

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2012

N°067

THESE
POUR LE
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
PAR
NICOLAS GRINAND

Présentée et soutenue publiquement le 15 novembre 2012

**Les biofilms à *Candida spp* : Epidémiologie et
sensibilité aux antifongiques**

Président : Mme Muriel DUFLOS, Professeur de Chimie Organique

Membres du jury : M. Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie et Mycologie
Médicale (directeur de thèse)

M. Michel MIEGEVILLE, Maître de Conférences de Parasitologie et
Mycologie Médicale

Sommaire

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	5
1. Figures	5
2. Tableaux	8
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	10
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	12
1. Le genre <i>Candida</i>	12
2. Les candidoses invasives.....	14
3. Un facteur de risque particulier : les cathéters	19
3.1. Le cathéter veineux périphérique (CVP)	19
3.2. Le cathéter veineux central (CVC).....	19
4. Les biofilms et les infections.....	23
4.1. Structure du biofilm	23
4.2. Implication du biofilm dans les infections	25
4.3. Le phénomène de quorum sensing	27
4.4. Résistance des biofilms aux antifongiques	29
4.5. Modèles de biofilms.....	29
MATÉRIELS ET MÉTHODES	32
1. Enquête rétrospective	32
2. Approche expérimentale : réalisation de biofilms <i>in vitro</i> à <i>Candida spp</i>	32
2.1. Objectifs	32
2.2. Souches utilisées	33

2.3. Protocole de formation de biofilms en plaque.....	33
2.3.1. <i>Protocole standard</i>	33
2.3.2. <i>Modifications du protocole standard</i>	36
2.4. Evaluation de la capacité des différentes espèces à former du biofilm.....	36
2.5. Protocole de formation de biofilm sur cathéter <i>in vitro</i>	36
2.6. Evaluation de la sensibilité des biofilms aux antifongiques	38
2.7. Impact de l'encapsulation d'antifongiques dans des nanoparticules	40
RÉSULTATS ET DISCUSSION	41
1. Enquête rétrospective	41
1.1. Espèces identifiées.....	41
1.2. Survie du patient à 3 mois	44
1.3. Services ayant fait la demande d'hémoculture	46
1.4. Analyse de cathéters.....	49
2. Formation <i>in vitro</i> de biofilm à <i>Candida</i>	49
2.1. Variations des conditions.....	49
2.1.1. <i>La taille de l'inoculum</i>	49
2.1.2. <i>Le temps d'incubation pour la formation du biofilm</i>	51
2.1.3. <i>Le temps d'incubation pour la phase de révélation</i>	53
2.1.4. <i>La présence de sérum bovin fœtal</i>	53
2.1.5. <i>Le pH</i>	55
2.2. Formation de biofilms dans les conditions standardisées.....	55
<i>Observation et comparaison du biofilm des différentes souches testées</i>	55
3. Formation de biofilms sur cathéter	55
4. Evaluation de médicaments sur le biofilm	59
4.1. Médicaments azolés	59

4.1.1. <i>Fluconazole</i>	59
4.1.2. <i>Voriconazole</i>	59
4.2. Amphotéricine B	61
4.3. Micafungine	61
5. Nouvelles pistes d'action sur le biofilm	65
5.1. Nouvelle molécule : la miltéfosine.....	65
5.2. Nouvelle approche : la vectorisation par nanoparticules.....	67
5.2.1. <i>Voriconazole vectorisé</i>	67
5.2.2. <i>Amphotéricine B vectorisée</i>	67
CONCLUSION	71
ANNEXE 1	73
Protocole de formation de biofilm de 24 heures	73
1. Préparation des cultures fongiques (J0)	73
2. Préparation de l'inoculum à une concentration de 10 ⁶ cellules par mL et ensemencement de la plaque (J1)	73
ANNEXE 2	75
Protocole de tests de sensibilité des biofilms à des molécules (J2)	75
ANNEXE 3	76
Molécules et réactifs	76
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

1. Figures

Figure 1 : Bourgeonnement des levures de <i>Candida</i> [http://frontal.univ-angers.fr].....	13
Figure 2 : Aspect typique de l'espèce <i>Candida albicans</i> à l'état frais [http://commons.wikimedia.org]	13
Figure 3 : Différentes formes morphologiques de <i>Candida albicans</i> [http://frontal.univ-angers.fr]	13
Figure 4 : « Muguet » caractéristique d'une candidose buccale pseudo-membraneuse [http://www.fascicules.fr].....	15
Figure 5 : Physiopathologie des candidoses invasives (d'après [71])	15
Figure 6 : Cathéter IV court Intraflon 2 VYGON [http://www.vygon.fr].....	20
Figure 7 : Différents cathéters centraux Multi-Cath™ INTRAVASCULAR™ [http://www.intravascular.be].....	22
Figure 8 : Physiopathologie de la contamination des cathéters [http://reaannecy.free.fr] ...	22
Figure 9 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm à <i>Candida albicans</i> sur la surface d'un cathéter en polyvinylchloride (PVC). (d'après [74]).....	24
Figure 10 : Microscopie Electronique à Balayage d'un biofilm à <i>C. albicans</i> après 48h d'incubation (photo issue de [26])	26
Figure 11 : Photos par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) issue de [27] montrant l'effet du farnésol sur du biofilm à <i>C. albicans</i> (24h).	28
Figure 12 : Molécule de résazurine (A) et de résorufine (B).....	35
Figure 13 : Spectre d'excitation et d'émission de la résorufine (illustration issue de [76]) ...	35
Figure 14 : Cathéter veineux central Multicath+ réf. 6202.241 VYGON®	37
Figure 15 : Evolution des cas de fungémies entre 2004 et 2010. (2011 : extrapolation à partir des données des mois de janvier à juillet)	42
Figure 16 : Espèces identifiées dans les hémocultures positives (n=191).....	43
Figure 17 : Pourcentage de la survie des patients à 3 mois.....	45

Figure 18 : Evolution de la mortalité à 3 mois après une candidémie entre 2004 et 2010	47
Figure 19 : Nombre d'hémocultures positives par service entre 2004 et 2010 (n=189).....	48
Figure 20 : Pourcentage de cultures de cathéter positives et négatives entre 2008 et 2010 au CHU de Nantes.	50
Figure 21 : Pourcentage d'hémocultures positives parmi les 20 patients ayant eu un cathéter positif. (NR = Non Réalisé).....	50
Figure 22 : Espèces isolées par cultures de cathéters entre 2008 et 2010 (n=20).....	50
Figure 23 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'incubation (en Unité Arbitraire de fluorescence).....	52
Figure 24 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la durée d'incubation avec la résazurine (en Unité Arbitraire de fluorescence).....	54
Figure 25 : Influence de l'ajout de 5% de sérum bovin fœtal dans le milieu de culture sur 4 souches de <i>Candida albicans</i> et une souche de <i>Candida krusei</i> (en Unité Arbitraire de fluorescence).....	54
Figure 26 : Influence du pH du milieu de culture sur le développement du biofilm de 4 souches de <i>Candida spp</i> (en Unité Arbitraire de fluorescence).....	56
Figure 27 : Corrélation entre l'aspect microscopique et l'intensité de fluorescence du biofilm des souches CA 134 [A], CK 818 [B] et CK818 avec 5% de SBF [C] (en Unité Arbitraire de fluorescence).....	58
Figure 28 : Capacité de formation d'un biofilm de 24 heures sur cathéter avec et sans l'ajout de 5% de SBF (en Unité Arbitraire de fluorescence).....	60
Figure 29 : Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition au fluconazole (64µg/mL) durant les 24 dernières heures (en Unité Arbitraire de fluorescence).....	60
Figure 30 : Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition au voriconazole à différentes concentrations, 0 à 64µg/mL [A] et 0 à 4µg/mL [B] durant les 24 dernières heures	62
Figure 31 : Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition à l'amphotéricine B à différentes concentrations, de 0 à 8µg/mL [A] et de 0 à 2µg/mL [B] durant les 24 dernières heures.....	63
Figure 32 : Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition à la micafungine à différentes concentrations, de 0 à 10µg/mL [A] et de 0 à 1µg/mL [B] durant les 24 dernières heures.....	64

Figure 33: Inhibition des souches CA 845, CA 073 et CA 134 en biofilm exposées à différentes concentrations de miltéfosine 66

Figure 34: Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition au voriconazole encapsulé à différentes concentrations, 0 à 64µg/mL durant les 24 dernières heures..... 68

Figure 35: Graphiques comparatifs des pourcentages d'inhibition entre l'amphotéricine B et l'amphotéricine B vectorisée pour les souches CA 845 [A], CA 134 [B], CA 073 [C] et CK 818 [D] 70

2. Tableaux

Tableau I : Taux d'incidence et distribution des agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales au niveau sanguin (INS) et mortalité. [3]	16
Tableau II : Facteurs de risque prédisposant au développement d'une candidose invasive d'après [1].	18
Tableau III : Souches utilisées pour la formation de biofilms <i>in vitro</i>	33
Tableau IV : Gammes de concentrations des molécules antifongiques testées	39
Tableau V : Espèces fongiques isolées des hémocultures positives entre 2004 et 2010 (n=191)	43
Tableau VI : Survie des patients à 3 mois (n=191).....	45
Tableau VII : Liste des réactifs	76

ABREVIATIONS

CVP : Cathéter Veineux Périphérique

CVC : Cathéter Veineux Central

CVCM : Cathéter Veineux Central à Manchon

MCBL : Microscopie Confocale à Balayage Laser

PLA-PEG : Acide PolyLactique greffé de PolyEthylène Glycol

PVC : Polyvinylchloride

SBF : Sérum Bovin Fœtal

UA : Unité Arbitraire

YPD : Yeast Extract Peptone Dextrose

INTRODUCTION

La pose d'un cathéter est effectuée chez environ deux tiers des patients hospitalisés (65.3%) pour une durée moyenne de pose de 12.2 jours (médiane = 8 jours). Cependant ces matériels peuvent être colonisés par certains agents microbiologiques pathogènes et être à l'origine d'infections invasives. Sur plus de 5 millions de cathéters veineux centraux posés chaque année aux Etats-Unis, près de 12% sont infectés, soit plus de 600 000 par an.

Les levures du genre *Candida* représentent la deuxième cause de ces infections sur matériel et sont associées à une forte mortalité. En effet ce type d'infection est fréquemment à l'origine de candidémies. La présence d'un matériel médical augmente le risque pour le patient de développer une infection invasive à *Candida* d'un facteur sept. De plus, les candidémies sont associées à un mauvais pronostic.

La conduite préconisée pour le traitement des infections sur cathéter passe par l'ablation de celui-ci. Mais si l'ablation d'un cathéter intraveineux périphérique ne pose généralement pas de problème, l'ablation d'un cathéter veineux central, quant à elle, n'est pas simple, et la pose d'un nouveau cathéter est associée à un risque supplémentaire pour le patient.

Les colonisations de matériels par *Candida* sont maintenant clairement associées à la formation d'un biofilm.

Devant cette problématique, nous nous proposons d'effectuer dans un premier temps des rappels bibliographiques concernant le genre *Candida*, les candidémies et les biofilms.

Il semble donc important de connaître la prévalence des infections à *Candida* associées aux biofilms. C'est pourquoi, nous avons réalisé une étude épidémiologique des cas de

candidémies ayant eu lieu sur le Centre Hospitalo-universitaire (CHU) de Nantes de 2004 à 2010. Puis dans un second temps, nous nous proposons de standardiser un modèle de biofilm *in vitro* afin d'étudier l'activité antifongique de médicaments commercialisés, de nouvelles molécules potentiellement d'intérêt et de nouvelles formulations basées sur des nanoparticules.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Le genre *Candida*

Les espèces du genre *Candida* sont des organismes cellulaires eucaryotes qui font partie du règne des *Fungi* et de la division des *Ascomycota*. Ce sont des levures de morphologies variées qui se reproduisent toutes par bourgeonnement (Figures 1-3). Certaines produisent du pseudomycélium ou du mycélium vrai.

La plupart de ces levures sont dites commensales car présentes sur la peau et/ou les muqueuses (digestives et génito-urinaires) chez l'Homme sain. Elles sont également opportunistes, profitant de facteurs favorisant pour se développer chez l'hôte et devenir pathogènes.

Ces facteurs favorisant sont de deux types, les facteurs intrinsèques qui sont liés à l'hôte, et les facteurs extrinsèques qui sont iatrogènes. Les facteurs intrinsèques peuvent être de plusieurs natures, les causes physiologiques (nouveau-né, vieillard...), locales (transpiration, macération...), ou celles liées au terrain du patient (diabète, immunosuppression, cancer...). Les facteurs extrinsèques sont les causes iatrogènes, comme l'antibiothérapie, les corticoïdes et les immunosuppresseurs, les actes chirurgicaux (digestifs ou cardiaques), les cathéters, les prothèses.

Les levures du genre *Candida* peuvent être responsables de candidoses dont la clinique est très riche allant de l'infection superficielle à l'infection invasive. L'espèce principalement impliquée en pathologie humaine est *Candida albicans*, bien que l'épidémiologie varie également en fonction des services d'hospitalisation.

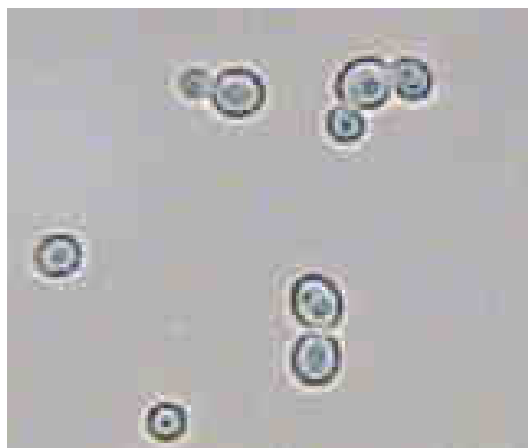


Figure 1 : Bourgeonnement des levures de *Candida* [<http://frontal.univ-angers.fr>]



Figure 2 : Aspect typique de l'espèce *Candida albicans* à l'état frais [<http://commons.wikimedia.org>]

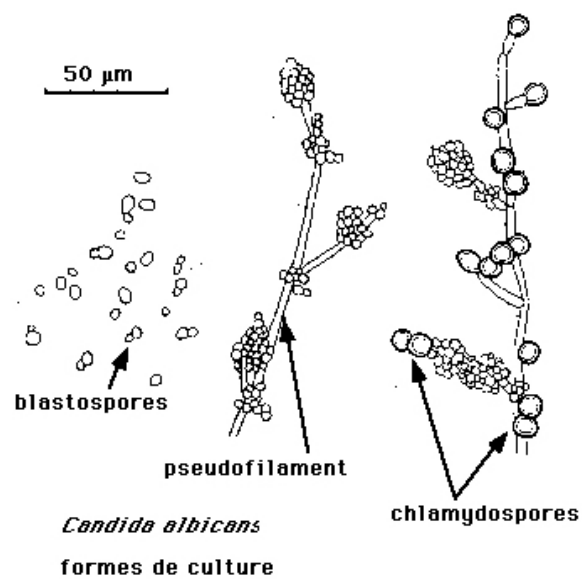


Figure 3 : Différentes formes morphologiques de *Candida albicans* [<http://frontal.univ-angers.fr>]

Dans les candidoses superficielles, les infections cutanées et unguéales sont distinguées des infections des muqueuses notamment digestives, allant de la sphère oropharyngée (muguet, perlèche) (Figure 4) à l'anus (anite), et génitales. Toutes ces infections ont généralement un pronostic favorable. Les infections invasives qui font le sujet de notre étude ont un pronostic plus défavorable.

A retenir :

Les levures du genre *Candida* sont principalement représentées par l'espèce *C. albicans*. En fonction de certains facteurs favorisants, ces agents peuvent devenir pathogènes pour l'Homme en occasionnant des candidoses superficielles ou invasives.

2. Les candidoses invasives

Les candidémies et les candidoses invasives ont un pronostic très défavorable avec un tableau clinique semblable à celui du choc septique. Bien que leur mortalité soit sujette à controverse, elle n'en reste pas moins élevée avec une mortalité brute comprise entre 40 et 60% et une mortalité attribuable comprise entre 20 et 40% [1]. Malgré cette hétérogénéité, une étude a montré qu'il existait une surmortalité liée aux candidémies, ainsi qu'une augmentation significative de la durée de séjour et des coûts hospitaliers [2] (Figure 5).

Ce type d'infection intervient souvent dans un contexte nosocomial. Une importante étude américaine menée entre 1992 et 2002 a mis en évidence que le genre *Candida* était responsable de 9% des infections nosocomiales arrivant ainsi au 4^{ème} rang des agents étiologiques après le staphylocoque à coagulase négatif (31.3%), le staphylocoque doré (20.2%) et les entérocoques (9.4%) [3] (Tableau I).

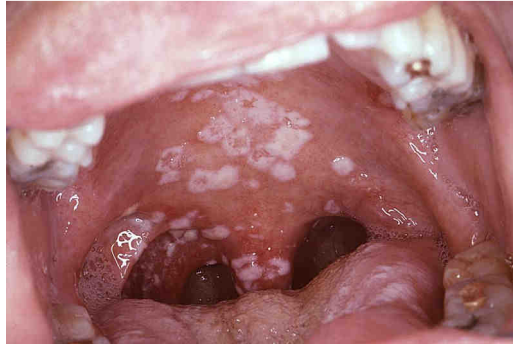


Figure 4 : « Muguet » caractéristique d'une candidose buccale pseudo-membraneuse
 [http://www.fascicules.fr]

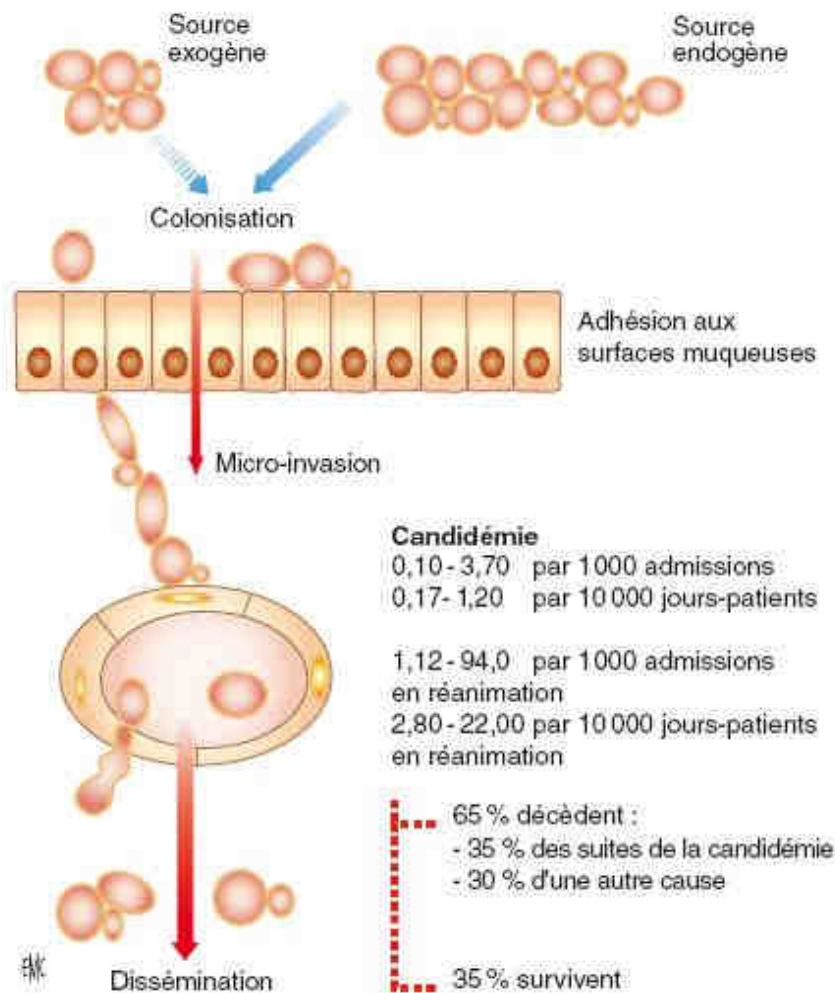


Figure 5 : Physiopathologie des candidoses invasives (d'après [71])

Tableau I : Taux d'incidence et distribution des agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales au niveau sanguin (INS) et mortalité. [3]

Agents pathogènes	INS pour 10 000 admissions	Pourcentage des INS			Mortalité brute, %		
		Total (n=20 978)	Unité Soins Intensifs (n=10 515)	Autres services (n=10 442)	Total	Unité Soins Intensifs	Autres services
Staphylocoques à coagulase négative	15.8	31.3	35.9	26.6	20.7	25.7	13.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.3	20.2	16.8	23.7	25.4	34.4	18.9
<i>Enterococcus species</i>	4.8	9.4	9.8	9.0	33.9	43.0	24.0
<i>Candida species</i>	4.6	9.0	10.1	7.9	39.2	47.1	29.0
<i>Escherichia coli</i>	2.8	5.6	3.7	7.6	22.4	33.9	16.9
<i>Klebsiella species</i>	2.4	4.8	4.0	5.5	27.6	37.4	20.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.1	4.3	4.7	3.8	38.7	47.9	27.6
<i>Enterobacter species</i>	1.9	3.9	4.7	3.1	26.7	32.5	18.0
<i>Serratia species</i>	0.9	1.7	2.1	1.3	27.4	33.9	17.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.6	1.3	1.6	0.9	34.0	43.4	16.3

De plus, l'incidence des candidémies a nettement progressé aux Etats-Unis entre 1980 et 2000 [4]. Cependant cette augmentation n'est pas retrouvée dans les pays européens, où une stabilité est plutôt observée [4-9]. L'incidence varie également beaucoup entre les services avec une incidence des épisodes survenant en réanimation jusqu'à 10 fois plus élevée que dans les services généraux [1]. Il existe de nombreux facteurs de risque qui prédisposent au développement d'une candidose invasive (Tableau II). Parmi ces facteurs sont retrouvés : la colonisation cutanée ou muqueuse par *Candida* [10, 11, 13], l'antibiothérapie, d'autant plus que le spectre antimicrobien est large et la durée d'exposition est longue [10, 12]. Egalement retrouvés, l'immunosuppression et la neutropénie [13], et tout accès veineux notamment les cathéters veineux centraux [11, 14].

