référence , nous avons calculé le rapport CMF/CMI . Si ce rapport est inférieur ou égal à 2 , le chlorhexidine est considérée comme fongicide, si ce rapport est supérieur à 2 , le chlorhexidine est considérée comme fongistatique ( Derwiche et coll., 2010)

Donc le chlorhexidine est considérée come fongicide pour les souches de référence IP 444 et ATTC 10231 et les souches N° 2 , souche N° 13 ,et N°22 et le rapport CMF/CMI est supérieur à 2 pour les souches N° 17 et N° 13 en considérée le chlorhexidine come fongiostatique .



**Figure n° 15** : Histogramme représentant les pourcentages des CMI et CMF et CMF/CMI des souches de *Candida albicans* .

### 7. Quantification de l'ergostérol membranaire de *Candida albicans*

L'extraction d'ergostérol membranaire des souches isolées (N°04,22), et de souches de références (ATTC 10231) à été réalisée selon un protocole décrit par **Beth A** et ses collaborateurs en 1999, les molécules d'ergostérol ainsi récupérées dans la phase supérieure d'éther de pétrole ont été diluées au 1/5, la lecture à été effectuée par spectrophotométrie uv entre 230 et 300 nm.

Les graphes ci-dessous, représentent le tracé du spectre d'absorption de la solution d'ergostérol membranaire extrait à partir des souches de *Candida albicans* N°04(Figure N°16), souche N° 22 (Figure N°17) et souche ATTC 10231 .(Figure N°18).

Les trois graphes représentent des défferantes pics avec des langedure d'ondes défferantes dont l'absorbance diffère pour les 3 souches de *Candida albicans* N°04 ,N° 22 , et ATTC 10231 .

Pour la souche N°04 : le graphe représent 3 courbes et 03 pics de défferant langedure d'onde.

La courbe N° 01 : le pic a environ 254 nm , dans l'absorbance est égale 2,01 DO et la courbe N° 04 le pic a environ 254 nm avec une absorbance de 2,5 DO , la courbe N° 02 le pic a environ 238 nm , dans l'absorbance est égale 0.7 DO

Pour la souche N° 22 : le graphe représente 3 courbes et 03 pics de différent longueur d'onde.

La courbe N° 03 : le pic a environ 238 nm , dans l'absorbance est égale 1,04 DO et la courbe N° 04 le pic a environ 243 nm avec une absorbance de 1.22 DO , la courbe N° 05 le pic a environ 233 nm , dans l'absorbance est égale 0.7 DO

Pour la souche ATTC 10231 : le graphe représente 05 courbes et 05 pics de différent longueur d'onde.

La courbe N° 01 : le pic a environ 238 nm , dans l'absorbance est égale 1 DO et la courbe N° 02 le pic a environ 233 nm avec une absorbance de 0,53 DO , la courbe N° 03 le pic a environ 233 nm , dans l'absorbance est égale 0.53 DO, la courbe N° 04 le pic a environ 238 nm , dans l'absorbance est égale 0.58 DO ,et la courbe N° 05 le pic a environ 243 nm , dans l'absorbance est égale 1,58 DO.

à partir des quelles on peut calculer la quantité ou le taux d'ergostérol membranaire de nos souches (tableau N° 05) à l'aide de l'équation suivante :

