



**Université Sidi Mohammed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz- Fès**  
**Centre d'Etudes Doctorales**  
**"Sciences et Technologies"**

**Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement  
et Développement Durable**

**Discipline : Biologie**

**Spécialité : Biotechnologie et chimie médicinale**

**Laboratoire : Biotechnologie et Préservation des Ressources Naturelles**

**THESE DE DOCTORAT**

Présentée par

**Mounyr BALOUIRI**

**Propriétés antimicrobiennes d'un isolat de *Bacillus* sp. de la  
rhizosphère de *Calotropis procera* et son effet sur  
l'adhésion de *Candida albicans* aux alliages dentaires**

Soutenue le, 6 juillet 2018 devant le jury composé de :

<b>Pr. Mohammed EL HASSOUNI</b>	<b>FSDM - Fès</b>	<b>Président</b>
<b>Pr. Hassan HAJJAJ</b>	<b>FS – Meknès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Mohammed MERZOUKI</b>	<b>FSDM – Fès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Abdellah ZINEDINE</b>	<b>FS – Eljadida</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Loubna BAHJE</b>	<b>FMD – Rabat</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Pr. Aziz BELGHITI ALAOUI</b>	<b>FST – Fès</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr. Saad KORAICHI IBNSOUDA</b>	<b>Cité d'Innovation - Fès</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr. El Houssaine HARKI</b>	<b>FST - Fès</b>	<b>Directeur de thèse</b>



# DEDICACE

*A mes parents Zohra Richi et Noureddine Balouiri.  
Votre soutien et votre affection ont été déterminant dans la réalisation de  
ce travail.  
Soyez bénis.*

*A la mémoire de ma grande mère, Aicha Sekou  
Ton amour inconditionnel me comble sans cesse*

*A mon frère et ma sœur, vous êtes ma fierté.*

## **REMERCIEMENTS**

Le présent travail constitue le recueil des résultats principaux obtenus à l'issue de six années de coopération entre le laboratoire des plantes médicinales et aromatiques et substances naturelles de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques et le laboratoire de Biotechnologie Microbienne au sein de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

Le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation et auxquelles d'ailleurs j'exprime ma profonde gratitude. La réussite de ce travail ne saurait être possible sans le grand apport de mon directeur de recherche Prof. El Houssaine HARKI et de ma co-directrice Prof. Samira BOUHDID. Je remercie Monsieur El Houssaine HARKI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce projet au sein de son équipe, d'avoir suivi mon travail avec beaucoup d'intérêt, de gentillesse, de présence et d'efficacité. Mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance s'adressent également à Madame Samira BOUHDID, Professeur à la Faculté des Sciences de Tétouan, pour ces années d'encadrement tant apprécié, sa rigueur scientifique, ses encouragements, ses conseils judicieux et la patience ainsi que le grand talent de supervision dont elle a su faire preuve, et qui m'a énormément appris quant à la rédaction des publications scientifiques.

Je serais toujours reconnaissant à Monsieur Saad KORAICHI IBNSOUDA, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, qui a aussi dirigé mes recherches avec beaucoup de compétence et de disponibilité. Ses conseils judicieux et les nombreuses discussions scientifiques ont largement contribué à ma formation. Cher Professeur, je vous remercie également de m'avoir accordé le plaisir et l'honneur d'être un membre de votre équipe et d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et membre de jury.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Mohammed EL HASSOUNI, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Cher Professeur, j'ai le plaisir d'avoir été un jour votre étudiant, vous m'avez tant appris avec beaucoup de rigueur scientifique et de pédagogie durant ma formation en master.

J'adresse également mes vifs remerciements à Monsieur Abdellah ZINEDINE, Professeur à la Faculté des Sciences - El Jadida, à Monsieur Hassan HAJJAJ, Professeur à la Faculté des Sciences – Meknès et à Monsieur Mohammed MERZOUKI, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz. Chers Professeurs, veuillez agréer toute notre reconnaissance d'avoir accepté d'être des rapporteurs de cette thèse et membres de jury.

Je remercie également Madame BAHJE Loubna, Professeur à la Faculté de Médecine Dentaire –Rabat, d'avoir accepté d'être examinatrice de cette thèse et membre de jury.