D'une manière générale, les accès vasculaires sont une source importante de candidémies. Toutes les recommandations vont dans le même sens en conseillant le retrait systématique et précoce de tout accès vasculaire en cas de candidémie [15, 16]. Cependant, cette pratique est à l'origine de controverses. En effet, plusieurs études ont montré que le retrait précoce du cathéter en cas de candidémie n'apporte pas de bénéfices cliniques et ne diminue pas la mortalité globale [17, 18].

A retenir :

Les candidoses invasives ont un pronostic très défavorable avec une mortalité élevée. Intervenant souvent dans un contexte nosocomial, leur incidence varie en fonction des services hospitaliers. Il existe de nombreux facteurs de risque qui prédisposent à ce genre d'infection et notamment la présence d'un cathéter veineux central.

Tableau II : Facteurs de risque prédisposant au développement d'une candidose invasive d'après [1].

Facteurs de risque importants	Facteurs de risque non spécifiques
Colonisation de sites corporels multiples Antibiothérapie à large spectre Immunosuppression Neutropénie Brûlure (>50%) Lésion du tractus digestif Chirurgie digestive majeure Chirurgie des voies urinaires (en présence de candidurie) Traumatisme majeur (ISS>20) Nutrition parentérale Dialyse Score APACHE II >20 Voie veineuse centrale Candidurie > 10 ⁵ cfu/mL	Ages extrêmes Diabète Insuffisance rénale Chirurgie récente Sondage urinaire Accès vasculaire Séjour prolongé en réanimation (>7jours) Transfusions multiples

ISS: Injury Severity Score (score de sévérité du trauma); APACHE II: acute physiology and chronic health status evaluation II; cfu: colony forming units.

3. Un facteur de risque particulier : les cathéters

Il existe différents types de dispositifs médicaux adaptés à différentes utilisations et faisant chacun l'objet de recommandations particulières. Le dispositif est choisi en fonction de la localisation, de la durée, de la thérapie ou de l'application du cathéter, du risque, du contexte ou des habitudes du service.

3.1. Le cathéter veineux périphérique (CVP)

Ce dispositif médical stérile est introduit dans une veine périphérique. Il est utilisé dans un but diagnostique ou thérapeutique en permettant l'administration par voie parentérale de solutés, de produits sanguins, de solutions nutritives ou de médicaments. En 2005, le nombre annuel de CVP (Figure 6) mis en place en France était estimé à 25 millions [19]. De plus, dans l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales réalisée en France en 2006, 21.5 % des patients hospitalisés depuis plus de 24 heures étaient porteurs d'un CVP [20]. Ce type de cathéter est d'utilisation très fréquente en milieu hospitalier quelque soit le service clinique, représentant 90% des cathéters vasculaires mis en place [20].

3.2. Le cathéter veineux central (CVC)

Ce dispositif médical est le plus souvent introduit dans une veine jugulaire interne ou externe, une veine sous-clavière, une veine axillaire et exceptionnellement dans une veine fémorale. La voie veineuse centrale permet de résoudre les limites de la voie veineuse périphérique et offre la possibilité d'administrer des produits trop agressifs pour les veines périphériques.

Deux types de cathéters veineux centraux sont à distinguer : les cathéters tunnelisés à



Figure 6 : Cathéter IV court Intraflon 2 VYGON [<http://www.vygon.fr>]

émergence cutanée et les chambres à cathéter implantable. Les cathéters tunnelisés sont des tubes en élastomère de silicone ou en polyuréthane, mono ou multi lumières comportant une émergence cutanée pourvue d'un raccord fixé à la peau (Figure 7). Certains cathéters sont munis dans leur partie tunnélisable d'un manchon de Dacron[®], assurant en une dizaine de jours une fixation définitive à la peau, ce sont les cathéters à manchon (CVCM) ou cathéters d'Hickman-Broviac. La chambre à cathéter implantable, quant à elle, est un dispositif composé d'un boîtier pourvu d'un septum en silicone, relié à un cathéter veineux central. L'ensemble du dispositif est totalement implanté sous la peau du patient.

Les complications liées à ces dispositifs ne sont pas rares. Environ 5% des patients porteurs de CVC souffrent de complications, augmentant leur mortalité de 10 à 25% [21, 22]. Ces complications sont de 3 types : les complications de type infectieux (Figure 8), les complications de type thrombotique et les complications de type mécanique.

Malgré les conditions de stérilité entourant la pose de ces dispositifs [23-25], des complications infectieuses peuvent survenir. Elles proviennent notamment de la colonisation de dispositifs par des agents pathogènes formant alors des biofilms.

A retenir :

Il existe deux principaux types de cathéters, les cathéters veineux périphériques et les cathéters veineux centraux. En ce qui concerne ces derniers, des complications peuvent survenir pour le patient, augmentant la mortalité. Ces complications sont de 3 types, infectieuses, thrombotiques et mécaniques.

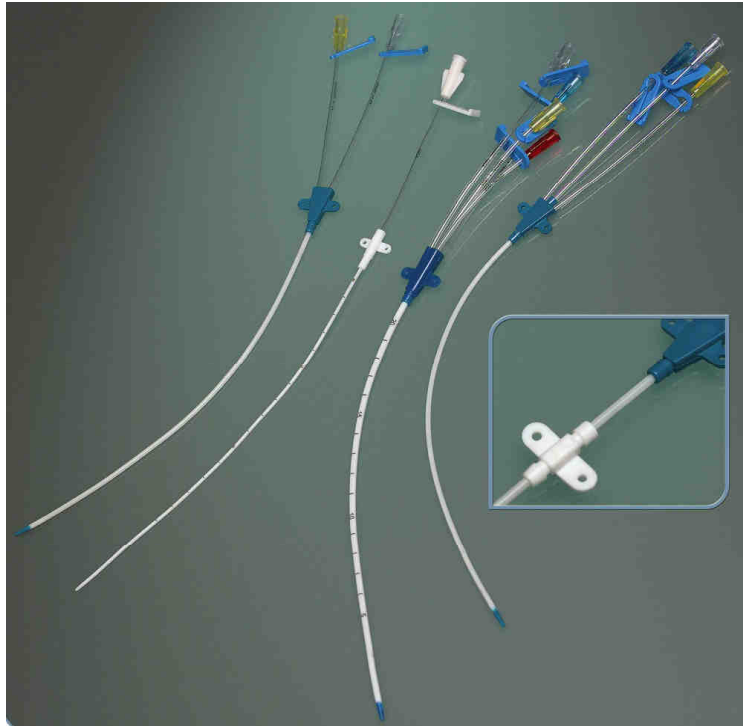


Figure 7 : Différents cathéters centraux Multi-Cath™ INTRAVASCULAR™ [<http://www.intravascular.be>]

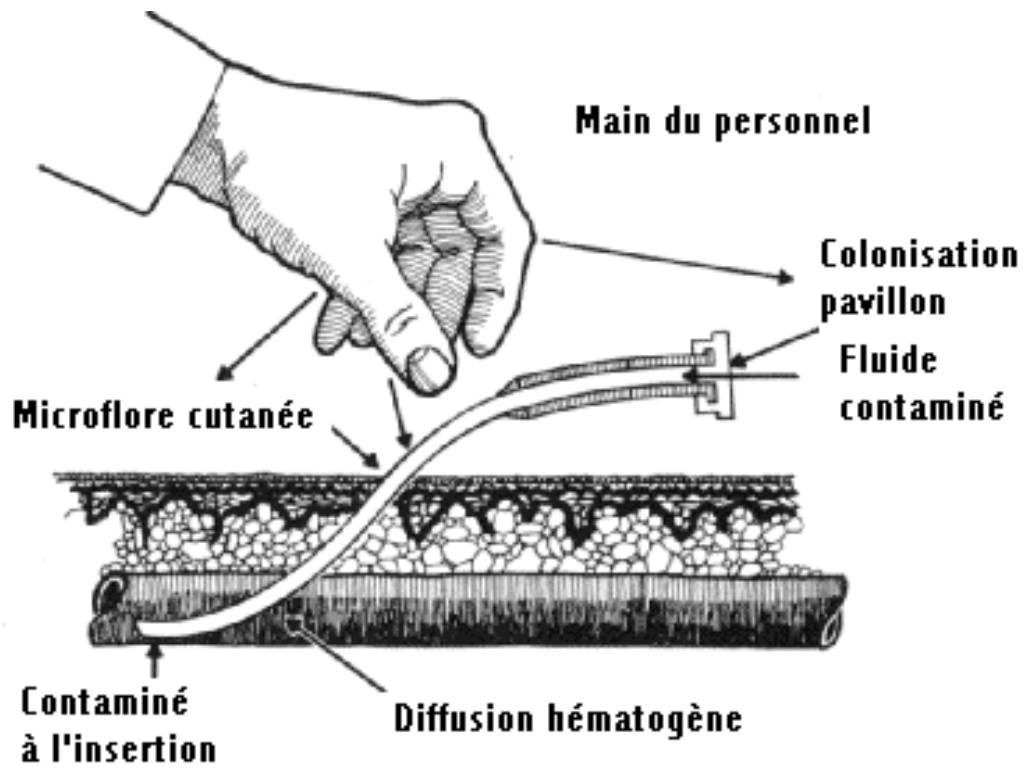


Figure 8 : Physiopathologie de la contamination des cathéters [<http://reaannecy.free.fr>]

4. Les biofilms et les infections

4.1. Structure du biofilm

Un biofilm est un mode de vie des microorganismes qui prédomine dans l'environnement naturel devant le mode de vie planctonique [28, 29]. Il faut noter que la très grande majorité des études microbiologiques est pourtant effectuée sur ces formes planctoniques de levures en suspension en milieu liquide.

Un biofilm est défini comme une structure dans laquelle une communauté de microorganismes adhère sur une surface organique ou non, et est recouverte par une matrice extracellulaire polymérique [26].

Pour coloniser une surface (Figure 9a), les levures doivent dans un premier temps, adhérer à la surface du matériel (Figure 9b). Cette phase est médiée par deux facteurs non-spécifiques (l'hydrophobicité de la surface cellulaire et les forces électrostatiques) et par des adhésines spécifiques [51]. Les cellules fongiques de *Candida* peuvent également s'associer à des bactéries pour former un biofilm [52]. La couche basale de colonies de levures se développe (Figure 9c). Une fois le développement du biofilm à *Candida* achevé, celui-ci arbore une structure tridimensionnelle complexe (Figure 9d) [35, 40, 41, 43, 44, 53-56]. Cette structure est en fait un arrangement spatial optimal, qui facilite les flux de nutriments et l'élimination des métabolites toxiques au sein de la communauté microbiologique. L'architecture du biofilm varie ; elle dépend du substrat et des conditions de croissance [40]. Elle varie également selon les différentes espèces de *Candida* et selon les souches [33, 44, 56, 57]. Par microscopie électronique à balayage, le biofilm à *Candida albicans* constitue un réseau dense de levures, d'hyphes et de pseudohyphes facilement observable, ainsi qu'une matrice

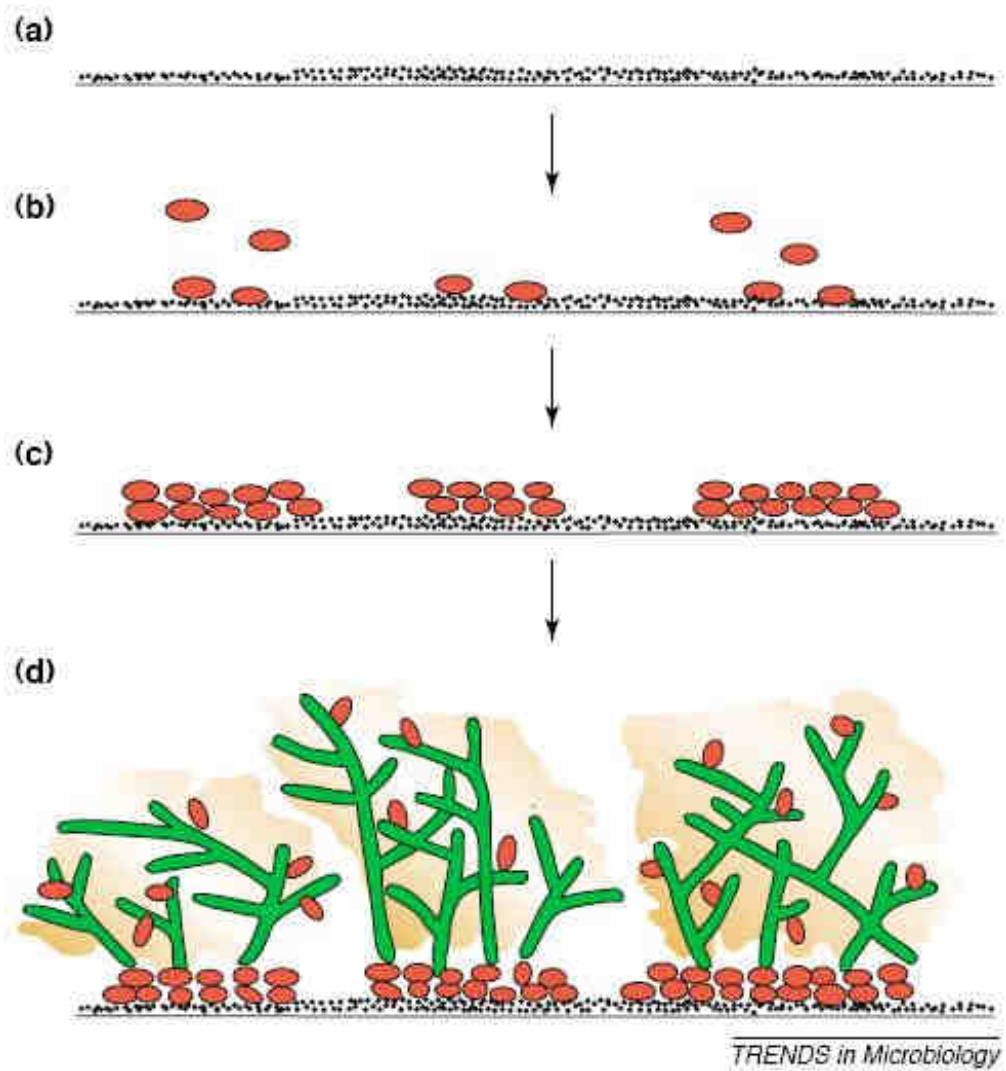


Figure 9 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm à *Candida albicans* sur la surface d'un cathéter en polyvinylchloride (PVC). (d'après [74])

extracellulaire polymérique à la surface des différentes formes morphologiques [44, 55] (Figure 10). Dans le laboratoire, des données similaires ont été obtenues avec des biofilms formés *in vivo* chez la souris cathétérisée. La conversion morphogénétique de *C. albicans* ou la capacité à pouvoir switcher de la forme levure à la forme filament est un élément pivot dans le développement de biofilm [58-60]. Afin d'identifier certains gènes responsables de cette filamentation impliquée dans la formation du biofilm, Ramage et al. [54] ont utilisé des souches mutantes de *C. albicans* déficientes en certains gènes, incapables de filamenter. Ils ont pu observer qu'une délétion du gène $\Delta efg1$ ou des gènes $\Delta cph1/\Delta efg1$ chez des mutants de *C. albicans* avait des conséquences néfastes sur la formation de biofilm [54]. En effet, le biofilm était assez pauvre, composé principalement d'une seule couche de cellules allongées. Ainsi, il est vraisemblable que la protéine régulant Efg1 est un facteur clé dans le développement de biofilm bien que ce rôle pourrait être une simple conséquence de la filamentation. Depuis, d'autres souches avec des mutations sur des gènes impliqués dans le processus de filamentation ont été testées [61-63]. Les résultats ont également montré un impact négatif sur la formation de biofilm. Toutefois le dimorphisme (levure/filament) ne serait pas un prérequis indispensable à la formation de biofilm, puisque des biofilms composés uniquement de levures ont été décrits [37, 39]. Il serait par contre nécessaire à l'organisation de la structure tridimensionnelle complexe.

4.2. Implication du biofilm dans les infections

Il devient de plus en plus certain qu'une importante proportion d'infections microbiennes chez l'Homme implique la formation de biofilms [28, 30-33]. Par ailleurs, il a été montré que

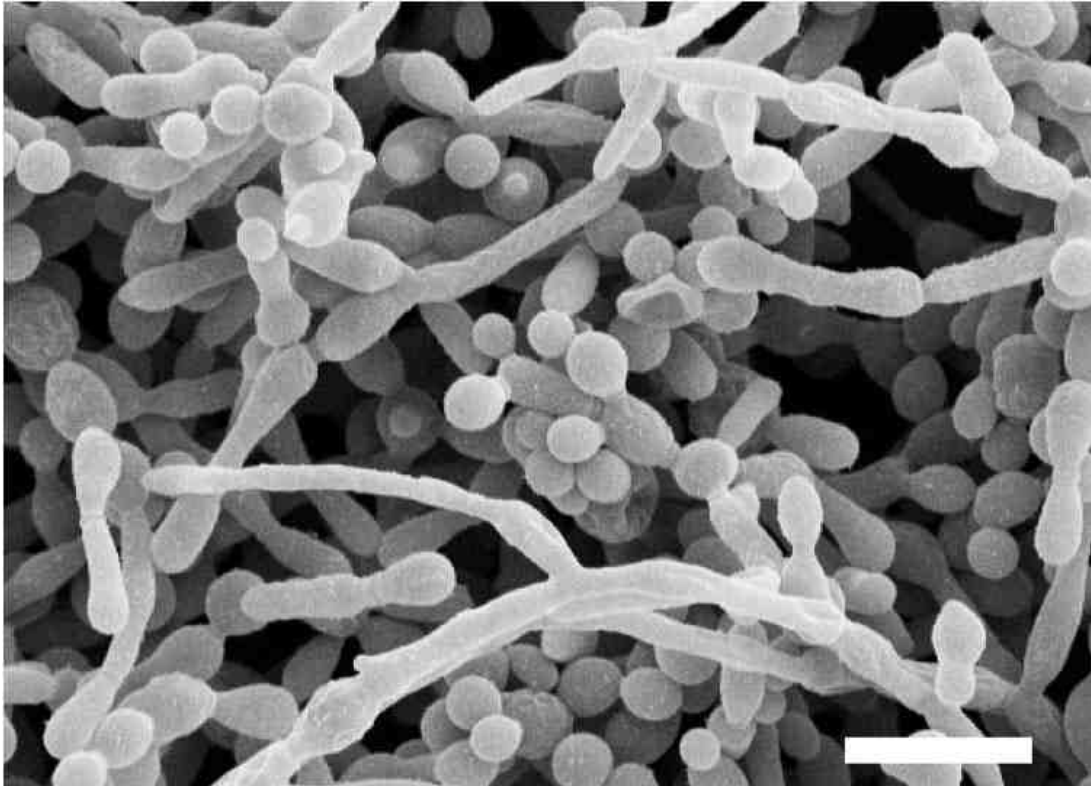


Figure 10 : Microscopie Electronique à Balayage d'un biofilm à *C. albicans* après 48h d'incubation (photo issue de [26])

la plupart des dispositifs médicaux invasifs comme les cathéters sont propices à la colonisation et à la formation de biofilm par les levures du genre *Candida* [34]. En servant de réservoir, la formation d'un biofilm sur un matériel médical peut être la source d'une future infection, à savoir, pour le genre *Candida*, une future candidémie. La présence de biofilm sur le matériel médical peut également être la cause d'un échec de fonctionnement du matériel [33, 34]. De plus, ces biofilms à *Candida* ont généralement une résistance accrue aux thérapeutiques antifongiques ainsi qu'une résistance accrue au système immunitaire de l'hôte.

4.3. Le phénomène de quorum sensing

La communication entre les cellules ou « quorum sensing », est fondamentale dans la formation de biofilm microbien. Elle permet d'éviter une surpopulation inutile, de contrôler la compétition pour les nutriments et a des implications importantes dans les processus infectieux, en particulier dans la dissémination. En ce qui concerne *C. albicans*, il a été montré que la molécule de farnésol contribue au quorum sensing [64]. Celle-ci est impliquée dans la régulation de l'expression de différents gènes, notamment des gènes impliqués dans la formation de filaments (Figure 11). Les cellules traitées par le farnésol à doses élevées forment un biofilm avec une architecture pauvre et avec une prédominance de levures et de pseudofilaments (Figure 11B) tandis que les cellules traitées par des doses plus faible de farnésol forment un biofilm avec de vrais filaments (Figure 11A). Certains gènes sont également impliqués dans les mécanismes de résistance aux médicaments, dans l'entretien de la paroi cellulaire, dans le transport du fer, dans la réponse au stress et au choc thermique, ou encore dans la lipophilie de la surface cellulaire [27].