$$Q = [A \ 281,5/290] \times F/P \quad (\text{Beth A. et coll., 1999}).$$

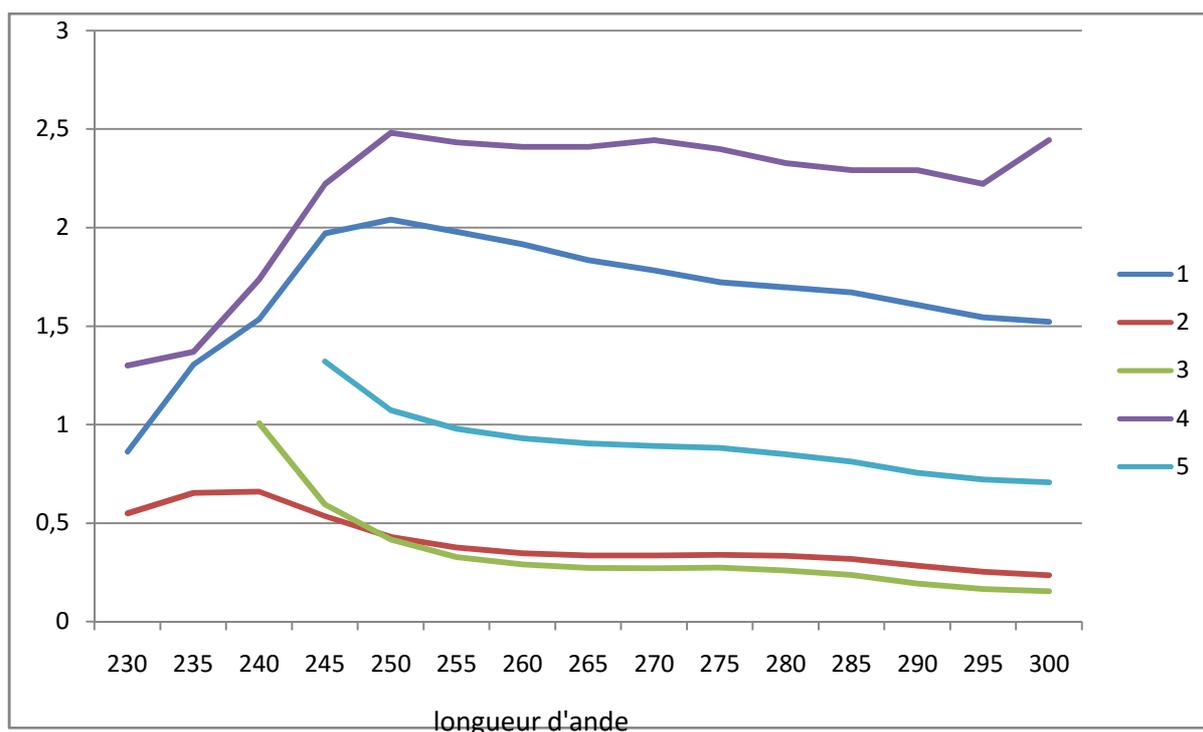
**Q :** Quantité d'ergostérol en %.

**A :** Absorbance à 281.5.

**F :** Facteur de dilution (5).

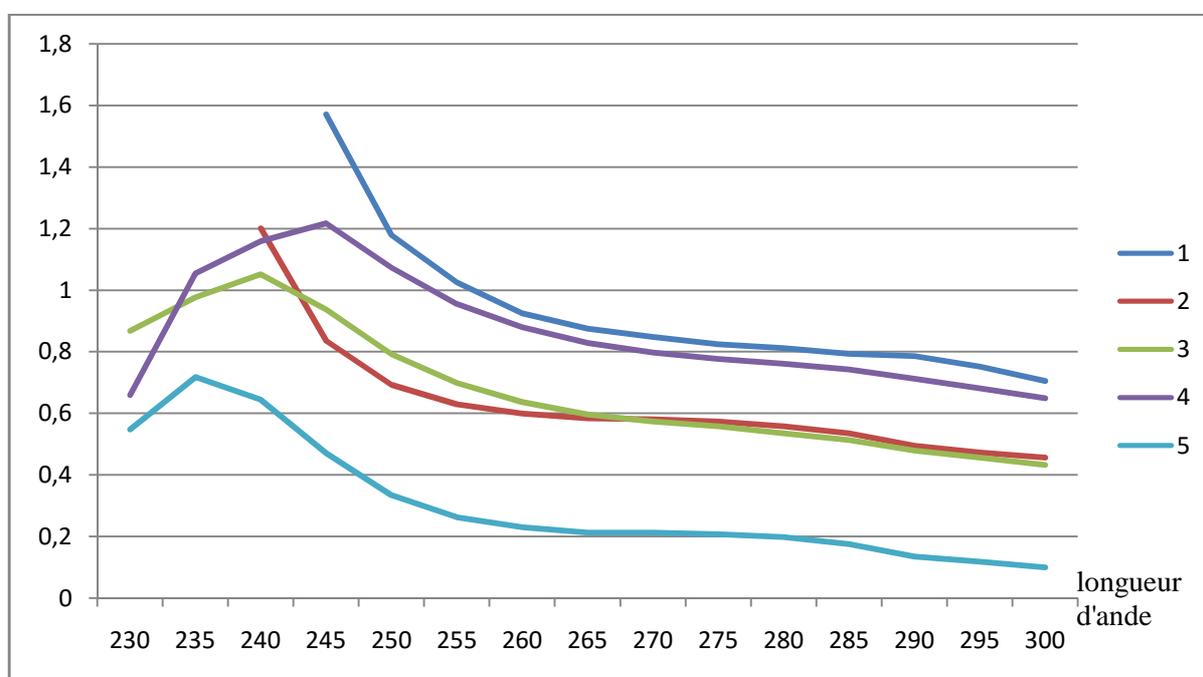
**P :** Poids nette du culot.