Je tiens aussi à diriger mes sincères remerciements à Monsieur Aziz BELGHITI ALAOUI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès pour sa confiance, ses encouragements, ses conseils judicieux. Je vous remercie cher Professeur, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier vivement avec tant de gratitude Madame Dalila BOUSTA, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, pour l'intérêt constant qu'elle a porté à mon travail, pour sa disponibilité, sa confiance, son aide moral et matériel et ses conseils sages. Je retiendrai en exemple votre aptitude à conserver la double facette de rigueur scientifique combinée à une amicalité chaleureuse.

J'adresse aussi mes remerciements et ma gratitude à Madame Wessal Ouedrhiri, Docteur en chimie, pour son amitié, ses encouragements, les discussions scientifiques qu'on a pu avoir et l'intérêt qu'elle a porté à mon projet doctoral et aussi de m'avoir initié dans les différentes manipulations des analyses chromatographiques.

J'adresse aussi mes remerciements aux Professeurs de l'Institut National des PAM : Prof. Houria Mesbahi, Prof. Hassan Greche, Prof. Abdesslam Ennabili, Prof. Abdellah Farah. Mes remerciements vont aussi aux Professeurs de Faculté des sciences et techniques de Fès : Prof. Najoua Benchemssi, Prof. Omar El Faricha, Prof. Mohamed Houssaini Iraqui, Prof. Khadija Bekhti, Prof. Jamal Yamani, Prof. Naima Ghachtouli, Prof Abdellatif Haggoud, Prof. Kaoutar Ben Brahim, Prof. Laila Manni, Prof, Wifak Bahafid ...

Je tiens à remercier vivement mes amis et collègues à la Faculté des sciences et techniques de Fès : Farid El Quacimy, My Sadiki, Btissam Ourid, Sara Lebrazi, Ikrame Zeouk, Yasser

Lekbach, Asmae Nakkabi, Taoufik Haloui, Said El Kinany, Mohamed Rabie, Zakaria Hazzoumi, Faouzi Lachaari, Hajar Maataoui, Fadoua Bennouna, Meryem Asri, Hamza Ettadili, Asmae Misbah, Mohamed Y Sayah, Aziza Kouchou, Mouhcine Fadil, Ismail Fichtali, Brahim Benbrik, Douae Ouyahia ...

Je dirige également un grand merci, à travers ces lignes, à mes amis avec qui j'ai partagé des moments inoubliables au cours de la préparation de ce travail, spécialement ; Hicham El Hadi, Azeddine Bachar, Amine Amektit, Mehdi Bentaleb, Latifa El Mansouri, Mohamed Lmir, Lahbib Bachiri, Mohamed Slimi, Mohamed Mohim, Samir El Azzaoui, Adnane Errahmouni, Anas Laaroussi, Oussama Ben Tabet, Bouchra Lachhab, Mohamed Idyr, Brahim Dermoumi, Imane Hamdaoui.

Enfin, ce travail est le fruit de nombreuses années d'étude, tant à Taounate comme à Fès et à Meknès, auxquelles l'amour et le soutien inconditionnel de ma famille ont largement contribué.