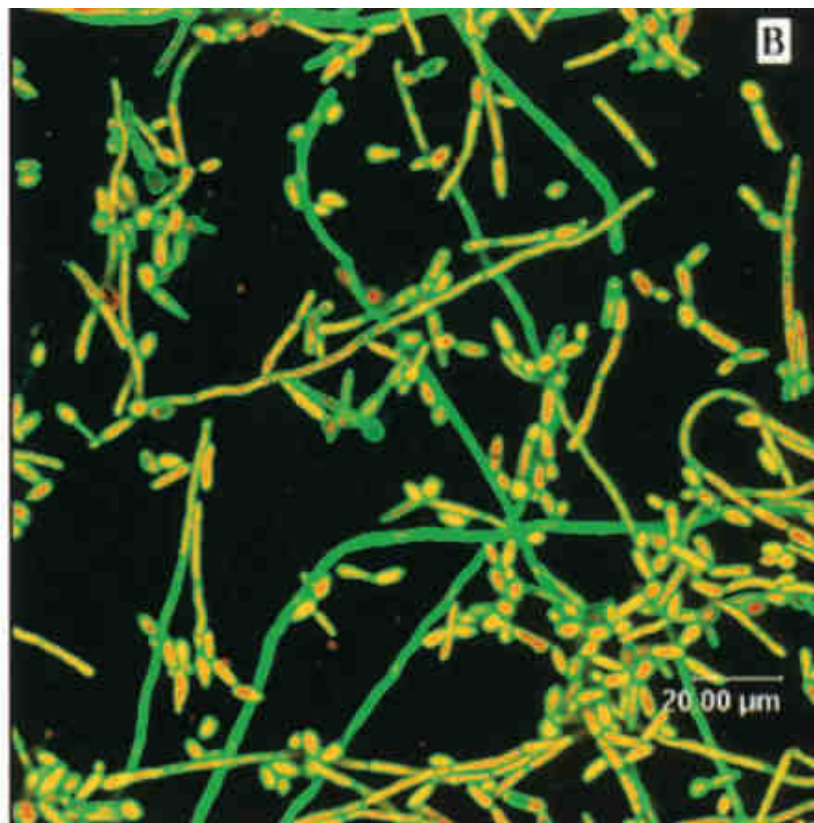
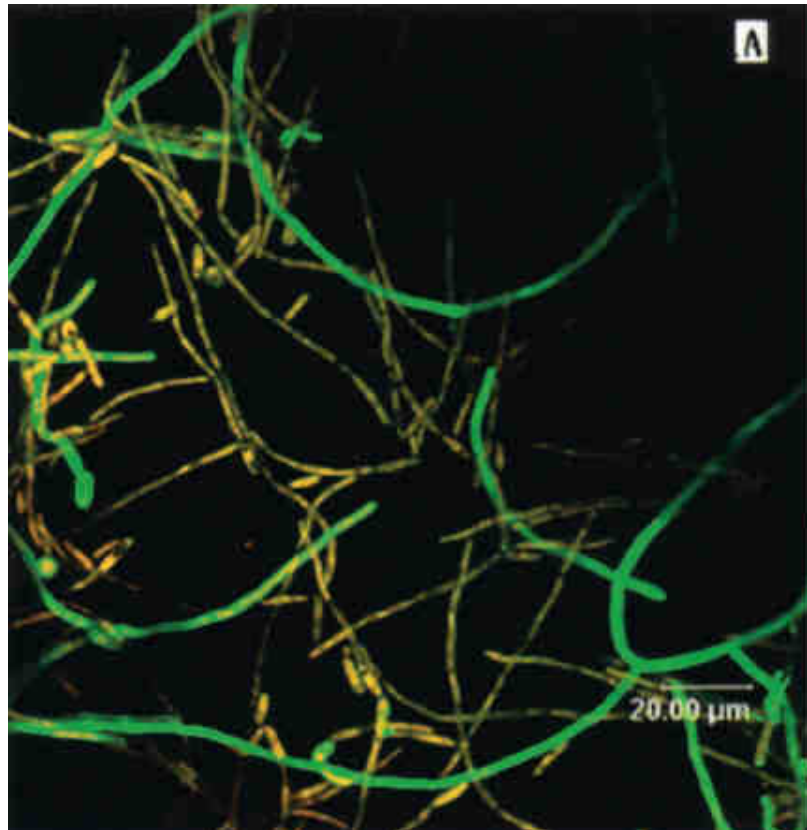


Figure 11 : Photos par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) issue de [27] montrant l'effet du farnésol sur du biofilm à *C. albicans* (24h).

4.4. Résistance des biofilms aux antifongiques

La résistance accrue du biofilm à *Candida* par rapport à sa forme planctonique a été mise en évidence dès 1995 [78]. Beaucoup d'agents antifongiques ont été testés comme l'amphotéricine B, le fluconazole, la flucytosine, le kétoconazole ou encore l'itraconazole. Tous ces antifongiques ont montré une activité plus faible contre la forme biofilm de *Candida*. Plus récemment deux nouveaux azolés (le voriconazole et le ravuconazole) ont également été testés sur le biofilm de *C. albicans* et *C. parapsilosis* et la résistance du biofilm s'est avérée une nouvelle fois. Seule la formulation lipidique de l'amphotéricine B et deux échinocandines (caspofungine et micafungine) ont révélé une activité « antibiofilm » *in vitro* contre le biofilm de *C. albicans* [79-80, 82]. Pour l'heure, il n'a pas été identifié de facteur spécifique responsable de la résistance de ces biofilms fongiques. Il semblerait plutôt que la résistance des biofilms soit le résultat de phénomènes multifactoriels complexes. Différents mécanismes pourraient être responsables de cette résistance comme la plus forte densité de cellules au sein du biofilm, l'effet de la matrice extracellulaire, la présence de cellules « persistantes » ou encore l'expression de gènes de résistance, et plus particulièrement ceux codant pour les pompes à efflux [36-38, 47, 66, 67].

4.5. Modèles de biofilms

Les méthodes classiques de détermination de sensibilité aux antifongiques utilisent des populations planctoniques de levures et ne permettent donc pas d'apprécier l'efficacité des antifongiques sur les biofilms à *Candida*. Il existe différents modèles *in vitro* de biofilms à *Candida*, formés sur différents matériaux, expérimentés soit de façon statique, soit dans des conditions dynamiques [35-48]. Des modèles *in vivo* de biofilms ont également été décrits.

Ils sont obtenus par cathétérisation de l'animal et infection par un inoculum de *Candida*, le biofilm se formant sur le cathéter. Les espèces d'animaux testées sont la souris, le rat et le lapin [49, 50, 75]. Les données suggèrent que la structure des biofilms *in vitro* et *in vivo* est similaire.

Un modèle de biofilm compatible avec les plaques 96 puits a récemment été mis au point. Il permet la détermination et la standardisation de tests de sensibilité aux antifongiques sur des biofilms à *Candida* [48]. Dans ce modèle, les biofilms sont dans un premier temps, formés dans les puits, puis dans un second temps, les médicaments antifongiques (ATF) sont ajoutés pendant un temps déterminé. Le test repose sur la mesure de l'inhibition du métabolisme des cellules au sein du biofilm par l'ATF. Les cellules restant viables réduisent un marqueur de viabilité cellulaire, en général le 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) en une molécule soluble et colorée. Une mesure colorimétrique est ensuite effectuée afin de déterminer indirectement la densité du biofilm [42, 65].

Néanmoins, cette méthode faisant intervenir le XTT est difficile d'utilisation et la fiabilité des résultats peut être discutée, en effet une certaine quantité du métabolite coloré du XTT est piégée dans le biofilm ne permettant pas une quantification précise.

A retenir :

Un biofilm à *Candida* est constitué d'un réseau dense de levures adhérant à une surface. Ce réseau est recouvert d'une matrice extracellulaire et arbore une structure tridimensionnelle. La communauté de levures se développe et évolue grâce à un système de communication intercellulaire, le quorum sensing. Les dispositifs médicaux sont des

surfaces propices au développement de biofilms. De plus, les biofilms ont une résistance fortement accrue à la quasi-totalité des antifongiques. Afin d'étudier ce mode de vie des levures, plusieurs modèles de biofilms à *Candida*, *in vitro* et *in vivo*, existent. Bien que présentant certaines limites, un modèle en microplaque repose sur la réduction par les cellules, d'un marqueur (XTT) en une molécule colorée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Enquête rétrospective

Dans un premier temps, une étude rétrospective est menée de 2004 à 2010 afin de répertorier les patients hospitalisés au Centre Hospitalo-universitaire (CHU) de Nantes ayant eu au moins une hémoculture positive à une espèce fongique, analysée au laboratoire de parasitologie et de mycologie médicale de l'Hôtel Dieu. Les patients sont sélectionnés et les données recueillies à l'aide de deux logiciels informatiques présents à l'hôpital. Le premier logiciel, DxLab®, permet l'enregistrement et la conservation de toutes les données d'analyses biomédicales réalisées au CHU. Le second, Clinicom®, répertorie toutes les informations médicales des patients (données cliniques, biologiques, imagerie, traitements,...).

Le recueil des données concerne en particulier le service clinique prescripteur de l'hémoculture, l'espèce isolée et la survie du patient à 3 mois. Concernant le cathéter, les données portent sur la positivité à levures et sur l'espèce isolée. Ces patients peuvent présenter ou avoir présenté une candidémie au cours de leur séjour.

2. Approche expérimentale : réalisation de biofilms *in vitro* à *Candida spp*

2.1. Objectifs

L'objectif principal est la mise au point d'un modèle *in vitro* de biofilm à *Candida* permettant l'évaluation de la capacité des souches à former le biofilm et celle des antifongiques à traiter ce biofilm.

2.2. Souches utilisées

Les souches de *Candida* utilisées pour réaliser les biofilms (Tableau III) sont des souches isolées d'hémocultures réalisées au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale du CHU de Nantes. Ces souches font partie de l'enquête rétrospective 2004-2010. Plusieurs souches de quatre espèces ont été sélectionnées : *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. glabrata*.

Tableau III : Souches utilisées pour la formation de biofilms *in vitro*

<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida glabrata</i>
CA134	CP599	CK506	CG540
CA073	CPRoll	CK818	CG230
CA845			
CA990			

Parmi ces souches, deux sont issues du service d'hématologie (CP599 et CK818) et trois sont issues du service d'hépatogastro-entérologie (CA134, CA073 et CG540). En ce qui concerne le reste des souches, elles sont issues de services divers (pneumologie, urologie, médecine interne, maladies infectieuses et tropicales). Les souches sont cryoconservées dans la mycothèque de l'EA1155 et sont cultivées sur pente Sabouraud à température ambiante avant emploi.

2.3. Protocole de formation de biofilms en plaque

2.3.1. Protocole standard

Les souches de levures à étudier sont préalablementensemencées soit en milieu Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) liquide pendant 12 heures à 30°C, soit en pente Sabouraud

pendant 24 heures à 37°C en fonction de la manipulation et du volume souhaité.

Les conditions standard permettant la formation d'un biofilm stable et homogène pour toutes les espèces et les souches testées ont été fixées au laboratoire antérieurement. Le milieu de culture utilisé est le RPMI-1640 (SIGMA®, Saint Quentin Fallavier, France) additionné de MOPS (SIGMA®) et est ajusté à pH 7. Après deux lavages par du PBS, l'inoculum de blastoconidies à *Candida spp* est remis en suspension dans ce milieu RPMI additionné de MOPS afin d'obtenir une suspension de 10^6 blastospores par millilitre après comptage à la cellule de Malassez. Cette suspension est ensuite déposée dans les puits d'une plaque 96 puits. Le temps d'incubation pour la formation des biofilms a été fixé à 24 heures ou 48 heures. Après incubation, le surnageant de chaque puits est aspiré avec précaution pour enlever les levures non adhérentes et ne pas décoller le biofilm formé, puis les puits sont lavés deux fois par du PBS. Un volume de 100 µL de RPMI MOPS, puis de 10 µL de résazurine (700 µM) sont alors ajoutés dans chaque puits. La résazurine est une molécule métabolisée par les levures en résorufine (Figure 12), molécule fluorescente. Après incubation à 37°C pendant 2 heures, l'intensité de fluorescence, déterminée en spectrofluorométrie, permet alors de déterminer indirectement la quantité de cellules fongiques présente dans chaque puits.

Pour la lecture, les longueurs d'onde d'excitation et d'absorption sont fixées par rapport au spectre d'excitation et d'émission de la résorufine (Figure 13) :

Excitation : 560 nm, émission : 590 nm

Les résultats sont exprimés en Unité Arbitraire de fluorescence (UA), proportionnelle à la densité des levures.

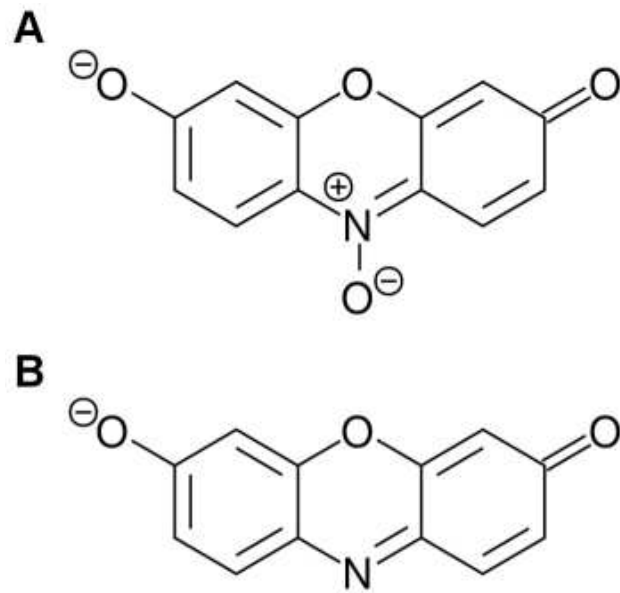


Figure 12 : Molécule de résazurine (A) et de résorufine (B)

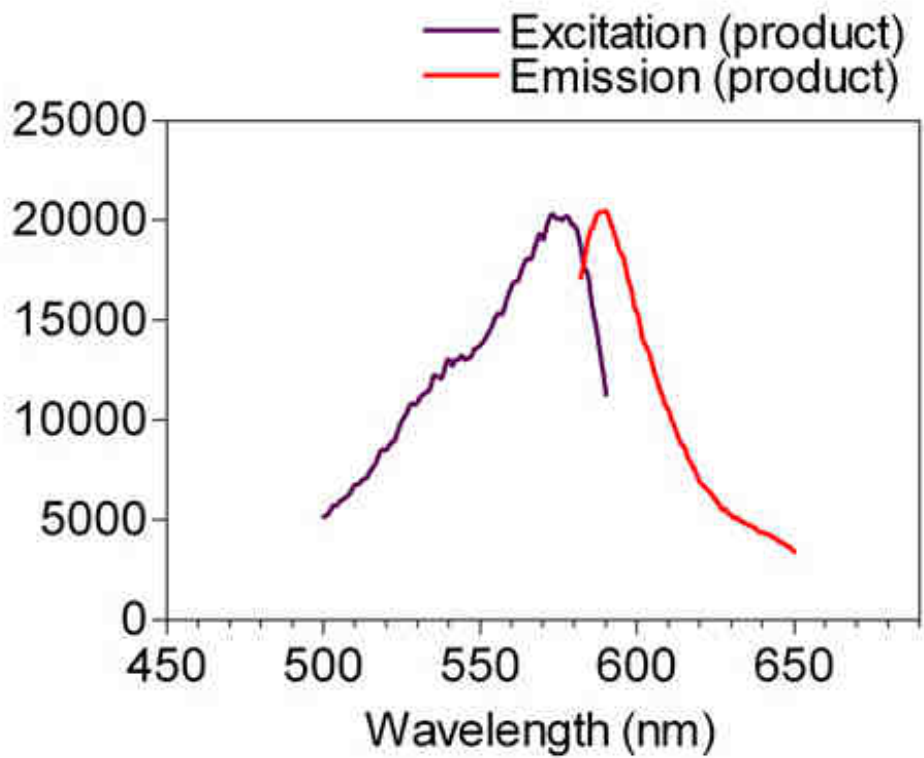


Figure 13 : Spectre d'excitation et d'émission de la résorufine (illustration issue de [76])

2.3.2. Modifications du protocole standard

Afin que le maximum de souches de *Candida* testées puisse produire un biofilm stable et homogène, plusieurs conditions ont fait l'objet de nombreuses variations successives du protocole standard. Tout d'abord, la taille de l'inoculum placé dans les puits. Quatre concentrations, 10^5 , 10^6 , 10^7 et 10^8 levures/mL, ont été testées. Ensuite, le milieu de culture dans lequel se forment les biofilms dans les puits a fait l'objet de deux variations. D'une part la présence ou l'absence de 5% de sérum bovin foetal (SBF) et d'autre part la valeur de pH (5, 6, 7 et 8). En ce qui concerne la durée de formation du biofilm, deux temps d'incubation ont été testés, 24 heures et 48 heures. Pour la phase de révélation, des lectures ont été effectuées à 1, 2, 3, 4 et 5 heures après l'ajout de la résazurine, afin de trouver le délai optimal de révélation du phénomène de réduction sachant que chaque souche pourrait posséder un métabolisme différent.

2.4. Evaluation de la capacité des différentes espèces à former du biofilm

Afin de comparer la capacité de toutes les souches à former du biofilm, les valeurs spectrofluorimétriques obtenues pour chaque biofilm, l'aspect et la densité des biofilms au microscope sont évalués.

2.5. Protocole de formation de biofilm sur cathéter *in vitro*

Pour ce faire, l'inoculum de blastoconidies est préparé à la même concentration et de la même façon que dans le protocole standard. Au préalable, un cathéter veineux central Multicath+ (VYGON®), référence la plus utilisée au CHU de Nantes (Figure 14), est découpé transversalement en morceaux de 2-3 mm de long dans des conditions stériles. Les

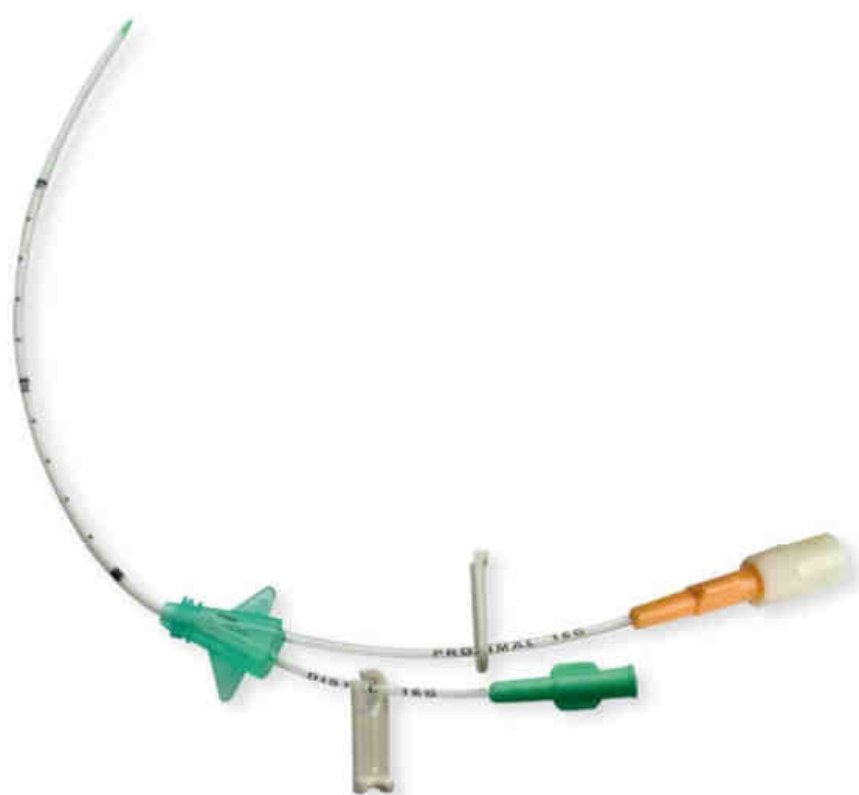


Figure 14 : Cathéter veineux central Multicath+ réf. 6202.241 VYGON®

morceaux sont ensuite déposés verticalement au fond des puits à utiliser. Les 100 μL de suspension de blastoconidies sont introduits dans les puits de façon à immerger les morceaux de cathéter. La plaque est incubée pendant 24 heures à 37°C. Enfin, les cathéters sont lavés deux fois afin d'enlever les levures non-adhérées.

En ce qui concerne ces lavages, ils sont réalisés par mobilisation du cathéter. Le morceau de cathéter est transféré dans le puits adjacent à l'aide d'un cône stérile. Ce puits est préalablement rempli par 200 μL de PBS 1X. Le second lavage est réalisé de manière identique. Chaque bain de PBS dure environ 5 minutes en agitation manuelle.

Le biofilm formé sur cathéter est alors prêt à être utilisé dans la suite des expériences ou incubé 24 heures supplémentaires et lavé pour obtenir un biofilm mature de 48 heures.

2.6. Evaluation de la sensibilité des biofilms aux antifongiques

Au total, cinq molécules antifongiques ont été testées *in vitro* sur le biofilm : le fluconazole (SIGMA ALDRICH®), le voriconazole (AK scientific®), l'amphotéricine B (SIGMA ALDRICH®), la micafungine (ASTELLAS®) et la miltéfosine (ZENTARIS®).

Les solutions d'antifongiques à tester aux dilutions souhaitées (Tableau IV) sont préparées dans du RPMI-1640+MOPS. Ces solutions sont ensuite déposées dans les puits possédant un biofilm de 24 heures à raison de 100 μL par puits. Chaque concentration de chaque molécule est testée en triplicate. Un témoin biofilm sans antifongique est réalisé pour chaque souche. Les témoins négatifs correspondent à 100 μL de RPMI MOPS. La plaque est incubée en chambre humide pendant 24 heures à 37°C. Après lavage, la révélation de l'action de l'antifongique est réalisée par l'ajout de résazurine. Les résultats sont exprimés en

Tableau IV : Gammes de concentrations des molécules antifongiques testées

Molécule	Concentrations testées (µg/mL)											
Fluconazole	64											
Voriconazole	64	16	4	1	0,25	0,0625						
Amphotéricine B	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125					
Micafungine	10	5	2,5	1,25	1	0,625	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	
Miltéfosine	100	10	1									

pourcentage d'inhibition de la prolifération (intensité de fluorescence) par rapport à la pousse témoin après soustraction de la fluorescence résiduelle obtenue dans le témoin négatif.