Selon les valeurs obtenues, nous avons remarqué que le taux d'ergostérol membranaire est largement supérieur chez la souche N° 04 ( $11.13\% \pm 2.873$ ), tandis qu'un taux de ( $9.62\% \pm 2.305$ ) a été obtenue avec la souche de référence ATTC 10231 (CMI = 6.25 %), et en fin un taux d'ergostérol a été égal à ( $1.86\% \pm 0.234$ ) chez l'une des souches résistante N° 24 (CMI = 12.5 %).



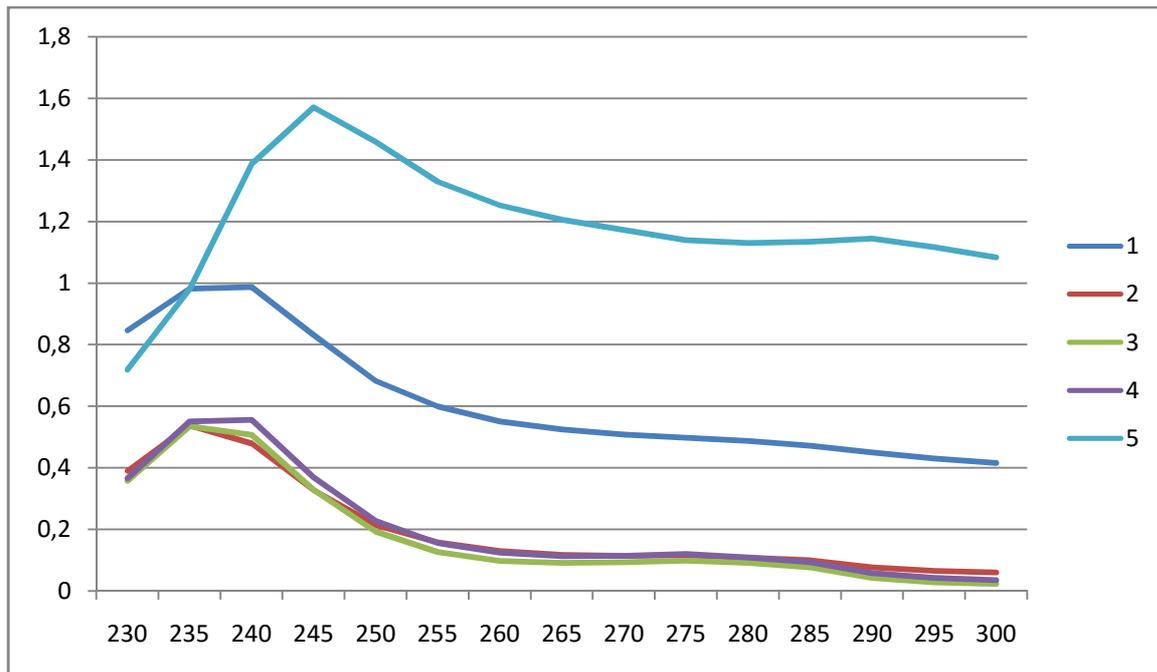
**Figure n°16** : les courbes de dosage de l'ergostérol de souche n° 04

-La présence de l'ergostérol et les stérols intermédiaires dans les extraits se présente par 3 pics caractéristiques.



**Figure n°17** : courb de dosage de l'ergostérol de souche n° 22

La présence de l'ergostérol et les stérols intermédiaires dans les extraits se présente par 3 pics caractéristiques.