Je remercie finalement tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Formes de croissance de <i>C. albicans</i> ; a) Blastospores ; b) Pseudohyphes ; c) Tubes germinatifs ; d) Véritable hyphe, (la barre = 10 µm) (Sudbery et al. 2004) -----	5
<b>Figure 2 :</b> Ultrastructure de <i>C. albicans</i> visualisée par microscopie électronique : A) Noyau, ribosomes et paroi cellulaire (Grossissement 40 000) ; B) Blastospore et cellule en germination (Grossissement 15 000). (N) : Noyau, (M) : Mitochondrie ; (V) : système vaculo-vésiculaire (Tokunaga et al. 1986) -----	7
<b>Figure 3 :</b> Illustration des étapes de formation d'un biofilm (Srivastava et Bhargava 2016) -----	14
<b>Figure 4 :</b> a) Représentation graphique de l'énergie libre d'interaction entre une particule colloïdale et une surface en fonction de la distance de séparation selon la théorie DLVO (An et al. 2000) ; b) Adhésion réversible d'une cellule microbienne sur une surface selon la théorie DLVO (Hori et Matsumoto 2010) -----	21
<b>Figure 5 :</b> Illustration de la double couche électrique et différence du potentiel électrique en fonction de la distance à la surface d'une particule chargée négativement en solution (An et al. 2017) -----	26
<b>Figure 6 :</b> Relation entre l'adhésion microbienne et les caractéristiques physicochimiques de la surface cellulaire du microorganisme (Van Loosdrecht et al. 1987b) -----	28
<b>Figure 7 :</b> A) Connexion entre la cellule et la surface et début de l'adhésion irréversible (Hori et Matsumoto 2010) ; B) Déformation de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> pour franchir la barrière d'énergie (Feldner et al. 1983) -----	29
<b>Figure 8 :</b> Relation entre l'adhésion et l'hydrophobicité de surface du substrat A) Relation entre la biomasse anaérobie attachée et le degré d'hydrophobicité de divers supports inorganiques ; B) Relation entre le nombre de cellules de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 adhérentes et le degré d'hydrophobicité de différents types de substrats (Oliveira et al. 2001)-----	32
<b>Figure 9 :</b> Schéma récapitulatif des facteurs liés aux propriétés de la surface qui influencent l'adhésion microbienne dans un environnement complexe (Song et al. 2015) -----	34
<b>Figure 10 :</b> Candidoses buccales superficielles ; a) Perlèche candidosique ;b) Glossite érythémateuse et perlèche bilatérale ; c) Stomatite candidosique constituée sous forme de muguet buccal (Caumes 1998)-----	37
<b>Figure 11 :</b> Lésions carieuses de différents stade d'évolution ; A) Lésion carieuse de la dentine ; B) Lésion carieuse extensive de la dentine ; C) Lésion par abfraction (Rinastiti 2016) -----	39
<b>Figure 12 :</b> A) Prothèse amovible complète supérieure ; B) Prothèse amovible partielle en cobalt-chrome; C) Implant dentaire inséré (Hollins 2015)-----	39
<b>Figure 13 :</b> A) Biofilm à <i>C. albicans</i> sur des irrégularités d'une prothèse dentaire visualisé par microscopie électronique (barre = 5 µm) (Ramage et al. 2004) ; B) Photo d'un érythème de la muqueuse palatine dessinant le contour d'une prothèse amovible supérieure contaminée par <i>Candida albicans</i> (Ahariz et al. 2010) -----	43
<b>Figure 14 :</b> Différentes stratégies pour limiter l'établissement des infections associées aux appareils médicaux (Campoccia et al. 2013)-----	45
<b>Figure 15 :</b> Schéma d'une section racinaire montrant la structure de la rhizosphère (McNear 2013)-----	51
<b>Figure 16 :</b> Structures chimiques de quelques métabolites secondaires produits par des espèces de <i>Bacillus</i> spp.---	56

