



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



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

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

**Mémoire présenté en vue l'obtention du diplôme:**

**Master en Biologie**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

## **Thème**

Contribution à l'étude des mécanismes de  
résistance des isolats de *Candida albicans*  
vis-à-vis de la chlorhexidine

**Présenté par : M<sup>lle</sup>. SAIDI Soumia**

**M<sup>lle</sup>. NEDDAF Imane**

**Soutenue publiquement devant le jury :**

<b>HACHEM KADDA</b>	<b>Maitre assistant A</b>	<b>Président</b>
<b>AMMAM Abdelkader</b>	<b>Maitre de conférences B</b>	<b>Examineur</b>
<b>HALLA Noureddine</b>	<b>Maitre assistant A</b>	<b>Encadreur</b>

**Année Universitaire : 2016-2017**

# **Remerciement**

*Nous remercions en premier lieu Allah le tous puissant de nous avoir illumine  
et ouvert les portes de savoir, et de nous avoir donne la volonté et le courage  
d'élaborer ce travail.*

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

*Notre encadreur monsieur HALLA Noureddine*

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

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

*Mr. Hachem Kadda. maitre de class A à la faculté des sciences de l'université  
Dr. Moulay tahar*

*–Saida- d'être examinateur.*

*Sans oubliée tous les professeur dans le département de biologie dans  
l'université Dr . MOULAY TAHAR*

*–Saida-*

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

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

# *Dédicace*

*Je tiens a dédié se travail à mes parent pour leur tendresse et que ne  
cesserais de les aimer toute ma vie. et à mon professeur Mr Halla .N*

*Mes soeurs Melouka, ibtessem ,Ikram et le petite Férie Mostapha et  
a tous la famille SAIDI.*

*Cher amis :Chikh , imane , kheira ,sara et Halima*

*Et a toutes mes amis de proche ou de loin.*

*Melle : soumia*

# *Dédicace*

*Je tiens a dédié se travail à mes parent pour leur tendresse et que ne cesserais de les aimer toute ma vie, et à mon professeur Mr Halla N.*

*Mes sœurs : Ahlem , Amina , Djihane , Chaima et touta, halouma et à tous la famille NEDDAF et MEZIANE*

*Et a toutes mes amis de proche ou de loin.*

.

**Melle : Imane**

# Plan de Travail

*Retracement*

*Dédicas*

*Liste des tableaux* .....

*Liste des figures*.....

Liste des abréviations.....

Introduction Générale ..... 1

## PAETIE1 : synthèse bibliographique

### *Chapitre I : Candida albicans*

I.1 candida albicans ..... 3

I.2 Morphologie et reproduction ..... 4

I.3 Reproduction sexuée chez C. albicans ..... 4

I.4 Génome ..... 4

I.5 Forme de résistance ..... 4

I.6 Structure cellulaire ..... 5

I. 6-1-La paroi ..... 6

I. 7-La formation de bio film ..... 6

I.8 HABITATS ..... 8

I.9 Caractères physiologiques de Candida albicans : ..... 9

I.9-1- Milieu de vie ..... 9

I. 9-2- PH :	9
I.9 Caractères physiologiques de Candida albicans	9
I.9-4-Nutrition	9
I.9-5- biochimique	
.9-5-1-Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence	9
I. 9-5-2-L'adhérence aux surfaces	10
I.9-5-3-La formation de mycéliums vrais et de pseudomycéliums	10
I.9-5-4-L'interférence avec la phagocytose	11
I.9-6-Les enzymes	11
I.10- Variabilité phénotypique	11
I.10-1-Variabilité morphologique	11
I.10-2- Variabilité antigénique	11
I.11- Facteurs sécrétés	12
I.12-Prélèvement	12
I.13- Examen direct	13
I.14-Culture :	14
I.14-1. Isolement	14
I.14-2. Identification	15

14-2. a-Techniques d'identifications :	15
I.1.5-Sérologie et antigénémie :	15
I.6-1-Candidoses buccales et digestives	16
I.16-2-Candidoses gastro-intestinales	17
I.16-3-Candidoses génitales	17
16-6-. Onychomycoses candidosiques :	17
17-1. Traitement	18
17-1. Traitement chimique	18
17-2. Traitement naturel	19

## ***Chapitre II : Chlorhexidine***

II.1 Historique :	21
II.2 Définition	21

<i>II.3 Structure chimique</i> .....	22
<i>II.4 Effet attendus de la chlorhexidine</i> .....	26
<i>II.4.1 Effets antiplaque</i> .....	26
<i>II.4.2. Effet antibactériens</i> .....	26
<i>II.4.2.1 A basse concentration</i> .....	26
<i>II.4.2.2 A hauteconcentration</i> .....	26
<i>II.4.3. Effet cariostatiques</i> .....	26
<i>II.4.4 Effet antifongique sur Candida albicans</i> .....	27



<i>II.5 Facteurs d'interaction</i> .....	27
<i>II.6.1. Principal :pH</i> .....	27
<i>II.6.2 Secondaires</i> .....	27
<i>II.6.3 Fluorure de sodium</i> .....	27
<i>II.6.2.2 Lauryl sulfate de sodium</i> .....	28
<i>II.6.2.3 Calcium</i> .....	28
<i>II.6.2.4Composition salivaire</i> .....	28
<i>II.7 Effets indésirables de la Chlorhexidine</i> .....	29
<i>II.7.1 Sensation de sécheresse buccale</i> .....	29
<i>II.8. Gonflement des parotides</i> .....	29

<i>II.8.1 Altération dugout</i> .....	29
<i>II.8.2 Infection virale</i> .....	29
<i>II.8.2.1 Coloration</i> .....	29
<i>II.8.2.2 Toxicité de Chlorhexidine:</i> .....	29

## ***Chapitre III : Matériel et Méthode***

III. Matériel: .....	36
I. Méthodes : .....	36
1.1. Prélèvement .....	36
2.2. Isolement : .....	37
2.3. Identification : .....	37
2.3.1. Examen macroscopique .....	37
2.3.2. Examen microscopique .....	37
2.3.3. Test de blastèse .....	38
2.3.4. Test de chlamydosporulation .....	38
2.3.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par La méthode des micro-dilutions sur milieu liquide .....	39
2.3.6. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) : .....	42

2.3.7 Dosage de l'ergosterol membranaire de 3 souches de *Candida albicans* ..... :42

## ***Chapitre IV: Matériel et Méthode***

1. Prélèvement, isolement et identification de <i>Candida albicans</i> : .....	46
2. Observation macroscopique.....	47
3. Observation microscopique .....	47
4. Test de Blastèse .....	47
5. Test de chlamydosporulation: .....	47
6. Étude de la résistance de <i>Candida albicans</i> .....	48
7. Quantification de l'ergostérol membranaire de <i>Candida albicans</i> .....	50
8. les taux d'ergostérol membranaire de trois souches répéter de <i>Candida albicans</i> ...	54
Conclusion Générale .....	56
Bibliographie .....	58

Annexe

## Liste des Figures

**Figure n° 1** : Morphologie de *C. albicans*. L : blastospores et blastospores bourgeonnantes, B : amas de blastospores, F : filaments mycéliens, C : chlamydo-spores Caractéristiques de *C. albicans*. D'après Segretain et coll.

**Figure n°2**: Les différents constituants de la paroi fongique

**Figure n°3** :Organisation moléculaire de la paroi de *Candida albicans*

**Figure n°4**: La formation de biofilm

**Figure n°05**: Levures et pseudo-filaments

**Figure n°6**: Levures et pseudofilaments de levures observés au bleu de méthylène

**Figure n°7** : Stomatite érythémateuse

**Figure n°8** : Muguet profus

**Figure n°9** : Structure chimique de l'amphotéricine B

**Figure n° 10**: Structure chimique de l'itraconazole, du fluconazole, du posaconazole et du voriconazole

**Figure n°11** : Structure chimique de la Chlorhexidine

**Figure 12**: Ensemencement par strie

**Figure 13**:Colonies de *Candida albicans*

**Figure 14**: *Candida albicans* par microscope optique

**Figure n°15** : les 2 dilutions de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

**Figure 16**: procédure de remplissage de microplaque

**Figure n°17** : utilisation de la microplaque (La méthode des micro-dilution sur milieu liquide RPMI )

**Figure n°18** : Formation de tube germinatif caractéristique de *Candida albicans* sous microscope optique l'objectif x40

**Figure n°19**: Formation de chlamydospores caractéristique de *Candida albicans* sous microscope optique l'objectif x40

**Figure n° 20** : Histogramme représentant les pourcentages des CMI et CMF et CMF/CMI des souches de *Candida albicans*

**Figure n°21** : les courbes de dosage de l'ergostérol de souche

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

**Figure n° 23**: courbe de dosage de l'ergostérol de souche de référence ATTC 10231

## Liste des Tableaux

**Tableau N°01** : Propriétés chimiques de la chlorhexidine

**Tableau n°02** : Mécanisme de l'action antimicrobienne de la chlorhexidine

**Tableau N 03** : résultat de l'isolement des souches isolées dans la gélose sabourand

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

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

# **Introduction Générale**

## **Introduction Générale :**

Les champignons (mycètes) ,sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires ,incluant des espèces macroscopiques (macromycetes) et d'autre microscopiques (micromycètes), d'aspect filamenteux ou levuriforme, Se nourrissent par absorption et utilisent le carbone organique comme source de carbone (ce sont des hétérotrophes),Ils peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée.(**dominique chabasse et votre coll -2002**).

On différencie quatre divisions selon les **modales** de reproduction sexuée : les Mastigomycotina, les zygomycotina, les ascomycotina et les basidomycotina. En outre lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée deuteromycotina. (**Céline Arsenault - 2001-**).

Dans le cas de champignon microscopiques et dans le partie de levures ,il exset plusieurs famille permie cette famille , la famille de candida albicans que l'on retrouve normalment dans l'organisme humain en quantité relativement limitée.(**Céline Arsenault -2001-**).

Quelles sont les caractères de cette espèces qui permettant de faire cette maladies et quelle est le traitement pour éviter cet infection?

**PAETIE1 :**  
**synthèse bibliographique**



# *Chapitre I : Candida albicans*

## **I.1 *Candida albicans*:**

*Candida albicans* est une levure naturellement présente chez l'homme, elle est responsable de nombreuses infections (**Thierry, 2009**). Elle est habituellement inoffensive et qui siège naturellement dans les voies génitales, le tube digestif, la bouche, la peau (**Pfaller et al., 2007**). Parmi les 200 espèces de *Candida* connues, seule une vingtaine est responsable d'infections humaines. L'espèce *Candida albicans* est la plus fréquemment impliquée dans des infections fongiques. Elle est notamment responsable de plus de 70 % des infections vaginales qui touchent la plupart des femmes au moins une fois dans leur vie (**Thierry, 2009**).

- **Pathogénicité:**

Les infections de la peau et des muqueuses peuvent se produire aussi bien chez des sujets sains que chez des individus immunodéprimés. Les candidoses cutanées se développent essentiellement dans les zones de transpiration, comme l'aîne, les aisselles, les zones interdigitales et sur des écorchures ou des brûlures. Les espèces du *Candida* peuvent infecter différentes muqueuses : la cavité buccale, la muqueuse vaginale et l'œsophage. L'une des candidoses les plus connues touchant la cavité buccale est le muguet. Il affecte fréquemment les nouveau-nés, les sujets traités par des antibiotiques à large spectre et les personnes immunodéprimées, principalement celles atteintes du sida. Les candidoses génitales ou vulvo-vaginites sont également fréquentes et dues dans 80 % des cas à l'espèce *Candida albicans* (**Thierry, 2009**).

- **Taxonomie :**

Le genre *Candida* est une micromycète, champignon imparfait (deutéromycète). Il est un organisme eucaryote appartenant au règne des champignons, au phylum des Ascomycètes, au sous-phylum des Saccharomycotina, de la classe des Saccharomycètes, de l'ordre des Saccharomycétales, du groupe des Saccharomycétales mitosporiques (**Buffo et Herman, 1984**).

Règne : Fungi ;

Division : Ascomycettes ;

Classe : Saccharomycettes ;

Ordre : Saccharomycétales ;

Famille : Cryptococoidae ;

Genre : *Candida* ;

Espèce : *albicans*.

## I.2 Morphologie et reproduction

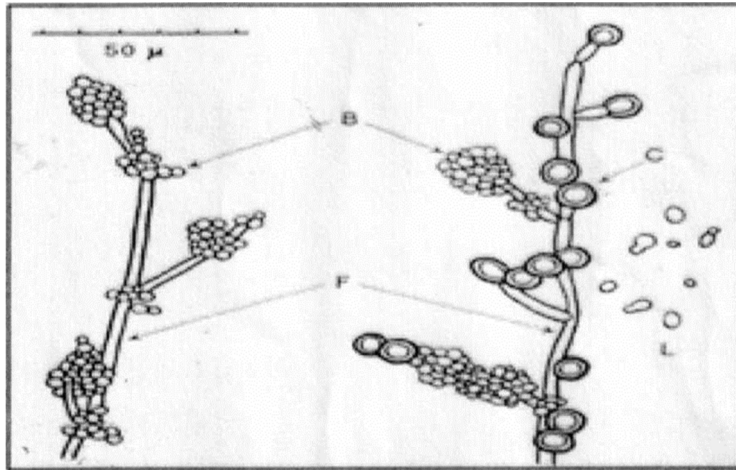
Les levures du genre *Candida* se présentent sous forme de blastospores (blastoconidies). Ce sont de petites cellules de 2 à 5 µm par 3 à 7 µm, globulaires, ovoïdes ou cylindriques. Apparaissent macroscopiquement sous forme de colonies blanches à crémeuses de 1 à 3 mm. Leur texture peut être pâteuse, lisse, brillante, à bord régulière (Graser et al., 1996). Le génome du *C. albicans* représente 16 Mb pour ~6500 gènes (dont 200 env. contiennent des introns ; taille moyenne des ORF : ~1.5kb) répartis sur 8 paires de chromosomes homologues. Dans certaines conditions de culture chez *C. albicans* on peut voir apparaître sur les filaments mycéliens, de grosses spores, rondes ou ovales, à paroi épaisse, de 6 à 12 µm de diamètre : ce sont des chlamydospores (Odds, 1979).