**Figure n° 18 :** courb de dosage de l'ergostérol de souche de référence ATTC 10231

**Tableau n° 05 :** Détermination la quantité de l'ergostérol apartir de trois souches de Candida albicans.

	Les souches répétées	A=[%ergostérol +%24(28)DHE]	B=%24(28)DHE	%ergostérol=A-B	M	S
<b>Souche N°4 : Sensible.</b>	1	0.106	0.059	/	11.13	11.13%±2.873
	2	2.25	1.26	/		
	3	0.203	0.114	8.9%		
	4	0.283	0.158	12.5%		
	5	0.251	0.140	11.1%		
<b>Souche N° 22 : Resistance.</b>	1	0.049	0.027	2.2%	1.86	1.86%±0.234
	2	0.035	0.019	1.6%		
	3	0.071	0.040	3.1%		
	4	0.029	0.016	1.3%		
	5	0.025	0.014	1.1%		
<b>Souche de référence ATTC 10231</b>	1	0.265	0.149	11.6%	9.62	9.62%±2.305
	2	0.206	0.115	9.1%		
	3	0.213	0.119	9.4%		
	4	0.190	0.106	8.4%		
	5	2.625	1.47	/		

### **Le taux d'ergostérol membranaire de trois souches répéter de *Candida albicans* :**

ce travail qui consiste à l'étude de la résistance de *Candida albicans* isolée à partir des cavités buccales à la chlorhexine fréquemment utilisée en produits cosmétiques ,dont il ressort que le taux d'ergostérol membranaire est élevé N°04 ( $11.13\% \pm 2.873$ ) chez les souches sauvages sensibles (CMI=0,19 %), tandis qu'il taux à ( $9.62\% \pm 2.305$ ) est inférieur chez les souches de référence ATTC 10231 (CMI =6.25 %), et très inférieur chez les souches la plus résistances N°22( $1.86\% \pm 0.234$ ) de (CMI =12.5%).

à la lumière de ces résultats on peut conclure que la résistance de *Candida albicans* à la chlorhexidine est probablement liée au changement de la composition en ergostérol membranaire.

# Conclusion

## Conclusion

---

Dans ce cadre, notre travail portera dans un premier temps sur l'évaluation de la sensibilité des souches sauvages de *Candida albicans* isolées à partir des cavités buccales des utilisateurs des dentifrices et des bains de bouche vis-à-vis de la chlorhexidine utilisée dans les produits cosmétiques comme conservateur antimicrobien et parfois comme antiseptique.

Dans un second temps nous déterminerons les concentrations minimales inhibitrices CMI et concentrations minimales fongicides CMF de ce conservateur, qui vont permettre de mieux le caractériser.

Toutefois, le taux d'ergostérol membranaire est élevé N°04 ( $11.13\% \pm 2.873$ ) chez les souches de *Candida albicans* sauvages sensibles (CMI=0,39 mg), tandis que le taux à ( $9.62\% \pm 2.305$ ) est inférieur chez les souches de référence 10250 ATTC (CMI =12,5 mg/ml), et très inférieur chez les souches la plus résistantes N°22( $1.86\% \pm 0.234$ ) de (CMI =25 mg/ml).

À la lumière de ces résultats on peut conclure que la résistance de *Candida albicans* à la chlorhexidine est probablement liée au changement de la composition en ergostérol membranaire.

En fin, ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies (mode d'action et d'application, etc.) et la caractérisation de ces isolats qui nécessite, peut-être, d'autres techniques de détermination moléculaire.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