<b>Figure 17 :</b> Structures chimiques de quelques lipopeptides cycliques produits par <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -----	<b>57</b>
<b>Figure 18 :</b> Photos des plantes sélectionnées pour l'échantillonnage de leur sol rhizosphérique ; A) <i>Calotropis procera</i> Ait. ; B) <i>Myrtus communis</i> L. ; C) <i>Pistacia lentiscus</i> L.-----	<b>60</b>
<b>Figure 19 :</b> Photo d'une boîte d'isolement ( <i>M. communis</i> ; dilution 10 <sup>-3</sup> ; milieu PDA)-----	<b>63</b>
<b>Figure 20 :</b> Photos montrant l'activité antimicrobienne de certains isolats rhizosphériques évaluée par la méthode de diffusion sur des plots d'agar -----	<b>64</b>
<b>Figure 21 :</b> Distribution du pourcentage des isolats actifs par type des microorganismes et par plante -----	<b>68</b>
<b>Figure 22 :</b> Nombre d'isolats actifs en fonction du nombre de souches indicatrices qui leur sont sensibles -----	<b>70</b>
<b>Figure 23 :</b> Pourcentages de sensibilité des souches microbiennes test aux isolats rhizosphériques -----	<b>72</b>
<b>Figure 24 :</b> Illustration de la méthode de microdilution adoptée pour la détermination de la CMI de l'extrait méthanolique (Balouiri <i>et al.</i> 2016) -----	<b>85</b>
<b>Figure 25 :</b> Activité antifongique de l'isolat Cp-LMA-16 vis-à-vis de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 révélée par la méthode de diffusion sur des plots d'agar -----	<b>89</b>
<b>Figure 26 :</b> Cinétique de croissance de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 dans le milieu LMB à 30 °C -----	<b>91</b>
<b>Figure 27 :</b> Séparation chromatographique et bioautographie de l'extrait acétonique ; a) Chromatogramme sur couche mince visualisé sous rayons UV ; b) Bioautographie du chromatogramme en utilisant <i>C. albicans</i> comme souche cible -----	<b>99</b>
<b>Figure 28 :</b> Mesure de la rugosité des surfaces des alliages dentaires -----	<b>106</b>
<b>Figure 29 :</b> Représentation de l'angle de contact ( $\theta$ ) d'une goutte déposée sur une surface solide-----	<b>107</b>
<b>Figure 30 :</b> Goniomètre (GBX, France) utilisé pour mesurer les angles de contact -----	<b>108</b>
<b>Figure 31 :</b> Propriétés physicochimiques de la surface de <i>C. albicans</i> avant et après traitement par l'extrait antifongique -----	<b>116</b>
<b>Figure 32 :</b> Evolution de l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ) et du caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) de la surface de l'alliage Co-Cr en fonction de la durée du préconditionnement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16-----	<b>124</b>
<b>Figure 33 :</b> Evolution de l'énergie totale de l'adhésion de <i>C. albicans</i> sur les deux alliages dentaires en fonction de la durée de leur préconditionnement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16-----	<b>131</b>
<b>Figure 34 :</b> Corrélation positive entre le caractère donneur d'électrons de surface et l'énergie libre totale de l'adhésion de <i>C. albicans</i> sur les deux alliages dentaires ; A) alliage Co-Cr ; B) alliage Ni-Cr-----	<b>132</b>
<b>Figure 35 :</b> Corrélation positive entre l'hydrophobicité (exprimée par l'énergie libre d'interaction $\Delta G_{iwi}$ ) et par l'angle de contact vis-à-vis de l'eau ( $\theta_w$ ) et l'énergie libre totale de l'adhésion $\Delta G_{Tot}$ de <i>C. albicans</i> sur l'alliage dentaire Co-Cr-----	<b>133</b>
<b>Figure 36 :</b> Clichés microscopiques de l'adhésion de <i>C. albicans</i> sur les surfaces des alliages dentaires traités et non traités par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 ; A) témoin négatif de l'alliage Co-Cr ; B) témoin négatif de l'alliage Ni-Cr; C) alliage Co-Cr non traité ; D) alliage Ni-Cr non traité ; E) alliage Co-Cr traité ; F) alliage Ni-Cr traité -----	<b>136</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b><u>Tableau 1</u></b> : Facteurs favorisant le développement des candidoses cutanées ou muqueuses (Caumes 1998) -----	<b>36</b>
<b><u>Tableau 2</u></b> : Plantes sélectionnées pour l'échantillonnage et leurs sites géographiques -----	<b>60</b>
<b><u>Tableau 3</u></b> : Souches microbiennes utilisées comme microorganismes indicateurs -----	<b>61</b>
<b><u>Tableau 4</u></b> : Criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de <i>Calotropis procera</i> Ait. -----	<b>65</b>
<b><u>Tableau 5</u></b> : Criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de <i>Myrtus communis</i> L. -----	<b>66</b>
<b><u>Tableau 6</u></b> : Criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de <i>Pistacia lentiscus</i> L. -----	<b>67</b>
<b><u>Tableau 7</u></b> : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification par PCR -----	<b>77</b>
<b><u>Tableau 8</u></b> : Mélange réactionnel de l'amplification par PCR -----	<b>78</b>
<b><u>Tableau 9</u></b> : Caractères biochimiques et caractéristiques de croissance de l'isolat Cp-LMA-16 -----	<b>90</b>
<b><u>Tableau 10</u></b> : Activité antifongique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 sur différents milieux de culture solides et liquides -----	<b>92</b>
<b><u>Tableau 11</u></b> : Activité antifongique des extraits obtenus par extraction solide-liquide vis-à-vis de <i>C. albicans</i> -----	<b>94</b>
<b><u>Tableau 12</u></b> : Impact du traitement thermique, du changement de pH et de l'action des protéases sur l'activité antifongique de l'extrait méthanolique vis-à-vis de <i>C. albicans</i> -----	<b>97</b>
<b><u>Tableau 13</u></b> : Composantes énergétiques des liquides purs utilisés pour les mesures des angles de contact (Van Oss <i>et al.</i> 1988) -----	<b>109</b>
<b><u>Tableau 14</u></b> : Angles de contact de la surface cellulaire de <i>C. albicans</i> avant et après traitement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 -----	<b>114</b>
<b><u>Tableau 15</u></b> : Composantes Lifshitz–Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ), donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ) de la surface de <i>C. albicans</i> avant et après traitement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 -----	<b>115</b>
<b><u>Tableau 16</u></b> : Angles de contact, composantes de l'énergie de surface et énergie libre d'interaction des alliages dentaires non traités -----	<b>120</b>
<b><u>Tableau 17</u></b> : Angles de contact de l'alliage dentaire Co-Cr après préconditionnement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 -----	<b>123</b>
<b><u>Tableau 18</u></b> : Energie libre d'interaction et tensions de surface de l'alliage dentaire Co-Cr après préconditionnement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 -----	<b>123</b>
<b><u>Tableau 19</u></b> : Angles de contact de l'alliage dentaire Ni-Cr après préconditionnement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 -----	<b>125</b>
<b><u>Tableau 20</u></b> : Energie libre d'interaction et composantes de l'énergie de surface de l'alliage dentaire Ni-Cr après préconditionnement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 -----	<b>126</b>
<b><u>Tableau 21</u></b> : Energies libres d'interaction de Lifshitz–Van der Waals ( $\Delta G^{LW}$ ), acide–base de Lewis ( $\Delta G^{AB}$ ) et l'énergie libre totale de l'adhésion ( $\Delta G^{Tot}$ ) de <i>C. albicans</i> sur les alliages dentaires traités et non traités par l'extrait méthanolique -----	<b>130</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALS	Agglutinin-like sequence proteins
ANOVA	Analyse de la variance (Analysis of variance)
API	Analytical profile index
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	Collection Américaine des Cultures Types (American Type Culture Collection)
Au	Or
BaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Chlorure de baryum dihydraté
BBP	Bleu de bromophénol (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> BrO <sub>5</sub> S)
BET	Bromure d'éthidium (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )
BHI	Bouillon cœur-cerveille (Brain-Heart Infusion)
C °	Degré Celsius
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMF	Concentration minimale fongicide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Co-Cr	Cobalt-chrome
ddNTPs	di-désoxyribonucléotides
DLVO	Derjaguin, Landau, Vervy et Overbeek
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique (Ethylenediaminetetraacetic acid) (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )
ERA	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol
GYEA	Gélose glucosée à l'extrait de levure
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HSP	Heat shock proteins
Hwp	Hyphal associated GPI linked protein
KDa	Kilodalton
LB	Bouillon lysogène (Lysogeny broth)
LMA	Gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt
MATH	Adhésion microbienne aux solvants (Microbial adhesion to hydrocarbons)
Mb	Million paire de bases
MHA	Mueller-Hinton-Agar
MnSO <sub>4</sub>	Sulfate de manganèse
mV	Millivolt
NaCl	Chlorure de sodium