2.7. Impact de l'encapsulation d'antifongiques dans des nanoparticules

L'apport de l'encapsulation dans des nanoparticules d'acide polylactique greffé par du polyéthylène glycol (PLA-PEG) sur la sensibilité des biofilms fongiques a été évalué pour deux molécules, le voriconazole et l'amphotéricine B.

Les nanoparticules ont été synthétisées et les deux antifongiques encapsulés dans le laboratoire de pharmacologie du Professeur Hildgen (Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Canada). La capacité d'encapsulation du voriconazole est de 1%, ce qui limite l'utilisation de haute concentration, les nanoparticules précipitant à trop forte concentration. En ce qui concerne l'amphotéricine B, la capacité d'encapsulation est de 25%. Les nanoparticules seules et chargées en antifongiques sont évaluées dans les conditions du protocole standard en microplaques.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Enquête rétrospective

Au cours de ces cinq premières années (2004-2008), une augmentation de l'incidence des fongémies est observée (Figure 15). Après 2008, une faible diminution de cette incidence mais non significative, commence à s'amorcer. L'augmentation générale de l'incidence des cas de candidémies entre 2004 et 2010 sur l'hôpital de Nantes, est une augmentation qui est observée de manière internationale [71] et est liée à l'augmentation des facteurs de risque.

1.1. Espèces identifiées

Durant l'étude, la très grande majorité des espèces fongiques isolées dans les hémocultures appartenait au genre *Candida* (98,4%). Comme observé dans plusieurs études [68-70], *Candida albicans* représente encore un peu plus de 50% des espèces identifiées (

Tableau V : Espèces fongiques isolées des hémocultures positives entre 2004 et 2010 (n=191)

, Figure 16). L'augmentation de l'incidence des fongémies ne s'est pas accompagnée d'un changement de répartition des espèces de *Candida*, la proportion de chaque espèce étant restée assez stable au cours de ces 7 ans. Toutefois si *C. albicans* arrive chaque année en tête des espèces les plus isolées, on remarque des variations importantes pour cette espèce de 33,3% à 69,2%.

En ce qui concerne les espèces non-*albicans*, *Candida parapsilosis* se démarque (13,1%) pour se placer en deuxième position des causes de fongémies à Nantes. Cette donnée est en accord avec la littérature. En effet, il a été observé qu'aux Etats-Unis et en Australie, la

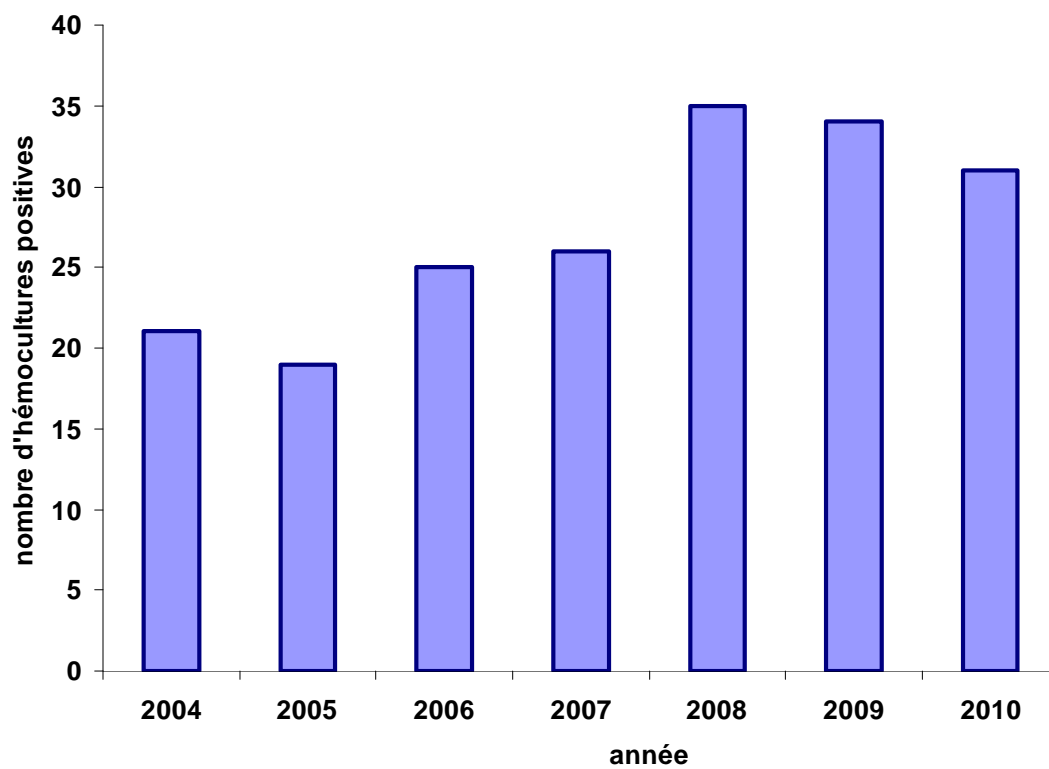


Figure 15 : Evolution des cas de fungémies entre 2004 et 2010. (2011 : extrapolation à partir des données des mois de janvier à juillet)

Tableau V : Espèces fongiques isolées des hémocultures positives entre 2004 et 2010 (n=191)

Espèce	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
<i>C. albicans</i>	7 (33,3%)	9 (47,4%)	12 (48,0%)	18 (69,2%)	18 (51,4%)	16 (47,1%)	19 (61,3%)	99 (51,8%)
<i>C. parapsilosis</i>	2 (9,5%)	3 (15,8%)	3 (12,0%)	3 (11,5%)	5 (14,3%)	7 (20,6%)	2 (6,5%)	25 (13,1%)
<i>C. glabrata</i>	3 (14,3%)	2 (10,5%)	2 (8,0%)	1 (3,9%)	5 (14,3%)	3 (8,8%)	4 (12,8%)	20 (10,5%)
<i>C. tropicalis</i>	2 (9,5%)	4 (21,1%)	5 (20,0%)	1 (3,9%)	4 (11,4%)	3 (8,8%)	1 (3,2%)	20 (10,5%)
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	1 (4,0%)	1 (3,8%)	0	1 (2,9%)	1 (3,2%)	4 (2,1%)
<i>C. krusei</i>	3 (14,3%)	1 (5,3%)	0	2 (7,7%)	0	1 (2,9%)	2 (6,5%)	9 (4,7%)
<i>C. kefyri</i>	2 (9,5%)	0	1 (4,0%)	0	0	2 (5,9%)	0	5 (2,6%)
non identifiable	0	0	0	0	0	1	0	1 (0,5%)
Autres	2 (9,5%)	0	1 (4,0%)	0	3 (8,6%)	0	2 (6,5%)	8 (4,2%)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1						1	2
<i>Scedosporium sp.</i>					1			1
<i>C. pelliculosa</i>					1			1
<i>C. famata</i>					1			1
<i>C. lipolytica</i>			1					1
<i>C. inconspicua</i>	1							1
<i>C. guilliermondii</i>							1	1
Total	21 (11,0%)	19 (10,0%)	25 (13,1%)	26 (13,6%)	35 (18,3%)	34 (17,8%)	31 (16,2%)	191

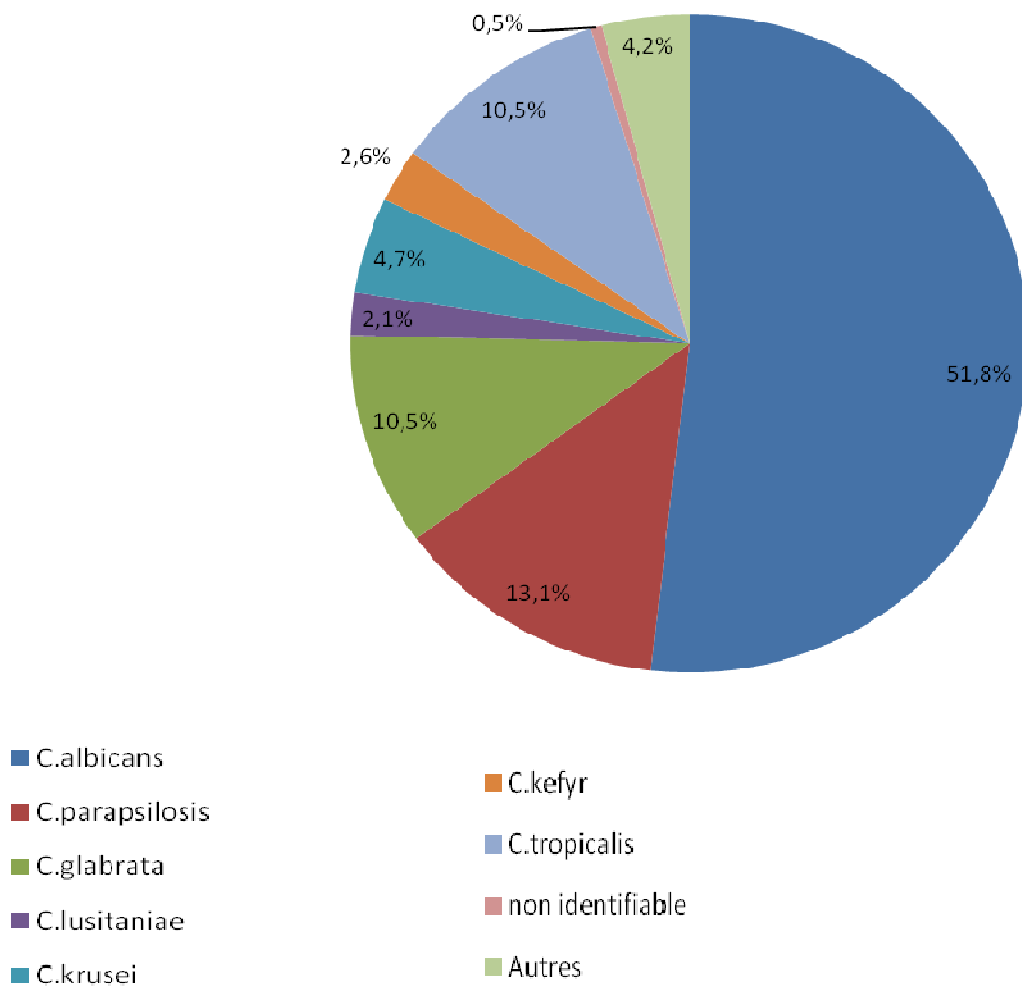


Figure 16 : Espèces identifiées dans les hémocultures positives (n=191)

seconde espèce responsable de candidémie est *Candida glabrata*, mais en Europe il s'agit bien de *Candida parapsilosis* [72]. Cette forte proportion s'expliquerait par différents paramètres qui n'ont pas été pris en compte dans l'étude, comme la présence d'un cathéter veineux central, l'âge du patient ou encore l'utilisation d'échinocandines (caspofongine) vis-à-vis de laquelle *Candida parapsilosis* a une sensibilité diminuée *in vitro* [1, 72].

Candida glabrata et *Candida tropicalis* ont quant à eux un pourcentage identique de 10,5%, ce qui représente une proportion non négligeable. La proportion de *Candida glabrata* est d'autant plus à prendre en compte que cette espèce a une sensibilité naturellement diminuée au fluconazole.

Toutes les publications s'accordent pour noter l'augmentation de l'incidence des cas de candidémie à *Candida krusei*, mais cette augmentation n'a pas été retrouvée dans cette étude à l'hôpital de Nantes.

1.2. Survie du patient à 3 mois

Le deuxième paramètre à avoir été exploré lors de l'étude est la survie des patients à 3 mois. Les candidémies ont de plus en plus clairement un mauvais pronostic. Falagas et son équipe ont étudié la mortalité attribuable aux candidémies et ont répertorié plusieurs publications qui s'y rattachent. Ils ont noté une mortalité attribuable allant de 5% à 71%. Malgré cette hétérogénéité, six études cas-témoins ayant analysé la mortalité due aux candidémies, ont observé une différence significative entre les deux groupes [2].

À Nantes, entre 2004 et 2010, la mortalité globale à 3 mois après un épisode de candidémie était de 23% (Figure 17 et Tableau VI), ce qui est un chiffre élevé dans l'absolu mais reste

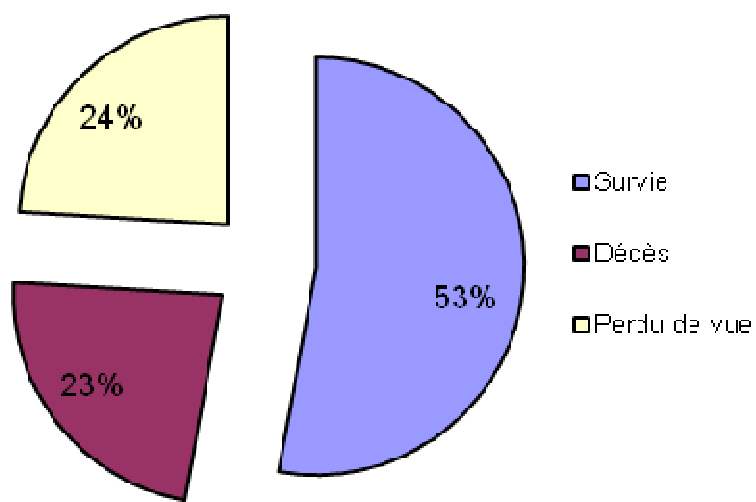


Tableau VI : Survie des patients à 3 mois (n=191)

Statuts	Patients
Survie	101
Décès	44
Perdu de vue	46

Figure 17 : Pourcentage de la survie des patients à 3 mois

bas par rapport aux différents chiffres répertoriés dans la publication de Falagas et al. [2].

De plus, l'évolution générale de la mortalité à 3 mois après une candidémie entre 2004 et 2010 a une tendance à la baisse, malgré une forte hétérogénéité entre les années, pour arriver à moins de 10% en 2010 (Figure 18). Dans ces décès, la part directement attribuable à *Candida* n'est pas estimée.

1.3. Services ayant fait la demande d'hémoculture

Parmi les services ayant fait des demandes d'hémocultures qui se sont révélées positives à micromycètes, deux se démarquent très largement (Figure 19).

En première position, le service de réanimation avec 47 hémocultures positives, représente 25% de l'ensemble des hémocultures positives analysées au laboratoire de parasitologie et mycologie médicale entre 2004 et 2010. Ce chiffre peut être additionné à celui du service de réanimation pédiatrique augmentant le pourcentage à 28,2%. Cette proportion très élevée est largement retrouvée dans la littérature [69, 70, 77]. Elle s'explique par le tableau clinique très sévère qui accompagne souvent une candidémie et mène directement au service de réanimation.

Le second service qui se démarque est le service d'hématologie avec 35 hémocultures positives, ce qui représente 18,6%. Cette proportion, également retrouvée dans la littérature, s'explique par le terrain fragilisé des patients qui sont présents dans ce service. En effet, ces patients peuvent accumuler plusieurs facteurs de risque de développer une candidémie, comme l'immunosuppression, la neutropénie, l'antibiothérapie à large spectre, la présence d'une voie veineuse centrale ou encore la nutrition parentérale.

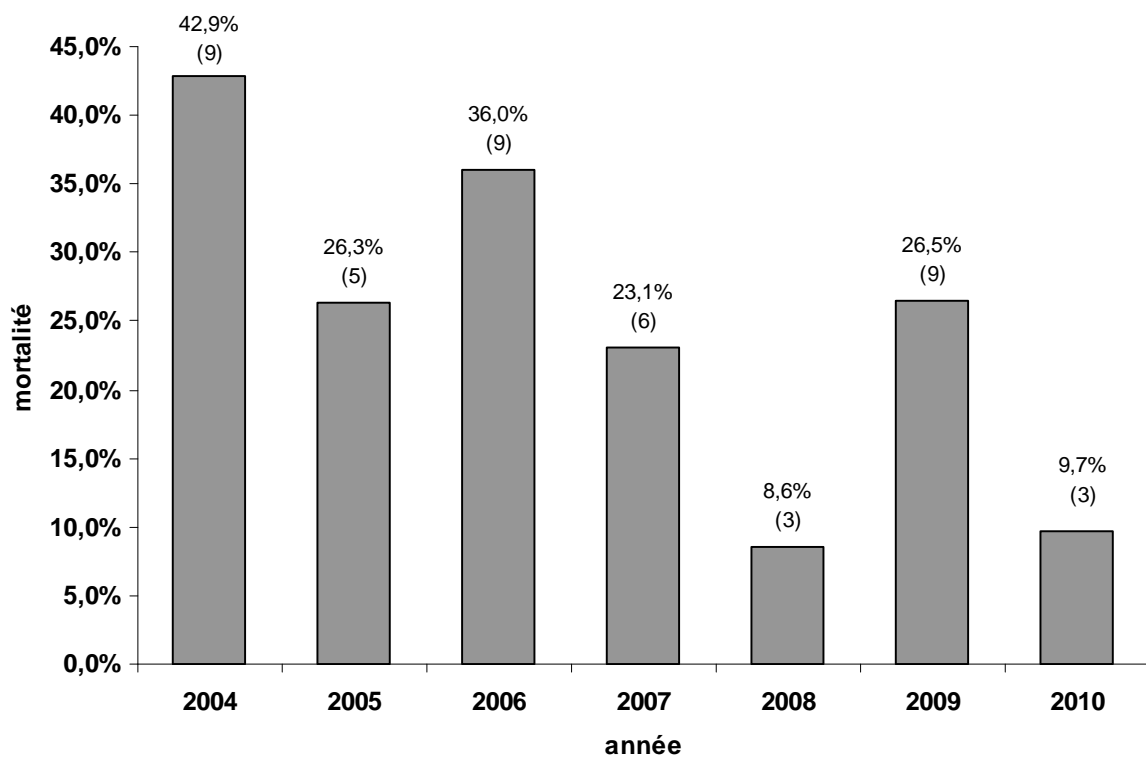


Figure 18 : Evolution de la mortalité à 3 mois après une candidémie entre 2004 et 2010

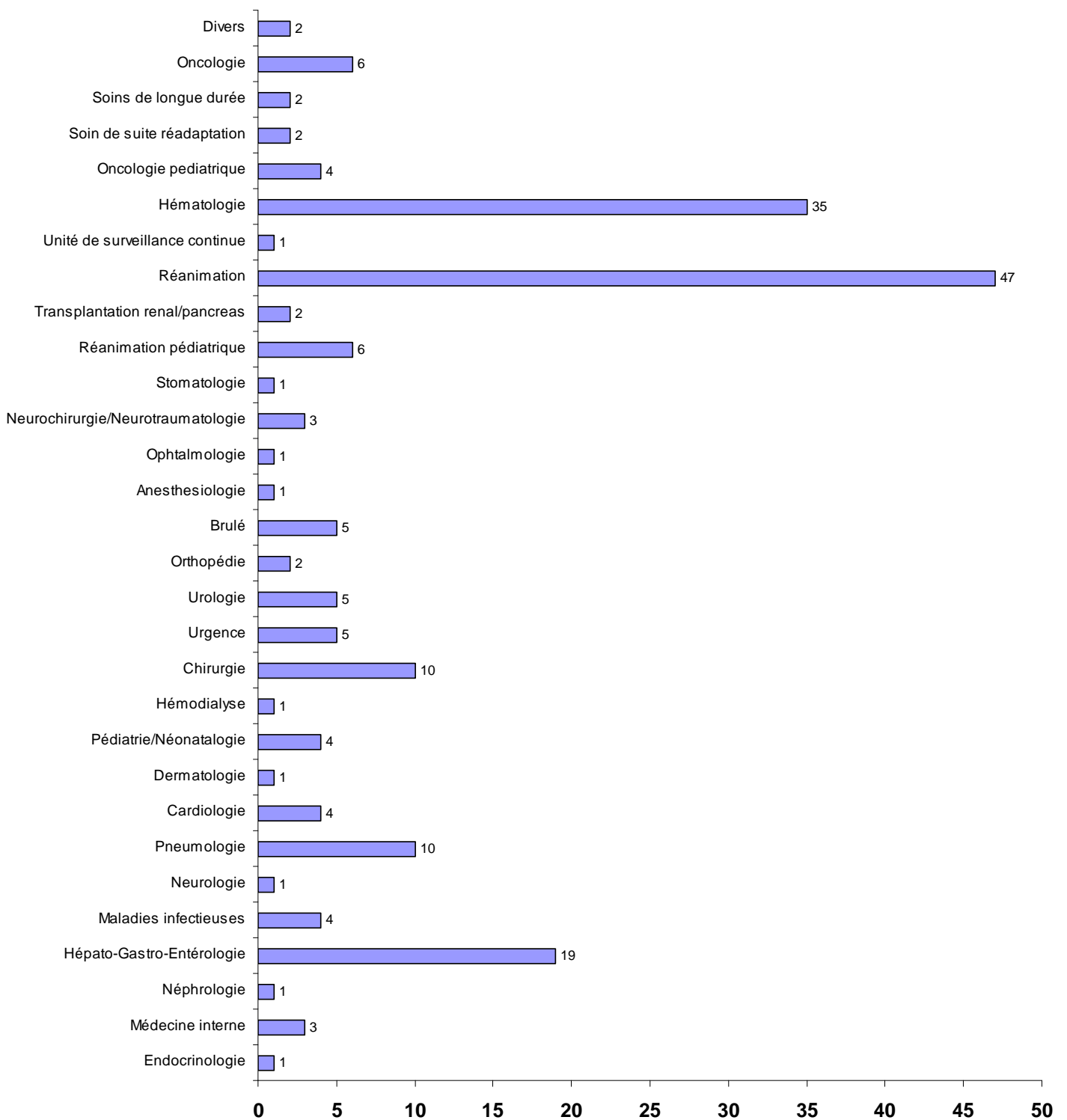


Figure 19 : Nombre d'hémocultures positives par service entre 2004 et 2010 (n=189).