- Ainsworth GC.** (1986). History of medical and veterinary mycology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Addy M et Roberts WR.** Comparison of the inorally cavity of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine. Relevance to mode of action. J Clin periodontal 1981.
- Barelle,C.j .,richarde,M .L.,Gaillardin,c.,Gow,n.a.and broun,a.j.,***candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inhevitanca and normal hyphal branching.Eukaryot cell 2006,5 :359-367.
- Bartnicki-, S.**2006. Chitosomes: past, present and future. FEMS Yeast Res 6:957-65.
- Berkhout CM.** (1923). De schimmelgeslachten Monilia, Oidium, Oospora en Torula. Utrecht University, Utrecht.
- Boucherit-Atmani Z., Seddiki S. M. L., Boucherit K., Sari-Belkharoubi L.,Kunkel D.** (2011). *Journal de Mycologie Médicale*, 21(3),182-187.
- Bonesvoll P, Lokken P et Rolla G.** Influence of concentration, time, temperature and ph on the retention of chlorhexidine in the humain oral cavity after mouth rinses.Arch Oral Biol 1974
- Braun, B. R., W. S. Head, M. X. Wang, and A. D. Johnson.**2000. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. Genetics 156:31-44.
- Calderone,R.A.and Braun,P.C.,**adherence and reveptor relationships of *candida albicans* Microbiol Rev 1991.55 :1-20.
- Calderone RA.** (2002). Introduction and historical perspectives. In *Candida and candidiasis*, ed. Calderone RA, pp. 3-13. ASM Press, Washington, D.C.
- Carlotti H, Maffort H.** Effect of chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque bacteria. J Periodont Res, 1996.
- Casone,A,**celle wall of *candida albicans* its function and its impact of on the host . curr top med mycol 1989.3 :248-314.
- Chaffin,W.L.,Lopez-Ribot,J.L.,casanova,Mgozalbo,D. And Martinez ,J.P.,**cell wall and secreted proteins of candida albicans identificat, function and expression .Microbiol Mol Biol Rev 1998.62 :130-180.
- Chaffin, W. L., and D. M. Stocco.**1983. Cell wall proteins of *Candida albicans*. Can J Microbiol 29:1438-44.
- Chu,W-S-,Magee,B-B-and Magee,P-T-,** constriction of an sfil macrorestriction map of the *Candida albicans* genome J Bacteriol 1993. 175 ; 6637-6651
- CiangoSG, Mather ML et Bunnell HL.**The effect on a quatemary ammonium contaning mouthwash on formed plaque pharmacol ther dent 1978.
- **Cuzel et al –(1999).** Pharmascience Inc. Product Monograph PERICHLOR (Chlorhexidine Gluconate) 1999.
- Dean, N.**1999. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. Biochim Biophys Acta 1426:309-22.
- Definition :** Réalisé en collaboration avec des Professionnels de la santé et de la médecine, sous la direction du docteur Pierrick HORDECARLOTTI D.N., MAFFART P.- (1996) La chlorhexidine, revue bibliographique. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp*
- Dolles OK et Gjemo P.**Caries increment and gingival stratus during 2 yeas use of chlorhexidine –and fluoride-containing dentifrices. Scan J Dent Res 1982.
- **Dupont B.**L'écobiologie des Candida.Laboratoire Squibb.,1985.
- Ernst, J. F., and S. K. Prill.**2001. O-glycosylation. Med Mycol 39 Suppl 1:67-74.
- Euzeby J.**Mycologie médicale comparée. Collection Mérieux., 1994, Fondation manuel, Tome II, 88-251
- Fleurette J et Cremieux 1995.** Antisepsie et désinfection. Paris : Les éditions E.S.K.A.
- Foulkes DM.** Some toxicological observation on chlorhexidine. J Periodont Res 1973.
- Games B, Viama ME Zaia AA et coll.** Chlohexidine in endodontics. Braz Dent J 2013