NaOH	Hydroxyde de sodium
NB	Bouillon nutritive
TSB	Bouillon Trypticase Soja
Ni-Cr	Nickel-chrome
OMS	Organisation mondiale de la santé
p/v	Poids / volume
Pb	Paire de base
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chaine reaction)
PDA	Gélose dextrosée à la pomme de terre (Potato dextrose Agar)
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
pH	Potentiel hydrogène
Ra	Moyenne arithmétique de la rugosité (Roughness average)
Rf	Rapport frontal
RPM	Rotation par minute
SAPs	Secreted aspartyl proteinases
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
TAE	Tampon pour Tris-acétate-EDTA
Ti	Titane
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultraviolet
v/v	volume / volume
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XDLVO	Extended Derjaguin, Landau, Verveij et Overbeek
YPG	Gélose glucosée et peptonée à l'extrait de levure

## RESUME

Les infections liées aux biofilms et l'émergence de la résistance microbienne, qui sont à l'origine de la plupart des infections nosocomiales et d'autres infections persistantes, constituent un réel problème de santé publique. Cette étude a pour objectif d'évaluer le potentiel antifongique d'une bactérie rhizosphérique obtenue de *Calotropis procera* vis-à-vis de *C. albicans*, et d'étudier son pouvoir à l'encontre de l'adhésion de cette levure sur deux alliages dentaires.