### Reproduction asexuée :

Le mode de multiplication de *C. albicans* est principalement de type asexué. Elle est assurée par bourgeonnement de la blastospore à un pôle particulier de la cellule donnant naissance, après division du noyau par simple mitose et septation de la cellule, à une blastospore fille qui se dissocie ultérieurement de la blastospore mère, sous certaines conditions (température, pH, composition du milieu de culture). Les cellules restent attachées les unes aux autres et forment une chaîne plus ou moins ramifiée appelée pseudo-mycélium, ce dernier est favorise également la formation de mycélium vrai chez *C. albicans*. Ce deuxième mode de multiplication végétative consiste en une croissance apicale, conduisant tout d'abord à la formation d'un tube germinatif puis d'un filament mycélien. Le filament mycélien se présente sous la forme d'articles cellulaires cylindriques uni nucléés et séparés par des cloisons ou septa incomplets avec persistance d'un pore central assurant la continuité cytoplasmique (Gow, 2002).

### I.3 Reproduction sexuée chez *C. albicans*:

*C. albicans* a été considéré comme un champignon diploïde asexué. Mais depuis la découverte du Mating Type Locus (MTL) et des conditions nécessaires à la reproduction de

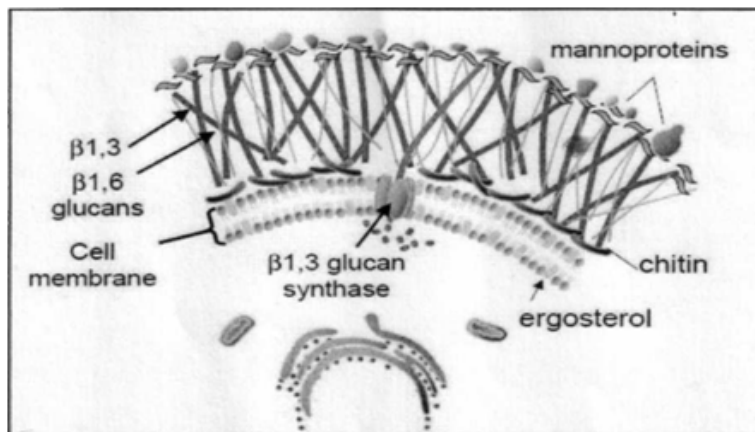


**Figure n° 1 :** Morphologie de *C. albicans*. L : blastospores et blastospores bourgeonnantes, B : amas de blastospores, F : filaments mycéliens, C : chlamydospores Caractéristiques de *C. albicans*. D'après Segretain et coll.

*C. albicans*, a été établi un cycle parasexuel (reproduction et réduction du génome mais sans méiose) comme possible modèle de reproduction sexuée de *C. albicans* (Johnson, 2003) (Figure 2). Puis une réduction chromatique (sans méiose et donc sans brassage génétique par simple perte aléatoire de chromosome) permet de revenir au stade diploïde (Miller et Johnson, 2002).

### I.6 Structure cellulaire :

*C. albicans* est un organisme eucaryotes unicellulaires sans chlorophylle, avec un noyau, une double membrane nucléaire, des chromosomes, des mitochondries, des inclusions lipidiques. La membrane plasmique est riche en lipides dont l'ergostérol, est recouverte d'une paroi qui donne à la levure sa forme et sa stabilité mécanique. Elle est aussi une zone de contact entre la cellule et son environnement et sa structure varie selon l'âge et le stade morphologique de la levure (Casson et Strippoli, 1973).

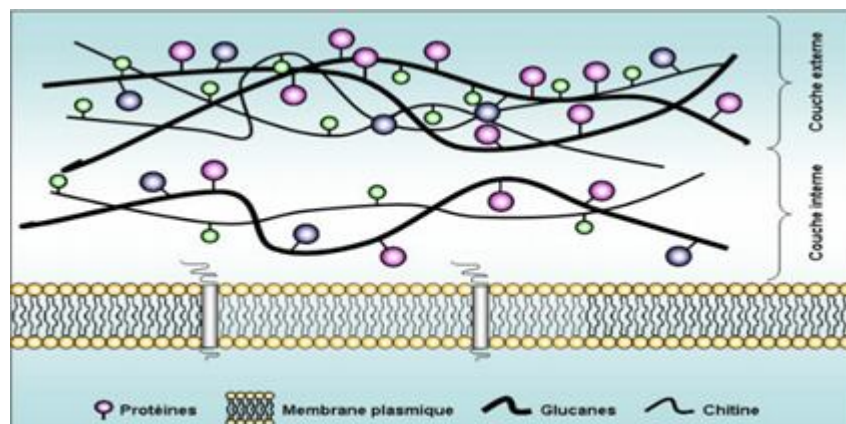


**Figure n°2:** Les différents constituants de la paroi fongique (Diamoiid, 1999).

## I. 6-1-La paroi :

### a. Structure générale

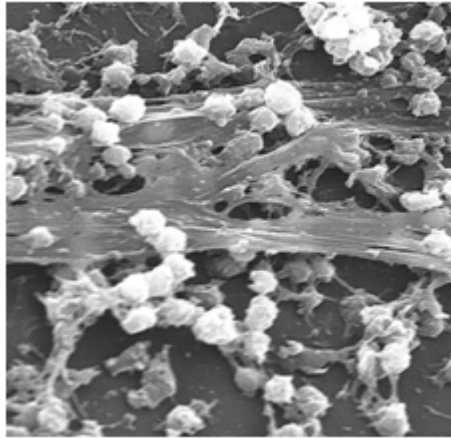
La paroi du *Candida albicans* est le premier contact avec les cellules de l'hôte. Généralement a été bien étudiée (Firon et al. 2004), (Klis, et al., 2002). La paroi confère une protection à la cellule contre les agressions physiques, chimiques et biologiques et elle est responsable de sa morphologie. Elle porte d'importants déterminants antigéniques du champignon et qui est responsable de l'adhérence de la pathogénicité. L'organisation générale de la paroi fongique de *C. albicans* est représentée dans la Figure n°4.



**Figure n°3 :**Organisation moléculaire de la paroi de *Candida albicans* (Ruiz-Herrera, 2006)

## II. 7- Formation de biofilms:

Le biofilm est un amas de microorganismes adhérant à un support, enrobés d'une matrice exopolysaccharidique. Des biofilms se constituent sur toute interface solide/liquide, sur les tissus vivants, ils constituent une barrière protectrice pour le tissu sous-jacent contre les agressions physiques, chimiques, thermiques et biologiques; par contre lorsque l'organisme s'affaiblit et que ses défenses sont perturbées, les biofilms peuvent être des réservoirs microbiens à l'origine d'infections. La structure d'un biofilm est tout à la fois hétérogène, micellaire, filtrante, évolutive. Il existe 4 étapes dans l'évolution d'un biofilm (Filloux et Vallet, 2003).



**Figure n°4:** La formation de biofilm.

- **Glucanes :**

*C. albicans* contient des 3 –glucanes qui se situent dans la couche interne de la paroi visible en microscopie. Ils comptent pour 50-60 % de la masse totale de la paroi. Ils forment une chaîne principale composée de polymères de glucose liés par des liaisons glycosidiques de type P -1,3 et/ou P-1,6 (Figure 6, b). Les -1,3-glucanes non branchés ont une structure micro fibrillaire. La paroi de *C. albicans* contient des P -1,3 et des P -1,6 glucanes, mais aucune liaison intra chaîne P -1,3/ -1,6. L'existence d'une liaison covalente entre les P -1,6 glucanes et la chitine par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique à la position 1 du glucose et 6 du N-acétylglucosamine a été démontrée chez *C. albicans* (Surarit et al,2001).

- **Protéines :**

Selon Ruiz-Herrera et al, les « véritables protéines » liées à la paroi sont N- et/ou O-glycosylées et possèdent d'autres caractéristiques spécifiques telles que la présence d'un motif glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont liées aux -glucanes et à la chitine des couches internes. Les analyses spectrométriques ont révélé la présence d'environ 6 à 25 % de la paroi sont constitués de mannoprotéines, ou de phosphopeptidomannanes généralement appelés mannanes. Le terme mannane ne se rapporte qu'à la partie glycosylée de ces glyco-conjugués. Les mannoprotéines sont nombreuses à la surface de la paroi de *C. albicans*, ainsi qu'au niveau de la cicatrice de bourgeonnement (Horisberger et al., 2006).

- **Lipides :**

Les lipides constituent les composés mineurs de la paroi de *C. albicans* ne représentent que 5 à 17 % de la paroi après extraction par des solvants. La présence de Phospholipides, de triglycérides et de stérols libres ou estérifiés a ainsi été observée. Un lipide intéressant de la paroi de *C. albicans* est le phospholipomannane, ont montré que le phospholipomannane induisait la production de Tumor

Necrosis Factor a chez des macrophages murins et humains. Il a été suggéré que les lipides pariétaux pouvaient jouer un rôle dans l'adhérence et dans l'activation de certaines voies de signalisation chez *C. albicans* (**Ghannoum et al.2001**).

#### **Espace péri plasmique :**

Il est situé entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique et est le site d'activité de diverses enzymes digestives et d'enzymes participant à la synthèse de la paroi.

#### **Membrane plasmique :**

Elle est constituée de deux feuillettes membranaires. Elle assure un rôle de transport actif d'acides aminés, d'osés et de différents ions, ainsi qu'un rôle passif dans la régulation de Flux moléculaires servant à maintenir la pression osmotique.

#### **Organites intracellulaires**

Dans le cytoplasme, tous les organites cellulaires classiques sont présents : réticulum Endoplasmique, appareil de Golgi, noyau, vacuoles digestives. Seul le contenu protéique et notamment l'activité enzymatique varie en fonction du stade morphologique surtout durant la germination (**Franklyn et al,2003**).

## **II. 8 Habitats :**

*Candida albicans* est considéré chez l'Homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne. Au niveau des muqueuses digestives et vaginales, la levure se présente sous forme de blastospores, considérées comme la forme saprophyte qui vit en symbiose avec l'organisme hôte. En revanche, lorsque le délicat équilibre entre la forme commensale et les défenses immunitaires est rompu, cette étroite symbiose se transforme en parasitisme, résultant en une maladie infectieuse appelée candidose. Au niveau des tissus infectés, *Candida albicans* est retrouvé simultanément sous les formes de blastospores et de mycéliums. Alors que la forme blastospore reste non-invasive, la forme mycélienne est capable de pénétrer les muqueuses (**Lagane, 2007**)

### **I.9 Caractères physiologiques de *Candida albicans* :**

*Candida albicans* peut passer de l'état saprophyte à l'état pathogène sous l'influence de divers facteurs environnementaux (**Euzeby J, 2001**).

### **I.9-1- Milieu de vie:**

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

### **I. 9-2- pH :**

En effet, la croissance est possible pour des pH allant de 3 à 7. En revanche, en milieu alcalin. In vivo, l'acidité gastrique ou vaginale n'altère pas sa vitalité 9-3- Température (Humidité, Chaleur). Elle a une croissance entre 20°C et 30° C pour la majorité des levures. Les espèces pathogènes sont capables de croître à 37 ° C (Euzeby.,1994).

### **I.9-4-Nutrition :**

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

### **I.9-5- Biochimique :**

Cette espèce possède la propriété de fermenter le glucose et le maltose, mais pas le lactose, ni le raffinose, ni le saccharose. La fermentation du tréhalose est irrégulière. Il existe également dans ces cellules des activités enzymatiques de type phosphatase, oxydase, catalase + et peroxydase (Reiss et al., 1992).

### **I.9-5-1- Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence:**

De façon générale, le rôle infectieux de *Candida albicans*, pathogène opportuniste, semble favorisé par une combinaison de facteurs liés aux statuts immunologique et physiologique de l'hôte, ainsi qu'à des facteurs liés au microorganisme, plutôt qu'à un facteur de virulence unique. Les infections candidosiques sont ainsi probablement initiées par une diminution des défenses de l'hôte qui modifie l'équilibre de commensalisme au profit de la levure, et entraîne le basculement du stade de colonisation à celui de l' infection.

Les infections de la peau et des muqueuses telles que les candidoses vaginales par exemple, sont principalement dues à des modifications du pH et de l'environnement microbien, alors qu'une atteinte systémique est habituellement associée à une insuffisance des défenses de l'hôte, telle que celle présentée par les patients hospitalisés en cancérologie soumis à une chimiothérapie ou à une



antibiothérapie à large spectre. La séquence des événements qui contribuent à l'installation de *Candida albicans* chez son hôte peut se résumer en trois étapes (**Hoyer et al., 2001**) :

- adhérence et colonisation
- invasion au niveau des tissus
- multiplication et survie chez l'hôte

Plusieurs facteurs de virulence ont été proposés :

#### **I. 9-5-2- Adhérence aux surfaces :**

Elle peut se faire au niveau des muqueuses, mettant en jeu des interactions spécifiques de type ligand / récepteur avec les mannoprotéines de la paroi de la levure. On parle d'adhésines, telles que celles de la famille de AlsI (**Hoyer et al., 2001**). L'adhérence peut se faire aussi à partir de la formation de biofilms à l'occasion d'un traumatisme de façon iatrogène ou chirurgicale par V introduction de matières plastiques telles que les cathéters, les sondes urinaires... De plus, l'hydrophobicité de la paroi du champignon favorise une interaction non spécifique avec les épithéliums. Il a été montré que la nature et le degré de glycosylation des protéines de la paroi altèrent cette hydrophobicité. Ceci pourrait expliquer en partie le fait que certaines souches ou sérotypes de *Candida albicans* soient plus adhérents que d'autres à un type cellulaire donné de l'hôte (**Ruiz-Herrera, 2006**).

#### **I.9-5-3- Formation de mycéliums vrais et de pseudomycéliums :**

En général, le passage de la forme levure à la forme plus ou moins filamenteuse est associé à la virulence. Les tubes germinatifs, structures intermédiaires entre le blastospore et le mycélium augmentent l'adhérence aux cellules épithéliales et favorisent la colonisation (**Hoyer et al., 2001**). en induisant la propre endocytose du pathogène (**Rotrosen et al., 1983**). Par la suite, la production d'hyphes augmente l'invasion et la destruction tissulaire (**Filler et Swerdloff, 1995**).