## Références bibliographiques

---

- Geais H.** Les antiseptiques et les désinfectants. Paris : les éditions ARNETTE. J Clin Periodont 2006.
- Gerald et Russel.** Definition of chlorhexidine by Médical dictionary. Consulté en 1999.
- Gerald et Russell , 1999.** Effect of four antimicrobial lavage solutions on the tarsocrural joint of horses. *Vet. Surg*, 305-315.
- Gerald et Russall.** 1999. Experimental gingivitis in man. [J Periodontol. 1999 May-Jun] ;
- Gorman et Scot.** In vivo substantivity of 0.01% and 0.1% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. [Clin Oral Investig. 2004.
- Gormanet Scoutt .** Side effects of chlorhexidine mouth washes. Scan J Dent Res 2004
- Grillotr.** Les mycoses humaines: démarche diagnostic. Collection option Bio., Elsevier, 1996, 116- 29 - 30-122.
- Haugen E et Johansen JR.** Sensitization of guinea pigs with chlorhexidine. Acta Odontol Scan 1974.
- Heitman, J.** 2006. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr Biol* 16:R711-25.
- Hentze U , Birkhed D et Bjon H.** Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J* 1983.
- Hepso HU, Bjornland LA.** Side-effects and patient acceptance of 0.2 versus 0.1 chlorhexidine used as post-operative prophylactic mouthwash. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988.
- Hjeliord LG, Rolla G et Bonesvoll P.** CHLOHEXIDINE-protein interaction. *J Periodont Res* 1973.
- Horisberger, M., and M. F. Clerc.** 1988. Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol* 46:444-52.
- Hogo WB et Longworth AR.** The effects of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic. *J Pharm pharmacol* 1966.
- Hull, C. M., and A. D. Johnson.** 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285:1271-5.
- Hull, C. M., R. M. Raisner, and A. D. Johnson.** 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289:307-10.
- Hull CM, Raisner RM & Johnson AD.** (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science (New York, NY)* 289,307-310.
- Jay J.** Le *Candida albicans* : un signal d'alarme. *Santé action.* , 1992.
- Jensen JE et Chistenen F.** A study of the elimination of chlorhexidine from the oral cavity using a new spectrophotometric method. *J periodont Res* 1971
- Johnson, A.** 2003. The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol* 1:106-16.
- 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.
- Kapteyn, J. C., L. L. Hoyer, J. E. Hecht, W. H. Muller, A. Andel, A. J. Verkleij, M. Makarow, H. Van Den Ende, and F. M. Klis.** 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* 35:601-11.
- Kassab H et Aboul-Rahman G.** The effect of some antifungal agents and chlorhexidine on *Candida albicans* adherence on acrylicresin denture base surface. 32. 33., placebo-controlled, 3week experimental gingivitis study . *J Clin periodontol* 2006 ; 33 :561-567.

## Références bibliographiques

---

- Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf.**2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39 Suppl 1:1-8.
- Knoke M & Bernhardt H.** (2006). The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses* 49,283-287.
- Koeigh.** Guide de mycologie médicales. Collection Ellipses., 1995.
- Lang NP, Catanotto FA et Knopeli RU.** Quality-specific taste impairment following the application of chlorhexidine digluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1988.
- Lindhe J, Lang N, Karring T et coll.** Clinical Periodontology and Implant Dentistry.4<sup>e</sup> ed. Copenhague : Munksgaard .Blackwell, 2003
- Lorenz K, Bruhn G, Heumann C et coll.** Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque , gingivitis, and discoloration .
- Lorenz K, Bruhn G.** Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discoloration. A randomized, investigator-blind
- Lopes Ribot,J.l .,casanova,M.,Murgui,A.and martinez,J .p.,**antibody response to *candida albicans* cell wall antigens *FEMS immunol med microbiol* 2004.41 :187-196.
- Lotz, H., K. Sohn, H. Brunner, F. A. Muhlschlegel, and S. Rupp.**2004. RBR1, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by RIM101 and activated by NRG1. *Eukaryot Cell* 3:776-84.
- Magee BB & Magee PT.** (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science (New York, NY)*289,310-313.
- Manning, M., and T. G. Mitchell.**1980. Morphogenesis of *Candida albicans* and cytoplasmic proteins associated with differences in morphology, strain, or temperature. *J Bacteriol* 144:258-73.
- Marcilla, A., C. Monteagudo, S. Mormeneo, and R. Sentandreu.**1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. *Microbiology* 145 ( Pt 3):695-701.
- Marcilla, A., M. V. Elorza, S. Mormeneo, H. Rico, and R. Sentandreu.**1991. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymolyase, chitinase and beta-mercaptoethanol. *Arch Microbiol* 155:312-9.
- Maris P.**-(1990) Evaluation de l'activité in vitro des antiseptiques vétérinaires. *Ann. Rech. Vet.*
- Mason K.V.**-(1993) **et Scott D.W** – (1995). *Current Veterinary Dermatology : The Science and Art of Therapy.*
- . **Mathurs S , Tanu M Rahul S.** Chlorhexidine : The gold standard in Chemical Plaque Control *Natl j physiol pharm pharmacol* 2011.
- **Mendieta C, Valcorba N, Binney A et coll.** *J Clin Periodontol* 1994.
- Mendieta C , Valcorba N ,Binney A et coll.** Comparison of 2 chlorhexidine mouthwashes on plaque regrowth cavity orally. *J Clin Periodontol* 1994.
- Miller, M. G., and A. D. Johnson.**2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110:293-302.
- Murat M.**-(1995) Les antiseptiques. Thèse de Pharmacie Lille II
- Nakagawa ,Y.,Ohna ,N.and Murai ,T.,**Suppression by *candida albicans* beta -glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cell in the presence of monocytes.*J infect dis* 2003.187 :710.713.
- Nordbo H .**Discoloration of human teeth by a combination of chlorhexidine in mouthrinse. *Scan J Dent Res* 1971.
- Odds, F. C.**1979. *Candida and Candidosis*, Leicester University Press ed, London.
- Odds, F. C.**1985.Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* 12:45-93.
- Oydn J et Gjermo.**Effect of chlorhexidine mouthrinses on concentration . *Scan J Dent Res* 1982.