1.4. Analyse de cathéters

Sur la période d'étude, quatre-vingt six cathéters ont fait l'objet d'une culture pour déterminer la présence, ou non, d'une colonisation du matériel d'origine fongique. Parmi ces 86 cultures, 20 (23%) se sont révélées positives à une espèce fongique (Figure 20).

Sur ces 20 patients dont ont été ôtés les cathéters positifs, 18 ont fait l'objet d'une demande d'hémoculture. Onze (65%) de ces hémocultures se sont révélées positives (Figure 21).

La quasi-totalité des espèces fongiques retrouvées dans les hémocultures est identique à celles identifiées dans les cultures du cathéter. Seul un patient présentait une hémoculture dont l'espèce isolée était différente de celle du cathéter mais il ne s'agissait pas du genre *Candida* (culture du cathéter : *Aspergillus fumigatus* / hémoculture : *Scedosporium*).

En ce qui concerne les espèces de levures isolées par cultures des cathéters (Figure 22), c'est sans surprise que l'on retrouve en grande majorité *Candida albicans* avec 66,7% des cathéters positifs. Malgré la petite taille de l'échantillon, *Candida parapsilosis* se démarque très nettement des autres espèces non-*albicans* avec 22,2% des cultures de cathéters positives.

2. Formation *in vitro* de biofilm à *Candida*

2.1. Variations des conditions

2.1.1. La taille de l'inoculum

Plusieurs concentrations d'inoculum ont été testées afin de déterminer la concentration

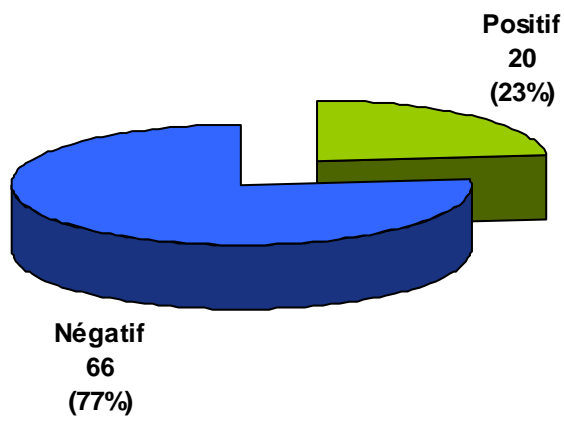


Figure 20 : Pourcentage de cultures de cathéter positives et négatives entre 2008 et 2010 au CHU de Nantes.

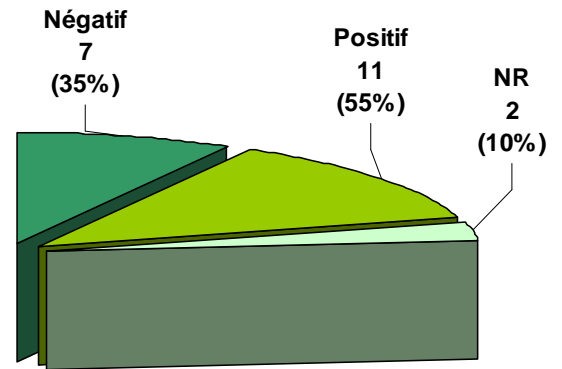


Figure 21 : Pourcentage d'hémocultures positives parmi les 20 patients ayant eu un cathéter positif. (NR = Non Réalisé)

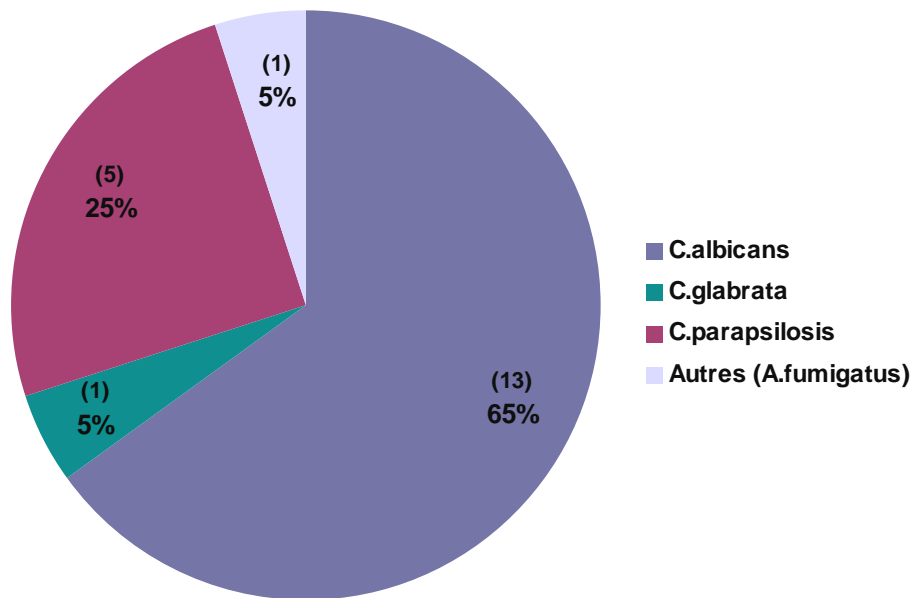


Figure 22 : Espèces isolées par cultures de cathéters entre 2008 et 2010 (n=20)

optimale pour la formation de biofilm. Le résultat retenu est la concentration de 10^6 blastopores par millilitre (données non représentées). Ce résultat est en accord avec les expérimentations réalisées par l'équipe de Ramage avec le XTT [48].

2.1.2. Le temps d'incubation pour la formation du biofilm

Plusieurs souches de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* et *Candida glabrata* ont été sélectionnées pour tester deux durées d'incubation, 24 heures et 48 heures. Les résultats montrent une disparité dans la capacité à former du biofilm entre les souches testées avec en particulier une prédominance de *C. albicans*. En effet, seules les souches CA845, CA073, CA134, CA990 et CK818 réalisent un biofilm dense. A noter la particularité de la souche CK818 par rapport aux autres souches de *C. krusei* (communication personnelle), particularité qu'il serait intéressant d'exploiter. Les résultats montrent également une nette différence dans la capacité à former du biofilm après un temps d'incubation de 24 heures ou de 48 heures pour la quasi-totalité des souches (Figure 23). En effet, après 24 heures l'intensité de fluorescence est toujours plus élevée qu'à 48 heures et peut être jusqu'à dix fois plus élevée. Seule une souche de *Candida albicans* (CA845) obtient une intensité de fluorescence légèrement plus importante à 48 heures. L'étude de Hawser arrive également au même résultat avec un effondrement du biofilm, mais celui-ci intervient après 48 heures [44]. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ces résultats. L'épuisement du milieu après 24 heures, dû à une pousse importante de levures aboutirait à une moindre viabilité du biofilm formé à 48 heures. Une autre explication possible est la saturation du biofilm dans sa formation par manque de surface colonisable dans les puits et un phénomène de quorum sensing [64]. Il pourrait être envisagé un lavage des puits à 24 heures puis le rajout du milieu de culture pour les 24 heures suivantes.

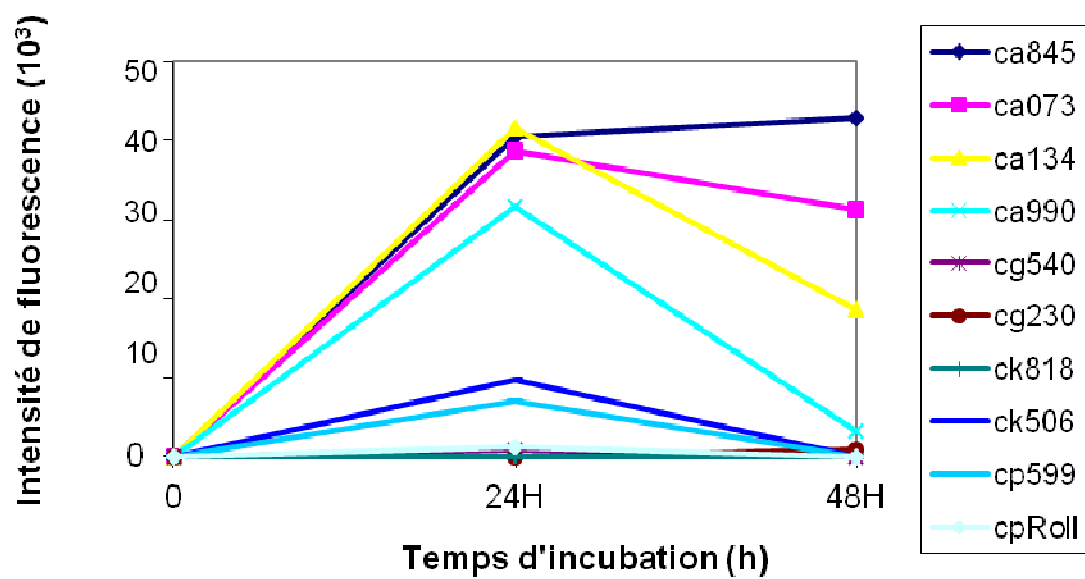


Figure 23: Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'incubation (en Unité Arbitraire de fluorescence)

2.1.3. Le temps d'incubation pour la phase de révélation

Les mêmes souches que précédemment ont été sélectionnées pour tester trois durées d'incubation avec le marqueur résazurine. Une augmentation de l'intensité de fluorescence avec l'augmentation de la durée d'incubation avec la résazurine est observée (Figure 24). On peut noter une saturation de l'intensité de fluorescence aux environs de 50000 UI, bien visible avec la souche CA845. Après 5 heures d'incubation, deux souches (CA845 et CK818) atteignent cette saturation d'intensité de fluorescence ne permettant pas d'apprécier la différence de quantité de biofilm entre ces deux souches. Cette durée d'incubation n'est donc pas optimale. A 1 heure d'incubation avec la résazurine, les valeurs de fluorescence de différentes souches sont assez faibles et ne permettent pas de détecter la formation de biofilms pour certaines souches. Le temps intermédiaire de 2 heures et demi permet quant à lui, d'obtenir des intensités de fluorescence assez discernables les unes des autres, tout en évitant que plusieurs valeurs n'atteignent le seuil de saturation de fluorescence. Ce temps d'incubation sera sélectionné dans le protocole standard. Dans cette expérience, il faut noter que la souche CA990 n'a pas donné un biofilm suffisamment dense pour être révélé par la résazurine.

2.1.4. La présence de sérum bovin fœtal

Afin de s'approcher des conditions physiologiques rencontrées *in vivo*, l'ajout de 5% de sérum bovin fœtal a été testé sur 5 souches de *Candida*. Les résultats (Figure 25) montrent une légère diminution de la capacité à créer du biofilm chez les souches de *Candida albicans* et une complète incapacité à former du biofilm chez les souches de *Candida krusei*.

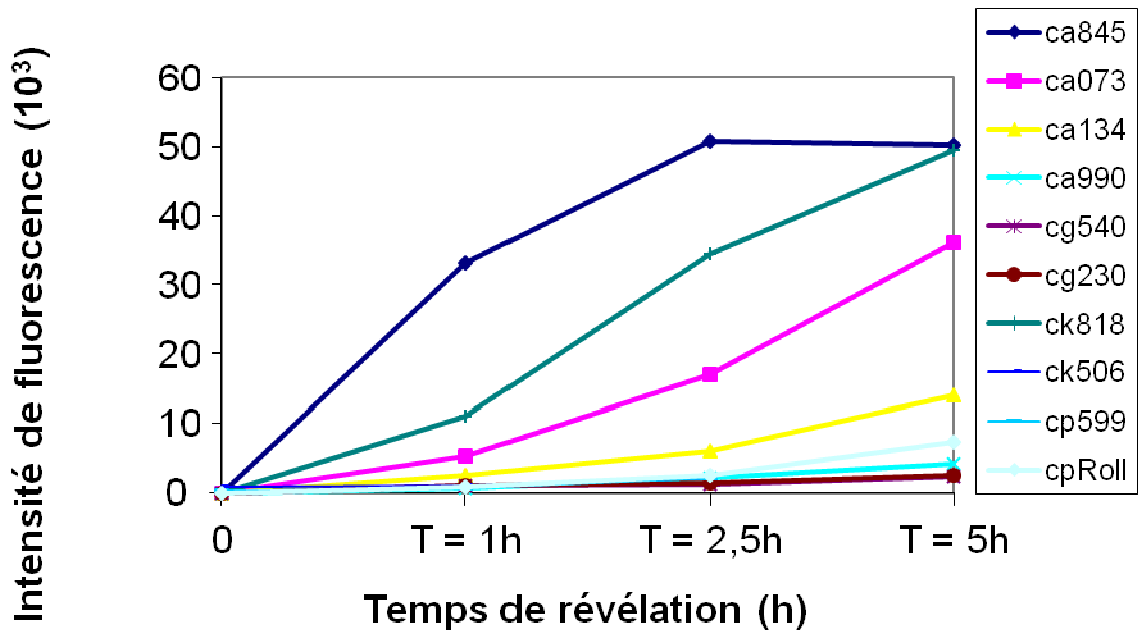


Figure 24: Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la durée d'incubation avec la résazurine (en Unité Arbitraire de fluorescence)

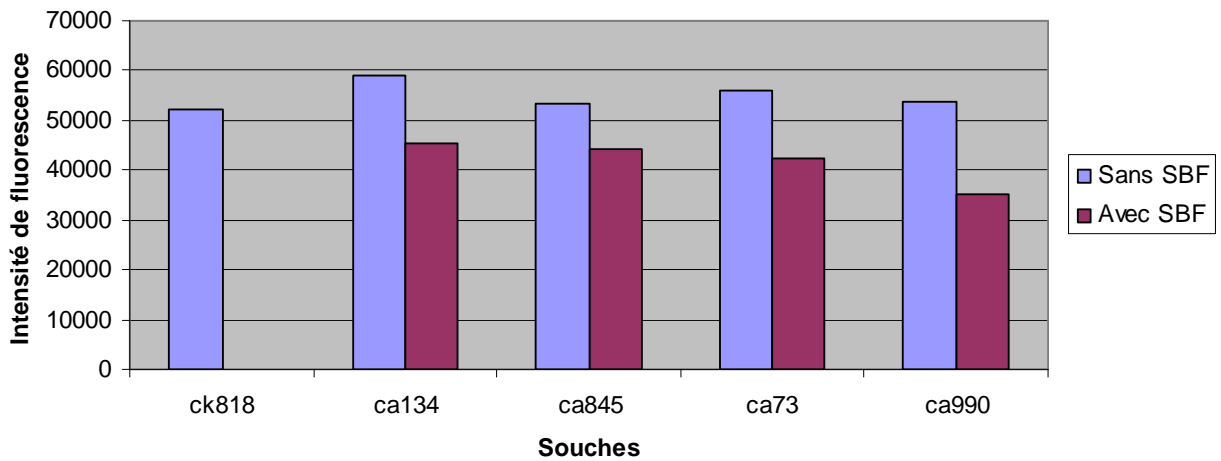


Figure 25: Influence de l'ajout de 5% de sérum bovin foetal dans le milieu de culture sur 4 souches de *Candida albicans* et une souche de *Candida krusei* (en Unité Arbitraire de fluorescence)

2.1.5. Le pH

Les quatre valeurs de pH testées pour le développement du biofilm des différentes souches donnent les résultats résumés dans le graphique de la Figure 26. A l'exception de CK818, le pH optimal de formation du biofilm est de 7, les pH de 5 et 8 diminuant significativement la formation de biofilm. Les protocoles futurs seront réalisés au pH classique de 7.

2.2. Formation de biofilms dans les conditions standardisées

Observation et comparaison du biofilm des différentes souches testées

On note une différence significative dans l'aspect morphologique des biofilms selon les souches. Cette différence de morphologie s'explique par le degré de filamentation de chaque souche (Figure 27 [A] [B] et [C]).

De plus, il semblerait qu'il existe une bonne relation entre la densité de biofilm observée au microscope et l'intensité de fluorescence obtenue grâce à la métabolisation de la résazurine (Figure 27).

3. Formation de biofilms sur cathéter

Trois souches de *Candida albicans* ont été testées afin de déterminer leur capacité à produire du biofilm sur cathéter. Le biofilm des souches CA990, CA134 et CA073 est formé pendant 24 heures sur cathéter en milieu RPMI, avec ou sans 5% de SBF. Les résultats d'intensité de fluorescence montrent que dans tous les cas, du biofilm se forme sur le cathéter. On note également une certaine hétérogénéité entre les souches mais une cohérence avec les résultats obtenus en microplaques puisque la souche CA073 forme

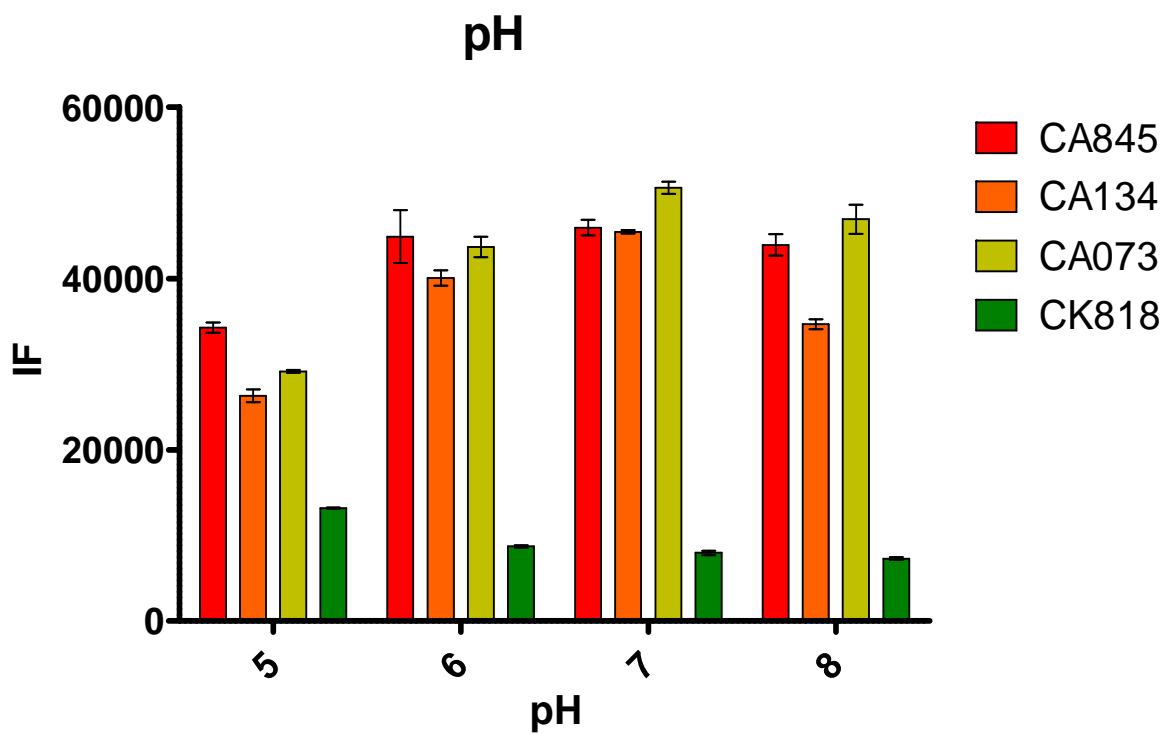
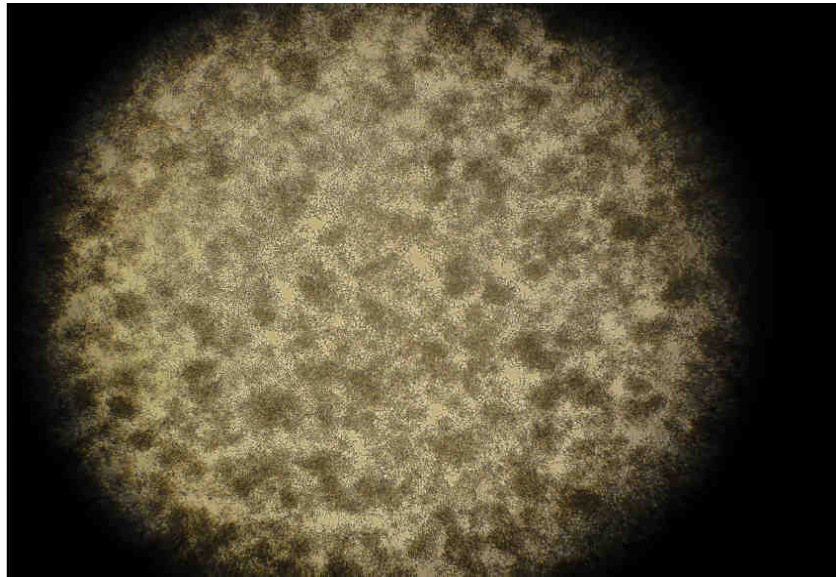
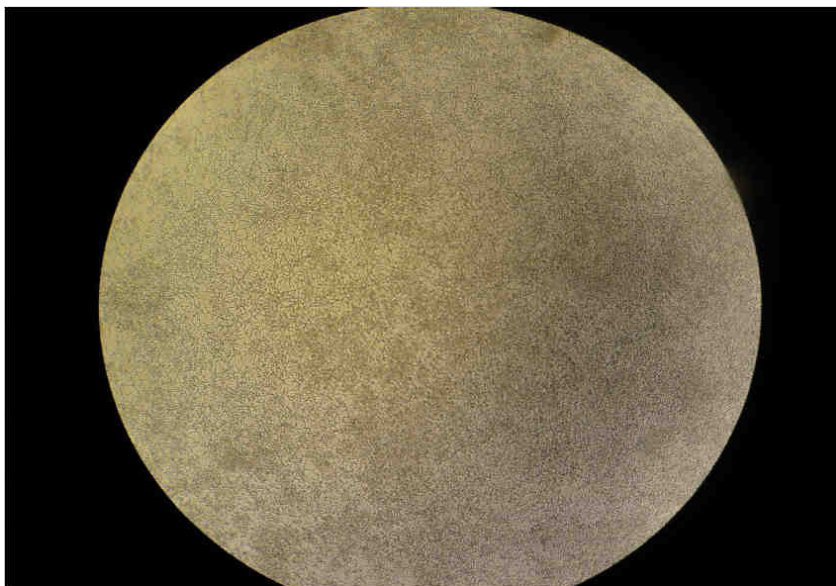