#### **I.9-5-4- Interférence avec la phagocytose:**

*Candida albicans* est capable de produire des peptides acides pouvant inhiber la liaison aux phagocytes et le métabolisme oxydatif. De plus, la levure peut induire l'apoptose des macrophages et des neutrophiles échappant ainsi aux cellules du système immunitaire (**Rotstein et Parodo, 2000**).

#### **9-5-e- Interférence avec le complément :**

Les adhésines fongiques (mannoprotéines), apparentées au récepteur CR3 des lymphocytes, peuvent être affines pour certains composants matriciels plasmatiques tels que la fibronectine, mais

aussi la fraction C3bi du complément, perturbant ainsi la phagocytose de la levure (**Ibata-Ombetta et Idziorek, 2003**).

### **I. 9-6- Enzymes :**

La sécrétion d'enzyme hydrolytiques au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires . Ces enzymes sont des aspartyl protéinases (Saps) , des phospholipases et des lipases (**Fu, 1997**).

## **II. 10- Variabilité phénotypique :**

### **I.10-1-Variabilité morphologique:**

La cellule *Candida albicans* considérée comme polymorphique, les principaux stades morphologiques sont la blastospore, la forme pseudo-mycélienne, le tube germinatif, la forme mycélienne vraie et enfin la chlamydo-spores. Ces transition dépendent de la nature, du nombre et de l'intensité de facteurs environnementaux mais aussi de l'activité des voies de signalisation intracellulaire au cours de la transition morphologique et aboutissent à l'activation de facteurs de transcription. Deux voies principales de transduction ont été bien étudiées :

La voie des MAP kinases (mitogène-activité protein kinases) et la voie des ras-AMPC protéines kinases A (PKA) (**Sullivan et Robert, 2000**).

Les différents facteurs de transcription enjeu dans la transition blastospore-mycélium sont regroupés dans la Figure n°6. Le régulateur est le facteur de transcription Efg1p de type « hélice-boucle-hélice » (**Sullivan et Robert, 2000**).

### **I.10-2-Variabilité antigénique :**

Les travaux de Suzuki sur les antigènes polysaccharidiques à l'aide de sérums mono spécifiques, ont permis une classification sérologique des *Candida* et l'identification de deux Sérotypes (A et B) chez *C. albicans* (**Suzuki et al., 1982**). Un antigène P dépendant de l'origine des blastospores de *C. albicans* a été mis en évidence. Des anticorps monoclonaux spécifiques d'un stade morphologique ont été développés comme l'AcM 3D9.3, l'AcM 16B1 et l'AcM 3B7 qui reconnaissent des glycoprotéines différentes, présentes sur le tube germinatif de *C. albicans* mais absentes des Blastospores. Les antigènes et gènes spécifiques de tubes germinatifs et de mycélium de *C. albicans* ou majoritairement exprimés lors de ces phases comprennent les antigènes 3D9 et 16B1 et les protéines Als3, Hwpl et Hyrl (**Marot-Leblond et al.,1982**).

### **I.11- Facteurs sécrétés :**

Outre les facteurs d'adhérence qui constituent des facteurs de pathogénicité, un certain nombre de composants sécrétés par le champignon :

**a) les enzymes.**

L'activité protéolytique de *C. albicans* lui permet d'utiliser les protéines comme seule source d'azote. Leurs activités ont été démontrées sur différents substrats comme la kératine, le système kallikréine-kinine et la cystadine A (Tsushima et al., 1994). Cette activité protéolytique est due à la famille des gènes *sap* qui codent pour des Secreted Aspartic Protéinases. Cette famille comporte 10 membres dont les Sap1-8 qui sont sécrétées dans l'espace extracellulaire et les Sap9-10 qui sont des protéines attachées à la membrane par une ancre GPI. Le rôle des Sap comme facteurs de pathogénicité de *C. albicans*. Ainsi la matrice extracellulaire et les protéines de surface de l'hôte telles que le collagène, la laminine, la fibronectine et la mucine sont dégradées par Sap2. Quelques protéines de la réponse inflammatoire ou immunitaire telles que la lactoferrine, la macroglobuline, les immunoglobulines comme les IgA peuvent être également hydrolysées par Sap2. D'autres enzymes sont sécrétées par *C. albicans* comme les phospholipases hydrolysent une ou plusieurs liaisons ester des glycérophospholipides et les lipases qui ont la capacité de catalyser l'hydrolyse des liaisons ester des mono-, di- et triacylglycérols et même des phospholipides (Beausejour, 1998).

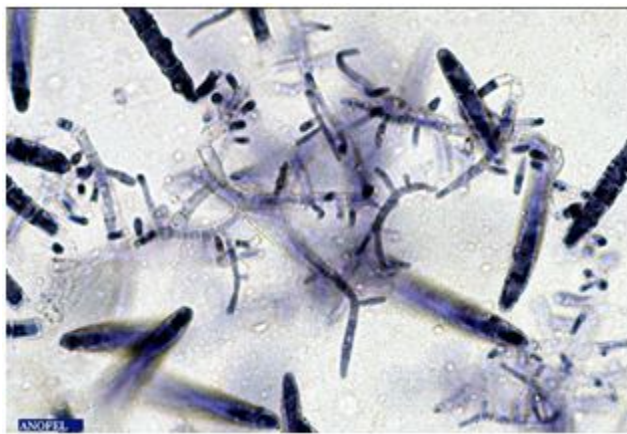
**I.12-Prélèvement :**

*Candida albicans* est un champignon cosmopolite dont les fréquences d'isolement montrent que chez des sujets sains la levure se répartit différemment en fonction des sites de prélèvement : peau (3%), vagin (13%), tractus ano-rectal (15%), cavité buccale (18%), estomac et duodénum (36%), et jéjunum et iléon (41%). Le réservoir principal est donc le tube digestif où la fréquence de portage varie selon les sujets. Ces résultats sont toutefois à observer avec précaution dans la mesure où les techniques de prélèvements ne sont pas toujours identiques et les sites de prélèvements ne présentent pas toujours un environnement homogène (Lagane, 2007).

En milieu hospitalier, les levures du genre *Candida* et en particulier *Candida albicans* représentent la cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique. Trois causes ont été identifiées : (1) Il semblerait qu'une grande majorité des infections profondes soient d'origine endogène et se développent à partir des levures saprophytes présentes dans le tube digestif de l'hôte et qui traversent la muqueuse. Cependant, il peut aussi exister quelques rares possibilités de colportage par le personnel hospitalier par exemple. (2) Une faible proportion des candidoses profondes peut aussi être d'origine exogène à partir d'une colonisation cutanée due au matériel de soins et à la pénétration de cathéters dans l'organisme. (3) Enfin, dans de très rares cas, la contamination en milieu hospitalier peut être due à l'environnement du patient (eau, air, alimentation...). (Lagane, 2007).

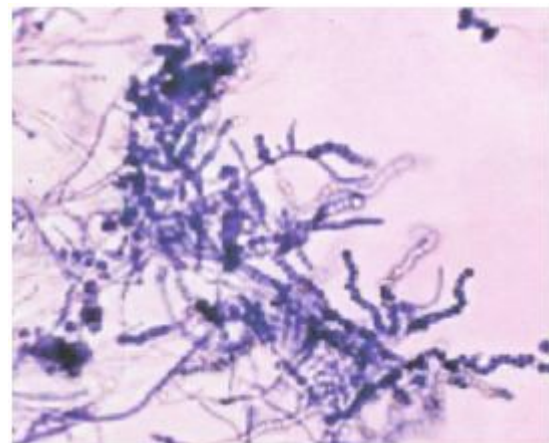
### I.13- Examen direct :

L'examen direct est le test de première ligne. Il permet une orientation diagnostique rapide du prélèvement, d'un point de vue qualitatif (présence ou non d'éléments levuriformes, de pseudo filaments mycéliens). Les levures apparaissent sous forme arrondie ou ovale, de 4 µm à 8 µm, éventuellement bourgeonnantes. Les levures sont également visibles sur des frottis colorés au MGG ou au Gram (les levures sont à Gram positif). En pratique, différentes techniques et colorations spécifiques peuvent être mise en œuvre, rendant alors l'observation plus aisée. Le lame/lamelle est utilisé pour les biopsies Œsophagiennes, gastriques, coliques et rectales ainsi que pour les prélèvements de la sphère génitale et urinaire (**Rispail, 2009**).



**Figure n°05:** Levures et pseudo-filaments

(Source : Anofel. Ed Masson.)



**Figure n°06:** Levures et pseudofilaments de levures observés au bleu de méthylène

((Source: Anofel. Ed Masson).

### I.14-Culture :

#### I.14-1. Isolement :

L'isolement se fait par ensemencements pratiqués de façon stérile, classiquement sur tubes de gélose glucosée (2 %) de Sabouraud, contenant des antibiotiques antibactériens et des vitamines. L'adjonction de cycloheximide (Actidione) dans une partie des milieux permet d'inhiber la croissance d'éventuels Champignons contaminants (**Chabasse et al.,1999**).

Les milieux ainsi ensemencés sont conservés au moins une semaine à 27° C (et à 37° C pour les produits biologiques d'origine profonde : biopsies, pièces opératoires).

En cas de positivité, le développement en deux à quatre jours (parfois davantage, notamment quand le patient est déjà traité par antifongiques), de colonies blanchâtres, à bord régulier, crémeuses,

épaisses, luisantes. Les colonies sont dénombrées, habituellement de façon semi-quantitative (de « rares » à « très nombreuses »).

Ces délais de croissance conditionnent, bien entendu, le délai de réponse définitive de la part du Laboratoire. Par ailleurs, la négativité des cultures (souvent du fait d'applications antérieures d'antifongiques) n'infirme bien évidemment pas le diagnostic (en particulier quand l'examen direct est positif) et n'a aucune valeur de guérison d'une mycose précédemment prouvée tant que l'examen direct reste positif (Chabasse et al., 1999).

#### **I.14-2. Identification:**

La croissance peut se faire sur différents milieux de culture, comme milieu de référence le milieu de Sabouraud additionné de chloramphénicol ou de gentamicine. Classiquement, la détection de ces associations passe par un repiquage sur milieu de Sabouraud contenant du triphényl-2,3,5-tétrazolium, spécifique précise). L'identification de *Candida albicans* passe par la révélation d'au moins un des deux caractères suivants : formation de chlamydozoospores caractéristiques, 24 à 48 heures après repiquage en stries Profondes (anaérobiose) sur des milieux pauvres en sucres et tensio-actifs (PCB = Pomme de terre - Carotte - Bile; RAT = Rice - Agar -Tween80); filamentation en sérum (= blastèse) à 37° C en quatre heures au maximum Les levures poussent en 24 à 48h, formant des colonies blanc-crème, lisses et crémeuses. La figure 10, montre l'aspect des colonies de *Candida*. Sur le milieu de Sabouraud.. (Noumi et al., 2011)

#### **14-2. a-Techniques d'identifications:**

Dès l'apparition des Unités Formant Colonies (UFC) sur le milieu de culture, l'identification d'espèce peut se faire par des techniques d'agglutinations, par la mise en évidence de ses caractères biochimiques (de loin la technique la plus utilisée) ou par PCR. Les recherches directes par PCR ne sont pas encore assez fiables et standardisées Il existe plusieurs tests rapides d'agglutinations, concernant *Candida albicans* : (1) Bichro-latex albicans (Fumouze diagnostics ®): C'est un test de coagglutination, permettant Une identification rapide (5 min) de *C. albicans*. (2) La culture sur milieu de type ChromAgar™ (Odds&Bernaerts, 1994), la formation de tubes germinatifs dans le sérum en 1-4 heures et la formation de Chlamydoconidies sur milieu pauvre (par exemple RiceCream Agar) sont les tests spécifiques habituels pour identifier *Candida albicans*. ( Pfaller et al., 1996)

#### **I.15-Sérologie et antigénémie:**

##### **Sérologie :**

La détection des anticorps anti-*Candida* a un rôle limité. Bien que la production d'anticorps soit plutôt le reflet d'une colonisation que d'une invasion, ils constituent, tout comme les scores

prédicatifs de colonisation, un élément dans la décision de prise en charge thérapeutique. (**Dr P.Rispail .,Octobre 2005**).

#### **Antigénémie :**

Il existe de nombreux antigènes pariétaux détectables, les plus utilisés sont les Mannanes (Pastorex Candida®). Certains kits commerciaux détectent un antigène inconnu Mixte : Cand-tec ® (mannoprotéine). (**Dr P.Rispail .,Octobre 2005**).

#### **I.1.6-Diagnostic clinique :**

Une infection à *Candida albicans* atteint : les muqueuses frontières orificielles du tube digestif (bouche, anus) ; les zones périphériques de ces muqueuses (génitales) les plis (intertrigos) ; les phanères (essentiellement les ongles, exceptionnellement les poils. (**J.-M. Bonnetblanc.,2011**).

#### **I.6-1-Candidoses buccales et digestives :**

Elles touchent un ou plusieurs segments du tube digestif. Elles sont fréquentes : aux âges extrêmes de la vie et chez les sujets immunodéprimés. (**J.-M. Bonnetblanc.,2011**).

#### **Diagnostic clinique :**

- ❖ **Perlèche** : C'est un intertrigo de la commissure labiale, uni- ou bilatéral, où le fond du pli est érythémateux, fissuraire et macéré
- ❖ **Glossite** : La langue est rouge (érythème) et dépapillée (figure n°14).Stomatite II s'agit d'une inflammation aiguë ou chronique de la muqueuse buccale. Se traduisant par : une sécheresse de la bouche (xérostomie). Une sensation de cuisson, de goût métallique. Elle peut se présenter sous la forme d'une stomatite érythémateuse (gencives et palais) : muqueuse brillante, rouge, vernissée et douloureuse (**J.-M. Bonnetblanc.,2011**).



**Figure n°07** : Stomatite érythémateuse

**Muguet :**

Son siège est la face interne des joues. Il s'agit d'un érythème recouvert d'un enduit blanchâtre, qui se détache facilement au racage et dont l'extension au Pharynx est possible entraînant une dysphagie (Fig15.) (J.-M. Bonnetblanc.,2011).



---

**Figure n°08** : Muguet profus (J.-M. Bonnetblanc.,2011).

**D) Atteinte œsophagienne :**

L'atteinte œsophagienne est plus rare. Elle provient le plus souvent d'une extension de la candidose buccale et doit faire rechercher une immunodépression(VIH). (J.-M. Bonnetblanc.,2011).