## Références bibliographiques

---

- Pazos, C., M. D. Moragues, G. Quindos, J. Ponton, and A. del Palacio.2006. Diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan and anti-Candida albicans germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. Rev Iberoam Micol 23:209-15.
- Pitarch, A., M. Sanchez, C. Nombela, and C. Gil.2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus Candida albicans cell wall proteome. Mol Cell Proteomics 1:967-82.
- Poulain,D.and feuilhade-de-chauvin, M.,candidos et levores diverses : 1995.
- Ponton, J., A. Marot-Leblond, P. A. Ezkurra, B. Barturen, R. Robert, and J. M. Senet.1993. Characterization of Candida albicans cell wall antigens with monoclonal antibodies. Infect Immun 61:4842-7.
- Prill, S. K., B. Klinkert, C. Timpel, C. A. Gale, K. Schroppel, and J. F.Ernst.2005. PMT family of Candida albicans: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. Mol Microbiol 55:546-60.
- Quigley et Hein. Comparative cleansing efficiency of manuel and power brushing. J Am Dent 1962.
- Reess M. (1877). Über den Soorpilz. Physikalisch-Medicinische Societät zu Erlangen 9, 190-193.
- Reiss, E., V. M. Hearn, D. Poulain, and M. G. Shepherd.1992. Structure and function of the fungal cell wall. J Med Vet Mycol 30 Suppl 1:143-56.
- Robin CP. (1853). Histoire naturelle des végétaux. Parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants. Ballière, Paris.
- Rolla et al - (1971). Manuel de pharmacologie. Paris :Masson et compagnie éditeurs.
- Rolla G et Melson B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine J Dent Res 1975.
- Remy et Wirz, 1998. Efficacy evaluations on five chlorhexidine teat dips formulations, J.Dairy Sci., 76, 2783-2788.
- Ruis.herrera,J.,Elorza,M.V.,valantin,E.andsertandreu,R.,molecular organization of the cell.Wall of candida albicans its relation pathogenicity FEMS yeast Res 2006,6 :14-29.
- Samson J. (1990). [Oral candidiasis: epidemiology, diagnosis and treatment]. Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie = Rivista mensile svizzera diodontologia e stomatologia / SSO 100, 548-559.
- Schaller, M., B. Hube, M. W. Ollert, W. Schafer, M. Borg-von Zepelin, E. Thoma-Greber, and H. C. Korting.1999. In vivo expression and localization of Candida albicans secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. J Invest Dermatol 112:383-6.
- Schiott CR , Briner WW ,Kirkland JJ et coll. Two years oral use of chlorhexidine in man .Changes in sensitivity of salivary flora. J Periodont Res 1976.
- Segretain, G., E. Drouhet, and F. Mariat.1987. Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale 5ème édition., Maloine ed, Paris.
- Sharkey, L. L., M. D. McNemar, S. M. Saporito-Irwin, P. S. Sypherd, and W. A. Fonzi.1999. HWP1functions in the morphological development of Candida albicans downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. J Bacteriol 181:5273-9.
- Sheens, Banfield N et Addy M. The effect of unstimulated and stimulated whole saliva on extrinsic in mouthrinse.-a development al method . J Dent 2002.
- SHEEN S, Owens J et Addy M. The Effect of Chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque bacteria. J Periodont Res, 2001.
- Shepherd,M .G.,cell envlope of candida albicans crit Rev micobiol 1987.15 :7-25.