Figure 26: Influence du pH du milieu de culture sur le développement du biofilm de 4 souches de *Candida spp* (en Unité Arbitraire de fluorescence)



[A]

CA 134



[B]

CK 818

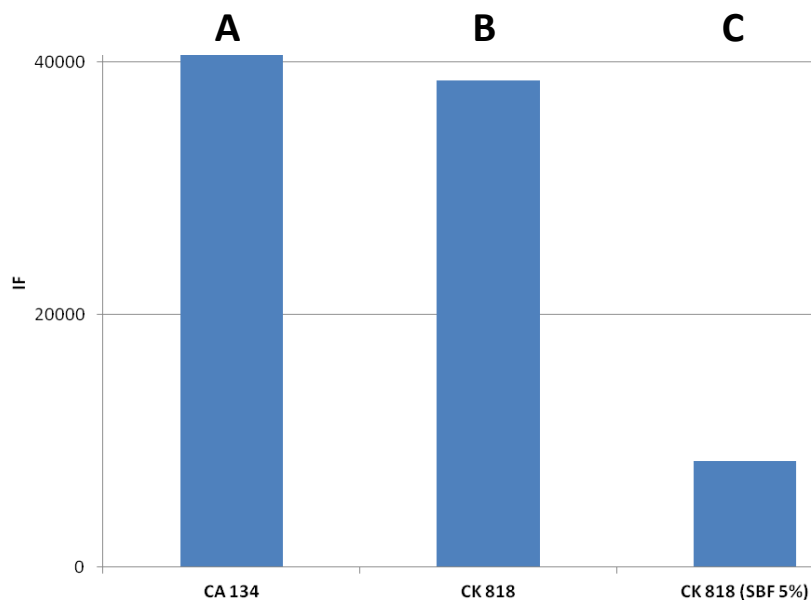


Figure 27: Corrélation entre l'aspect microscopique et l'intensité de fluorescence du biofilm des souches CA 134 [A], CK 818 [B] et CK818 avec 5% de SBF [C] (en Unité Arbitraire de fluorescence)

toujours plus de biofilm. Par contre les niveaux d'intensité de fluorescence ne sont pas comparables avec ceux des biofilms formés dans les puits, en raison de la différence de surface de développement du biofilm ou de la différence du matériau (surface du puits *versus* surface du cathéter). Par ailleurs, on constate que, tout comme dans les expérimentations en microplaques, l'ajout de 5% de SBF diminue la quantité de biofilm formé en 24 heures (Figure 28).

4. Evaluation de médicaments sur le biofilm

Quatre médicaments antifongiques utilisés en clinique ont été utilisés pour vérifier leur action sur un biofilm préformé. Ayant démontré la cohérence des résultats entre biofilms générés en microplaques et sur cathéters, c'est ce premier support qui a été utilisé afin de disposer d'un format adapté aux tests en grandes séries.

4.1. Médicaments azolés

4.1.1. Fluconazole

Le traitement par fluconazole montre l'absence de réduction significative du biofilm fongique quelle que soit l'espèce évaluée (Figure 29). Le plus fort pourcentage d'inhibition est obtenu pour la souche de *C. krusei* 818 avec 18% d'inhibition. Ces résultats sont en accord avec la littérature [48,78,80, 81].

4.1.2. Voriconazole

L'évaluation de cette deuxième molécule azolée confirme la résistance des biofilms fongiques à cette classe d'antifongiques. Ceci est valable pour toutes les souches de

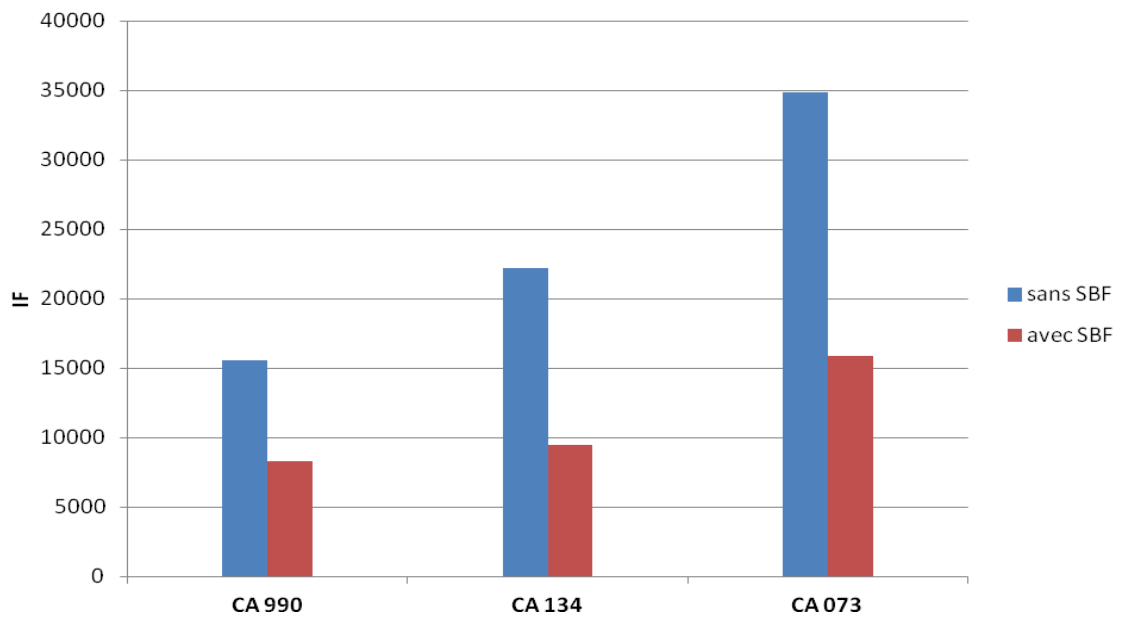


Figure 28: Capacité de formation d'un biofilm de 24 heures sur cathéter avec et sans l'ajout de 5% de SBF (en Unité Arbitraire de fluorescence)

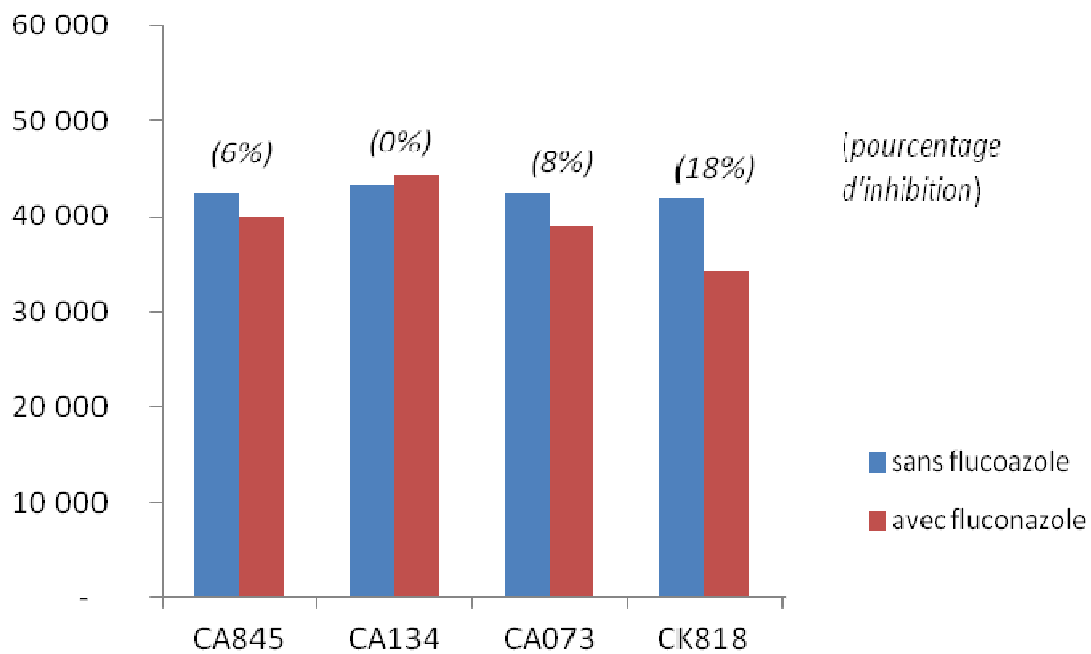


Figure 29: Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition au fluconazole (64µg/mL) durant les 24 dernières heures (en Unité Arbitraire de fluorescence)

C. albicans. Toutefois la sensibilité de la souche de *C. krusei* au voriconazole démontre à nouveau la singularité de cette souche (Figure 30) avec une CI50 proche de 0,250 µg/mL. Dans l'ensemble, l'inefficacité apparente de cette classe sur le biofilm est également retrouvée dans les études de l'équipe de Nweze El et de D. M. Kuhn avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures ou égales à 64 µg/mL pour le fluconazole, le voriconazole et l'itraconazole [79, 82]. Cependant une étude récente obtient une CMI de 2 µg/mL pour le voriconazole [83].

4.2. Amphotéricine B

Cet antifongique permet de réduire la formation du biofilm avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 50% dès 1 µg/mL. Toutefois, par rapport à la sensibilité des souches utilisées en culture planctonique dont les 100% d'inhibition sont obtenus à des concentrations faibles d'amphotéricine B (0,001 à 0,05 µg/mL), des doses élevées sont donc nécessaires (Figure 31). Doses qui ne permettent d'ailleurs jamais une destruction totale du biofilm. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés dans la littérature avec des CMI comprises entre 0,5 µg/mL et 8 µg/mL [79,83].

4.3. Micafungine

La micafungine, dès la concentration de 1 µg/mL, permet une inhibition de 100% du biofilm de la souche CK818. Par contre cette molécule ne permet pas une destruction totale des trois autres souches quelle que soit la dose utilisée. Cependant, pour ces trois autres souches, la micafungine permet la destruction de plus de 50% du biofilm avec des CI50 variant de 0,5 µg/mL à 5 µg/mL (Figure 32). Ces résultats sont bien au-dessus des seuils de

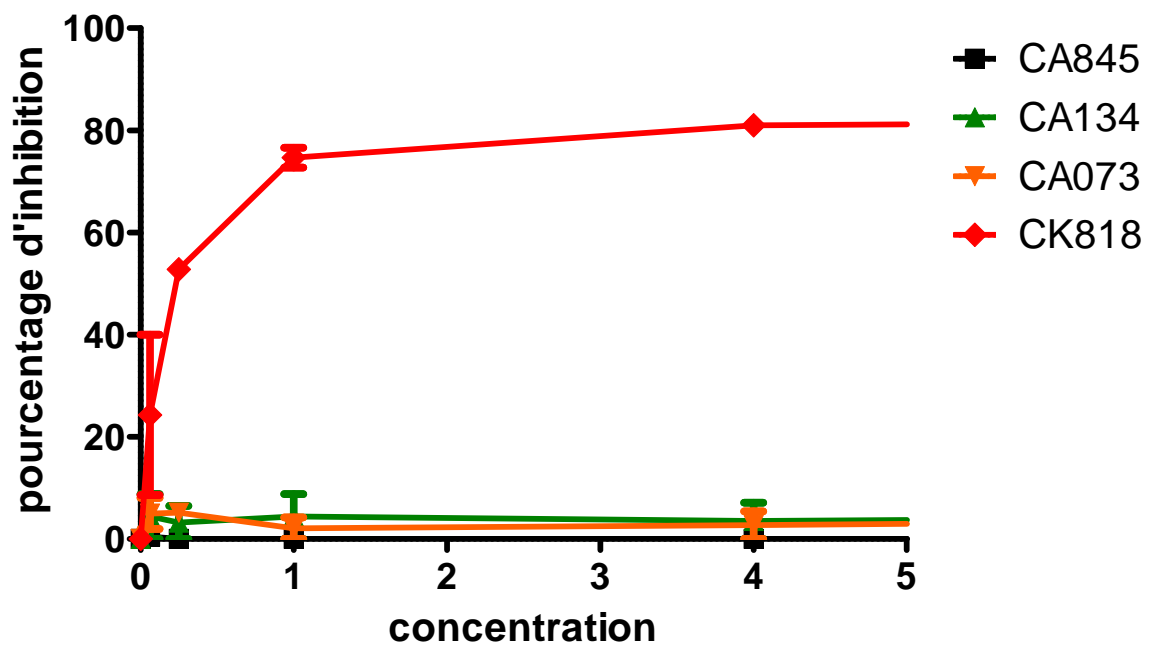
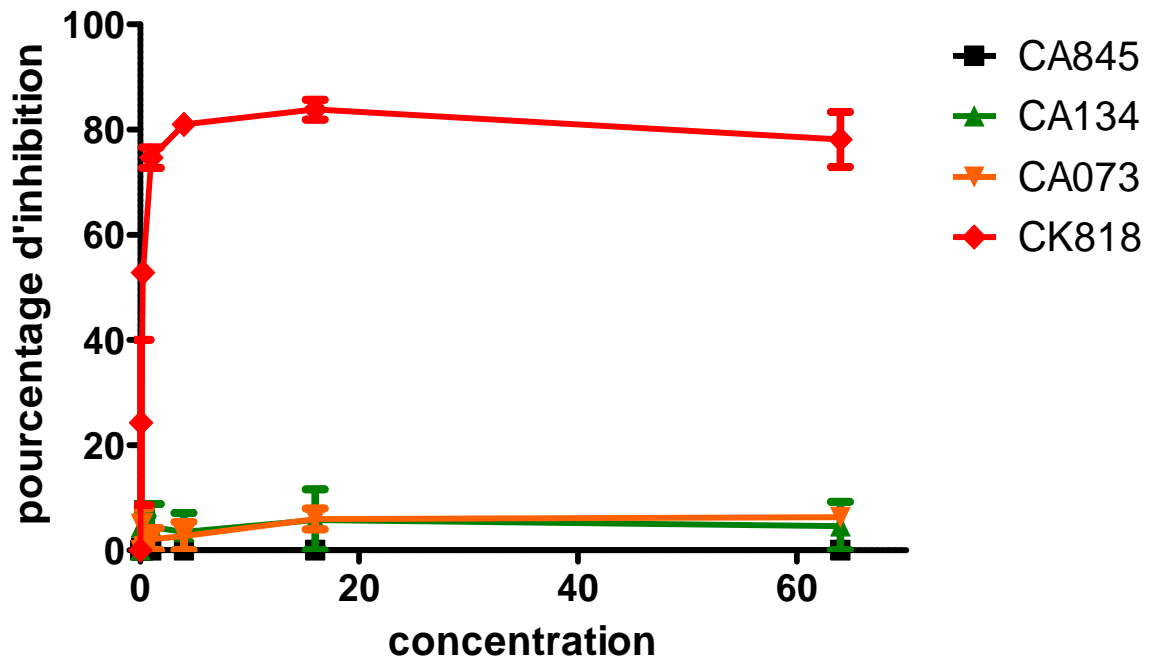


Figure 30: Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition au voriconazole à différentes concentrations, 0 à 64µg/mL [A] et 0 à 4µg/mL [B] durant les 24 dernières heures

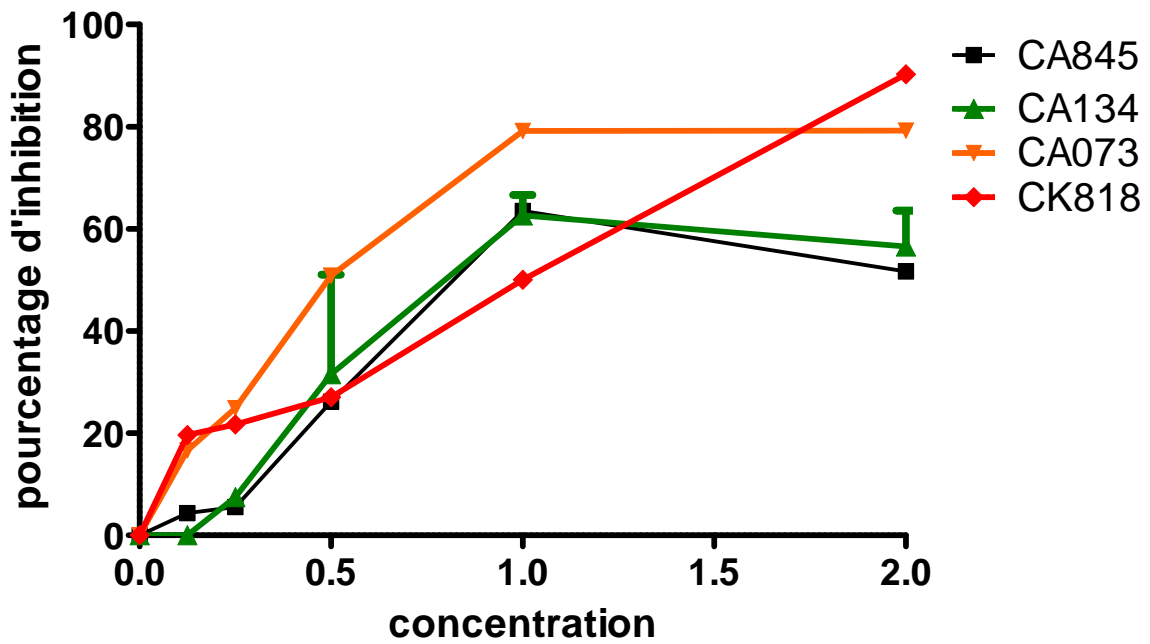
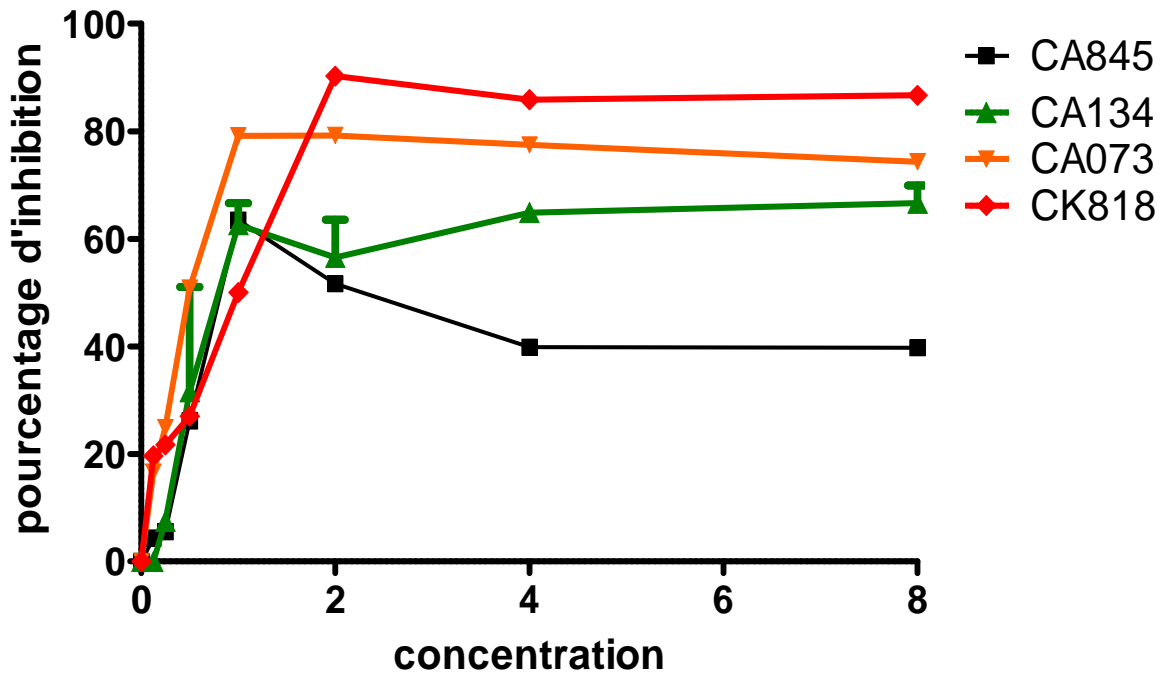


Figure 31: Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition à l'amphotéricine B à différentes concentrations, de 0 à 8 μg/mL [A] et de 0 à 2 μg/mL [B] durant les 24 dernières heures