**I.16-2-Candidoses gastro-intestinales :**

Elles accompagnent généralement une candidose bucco-œsophagienne et peuvent être indirectement révélées par une diarrhée. La candidose an rectale, il s'agit d'une anite érythémateuse, érosive et suintante, avec une atteinte péri anale (prurit anal) qui peut se prolonger par un intertrigo inter fessier (J.-M. Bonnetblanc.,2011).

**I.16-3-Candidoses génitales:**

Le caractère sexuellement transmissible est controversé. Elles peuvent survenir chez l'enfant par extension d'une dermatite fessière ou d'une anitecandidosique. Les vulvo-vaginite candidosique concernent les femmes jeunes et d'âge moyen, surtout pendant la grossesse .Les lésions sont

érythémateuses et œdémateuses avec prurit, puis il apparaît un enduit blanchâtre et des leucorrhées souvent abondantes, blanc-jaunâtre, qui stagnent dans les plis de la muqueuse vulvo-vaginales (Prurit intense, dyspareunie). Candidoses génitales masculines se trouvent uniquement sur un terrain prédisposé, avec un ensemencement par rapport sexuel ou à partir d'une candidose urétrale ou digestive (J.-M. Bonnetblanc.,2011).

## 17- Traitement :

Le traitement des candidoses cutanéomuqueuses est local. Le choix des antifongiques tient compte : (1) de la localisation et de l'étendue des lésions, (2) du terrain (femme enceinte, immunodépression...), (3) d'une atteinte phanérienne associée (poils, ongles), (4) du risque d'effets secondaires et d'interactions médicamenteuses (traitement oral) ( R.Steiner .,1923) .

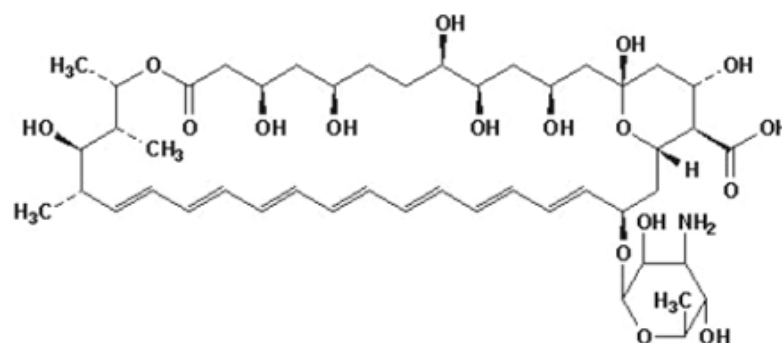
### 17-1. Traitement chimique :

#### Les antifongiques :

Les principaux aspects sur l'utilisation des antifongiques dans les infections fongiques sont : le mode d'action, le spectre d'activité, les principaux effets indésirables des antifongiques utilisés dans les infections fongiques invasives. ( R.Steiner .,1923) .

#### a) Polyènes :

L'amphotéricine B est considéré comme l'antifongique de référence par son activité sur un large spectre fongique et par son mécanisme d'action fongicide unique. Les polyènes sont des macrolides comportant un cycle lactone et une chaîne lactone et une chaîne carbonée avec des doubles liaisons conjuguées. Ils agissent au niveau de lamembrane fongique ens'intercalant dans la couche phospholipidique par interaction avec l'ergostérol, altérant la perméabilité cellulaire puis entraînant la mort de la cellule fongique .Ses principaux effets indésirables sont immédiats, avec le choc anaphylactique, pouvant être prévenus par administration de corticoïdes ou d'anti histaminiques, mais surtout rénaux, avec une insuffisance rénale aiguë. En pratique, la FUNGIZONE® (amphotéricine B) peut être utilisée comme antimycotique local et décontaminant digestif, car cette molécule n'est pas absorbée dans le tube digestif ( R.Steiner .,1923) .



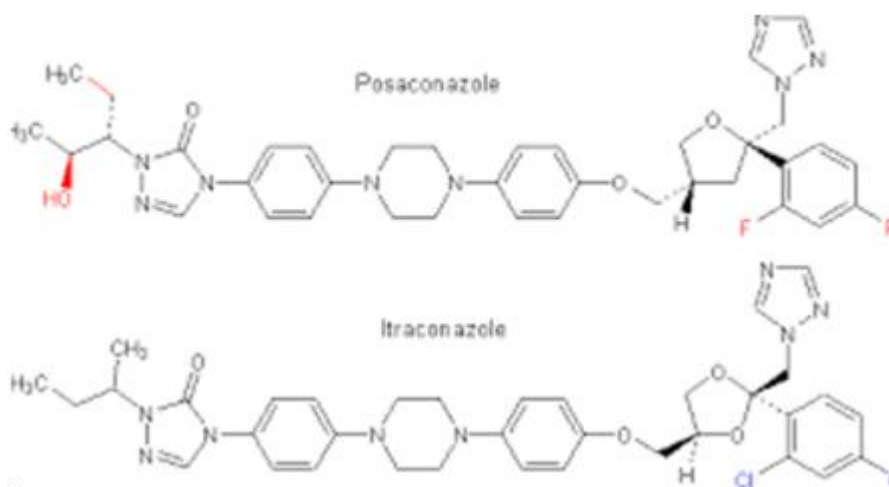


---

**Figure n°09** : Structure chimique de l'amphotéricine B

**b) Triazoles**

Cette classe médicamenteuse fongistatique comprend le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole et le posaconazole. Les thiazoles dérivent de l'imidazole ou du triazole. Ils agissent sur la synthèse de l'ergostérol, composant indispensable de la membrane fongique, par inhibition de 1  $\rightarrow$ 14 $\alpha$  deméthylasehg, lors de l'étape lanostérol  $\rightarrow$  14-deméthyl lanostérol ( **R.Steiner** ,1923) .



---

**Figure n° 10:** Structure chimique de l'itraconazole, du fluconazole, du posaconazole et du voriconazole.

**17-2. Traitement naturel :**

**L'ail:** De part ses composants, la galicine et l'alicine, il est bactériostatique et fongicide (**J.Pierre Willem**) .

**Le BerberisVulgaris** : Son action thérapeutique est due à sa forte concentration en un alcaloïde : la berbérine qui a une activité antibiotique et anti fongique empêchant le développement du *Candida*. Elle a une puissante action de normalisation (**J.Pierre Willem**) .*aa*

**Les épices** : Certains contiennent des phénols, tel que le thymol et le carvacrol, qui ont des propriétés antifongiques. Le gingembre, le thym, la mélisse Le gingembre, le thym, la mélisse, le romarin (**J.Pierre Willem**) .

**Les huiles essentielles** : Origan, Thym à Linalol (**F.Couic Marinier**) .

## *Chapitre II : Chlorhexidine*

### **II.1 Historique :**

Chlorhexidine - est un médicament populaire, antiseptique topique, qui est utilisé avec succès comme désinfectant universel. La chlorhexidine a été découverte au Royaume-Uni en 1950 et en 1954 est venu le premier antiseptique de la peau. Après, la substance a commencé

à ajouter dans les lubrifiants urologiques, les cathéters d'imprégnation, implants, vêtements du personnel médical. Il est inclus aussi dans la série de rince-bouche et dentifrices et largement appliqué en médecine vétérinaire. L'utilisation de la chlorhexidine est capable de provoquer la résistance bactérienne aux antibiotiques. Le médicament appartient à un groupe de antimicrobiens à bas prix est à la disposition de la population générale (Gomes et Viama, 2013).

## II.2 Définition

La chlorhexidine est l'antiseptique le plus étudié en parodontie. Cette molécule cationique est active sur les bactéries associées aux pertes d'attache actives sans entraîner de résistance. La chlorhexidine est bactéricide à haute concentration et bactériostatique à basse concentration. Son mécanisme d'action s'explique par l'augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne et la précipitation des macromolécules intracellulaires cytoplasmiques. La chlorhexidine possède la capacité de s'attacher de manière réversible (effet de rémanence) à toutes les structures buccales permettant ainsi une action prolongée après usage (Lang N.P., Attström R. et Løe H, 1998)

## II.3 Structure chimique

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

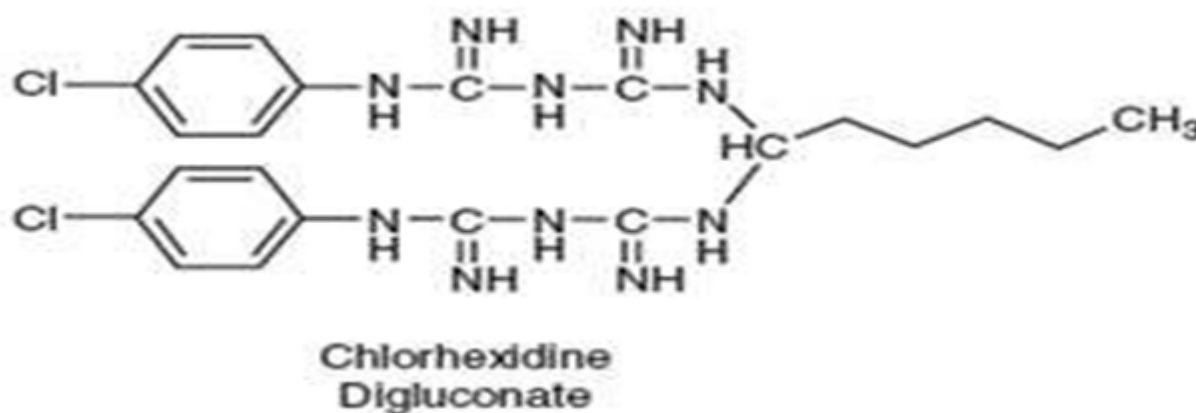


Figure n°11 : Structure chimique de la Chlorhexidine (Geais, 2006)

*Propriétés physico-chimiques:*

La Chlorhexidine est une base avec de fortes charges bicationiques ce qui lui confèrent une haute interactivité » avec les anions (**Bascones et al .2005**). Cette molécule est plus stable sous forme de base libre. Le diacétate et le dichlorhydrate sont peu solubles dans l'eau tandis que le digluconate est très soluble. L'hydroxyapatite seule est incapable de capter et de retenir la chlorhexidine après un bain de bouche. Cependant, l'hydroxyapatite de l'émail est toujours recouverte par un film protecteur de glycoprotéines salivaires. On peut donc considérer que les mucines présentes à la surface dentaire jouent un rôle significatif dans la rétention de la Chlorhexidine (**Foulkes, 1973**).

Une étude de **HJELIORD et ROLLA(1973)** a montré que l'absorption de la Chlorhexidine était largement supérieure à 50 000 En revanche, cette captation est quasiment nulle pour des poids moléculaires inférieurs à 20 000. Ces auteurs émettent l'hypothèse que la Chlorhexidine était retenue aux surfaces des tissus buccaux par des liaisons électrostatiques. Les molécules de Chlorhexidine liées seraient ensuite remplacées progressivement par compétition par des ions calcium présents dans la salive. Sa capacité de se lier autant avec les protéines restant en solution qu'avec celle qui précipitent est une des raisons qui expliqueraient sa rémanence malgré les flux salivaires.

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

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

## **Spectre d'action**

La Chlorhexidine est active sur les bactéries GRAM+ et sur la plupart des bactéries GRAM-. Par contre son activité est moindre sur les bactéries A.A.R. (Alcool-Acido-Résistantes) et sur les endospores. La plupart des études ont abouti à un pourcentage de bactéries tuées supérieur à 80 %. Son action importante et rapide semblerait encore être accélérée en présence d'alcool. En fonction de la concentration utilisée, la Chlorhexidine peut être uniquement bactériostatique (**Carlotti et Maffart, 1996**). La Chlorhexidine est efficace sur un grand nombre de bactéries. Certaines souches de *Pseudomonas*, *Serratia* et *Proteus* ont été reconnues résistantes avec une augmentation importante des CMI (**Maris, 1990**).

D'après **Carlotti et Maffart (1996)**, ont montré que la Chlorhexidine était fongistatique sur les levures pour des concentrations allant de 0,4 à 50 mg. Une concentration minimale de 1 %, ou mieux comprise entre 2 et 4 % serait nécessaire pour être efficace contre les *Malassezia* (**Mason, 1993**) et (**Scott., 1995**). Les autres champignons nécessitent des concentrations allant de 75 à 500 mg/l. L'action de la Chlorhexidine serait plus rapide sur les levures que sur les dermatophytes et les moisissures. Elle ne possède pas d'effet sporicide (**Murat., 1995**).

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

## *Mode d'action*

La Chlorhexidine exerce son action par le biais d'interactions de ses deux groupements biguanides avec les phospholipides des membranes cellulaires. Il se produit une modification de la perméabilité des membranes des bactéries vis à vis de substances inorganiques (ions potassium, acides aminés, nucléotides). Indirectement, le fonctionnement des enzymes s'en trouve altéré (**Carlotti et Maffart., 1996**). Dans un premier temps, la molécule de Chlorhexidine s'adsorbe à la surface grâce à son caractère basique. La quantité absorbée est une concentration dépendante. D'après **Tonelli et Gjerme** ont montré qu'il s'ensuit alors une altération de la mobilité électrophorétique par modification de la répartition des charges électriques au niveau de la paroi cellulaire.

Enfin la Chlorhexidine entraîne une solution de continuité et la membrane ne joue

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

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

#### *Facteurs de variation de l'activité*

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

#### *Résistance*

La résistance naturelle est en relation avec la richesse de la membrane externe, en phospholipides pour les bactéries et en cires pour les mycobactéries, qui agit comme une barrière de protection contre les antiseptiques. Cela explique que les bactéries GRAM- sont plus résistantes que les bactéries GRAM+. La résistance acquise de nature chromosomique concerne essentiellement les bactéries GRAM-. Les souches résistantes sont obtenues par passages répétés sur un milieu contenant de la Chlorhexidine, ce qui entraîne des changements dans la composition de la membrane externe (**Boucherit-Atmani et al., 2011**).

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

pasatteindre les bactéries GRAM-.