## Références bibliographiques

---

- SILNESS J et LOE H.** Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol Scand 1964.
- Slabas, A. R., B. Ndimba, W. J. Simon, and S. Chivasa.**2004. Proteomic analysis of the Arabidopsis cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations. Biochem Soc Trans 32:524- 8.
- Sohn, K., C. Urban, H. Brunner, and S. Rupp.**2003. EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. Mol Microbiol 47:89-102.
- Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom.**1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. Science 283:1535-8.
- Staab, J. F., Y. S. Bahn, C. H. Tai, P. F. Cook, and P. Sundstrom.**2004. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidyl inositol modification. J Biol Chem 279:40737-47.
- Surarit,R.,gopal,P.K.and shepherd, M.G.,**evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *candida albicans* J Gen Microbiol 1988 , 134 : 1723-1730.
- Surarit, R., P. K. Gopal, and M. G. Shepherd.**1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. J Gen Microbiol 134:1723-30.
- Taylor JW.** (1995). Making the Deuteromycota redundant: a practical intergration of mitosporic fungi. Canadian journal of botany 73, s754-s759.
- Tonelli et G jerlemanne et hoscoold** 1995.Enseignement optionnel de pathologie équine. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
- Tronchin, G., D. Poulain, J. Herbaut, and J. Biguet.**1981. Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. II. Evidence for a cell wall coat using concanavalin A. J Ultrastruct Res 75:50-9.
- Tsuchimori, N., L. L. Sharkey, W. A. Fonzi, S. W. French, J. E. Edwards, Jr., and S. G. Filler.**2000. Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. Infect Immun 68:1997-2002.
- Umazume, M., E. Ueta, and T. Osaki.**1995. Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. J Clin Microbiol 33:432-9.
- Urban, C., K. Sohn, F. Lottspeich, H. Brunner, and S. Rupp.**2003. Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. FEBS Lett 544:228-35.
- Urban, C., X. Xiong, K. Sohn, K. Schroppel, H. Brunner, and S. Rupp.**2005. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. Mol Microbiol 57:1318- 41.
- Zopf W.** (1890). Die Pilze. Verlang von E. Trewendt, Breslau.

# Annexes

## Annex

### Milieu sabouraud :

Eau distillée.....	1000ml
Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar-agar.....	15g

PH=6.3

### Milieu Gélose sabourand

Milieu sabourand dishédraté .....65.5g/l

Eau distillée.....1000ml

Ph =7.2

### Milieu selectif

Eau distillée.....1000ml

Peptone.....10g

Glucose .....20g

Agar -agar.....15g

Gentamicine.....20

Ph=6

### Milieu PCB

Eau distillée.....1000ml

Bille de bœuf .....150ml

Extrait de la pomme de terre..... 250 ml

Extrait de carotte .....250 ml

Agar-agar..... 25 g

pH = 7.2

## Annexes

Nombre d'échantillon	L'âge	Sexe	Utilisation de dentifrices	La marque de dentifrices	Nombre d'utilisation des dentifrices	La période d'utilisation	L'utilisation de chlorhexidine
1	24	H	Oui	Colgate	2	Matin et soir	/
2	23	H	Oui	Sanino	1	Soir	/
3	23	F	Oui	Signal	1	Soir	/
4	23	F	Oui	Daber elmiswak	3	Matin midi soir	/
5	23	F	Oui	Daber elmiswak	1	Soir	/
6	45	F	Non	/	/	/	/
7	20	F	Oui	Signal	1	Soir	/
8	16	F	Non	/	/	/	/
9	25	F	Oui	Daber elmiswak	1	Matin	/
10	23	F	Oui	Daber elmiswak	3	Matin midi soir	Oui
11	25	F	Oui	Changé la marque chaque fois	2	Matin et soir	/
12	10	F	Non		/	/	/
13	36	F	Oui	Signal	1	Soir	/
14	55	H	Oui	Signal	1	Soir	/
15	33	F	Non	/	/	/	/
16	31	F	Non	/	/	/	/
17	29	H	Oui	Signal	1	Soir	/
18	29	F	Oui	Signal	1	Soir	/
19	24	H	Non	/	/	/	/
20	10	H	Oui	Signal	2	Matin et soir	/
21	20	F	oui	Changé la marque chaque fois	2	Matin et soir	/
22	24	H	oui	Aquafresh	2	Matin et soir	/

F : femme

H : homme