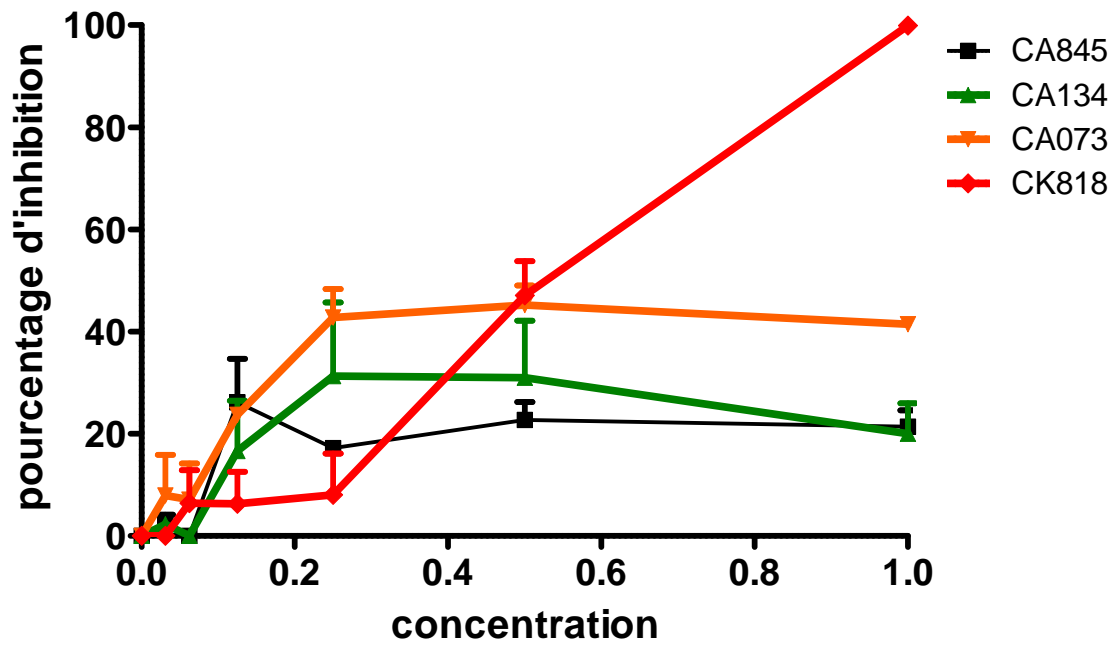
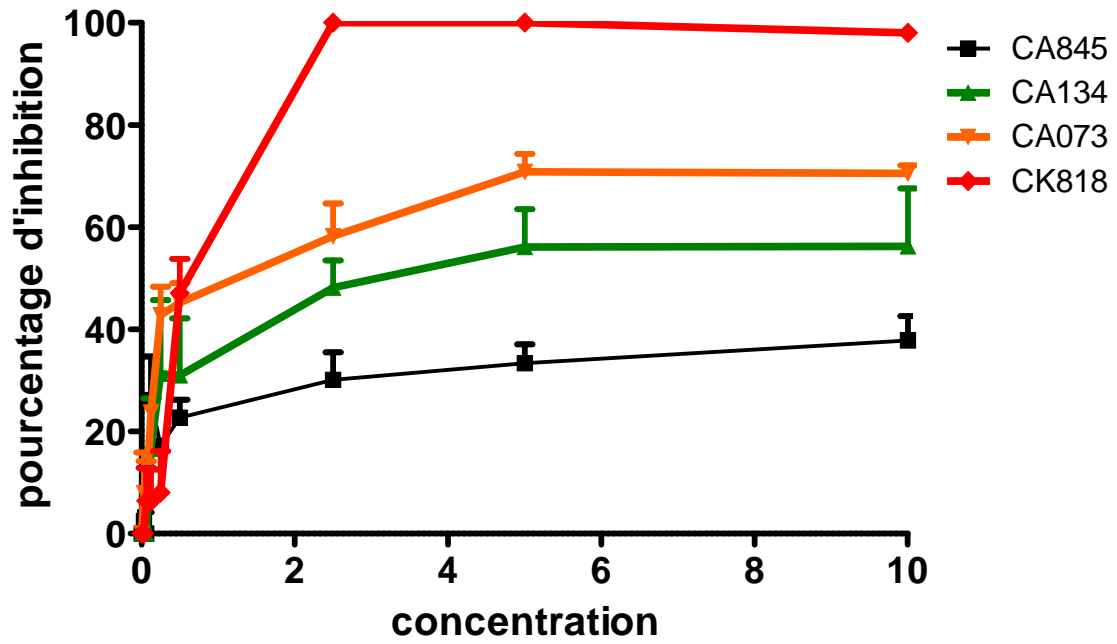


Figure 32: Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition à la micafungine à différentes concentrations, de 0 à 10µg/mL [A] et de 0 à 1µg/mL [B] durant les 24 dernières heures

résistance habituellement retrouvés dans les conditions planctoniques. L'efficacité de ce médicament antifongique peut être qualifiée de moyenne vis-à-vis du biofilm. La micafungine pourrait être classée entre les médicaments antifongiques azolés et l'amphotéricine B d'après nos expérimentations. Hormis la souche CA845, les résultats sont cohérents avec la littérature dans laquelle on trouve des CMI comprises entre 0,125 µg/mL et 2 µg/mL pour la micafungine et des valeurs similaires pour la caspofungine [79, 80, 83].

5. Nouvelles pistes d'action sur le biofilm

Les résultats précédents montrent la nécessité d'explorer de nouvelles pistes de traitement des biofilms fongiques. Dans ce cadre, nous avons évalué une nouvelle molécule qui avait démontré des activités antifongiques vis-à-vis de différentes espèces de *Candida* en culture planctonique ainsi qu'une nouvelle formulation galénique à base de nanoparticules.

Ces étapes d'évaluation *in vitro* constituent une étape préalable à une éventuelle évaluation dans un modèle de candidose invasive chez la souris cathétérisée.

5.1. Nouvelle molécule : la miltéfosine

La miltéfosine a été testée sur le biofilm de trois souches de *Candida albicans*, les souches 845, 073 et 134. L'efficacité de la molécule est équivalente sur ces trois souches. On observe une éradication totale du biofilm dès 10 µg/mL (Figure 33). Les CI50 estimées se situent entre 2 et 2,5 µg/mL, tandis qu'en condition planctonique, celles-ci se situent entre 2 et 4 µg/mL. Avec les échinocandines, ces résultats font de la miltéfosine, la molécule la plus efficace de nos expérimentations sur le biofilm fongique. En effet, cette nouvelle molécule maintient son activité antifongique malgré ce passage de la levure, du mode de vie

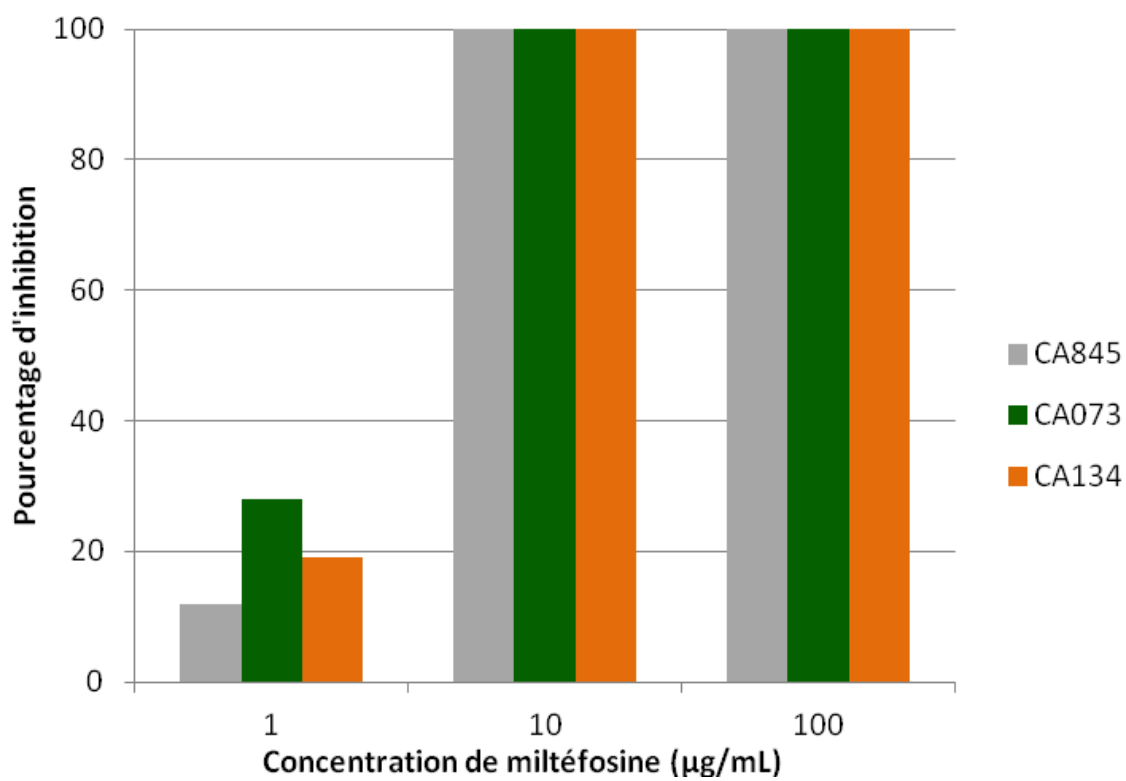


Figure 33: Inhibition des souches CA 845, CA 073 et CA 134 en biofilm exposées à différentes concentrations de miltéfosine

planctonique au mode de vie biofilm.

5.2. Nouvelle approche : la vectorisation par nanoparticules

Deux médicaments antifongiques ont été encapsulés dans les nanoparticules à base de PLA-PEG.

5.2.1. Voriconazole vectorisé

L'encapsulation du voriconazole puis sa vectorisation au sein du biofilm semble améliorer légèrement l'action de la molécule (Figure 34). Toutefois, les pourcentages d'inhibition obtenus ne permettent pas, en l'état, de conclure cette approche comme applicable à une prise en charge des cathéters pour une stratégie de « Lock Therapy » ou verrou thérapeutique. Par contre un élément intéressant est mis à jour : la résistance du biofilm au voriconazole ne semblerait pas passer uniquement par la surexpression de pompe à efflux ou la surexpression de la cible ERG11. Il s'agirait également, d'un problème d'accès à l'agent pathogène.

5.2.2. Amphotéricine B vectorisée

Contrairement au voriconazole, l'encapsulation de l'amphotéricine B et sa vectorisation au sein du biofilm n'améliore pas l'efficacité de la molécule (Figure 35). De plus, aux faibles concentrations, l'amphotéricine B encapsulée semble totalement inefficace. Une difficulté de libération à partir du nanovecteur est peut être à l'origine de cette inefficacité aux faibles concentrations.

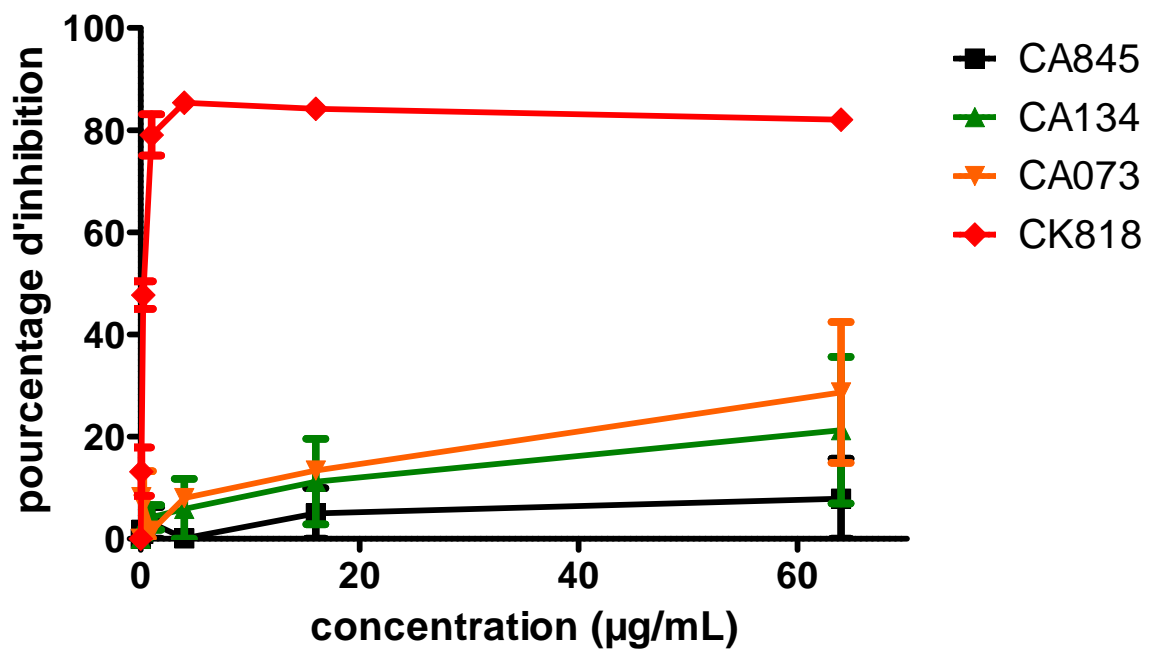
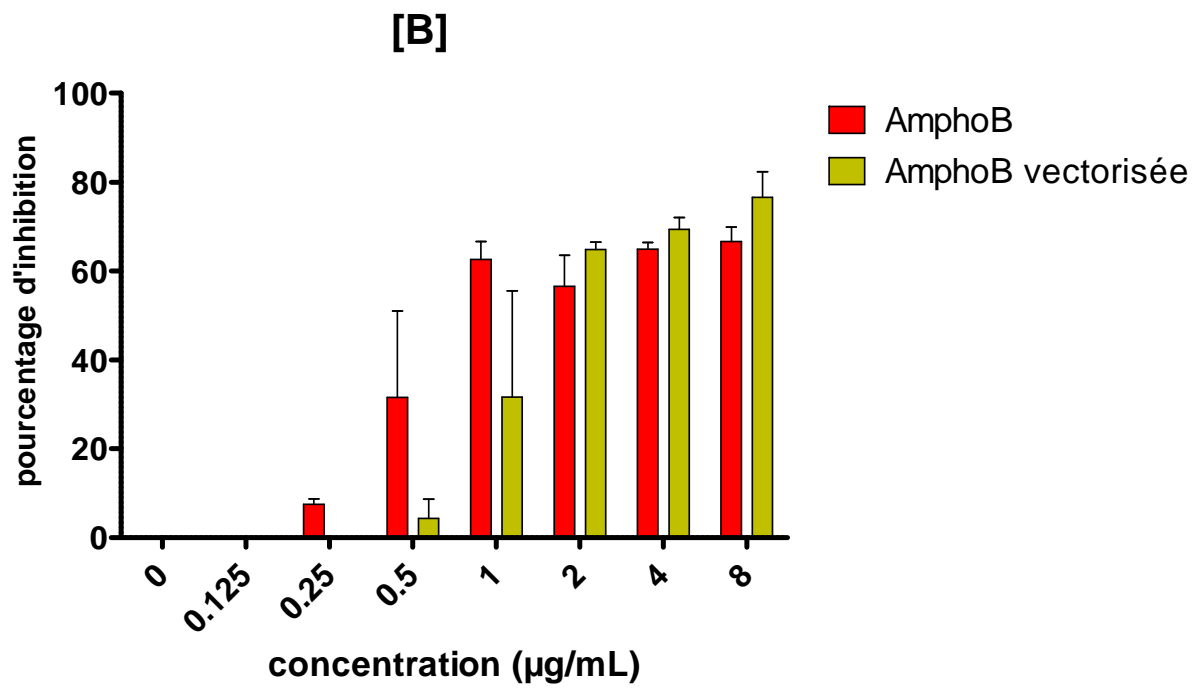
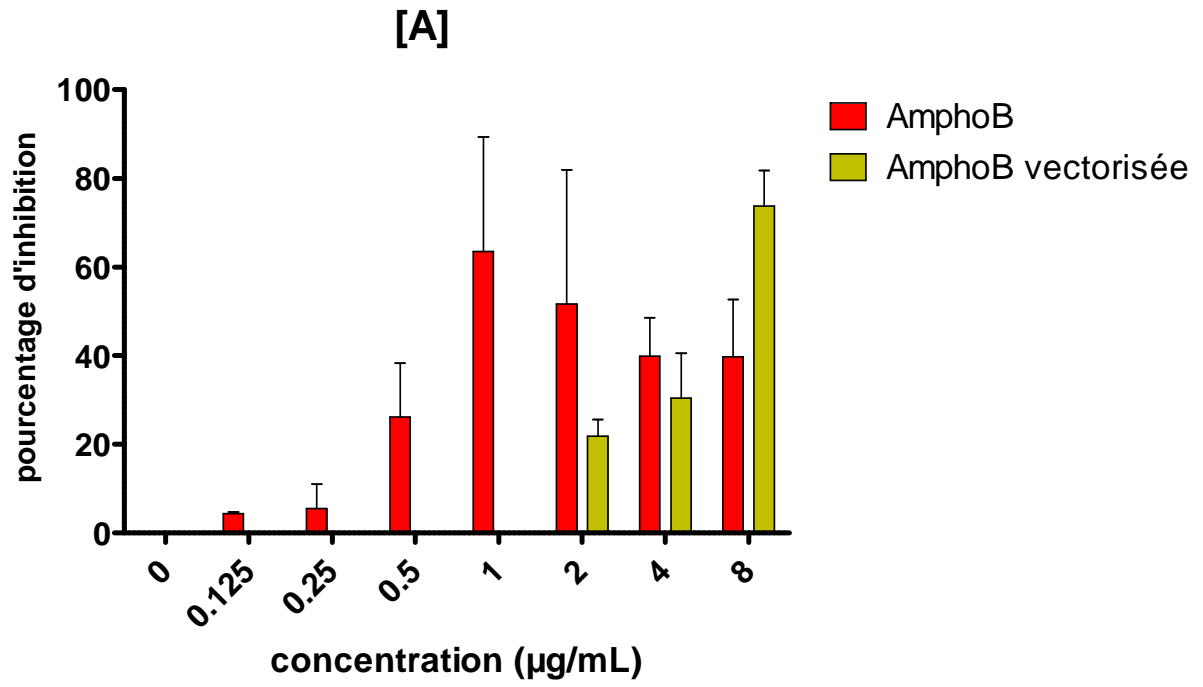


Figure 34: Inhibition de biofilms de 48 heures après une exposition au voriconazole encapsulé à différentes concentrations, 0 à 64µg/mL durant les 24 dernières heures



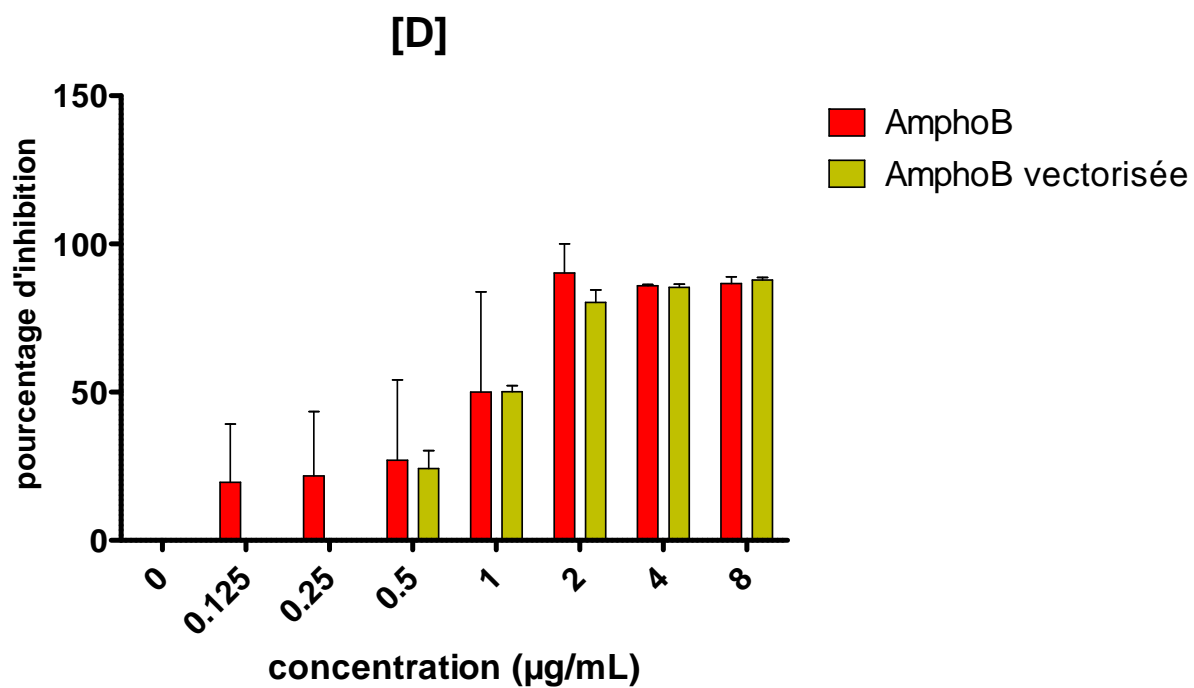
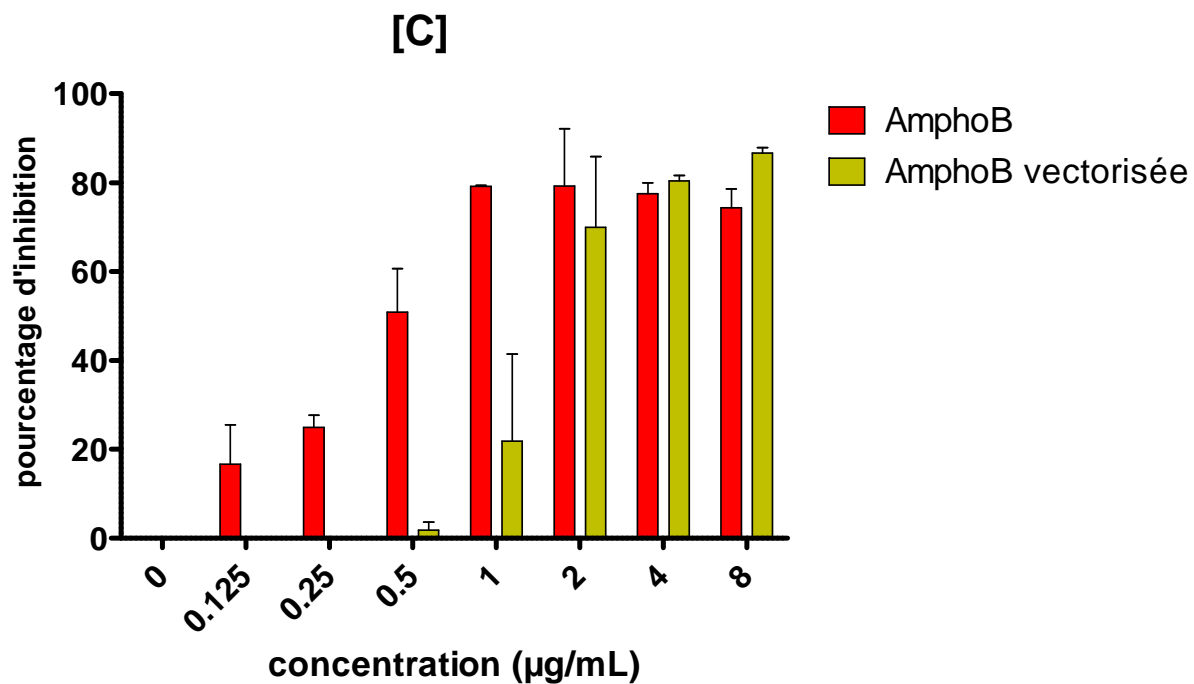


Figure 35: Graphiques comparatifs des pourcentages d'inhibition entre l'amphotéricine B et l'amphotéricine B vectorisée pour les souches CA 845 [A], CA 134 [B], CA 073 [C] et CK 818 [D]

CONCLUSION

Il paraît de plus en plus évident que la formation de biofilms fongiques à *Candida* à la surface des dispositifs médicaux, tels que des cathéters, est un élément fondamental dans la survenue de candidoses invasives ou de candidémies. Durant les dernières années, une augmentation des cas de candidémies a pu être observée de manière internationale, liée à l'augmentation des facteurs de risque. La mortalité attribuable à ce type d'infection à *Candida*, bien qu'assez hétérogène à travers les études, reste significativement élevée. Face à cette forte morbi-mortalité, l'éradication des biofilms va devenir incontournable dans la stratégie thérapeutique. En effet, à ce jour, la stratégie thérapeutique des infections sur les dispositifs médicaux consiste en l'ablation du dispositif. Cette stratégie, pas toujours efficace, est coûteuse et risquée. Mais si les traitements antifongiques classiques sont généralement efficaces sur les levures en condition planctonique, leur efficacité sur les biofilms est fortement diminuée voire quasiment nulle.