<b>Tableau n°02 : Mécanisme de l'action antimicrobienne de la chlorhexidine (Gerald et Russell, 1999)</b>	
<b>Type de microorganisme</b>	<b>L'action de la chlohexidine</b>
Spores bactériennes	non sporicides, empêche le développement des spores mais pas la germination.
Mycobactérie	Mycobacteristatique (mécanisme inconnu) mais pas mycobactericide.
Bactéries non sporulées	lyse des protoplastes et sphéroplastes; à concentrations élevées cause la précipitation des protéines et des acides nucléiques.
Levures	lyse de protoplaste et la fuite intracellulaire; concentrations élevées cause une coagulation intracellulaire.
Virus	une activité réduite contre plusieurs virus; virus lipide- enveloppés plus sensibles que les virus non enveloppés; effet probablement sur l'enveloppe virale, peut-être la partie lipidique.
Protozoaires	Activité membranaire vis-à-vis <i>A.castellanii</i> (une fuite)



## *II.4 Effet attendus de la chlorhexidine*

### *II.4.1 Effets antiplaque*

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

Une autre étude de **Lorenz et Bruhn (2006)** a montré une diminution significative de l'indice de plaque après rinçage deux fois par jour d'une solution à base de Chlorhexidine versus groupe contrôle pendant trois semaines. Cette étude est arrivée aux mêmes résultats. Il semblerait que cet effet soit lié à la Chlorhexidine qui empêcherait les liaisons cellules-cellules et cellule et cellules-surfaces par compétition Chlorhexidine-calcium car celui-ci serait impliqué dans les phénomènes de liaison. De ce fait, l'adhésion bactérienne ne peut avoir lieu ce qui empêche leur agglutination (**Rolla et Melson, 1975**).

### *II.4.2. Effet antibactériens*

La Chlorhexidine a des effets sur les bactéries GRAM positifs et les GRAM négatifs, incluant les aérobies et les anaérobies. Cependant, il existe de petites variations de sensibilités entre les différentes familles de bactéries avec une sensibilité augmentée pour les bactéries GRAM+ en comparaison des GRAM- (**Hennesey, 1973**).

#### *II.4.2.1 A basse concentration :*

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

#### *II.4.2.2 A hauteconcentration*

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

### *II.4.3. Effet cariostatiques*

Son action antibactérienne diminue les risques d'atteinte carieuse car celle-ci est d'origine bactérienne. Des études visant à l'acidité ont été réalisées. Ainsi, **Opperman(1979)** a mesuré le pH de la plaque après avoir appliqué une solution à base de

sucrose pour constater la diminution du pH. Ensuite, des bains de bouche à base de Chlorhexidine de concentration de 0.05% ont été réalisés. L'augmentation du pH est constatée jusqu'à 4h. On peut aisément en déduire que si la concentration était augmentée pour atteindre la concentration en Chlorhexidine des bains de bouche du marché, l'effet pourrait être prolongé augmentant ainsi les effets cariostatiques de la Chlorhexidine.

#### **II.4.4 Effet antifongique sur *Candida albicans***

Habituellement, *Candida albicans* est sous forme de champignon (état saprophyte). Elle est donc inoffensive. Mais sous certaines conditions, elle se transforme en parasite avec l'apparition de filaments et devient pathogène (**Jay et al., 1992**). Des études ont été menées sur l'adhésion de *Candida albicans* au contact des résines acryliques sous l'effet de la Chlorhexidine (**Kassab et al., 2000**). Celle-ci montre un effet anti-adhérent de la Chlorhexidine sur *Candida albicans* car l'antiseptique agit sur les mécanismes de production des phospholipases à l'origine de son maintien sous sa forme levure. La Chlorhexidine diminue ainsi la forme hyphale (filamenteuse) de la levure et diminue son pouvoir pathogène.

### *II.5 Facteurs d'interaction*

#### *II.6.1. Principal :pH*

Une étude menée par **Addy et Roberts** en **1981** a montré l'influence du pH sur le potentiel antiseptique de la Chlorhexidine. Celle-ci portait sur la fixation de différents antiseptiques dont le digluconate de Chlorhexidine au contact de pastilles de résines polyméthylacrylates. Le potentiel d'adhésion de l'antiseptique montrait une faible désorption est augmentée avec la diminution du pH environnant par perte des charges négatives de la surface des résines acryliques. Ce phénomène chimique de surface voudrait réduire considérablement les liaisons de surface avec les charges positives de l'antiseptique. Cette altération de surface pourrait expliquer la dépendance de l'absorption de la Chlorhexidine et expliquer également la réduction de l'effet antibactérien de ces bains de bouche. Selon cette étude, en dessous d'un pH de 3, l'augmentation de la nature cationique des molécules environnantes est telle que la Chlorhexidine ne peut plus se fixer sur les surfaces dentaires et est éliminée par le flux salivaire (**Addy et Roberts, 1981**).

#### *II.6.2 Secondaires*

##### *II.6.2.1 Fluorure de sodium*

C'est un composé chimique utilisé dans la fabrication des dentifrices comme source

d'ions fluorures. Celui-ci est connu pour ses effets anti-caries. Diverses études ont été publiées afin de connaître l'influence du fluorure de sodium sur les propriétés de la Chlorhexidine. **Lorenz et Bruhn en 2006** ont trouvé des résultats similaires sur la plaque dentaire après rinçage à la Chlorhexidine, suivi avec ou sans brossage avec un dentifrice à base de fluorure de sodium. **Mendieta et Vallcorba en 1994** ont comparé deux bains de bouche à base de Chlorhexidine avec et sans fluorure de sodium. Celui-ci semblerait diminuer l'efficacité de la Chlorhexidine par incorporation du fluor sur la surface dentaire et empêchant ainsi l'antiseptique de se fixer (**Mendieta et Vallcorba, 1994**).

#### *II.6.2.2 Lauryl sulfate de sodium*

C'est un composé utilisé dans la fabrication des dentifrices pour ses propriétés amphiphiles, donnant ainsi une capacité à créer de la mousse. Les adjuvants, composés anionique, diminuent les effets cationique de la Chlorhexidine et diminuent les propriétés antiseptique de la Chlorhexidine. Les études de **Sheen et Owens en 2001** ont montré une diminution des colorations induites par la Chlorhexidine avec l'utilisation d'un dentifrice à base de lauryl sulfate de sodium. Cependant, cela peut résulter une inactivation de l'antiseptique par les charges anionique contenues dans la plupart du dentifrice. Il est donc préférable d'effectuer les brossages à distance des rinçages avec les bains de bouche (**Sheen et Owens., 2001**).

#### *II.6.2.3 Calcium*

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

#### *II.6.2.4 Composition salivaire*

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

La concentration des constituants (protéines, glycoprotéines) dépendent du flux

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

## *II.7 Effets indésirables de la Chlorhexidine*

### *II.7.1 Sensation de sécheresse buccale*

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

## **II.8. Gonflement des parotides**

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

### *II.8.1 Altération du goût*

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

### *II.8.2 Infection virale*

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

### *II.8.2.1 Coloration*

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

### *II.8.2.2 Toxicité de Chlorhexidine:*

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

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

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

# Partie 02

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie de l'université Dr. Tahar Moulay de Saida. L'objectif d'étudier les mécanismes de résistance des isolats de *Candida albicans* vis-à-vis de la chlorhexidine. Les étapes de ce travail a été tracé comme suit :

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

### **III. Matériel:**

Les levures utilisées pour notre étude sont des souches sauvages prélevées à partir de la cavité buccale des utilisateurs de bain de bouche et de dentifrice de différentes marques et avec usages anarchique ou ordonnée. L'âge d'utilisateurs se diffère entre 04 et 81 ans. En plus de ces souches isolées, des souches de référence *Candida albicans* 444 IP et ATCC 10250 et ATCC 26790 ont été étudiées.

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

### **I. Méthodes :**

#### **1.2. Prélèvement**

21 prélèvements ont été effectués entre le 13/03/2017 et le 25/03/2017, à partir de la cavité buccale des étudiants au laboratoire de biologie de nouveau site 2000 à l'université Tahar Moulay de Saida et d'autres personnes, ce prélèvement réalisé par écouvillonnage buccal. Les écouvillons sont mis directement dans un tube à essai contenant 5ml du milieu sélectif bouillon avec Gentamicine, Afin d'éviter toute contamination, les tubes sont ouverts devant une torche, flambés puis vite refermés après coupure d'extrémité distale des écouvillons.

les tubes contenant les échantillons sont marqués puis placés dans une étuve à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

## 2.2. Isolement :

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

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



**Figure 12: Ensemencement par strie**



**Figure 13: Colonies de *Candida albicans***

## 2.3. Identification :

### 2.3.1. Examen macroscopique :

Après l'incubation de 48 h. l'observation, des boîtes pétri qui contient de gélose Sabouraud, a été faite par l'œil nu.

### 2.3.2. Examen microscopique :

L'observation microscopique de *Candida albicans* a été effectué à l'état frais. Une goutte de la suspension levurienne a été prélevée et puis versée sur une lame stérile et couverte par une lamelle afin de l'observer par microscope optique  $\times 40$ .



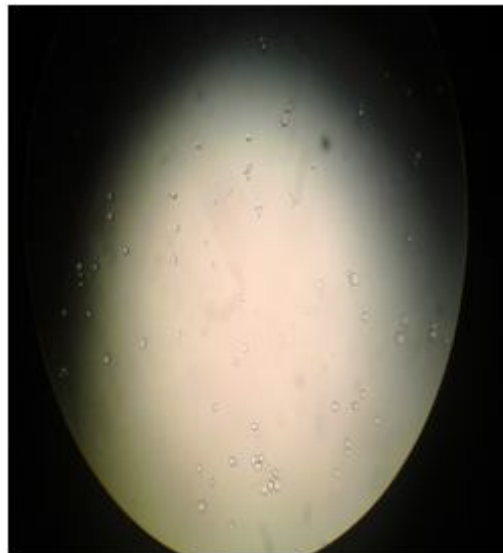
### 2.3.3. Test de blastèse

Appelé aussi test de germination ou de Tschadjian. Il consiste à émulsionner une pointe de pipette de levures dans 1 ml de sérum humain, puis à l'incuber à 37 °C pendant 3 à 4 heures. Nous avons effectué un montage d'état frais afin de rechercher des tubes germinatifs caractéristiques de *Candida albicans*. Si le *Candida* est un *C. albicans*, on observe dans presque 90 % des cas un tube de germination partant de la levure sans présence de constriction à la base (**Drochey et Vieu, 1957**).

### 2.3.4. Test de chlamydosporulation

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

*La lecture s'effectue par observation directe au microscope du milieu à l'objectif x40. La présence de chlamydozoaires (spores globuleuses de 10 à 15 µm entourées d'une paroi épaisse) signifie qu'il s'agit dans 95 % des cas de C. albicans. Par ailleurs s'il y a des pseudofilaments sans présence de chlamydozoaires, il s'agit d'une levure du genre Candida. (Drochey et Vieu, 1957).*



**Figure 14: *Candida albicans* par microscope optique**

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

Nous avons utilisé la méthode décrite en 2002 par *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A2 (CLSI). C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (**CLSI-M27-A2, 2002**). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes.

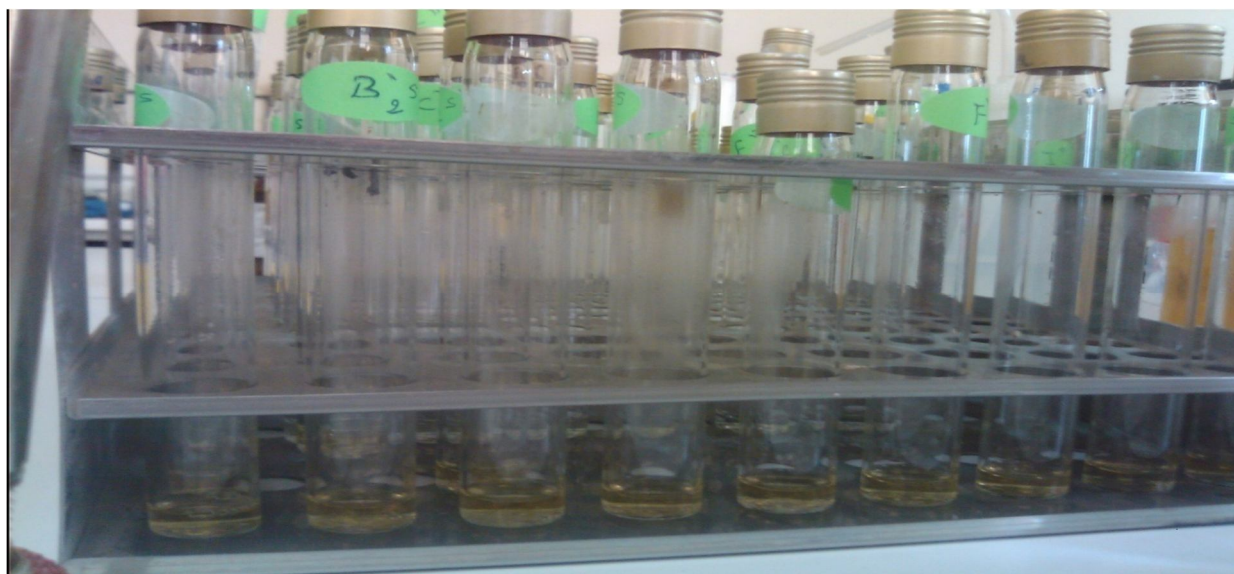
Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations croissantes du conservateur.

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

#### - **Préparation de l'inoculum :**

Ce test est réalisé le 18/04/2017, à partir d'une culture jeune de *Candida albicans* en milieu sabouraud gélosé, nous avons prélevé cinq (5) colonies de même diamètre (1mm) que nous avons transféré dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile. La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée à  $10^6$  à  $5 \times 10^6$  cellules/ml à l'aide de la cellule de Thomas. La concentration cellulaire finale est fixée entre  $5 \times 10^2$  à  $2.5 \times 10^3$  cellules/ml. Elle est obtenue par deux dilutions successives dans le milieu de test, une dilution de 1:100, suivie d'une autre dilution de 1:20.

Afin de préparer les différentes dilutions, 10 tubes à hémolyse ont été mis dans un portoir, et 9 tubes entre eux ont été remplis par 1 ml de milieu de culture RPMI, dans une éprouvette nous avons ajouté 1 ml de RPMI et 1 ml de chlorhexidine avec agitation de cette solution et après une filtration puis un versement dans le tube n° 1. Les dilutions de  $\frac{1}{2}$  ont été préparées à partir du tube 1 jusqu'à le tube n° 10 ,



**Figure n°15** : les 2 dilutions de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

- **Préparation de la microplaque :**

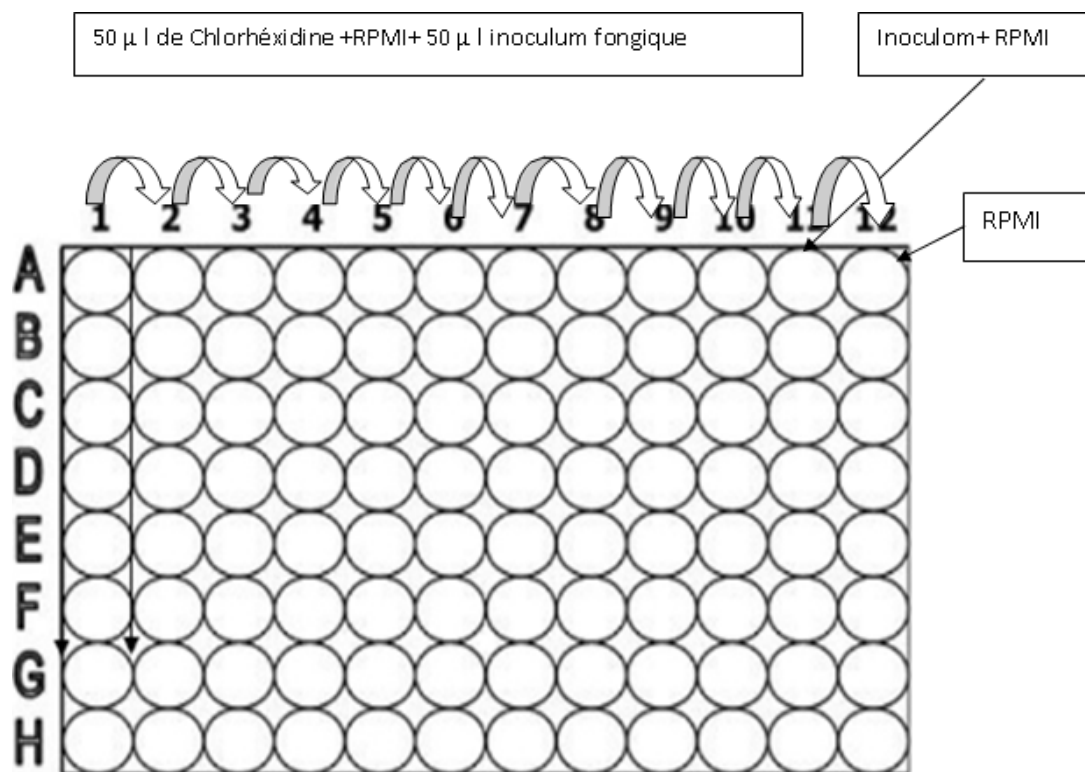
Pour obtenir un grand intervalle de dilutions, nous avons inoculé la microplaque par une disposition horizontale, et nous avons utilisé 12 puits pour chaque souche. Pour chaque colonne de la microplaque, nous avons déposé par une micropipette 50µl de milieu de test dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et N°12. Le puits N°11 servira de témoin positif qui contient le milieu de culture RPMI (50µl) et l'inoculum (50µl), et le puits N°12 servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement le milieu de culture comme témoin négatif (100µl) de RPMI. Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution mère de la chlorhexidine dans les puits N°1 et effectuer une dilution au ½. Jusqu'au puits N° 10, prendre l'aluminium stérile et emballé les microplaques pour éviter la contamination et incubé à 35± 2 °C pendant 24 heures.

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

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



**Figure 16:** procedure de remplissage de microplaque



**Figure n °17 :** utilisation de la microplaque (La méthode des micro-dilution sur milieu liquide RPMI )

### 2.3.6. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :

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

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu sabouraud gélose. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 30 °C pendant 48 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (**MAJOROS et coll., 2005**).

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

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

Nous avons sélectionné trois souches parmi les 6 souches de *C.albicans*, qui sont : la plus résistante N° 17, la plus sensible N°4 et la souche de référence ATCC 10250. Après, nous avons traité chaque souche avec les mêmes étapes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

F : facteur de dilution

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

Calcul :

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

$$B = \% 24(28) \text{ DHE}$$

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

$$\% \text{ ergostérol} = A - B$$

S= la quantité d'ergostérol

# **Partie 03**

## **Résultats et Discussion**

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

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

Sur un total de 21 prélèvements, 06 souches de *Candida albicans* ont été isolées, ce qui représente 28.57 % de l'ensemble des prélèvements.

Tableau N 03 : résultat de l'isolement des souches isolées dans la gélose sabourand	
Numéro de souche	Présence ou absence des colonies dans le gélose sabourant
1	+
2	-
3	+
4	+
5	-
6	-
7	-
8	-
9	+
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	+
16	+
17	+
18	-
19	+
20	-
21	+

+ :presence des colonies

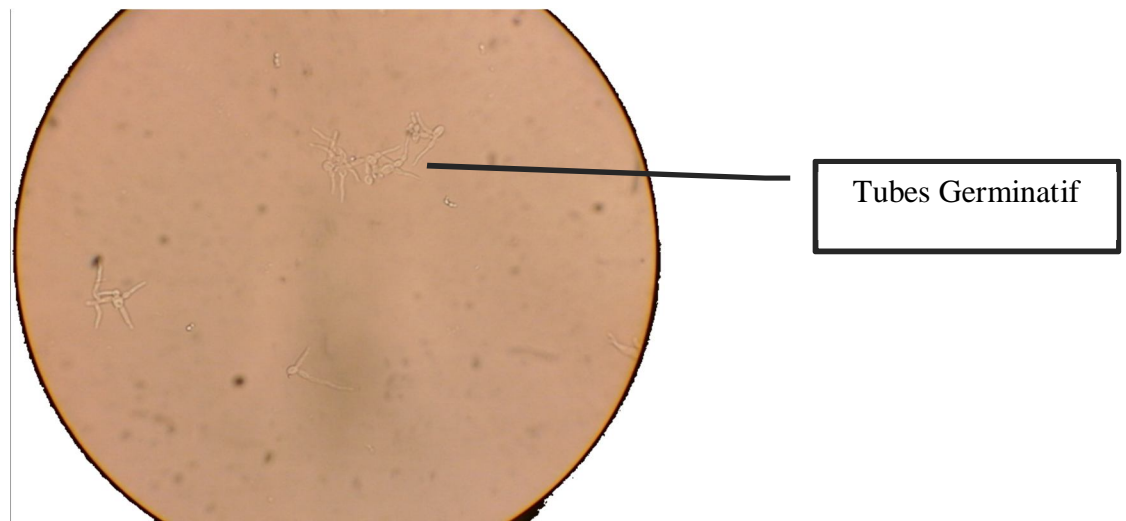
- : absence des colonies



**2. Observation macroscopique:** l'examen macroscopique montre des colonies blanchâtre sou crémeuses, lisses brillantes.

**3. Observation microscopique:** nous avons observé des levures rondes ou ovalaires Bourgeonnantes (blastospores) et la présence de Pseudomycelium.

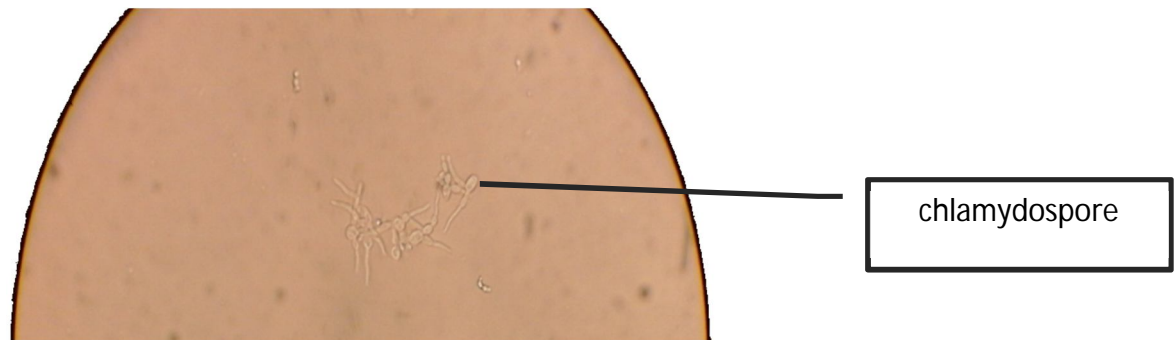
**4. Test de Blastèse:** La formation de tubes germinatifs dans un bouillon blastèse (sérum) est l'un des critères d'identification des levures *Candida albicans* (Figure n°13).



**Figure n°18 :** Formation de tube germinatif caractéristique de *Candida albicans* sous microscope optique l'objectif x40.

**5. Test de chlamydo sporulation:**

Après 24h d'incubation à 37°C sur la gélose PCB, les levures du genre *Candida* présentent un pseudomycelium et des blastospores, la levure *Candida albicans*, espèce la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine produit en plus des chlamydo spores (spores de 6 à 12  $\mu\text{m}$  à parois épaisses, terminale sou latérales rondes ou ovales) (Figure n°14).



**Figure n°19:** Formation de chlamydospores caractéristique de *Candida albicans* sous microscope optique l'objectif x40.

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

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

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF) de la Chlorhexidine vis-à-vis de nos souches de levure *Candida albicans* sont présentés dans le tableau n° 04.

Nous remarquons que:

- Les CMI des souches de références sont de 3.12 mg/ml pour *Candida albicans* 444 IP, et 6.25 mg/ml pour *Candida albicans* ATCC 10231.
- Pour les souches isolées, les CMI sont de 6.25 mg/ml pour la souche N° 17 et 0.19 mg/ml pour la souche N°4 donc cette valeur est minimale cette souche la plus sensible et atteignent une valeur maximale de 12.5 mg/ml pour la souche N° 21. Donc, ces dernières sont les plus résistantes à la chlorhexidine par rapport aux autres souches, ce qui nous a poussé à déterminer le taux d'ergosterol membranaire de ces souches.

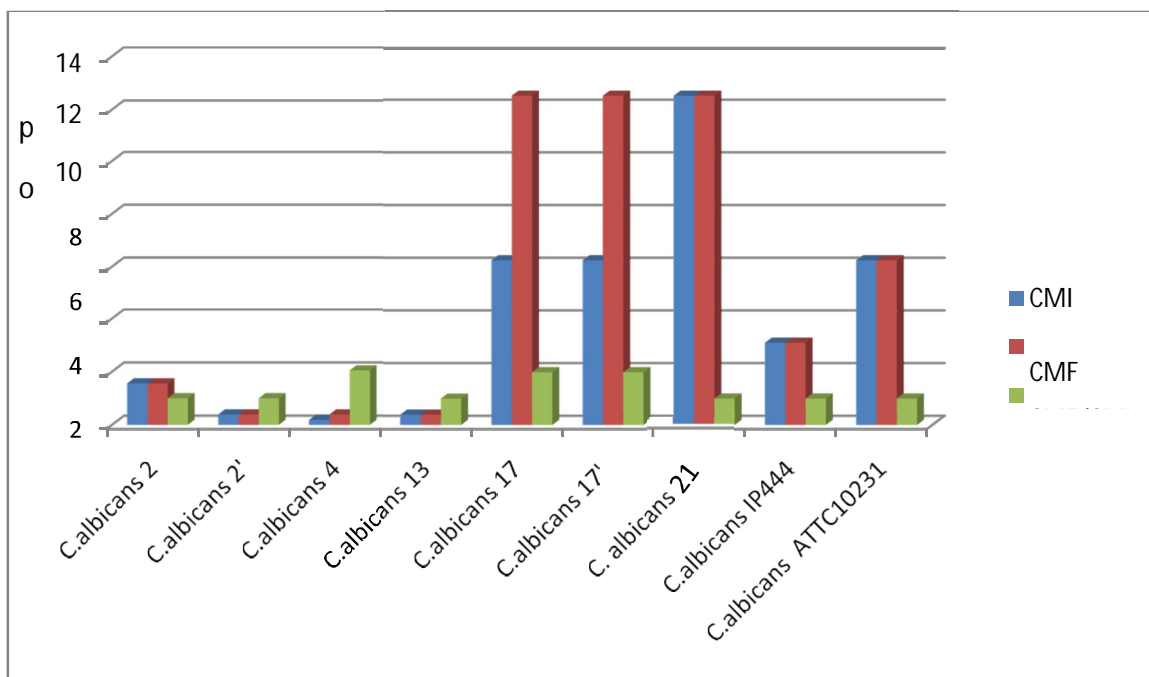
- Concernant les CMF, sont dans la plus part des souches égalent au CMI, leurs valeurs varient de 0,39% à 12.5%.

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

<b>Souche</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMF /CMI</b>
<i>C.albicans</i> 2	1.56	1. 56	1
<i>C.albicans</i> 2	0.39	0.39	1
<i>C.albicans</i> 4	0.19	0.39	2.05
<i>C.albicans</i> 13	0.39	0.39	1
<i>C.albicans</i> 17	6.25	12.5	2
<i>C.albicans</i> 17'	6.25	12.5	2
<i>C.albicans</i> 21	12.5	12.5	1
<i>C.albicans</i> 444 IP	3.12	3.12	1
<i>C.albicans</i> ATTC 10231	6.25	6.25	1

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

Donc le chlorhexidine est considérée come fongicide pour les souches de référence IP 444 et ATTC 10231 et les souches N° 2, souche N° 13, et N°21 et le rapport CMF/CMI est supérieur à 2 pour les souches N° 17 et N° 13 qui nous pouvons considérer le chlorhexidine comme fongistatique .



**Figure n° 20** : Histogramme représentant les pourcentages des CMI et CMF et CMF/CMI des souches de *Candida albicans*.

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

L'extraction d'ergostérol membranaire des souches isolées (N°04,21), et de souches de références (ATTC 10231) a été réalisée selon un protocole décrit par **Beth A** et ses collaborateurs en 1999, les molécules d'ergostérol ainsi récupérées dans la phase supérieure d'éther de pétrole ont été diluées au 1/5, la lecture à été effectuée par spectrophotométrie UV entre 230 et 300 nm.

Les graphes ci-dessous, représentent le tracé du spectre d'absorption de la solution d'ergostérol membranaire extrait à partir des souches de *Candida albicans* N°04(Figure N°16), souche N° 21 (Figure N°17) et souche ATTC 10231 (FigureN°18).