La réalisation d'un protocole standard de formation *in vitro* de biofilm fongique à *Candida* en microplaque était indispensable pour une étude approfondie. Bien que seules des expérimentations *in vivo* sur un modèle animal cathétérisé permettraient d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes *in situ* impliqués dans les infections liées aux biofilms à *Candida*, notre modèle *in vitro* basé sur une révélation par la résazurine semble permettre une analogie entre la formation du biofilm sur cathéter et celle sur la surface des puits des microplaques.

Concernant les médicaments antifongiques utilisés en clinique, seules de fortes doses permettent, pour certains d'entre eux, une activité sur le biofilm, n'autorisant pas une

utilisation par voie systémique. La mise en contact directe de fortes doses d'antifongique avec le cathéter colonisé par le biofilm comme évoqué dans la méthode de « Lock Therapy » ou verrou thérapeutique serait alors la seule alternative.

C'est la raison pour laquelle de nouvelles molécules ou de nouvelles formulations pour lutter contre les biofilms ont été évaluées afin de trouver une alternative thérapeutique aux traitements antifongiques classiques, comme c'est le cas pour la miltéfosine qui semble avoir une activité similaire vis-à-vis des levures planctoniques et des biofilms.

L'étude des biofilms fongiques à *Candida* n'en est qu'à ses débuts mais face à l'augmentation des infections invasives à cette espèce, la lutte contre les biofilms mérite d'être approfondie.

ANNEXE 1

Protocole de formation de biofilm de 24 heures

1. Préparation des cultures fongiques (J0)

Les souches de levures à étudier sontensemencées à l'aide d'une anse dans des Erlenmeyer de 25 mL contenant 10 mL de milieu YPD. Elles sont ensuite incubées pendant 12 à 16 heures dans une étuve à agitation à 100 rotations par minute à une température de 30°C.

Dans le cas où l'inoculum souhaité est de faible volume, il est possible de repiquer les souches sur pente Sabouraud et de laisser incubé pendant 24 heures dans une étuve à 37°C.

2. Préparation de l'inoculum à une concentration de 10⁶ cellules par mL et ensemencement de la plaque (J1)

Le contenu des Erlenmeyer est ensuite transféré dans des tubes Falcon de 10mL afin d'être centrifugé à 3000g pendant 5 minutes à une température de 4°C. Le surnageant est jeté.

Deux lavages du culot cellulaire au PBS sont effectués de la façon suivante : les cellules sont remises en suspension par vortexation dans 5 mL de PBS stérile, puis à nouveau centrifugées à 3000g à une température de 4°C pendant 5 min. Le surnageant est jeté. Ces mêmes étapes sont répétées pour le second lavage.

Les cellules fongiques sont remises en suspension par vortexation dans 1 mL de RPMI-1640+MOPS pour obtenir la solution mère.

Une solution diluée au 1/100 est ensuite obtenue par ajout de 10 μL de solution mère dans 990 μL de sérum physiologique. Par comptage sur cellule de Malassez, la concentration de la dilution 1/100 est estimée, afin de déterminer le volume nécessaire de solution mère à prélever pour obtenir la solution fille à 10^6 cellules/mL.

La solution fille est obtenue par ajout du volume de solution mère déterminé préalablement, dans le volume de RPMI-1640+MOPS nécessaire au nombre de puits à réaliser.

Exemple : pour la réalisation de 20 puits de 100 μL

Le compte à la cellule de Malassez est de **106 cellules pour 0,1 mm^3** soit une concentration de la solution diluée (1/100) de **$1,06 \cdot 10^6$ cellules/mL**. La concentration de la solution mère est donc de **$1,06 \cdot 10^8$ cellules/mL**. Afin de réaliser les 20 puits de 100 μL , le volume final de la solution fille doit être de **2 mL** à une concentration de 10^6 cellules/mL, soit une quantité de $2 \cdot 10^6$ cellules fongiques dans la solution. Il faut alors prélever le volume de solution mère contenant cette quantité de cellules, c'est-à-dire **19 μL** qui sont ajoutés à 1981 μL de RPMI-1640+MOPS pour obtenir les 2 mL de solution fille à 10^6 cellules/mL.

Cette suspension est ensuite déposée dans les puits à raison de 100 μL par puits. Trois puits sont remplis de 100 μL de RPMI-1640+MOPS et servent de témoins négatifs. Une fois tous les puits nécessaires remplis, la plaque est incubée en chambre humide pendant 24 heures dans une étuve à 37°C.

ANNEXE 2

Protocole de tests de sensibilité des biofilms à des molécules (J2)

Le surnageant de chaque puits est aspiré avec précaution à l'aide d'un pince-tête ou d'une micropipette en évitant au maximum de toucher le biofilm ou les parois du puits.

Deux lavages des puits par du PBS sont ensuite réalisés de la façon suivante : 200 μ L de PBS sont ajoutés à chaque puits puis aspirés comme au préalable. Cette étape est répétée pour le second lavage.

Les solutions de molécules à tester aux dilutions souhaitées sont préparées dans du RPMI-1640+MOPS. Ces solutions sont ensuite déposées dans les puits concernés à raison de 100 μ L par puits. Les témoins négatifs sont à nouveau remplis de 100 μ L de RPMI-1640+MOPS.

La plaque est incubée en chambre humide pendant 24 heures dans un incubateur à 37°C.

ANNEXE 3

Molécules et réactifs

Afin de réaliser le protocole de formation de biofilm, plusieurs réactifs sont nécessaires (Tableau VII).

Tableau VII : Liste des réactifs

RPMI-1640	RPMI-1640 Medium SIGMA-ALDRICH®
MOPS	Acide 3-morpholino-propanesulfonique SIGMA-ALDRICH®
PBS (10X)	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (10X) CaCl ₂ MgCl ₂ GIBCO®
Milieu Sabouraud	Sabouraud BIOMERIEUX®
DMSO	Dimethylsulfoxid UVASOL® MERCK®
Résazurine	Resazurin sodium salt 7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one SIGMA-ALDRICH®

De plus, pour évaluer la sensibilité du biofilm, cinq molécules ont été utilisées. Deux médicaments antifongiques azolés, le fluconazole et le voriconazole, deux autres médicaments antifongiques, la micafungine et l'amphotéricine B, et une molécule qui s'inscrit dans une nouvelle approche, la miltéfosine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Eggimann P., Pittet D.** Candidémie et candidoses généralisées. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Anesthésie-Réanimation*, 36-983-D-10, 2010.
- [2]. **Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD.** Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:419-25.
- [3]. **Whisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.
- [4]. **Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL.** Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34:344-53.
- [5]. **Marchetti O, Bille J, Fluckiger U.** Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends 1991-2000. *Clin Infect Dis* 2004;38:311-20.
- [6]. **Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Gaustad P, Haukland HH, Steinbakk M.** Constant low rate of fungemia in Norway, 1991 to 1996. The Norwegian Yeast Study Group. *J Clin Microbiol* 1998;36:3455-9.
- [7]. **Honderlick P, Gravisse J, Cahen P, Vignon D.** Is there a change in ecology of *Candida species* incriminated in fungemia? A 7 years study at Foch Hospital. *Pathol Biol* 2007;55:531-3.
- [8]. **Bedini A, Venturelli C, Mussini C.** Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:75-80.
- [9]. **Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, De RT, Maertens J, Van WE.** Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:541-7.
- [10]. **Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R.** *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994;220:751-8.
- [11]. **Saiman L, Ludington E, Dawson JD.** Risk factors for *Candida species* colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1119-24.
- [12]. **Charles PE, Dalle F, Aube H.** *Candida spp.* colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intensive Care Med* 2005;31:393-400.
- [13]. **Richet HM, Andreumont A, Tancrede C, Pico JL, Jarvis WR.** Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocytic leukemia. *Rev Infect Dis* 1991;13:211-5.
- [14]. **Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM.** Risk factors for candidial bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* 2001;33:177-86.
- [15]. **Fluckiger U, Marchetti O, Bille J.** Treatment options of invasive fungal infections in adults. *Swiss Med Wkly* 2006;136:447-63.

- [16]. Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte 2004.
- [17]. **Velasco E, Portugal RD.** Factors prompting early central venous catheter removal from cancer patients with candidaemia. *Scand J Infect Dis* 2011;43:27-31.
- [18]. **Nucci M, Anaissie E, Betts RF, Dupont BF, Wu C, Buell DN, Kovanda L, Lortholary O.** Early removal of central venous catheter in patients with candidemia does not improve outcome: analysis of 842 patients from 2 randomized clinical trials. *Clin Infect Dis* 2010;51:295-303.
- [19]. Série de critères de qualité pour l'évaluation et l'amélioration des pratiques professionnelles – Pose et entretien des cathéters veineux périphérique. SFHH-HAS-Avril 2007.
- [20]. **Institut de Veille Sanitaire.** Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006.
- [21]. **Ruesch S, Walder B, Tramèr MR.** Complications of central venous catheters: internal jugular versus subclavian access-a systematic review. *Crit Care Med* 2002;30:454-60.
- [22]. **Renaud B, Brun-Buisson C.** Outcomes of primary and catheter-related bacteremia. A cohort and case-control study in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1584-90.
- [23]. **Sherertz RJ, Ely EW, Westbrook DM, et al.** Education of physicians-in-training can decrease the risk for vascular catheter infection. *Ann Intern Med* 2000;132:641-8.
- [24]. **O'grady NP, Alexander M, Dellinger EP, et al.** Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Am J Infect Control* 2002;30:476-89.
- [25]. **Eggimann P, Harbarth S, Constantin MN, Touveneau S, Chevrolet JC, Pittet D.** Impact of a prevention strategy targeted at vascular-access care on incidence of infections acquired in intensive care. *Lancet* 2000;355:1864-8.
- [26]. **Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL.** *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 2005;4:633-8.
- [27]. **Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY.** cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:584-9.
- [28]. **Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 1987;41:435-464.
- [29]. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995;49:711-745.
- [30]. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
- [31]. **Donlan, R. M.** Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* 2001;33:1387-1392.
- [32]. **Donlan, R. M.** Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2001;7:277-281.

- [33]. **Douglas, L. J.** Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev. Iberoam. Micol.* 2002;9–143.
- [34]. **Kojic, E. M., and R. O. Darouiche.** *Candida* infections of medical devices. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004;17:255–267.
- [35]. **Baillie, G. S., and L. J. Douglas.** *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol.* 1999;310:644–656.
- [36]. **Baillie, G. S., and L. J. Douglas.** Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42:1900–1905.
- [37]. **Baillie, G. S., and L. J. Douglas.** Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42:2146–2149.
- [38]. **Baillie, G. S., and L. J. Douglas.** Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000;46:397–403.
- [39]. **Baillie, G. S., and L. J. Douglas.** Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 1999;48:671–679.
- [40]. **Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick, and M. A. Ghannoum.** Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 2001;183:5385–5394.
- [41]. **Chandra, J., P. K. Mukherjee, S. D. Leidich, F. F. Faddoul, L. L. Hoyer, L. J. Douglas, and M. A. Ghannoum.** Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J. Dent. Res.* 2001;80:903–908.
- [42]. **Hawser, S.** Adhesion of different *Candida spp.* to plastic: XTT formazan determinations. *J. Med. Vet. Mycol.* 1996;34:407–410.
- [43]. **Hawser, S. P., G. S. Baillie, and L. J. Douglas.** Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 1998;47:253–256.
- [44]. **Hawser, S. P., and L. J. Douglas.** Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun.* 1994;62:915–921.
- [45]. **Millsap, K. W., R. Bos, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher.** Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie Leeuwenhoek* 1999;75:351–359.
- [46]. **Raad, I., I. Chatzinikolaou, G. Chaiban, H. Hanna, R. Hachem, T. Dvorak, G. Cook, and W. Costerton.** *In vitro* and *ex vivo* activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47:3580–3585.
- [47]. **Ramage, G., S. Bachmann, T. F. Patterson, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot.** Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002;49: 973–980.
- [48]. **Ramage, G., K. Vande Walle, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot.** Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45:2475–2479.

- [49]. **Andes, D., J. Nett, P. Oschel, R. Albrecht, K. Marchillo, and A. Pitula.** Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect. Immun.* 2004;72:6023–6031.
- [50]. **Schinabeck, M. K., L. A. Long, M. A. Hossain, J. Chandra, P. K. Mukherjee, S. Mohamed, and M. A. Ghannoum.** Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:1727–1732.
- [51]. **Chaffin, W. L., J. L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martinez.** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62:130–180.
- [52]. **Holmes, A. R., R. D. Cannon, and H. F. Jenkinson.** Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 1995;15:208–213.
- [53]. **Kuhn, D. M., J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum.** Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* 2002;70:878–888.
- [54]. **Ramage, G., K. VandeWalle, J. L. Lopez-Ribot, and B. L. Wickes.** The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002;214:95–100.
- [55]. **Ramage, G., K. VandeWalle, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot.** Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 2001;18:163–170.
- [56]. **Li, X., Z. Yan, and J. Xu.** Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 2003;149:353–362.
- [57]. **Ramage, G., K. Vande Walle, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot.** Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:3234–3240.
- [58]. **Brown, A. J., and N. A. Gow.** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 1999;7:333–338.
- [59]. **Brown, A. J. P.** Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*, p. 95–106. In R. A. Calderone (ed.), *Candida and candidiasis*. *ASM Press, Washington, D.C.*
- [60]. **Gow, N. A., A. J. Brown, and F. C. Odds.** Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002;5:366–371.
- [61]. **Garcia-Sanchez, S., S. Aubert, I. Iraqui, G. Janbon, J. M. Ghigo, and C. d’Enfert.** *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot. Cell* 2004;3:536–545.
- [62]. **Kelly, M. T., D. M. MacCallum, S. D. Clancy, F. C. Odds, A. J. Brown, and G. Butler.** The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol. Microbiol.* 2004;53:969–983.
- [63]. **Krueger, K. E., A. K. Ghosh, B. P. Krom, and R. L. Cihlar.** Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*. *Microbiology*

2004;150:229–240.

- [64]. **Hornby, J. M., E. C. Jensen, A. D. Lisec, J. J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault, and K. W. Nickerson.** Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67:2982–2992.
- [65]. **Hawser, S. P., H. Norris, C. J. Jessup, and M. A. Ghannoum.** Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy – 4 – nitro – 5 - sulfophenyl) - 5 [(phenylamino)carbonyl] - 2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:1450–1452.
- [66]. **Kuhn, D. M., and M. A. Ghannoum.** *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2004;5:186–197.
- [67]. **Ramage, G., B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot.** Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am. Clin. Lab.* 2001;20:42–44.
- [68]. **Rodríguez-Hernández MJ, Ruiz-Pérez de Pipaon M, Márquez-Solero M et al.** Candidemias: multicentre analysis in 16 hospitals in Andalusia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:328-333.
- [69]. **Motta AL, Almeida GM, de Almeida Júnior JN, Burattini MN, Rossi F.** Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis.* 2010;14:441-8.
- [70]. **J.-P. Talarmin , D. Boutoile, P. Tattevin et al.** Épidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'Ouest de la France. *Médecine et maladies infectieuses* Volume 39, numéro 12 pages 877-885 (décembre 2009)
- [71]. **C. Kibbler.** Évolution de l'épidémiologie des candidoses et aspergilloses invasives. *Médecine et maladies infectieuses* Volume 37, numéro S2 pages 2-4 (2007)
- [72]. **Morace G, Borghi E.** Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. *Minerva Anesthesiol.* 2010;76:950-6.
- [73]. **Eggimann P, Garbino J, Pittet D.** Epidemiology of *Candida species* infections in critically ill non-immunosuppressed patient. *Lancet Infect Dis* 2003;3:685-702.
- [74]. **Douglas LJ.** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003;11:30-6.
- [75]. **Lazzell AL, Chaturvedi AK, Pierce CG, Prasad D, Uppuluri P, Lopez-Ribot JL.** Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:567-70.
- [76]. **Motabar O, Shi ZD, Goldin E, Liu K, Southall N, Sidransky E, Austin CP, Griffiths GL, Zheng W.** A new resorufin-based alpha-glucosidase assay for high-throughput screening. *Anal Biochem.* 2009;390:79-84.
- [77]. **Labbé AC, Pépin J, Patiño C, Castonguay S, Restieri C, Laverdiere M.** A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2009;20:45-50.

- [78]. **Hawser, S.P. and Douglas, L.J.** Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2128–2131
- [79]. **Kuhn, D.M. et al.** Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1773–1780
- [80]. **Bachmann, S.P. et al.** In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46,3591–3596
- [81]. **Ramage, G. et al.** *In vitro* pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilmsdetermined by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46,3634–363.
- [82]. **Nweze EI, Ghannoum A, Chandra J, Ghannoum MA, Mukherjee PK.** Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2012:149-53.
- [83]. **Shinde RB, Chauhan NM, Raut JS, Karuppayil SM.** Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:27

GRINAND Nicolas, Paul, Pierre

Titre de la thèse : Les biofilms à *Candida spp* : Epidémiologie et sensibilité
aux antifongiques

Résumé de la thèse :

Les biofilms sont un mode de vie de microorganismes vivant en communauté, fixés à une surface et organisés en une structure tridimensionnelle. Le biofilm formé par les différentes espèces de *Candida* est impliqué dans les infections humaines notamment par le biais de la colonisation de dispositifs médicaux comme les cathéters. Ces infections ont un mauvais pronostic avec des candidoses invasives et des candidémies. Le premier objectif de notre étude était d'évaluer l'épidémiologie de ces infections au sein du CHU de Nantes. Plusieurs méthodes d'étude des biofilms fongiques *in vitro* existent. La méthode au XTT semble la plus utilisée dans la littérature. Le second objectif de notre étude était de mettre en place un protocole standard de formation de biofilm *in vitro* et de révélation avec la résazurine sur 10 souches de *Candida* isolées dans le laboratoire de Parasitologie et Mycologie du CHU de Nantes. Nous avons pu observer une grande diversité dans la capacité des souches à former du biofilm dans les conditions standard. Par ailleurs, la formation de biofilm varie pour une souche donnée en fonction des conditions expérimentales (milieu de culture, pH, présence de sérum bovin fœtal). Ce protocole standard nous a permis d'évaluer la formation du biofilm fongique sur un cathéter et d'évaluer la sensibilité du biofilm de ces souches cliniques, à cinq molécules et à une nouvelle formulation galénique. Ces expérimentations *in vitro* sont une étape incontournable avant une éventuelle évaluation dans un modèle de candidose invasive chez la souris cathétérisée afin d'améliorer les moyens de lutte contre les biofilms.

Mots clés : CANDIDA, BIOFILM, CATHETER

Jury

- **PRESIDENT :** Madame le Pr. Muriel DUFLOS, Professeur de Chimie Organique – Faculté de Pharmacie - Nantes
 - **ASSESEURS :** Monsieur le Pr. Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie et Mycologie Médicale – Faculté de Pharmacie - Nantes
Monsieur le Dr. Michel MIEGEVILLE, Maître de conférences et Praticien Hospitalier de Parasitologie et Mycologie Médicale – Faculté de Médecine - Nantes
-