Les trois graphes représentent des différents pics avec des longueurs d'ondes différentes dont l'absorbance diffère pour les 3 souches de *Candida albicans* N°04 , N° 21 , et ATTC 10231 .

Pour la souche N°04 : le graphe représente 3 courbes et 03 pics de défférentlangueured'onde.

La courbe N° 01 : le pic a environ 254 nm, dans l'absorbance est égale 2,01 DO et la courbe

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

Pour la souche N° 21 : le graphe représente 3 courbes et 03 pics de différentes longueurs d'onde.

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

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

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

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

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

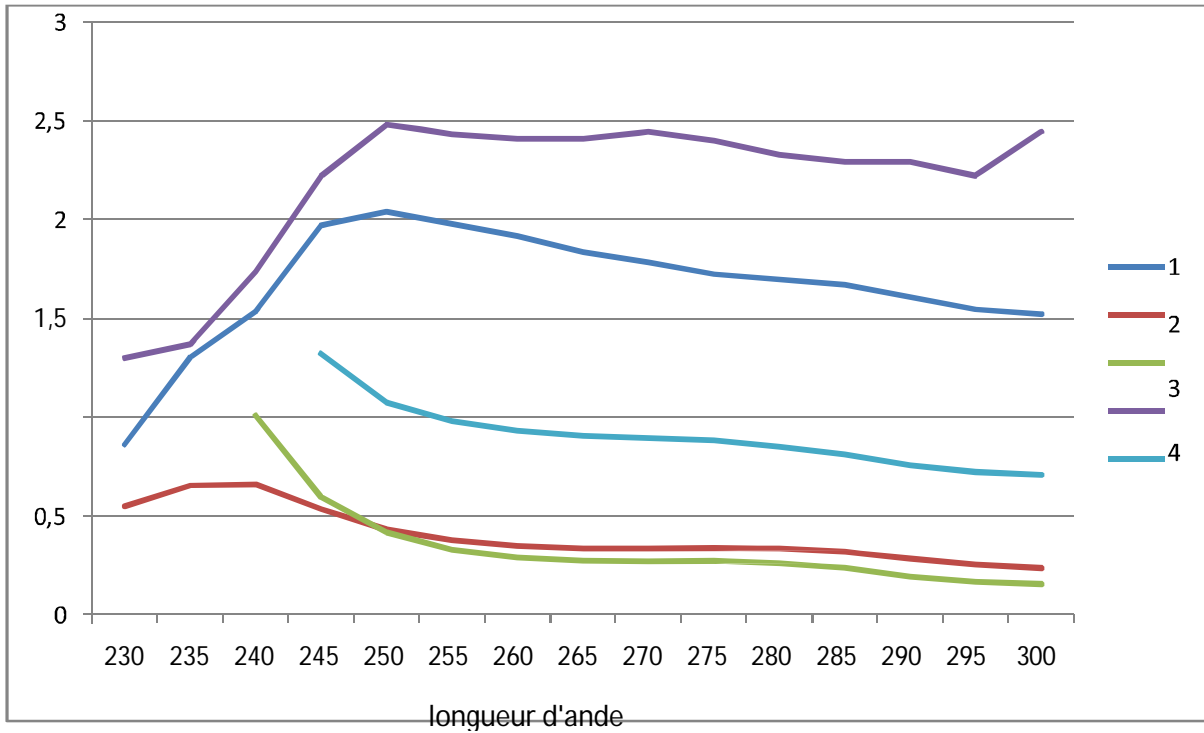
**Q :** Quantité d'ergostérol en %.

**A:** Absorbance à 281.5.

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

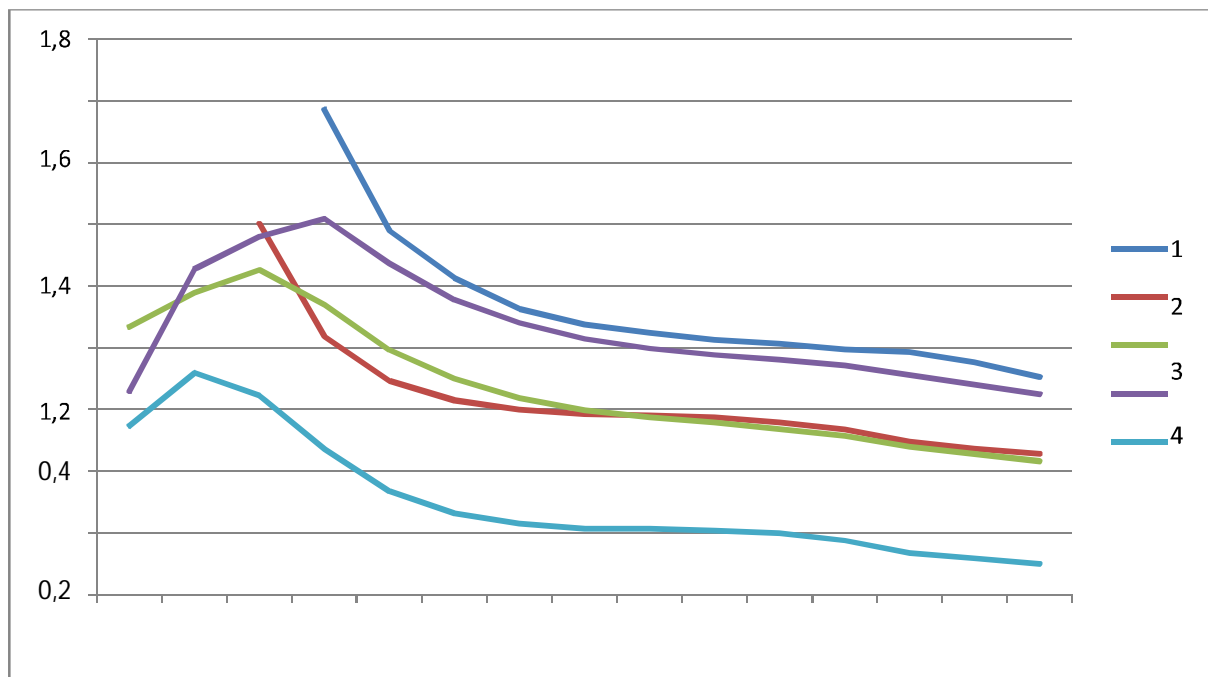
**P:** Poidsnettes du culot.

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



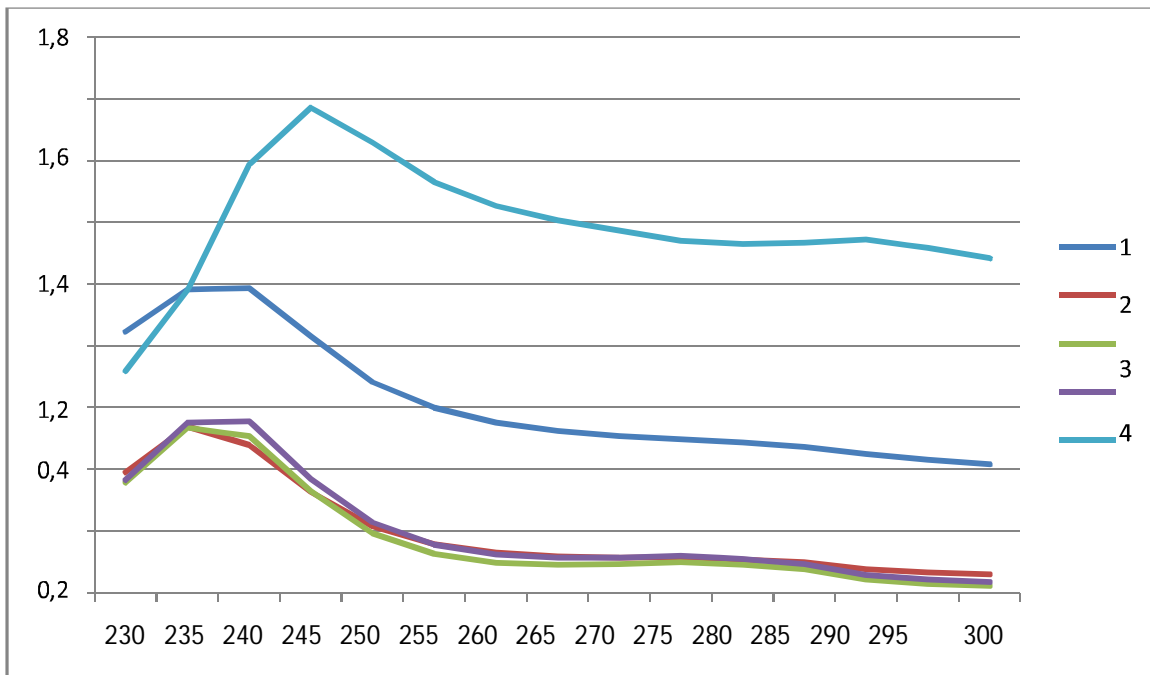
**Figure n°21** : les courbes de dosage de l'ergostérol de souche n° 04

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



**Figure n°22** : courbe de dosage de l'ergostérol de souche n° 21

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



**Figure n° 23:** courbe de dosage de l'ergostérol de souche de référence ATTC 10231

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

	Les souches répétées	A=[%ergostérol +%24(28)DHE]	B=%24(28)DHE	%ergostérol=A-B	M	S
<b>Souche N°4 : Sensible.</b>	<b>1</b>	0.106	0.059	/	11.13	11.13%±2.873
	<b>2</b>	2.25	1.26	/		
	<b>3</b>	0.203	0.114	8.9%		
	<b>4</b>	0.283	0.158	12.5%		
	<b>5</b>	0.251	0.140	11.1%		
<b>Souche N° 21 : Resistance.</b>	<b>1</b>	0.049	0.027	2.2%	1.86	1.86%±0.234
	<b>2</b>	0.035	0.019	1.6%		
	<b>3</b>	0.071	0.040	3.1%		
	<b>4</b>	0.029	0.016	1.3%		
	<b>5</b>	0.025	0.014	1.1%		
<b>Souche de référence ATTC 10231</b>	<b>1</b>	0.265	0.149	11.6%	9.62	9.62%±2.305
	<b>2</b>	0.206	0.115	9.1%		
	<b>3</b>	0.213	0.119	9.4%		
	<b>4</b>	0.190	0.106	8.4%		
	<b>5</b>	2.625	1.47	/		

#### 8. les taux d'ergostérol membranaire de trois souches répéter de *Candida albicans* :

ce travail qui consiste à l'étude de la résistance de *Candida albicans* isolée à partir des cavités buccales à la chlorhexine fréquemment utilisée en produits cosmétiques, dont il ressort que le taux d'ergostérol membranaire est élevé N°04 (11.13%±2.873) chez les souches sauvages sensibles (CMI=0,19 %), tandis qu'il taux à (9.62%±2.305) est inférieur chez les souches de référence ATTC 10231 (CMI =6.25 %), et très inférieur chez les souches la plus résistances N°21(1.86%±0.234) de (CMI =12.5%).

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



# Conclusion Générale

## Conclusion Générale :

*Candida albicans* est une levure polymorphique commensale de la cavité buccale et du tractus digestif, des muqueuses digestive et gynécologique qui peut entraîner des infections sévères

particulièrement chez les patients immunodéprimés les patients atteints du sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse. Les candidoses orale et œsophagienne sont fréquentes chez le patient atteint du sida. Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose).

A l'état pathogène, les formes blastospores sont généralement observées en association avec des éléments filamenteux. Lorsque *Candida* s'infiltré dans le flux sanguin, l'infection devient systémique et on parle alors de candidémie. Les candidémies sont caractérisées par une mortalité de l'ordre de 40 %. *Candida albicans* peut donner également une multitude d'autre infections car il s'agit d'un pathogène opportuniste très polyvalent, il peut être responsable d'infection superficielle cutanée, causer un érythème fessier chez les nouveau-nés, une bronchopneumonie et/ou une pneumonie, une vaginite, une balanite ou être responsable d'infections profondes.

La prophylaxie et le traitement des candidoses ne se réduisent pas à leur seul traitement par voie locale ou générale mais doivent faire rechercher des facteurs favorisants, particulièrement en cas de formes récidivantes

# Bibliographie

## A

- Ainsworth GC.** (1986). History of medical and veterinary mycology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Addy M et Roberts WR.** Comparison of the inorally cavity of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine. Relevance to mode of action. J Clin periodantal 1981.

## B

- Buffo et Herman, 1984** ,*candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inhevitanace and normal hyphal branching.Eukaryot cell 2006,5 :359- 367.
- Bartnicki-, S.**2006. Chitosomes: past, present and future. FEMS Yeast Res 6:957-65.
- Berkhout CM.** (1923). De schimmelgeslachten Monilia, Oidium, Oospora en Torula. Utrecht University, Utrecht.
- Boucherit-Atmani Z., Seddiki S. M. L., Boucherit K., Sari-Belkharoubi L.,Kunkel D. (2011).** *Journal de Mycologie Médicale, 21(3),182-187.*
- Bonesvoll P, Lokken P et Rolla G.** Influence of concentration, time, temperature and ph on the retention of chlorhexidine in the humain oral cavity after mouth rinses.Arch Oral Biol 1974
- Braun, B. R., W. S. Head, M. X. Wang, and A. D. Johnson.**2000. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. Genetics 156:31-44.

## C

- **Casson et Strippoli, 1973.**,adherence and reveptor relationships of *candida albicans* Microbiol Rev 1991.55 :1-20.
- Calderone RA.** (2002). Introduction and historical perspectives. In *Candida and candidiasis*, ed. Calderone RA, pp. 3-13. ASM Press, Washington, D.C.
- Carlotti H, Maffort H.** Effect of chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque bacteria. J Periodont Res, 1996.

-**Casone, A.**, celle wall of *Candida albicans* its function and its impact of on the host . curr top med mycol 1989.3 :248-314.

-**Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., casanova, Mgozalbo, D. And Martinez , J.P.**, cell wall and secreted proteins of candida albicans identificat, function and expression .Microbiol Mol Biol Rev 1998.62 :130-180.

-**Chaffin, W. L., and D. M. Stocco.**1983. Cell wall proteins of *Candida albicans*. Can J Microbiol 29:1438-44.

- **Chabasse et al.,1999** constriction of an sfil macrorestriction map of the *Candida albicans* genome J Bacteriol 1993. 175 ; 6637-6651

-**Ciango SG, Mather ML et Bunnel HL.**The effect on a quaternary ammonium containing mouthwash on formed plaque pharmacol ther dent 1978.

- **Cuzel et al –(1999).** Pharmascience Inc. Product Monograph PERICHLOR (Chlorhexidine Gluconate) 1999.

## D

-**Dean, N.**1999. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. Biochim Biophys Acta 1426:309-22.

-**Definition** : Réalisé en collaboration avec des Professionnels de la santé et de la médecine, sous la direction du docteur Pierrick HORDECARLOTTI D.N., MAFFART P.-(1996) La chlorhexidine, revue bibliographique. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp*

-**Dolles OK et Gjemo P.**Caries increment and gingival stratus during 2 yeas use of chlorhexidine –and fluoride-containing dentifrices. Scan J Dent Res 1982.

- **Dupont B.**L'écobiologie des *Candida*.Laboratoire Squibb.,1985.

## E

-**Ernst, J. F., and S. K. Prill.**2001. O-glycosylation. Med Mycol 39 Suppl 1:67-74.

-**Euzeby J.**Mycologie médicale comparée. Collection Mérieux., 1994, Fondation manuel, Tome II, 88-251

## F

- **Filler et Swerdloff, 1995.** Antisepsie et désinfection. Paris : Les éditions E.S.K.A.
- **Filloux et Vallet, 2003.** Some toxicological observation on chlorhexidine. *J Periodont Res* 1973.

## G

- **Graser et al., 1996.** Chlohexidine in endodontics. *Braz Dent J* 2013
- Geais H.** Les antiseptiques et les désinfectants. Paris : les éditions ARNETTE. *J Clin Periodont* 2006.
- Gerald et Russel.** Definition of chlorhexidine by Médical dictionary. Consulté en 1999.
- **Gerald et Russell , 1999.** Effect of four antimicrobial lavage solutions on the tarsocrural joint of horses. *Vet. Surg*, 305-315.
- **Ghannoum et al. 2001.** 1999. Experimental gingivitis in man. [*J Periodontol. 1999 May-Jun*] ;
- Gorman et Scot.** In vivo substantivity of 0.01% and 0.1% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. [*Clin Oral Investig.* 2004.
- Gormanet Scoutt .** Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scan J Dent Res* 2004
- Grillotr.** Les mycoses humaines: démarche diagnostic. Collection option Bio., Elsevier, 1996, 116- 29 - 30-122.

## H

- Haugen E et Johansen JR.** Sensitization of guinea pigs with chlorhexidine. *Acta Odontol Scan* 1974.
- Heitman, J.** 2006. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr Biol* 16:R711-25.
- Hentze U , Birkhed D et Bjorn H.** Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J* 1983.

- **Horisberger et al., 2006** .Side-effects and patient acceptance of 0.2 versus 0.1 chlorhexidine used as post-operative prophylactic mouthwash. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988.

-**Hjeliord LG, Rolla G et Bonesvoll P.** CHLOHEXIDINE-protein interaction. *J Periodont Res* 1973.

- **Hoyer et al., 2001.**1988. Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol* 46:444-52.

-**Hogo WB et Longworth AR.**The effects of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic. *J Pharm pharmacol* 1966.

-**Hull, C. M., and A. D. Johnson.**1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285:1271-5.

-**Hull, C. M., R. M. Raisner, and A. D. Johnson.**2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289:307-10.

-**Hull CM, Raisner RM & Johnson AD.** (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science (New York, NY)*289,307-310.

## J

- **Johnson, 2003** Le *Candida albicans* : un signal d'alarme. *Santé action*. , 1992.

- **Miller et Johnson, 2002.** A study of the elimination of chlorhexidine from the oral cavity using a new spectrophotometric method. *J periodont Res* 1971

-**Johnson, A.**2003. The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol* 1:106-16.

-**Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G,**

## T

**Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW & Scherer S.** (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*101,7329-7334.

## K

- **Koenigh.,1995.** The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* 35:601-11.

-**Kassab H et Aboul-Rahman G.** The effect of some antifungal agents and chlorhexidine on *Candida albicans* adherence on acrylicresin denture base surface.

32. 33., placebo-controlled, 3week experimental gingivitis study . *J Clin periodontol* 2006 ; 33 :561-567.

-**Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf.**2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39 Suppl 1:1-8.

-**Knoke M & Bernhardt H.** (2006). The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses* 49,283-287.

-**Koeigh.** Guide de mycologie médicales. Collection Ellipses., 1995.

## L

- **Marot-Leblond et al.,1982.** Quality-specific taste impairment following the application of chlorhexidine digluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1988.

-**Lindhe J, Lang N, Karring T et coll.** *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.*4<sup>th</sup> ed. Copenhagen : Munksgaard .Blackwell, 2003

-**Lorenz K, Bruhn G, Heumann C et coll.** Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque , gingivitis, and discolouration .

-**Lorenz K, Bruhn G.** Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind

-**Lopes Ribot,J.I . ,casanova,M.,Murgui,A.and martinez,J .p.,**antibody response to *candida albicans* cell wall antigens *FEMS immunol med microbiol* 2004.41 :187-196.

-**Lotz, H., K. Sohn, H. Brunner, F. A. Muhlschlegel, and S. Rupp.**2004. RBR1, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by RIM101 and activated by NRG1. *Eukaryot Cell* 3:776-84.

## M

**Miller et Johnson, 2002.** (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science* (New York, NY)289,310-313.



-**Manning, M., and T. G. Mitchell.**1980. Morphogenesis of *Candida albicans* and cytoplasmic proteins associated with differences in morphology, strain, or temperature. *J Bacteriol* 144:258-73.

-**Marcilla, A., C. Monteagudo, S. Mormeneo, and R. Sentandreu.**1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. *Microbiology* 145 ( Pt 3):695-701.

-**Marcilla, A., M. V. Elorza, S. Mormeneo, H. Rico, and R. Sentandreu.**1991. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymolyase, chitinase and beta-mercaptoethanol. *Arch Microbiol* 155:312-9.

-**Maris P.**-(1990) Evaluation de l'activité in vitro des antiseptiques vétérinaires. *Ann. Rech. Vet.*

-**Mason K.V.**-(1993) **et Scott D.W** – (1995). *Current Veterinary Dermatology : The Science and Art of Therapy.*

. **Mathurs S , Tanu M Rahul S.** Chlorhexidine : The gold standart in Chemical Plaque Control *Natl j physiol pharm pharmacol* 2011.

- **Mendieta C, Valcorba N, Binney A et coll.** *J Clin Periodontol* 1994.

-**Mendieta C , Vallocorba N ,Binney A et coll.** Comparison of 2 chlorhexidine mouthwashes on plaque regrowth cavity orally. *J Clin Periodontol* 1994.

-**Miller, M. G., and A. D. Johnson.**2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110:293-302.

-**Murat M.**-(1995) Les antiseptiques. Thèse de Pharmacie Lille II

## N

-**Nakagawa ,Y.,Ohna ,N.and Murai ,T.**,Suppression by *Candida albicans* beta -glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cell in the presence of monocytes.*J infect dis* 2003.187 :710.713.

-**Nordbo H** .Discoloration of human teeth by a combination of chlorhexidine in mouthrinse. *Scan J Dent Res* 1971.

## O

- Odds, F. C.**1979. *Candida and Candidosis*, Leicester University Press ed, London.
- Odds, F. C.**1985.Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* 12:45-93.
- Oydn J et Gjermo.**Effect of chlorhexidine mouthrinses on concentration .  
Scan J Dent Res 1982.

## P

- Pfaller et al., 2007.**.. Diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan and anti-*Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol* 23:209-15.
- Pitarch, A., M. Sanchez, C. Nombela, and C. Gil.**2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics* 1:967-82.
- **poulain,D.and feuilhade-de-chauvin, M.**,candidos et levores diverses : 1995.
- Ponton, J., A. Marot-Leblond, P. A. Ezkurra, B. Barturen, R. Robert, and J. M. Senet.**1993. Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 61:4842-7.
- Prill, S. K., B. Klinkert, C. Timpel, C. A. Gale, K. Schroppel, and J. F.Ernst.**2005. PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* 55:546-60.

## Q

- Quigley et Hein.** Comparative cleansing efficiency of manuel and power brushing. *J Am Dent* 1962.

## R

- **Ruiz-Herrera, 2006.** Über den Soorpilz. *Physikalisch-Medicinische Societät zu Erlangen* 9, 190- 193.

-**Reiss, E., V. M. Hearn, D. Poulain, and M. G. Shepherd.**1992. Structure and function of the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl 1:143-56.

-**Robin CP.** (1853). *Histoire naturelle des végétaux. Parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants.* Ballière, Paris.

-**Rolla et al - (1971).** Manuel de pharmacologie. Paris :Masson et compagnie éditeurs.

-**Rolla G et Melson B.** On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine *J Dent Res* 1975.

- **Remy et Wirz, 1998.** Efficacy evaluations on five chlorhexidine teat dips formulations, *J.Dairy Sci.*, **76**, 2783-2788.

-**Ruis.herrera,J.,Elorza,M.V.,valantin,E.andsertandreu,R.,**molecular organization of the cell.Wall of *candida albicans* its relation pathogenicity *FEMS yeast Res* 2006,6 :14-29

## S

- **Surarit et al, (2001)** [Oral candidiasis: epidemiology, diagnosis and treatment]. *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia / SSO* 100, 548-559.

- **Sullivan et Robert, 2000.** Two years oral use of chlorhexidine in man .Changes in sensitivity of salivary flora. *J Periodont Res* 1976.

**Segretain, G., E. Drouhet, and F. Mariat.**1987. *Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale 5ème édition.,* Maloine ed, Paris.

**Sharkey, L. L., M. D. McNemar, S. M. Saporito-Irwin, P. S. Sypherd, and W. A. Fonzi.**1999. HWP1functions in the morphological development of *Candida albicans* do wnstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J Bacteriol* 181:5273-9.

**Sheens, Banfield N et Addy M.** The effect of unstimulated and stimulated whole saliva on extrinsic in mouthrinse.-a devlopment al method . *J Dent* 2002.

**SHEEN S, Owens J et Addy M.** The Effect of Chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque bacteria. *J Periodont Res*, 2001.

-**Shepherd,M .G.,**cell envlope of *candida albicans* *crit Rev micobiol* 1987.15 :7-25.

**SILNESS J et LOE H.** Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol Scand 1964.

**Slabas, A. R., B. Ndimba, W. J. Simon, and S. Chivasa.**2004. Proteomic analysis of the Arabidopsis cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations. Biochem Soc Trans 32:524- 8.

**Sohn, K., C. Urban, H. Brunner, and S. Rupp.**2003. EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. Mol Microbiol 47:89-102.

**Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom.**1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. Science 283:1535-8.

**Staab, J. F., Y. S. Bahn, C. H. Tai, P. F. Cook, and P. Sundstrom.**2004. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidyl inositol modification. J Biol Chem 279:40737-47.

**Surarit,R.,gopal,P.K.and shepherd, M.G.,**evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *candida albicans* J Gen Microbiol 1988 , 134 : 1723-1730.

**Surarit, R., P. K. Gopal, and M. G. Shepherd.**1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. J Gen Microbiol 134:1723-30.

## T

**Taylor JW.** (1995). Making the Deuteromycota redundant: a practical intergration of mitosporic fungi. Canadian journal of botany 73, s754-s759.

**Tonelli et G jerlemanne et hoscoold 1995.**Enseignement optionnel de pathologie équine. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

**Tronchin, G., D. Poulain, J. Herbaut, and J. Biguet.**1981. Cytochemical and ultrastructural studies of *Candidaalbicans*. II. Evidence for a cell wall coat using concanavalin

A. J Ultrastruct Res 75:50-9.

**Tsuchimori, N., L. L. Sharkey, W. A. Fonzi, S. W. French, J. E. Edwards, Jr., and S. G. Filler.**2000. Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. Infect Immun 68:1997-2002.

## U

**Umazume, M., E. Ueta, and T. Osaki.**1995. Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. *J Clin Microbiol* 33:432-9.

**Urban, C., K. Sohn, F. Lottspeich, H. Brunner, and S. Rupp.**2003. Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett* 544:228-35.

**Urban, C., X. Xiong, K. Sohn, K. Schroppel, H. Brunner, and S. Rupp.**2005. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 57:1318- 41.

## Z

**Zopf W.** (1890). *Die Pilze*. Verlag von E. Trewendt, Breslau.

# Annexe

## Annex

### *Milieu sabouraud :*

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

PH=6.3

### Milieu Gélose sabourand

Milieu sabourand dishédraté .....	65.5g/l
Eau distillée.....	1000ml

Ph =7.2

### Milieu selectif

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

Ph=6

### Milieu PCB

Eau distillée.....	1000ml
Bille de bœuf .....	150ml
Extrait de la pomme de terre.....	250 ml
Extrait de carotte .....	250 ml
Agar-agar.....	25 g

pH = 7.2

Nombre d'échantillon	L'âge	Sexe	Utilisation de dentifrices	La marque de dentifrices	Nombre d'utilisation des dentifrices	La période d'utilisation	L'utilisation de chlorhexidine
1	23	F	Oui	Signal	1	soir	/
2	24	F	Oui	Sanino	2	Matin et Soir	/
3	23	F	Oui	Signal	1	Soir	/
4	32	H	Oui	Daber elmiswak	2	Matin et soir	/
5	24	F	Oui	Colgate	1	Soir	/
6	04	F	Oui	Sanino kids	3	Matin midi Soir	/
7	18	F	Non	/	/	/	/
8	81	H	Non	/	/	/	/
9	45	F	Non	/	/	/	/
10	33	H	Oui	Daber elmiswak	1	soir	/
11	27	F	Oui	Snonas	2	Matin et soir	/
12	30	H	Non	/	/	/	/
13	11	H	Non	/	/	/	/
14	36	H	Non	/	/	/	/
15	19	F	Oui	Sansodaine	2	Matin et Soir	/
16	49	H	Oui	Changé la marque chaque fois	1	Soir	/
17	29	H	Oui	Colgate	1	Soir	/
18	26	F	Oui	Sanino sencive	2	Matin et Soir	/
19	09	H	Non	/	/	/	/
20	42	H	Non	/	/	/	/
21	25	H	Oui	Changé la marque chaque fois	1	Soir	/

F : femme

H : homme