Parmi 65 souches microbiennes rhizosphériques, une bactérie a montré la plus grande activité inhibitrice. L'identification moléculaire de cette bactérie a permis son affiliation au genre *Bacillus* sp., et des tests menés sur son activité inhibitrice ont montré l'intérêt biotechnologique important du principe actif étudié. En effet, les résultats ont prouvé sa thermorésistance, sa résistance à l'action de deux protéases, et sa stabilité dans des solutions acide et alcaline, ainsi que son effet fongicide spécifique à *C. albicans*.

Par ailleurs, des tests supplémentaires ont montré que l'extrait méthanolique actif de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16, appliqué à une concentration subinhibitrice, a entraîné une diminution de l'hydrophobicité de la surface cellulaire de *C. albicans*, accompagnée par une augmentation de son caractère donneur d'électrons.

D'autre part, le préconditionnement de deux alliages dentaires (Co-Cr et Ni-Cr) par cet extrait était derrière une diminution de l'hydrophobicité et une augmentation du caractère donneur d'électrons pour l'alliage Co-Cr. Cependant, l'effet inverse est obtenu pour l'alliage Ni-Cr.

L'étude de l'impact de ce préconditionnement sur l'adhésion théorique et expérimentale de *C. albicans* a montré que l'énergie libre totale de l'adhésion a augmenté proportionnellement avec la durée du préconditionnement pour l'alliage Co-Cr. Ce résultat est confirmé par une inhibition de l'adhésion expérimentale de 100 % pour une durée de 240 min. Par contre, une légère augmentation de l'adhésion est manifestée théoriquement et expérimentalement sur l'alliage Ni-Cr.

Ces résultats prometteurs méritent d'être exploités, d'une part, pour développer de nouveaux anti-*Candida* et, d'autre part, pour concevoir des surfaces antiadhésives sur l'alliage Co-Cr, et envisager leur extension à d'autres matériaux usuels des appareils dentaires.

**Mots-clés :** Biofilms ; *Candida albicans* ; alliage dentaire ; rhizosphère ; plantes médicinales ; *Bacillus* ; fongicide ; hydrophobicité ; paramètres physicochimiques ; adhésion.

## ABSTRACT

Biofilm-related infections and the antimicrobial resistance are both the root of emerging nosocomial and other incurable diseases that continue to rise. Since *Candida albicans* is one of the most virulent pathogens, the present study aims to investigate the antifungal potential of a rhizospheric bacterium isolated from *Calotropis procera* against *C. albicans*, and to explore the effect of its extract on the adhesion of this yeast to the surface of two dental alloys.

Among 65 rhizospheric microbial strains, the most active one was selected. It was identified as *Bacillus* sp. Cp-LMA-16, and it was able to produce an antifungal agent (s) of major biotechnological interest. In fact, results showed that the antifungal production is heat-resistant, stable in acid and alkali pH, and it resists to the proteolysis treatment. Moreover, the fungicidal action against *C. albicans* was proved.

Thereafter, the antifungal extract was able to decrease the cell surface hydrophobicity of *C. albicans* and to increase its electron-donor character at a sub-inhibitory concentration.

On the other hand, preconditioning the surface of two dental alloys (Co-Cr and Ni-Cr) by the antifungal extract has decreased the surface hydrophobicity and increased the electron-donor character of the Co-Cr base metal alloy. Whereas, the opposite effect was observed for Ni-Cr base metal alloy.

The investigation of the impact of preconditioning the surface of both dental alloys on the theoretical (in a physicochemical point of view) and the experimental adhesion of *C. albicans* showed that the total free energy of adhesion on the surface of Co-Cr alloy was increased proportionally with the time-exposure to the extract. This fact was proved experimentally when a total inhibition of the experimental adhesion on this alloy was achieved with a time-exposure of 240 min. However, an increase of the theoretical and experimental adhesion of *C. albicans* was observed on the surface of Ni-Cr alloy.

These promising results should be exploited to develop new anti-candidal agents, and also to design new antiadhesive surfaces on the Co-Cr dental alloy, that may be extended to other dental-devices common materials.

**Key-words:** Biofilms; *Candida albicans*; dental alloy; rhizosphere; medicinal plants; *Bacillus*; fungicidal; hydrophobicity; physicochemical properties; adhesion.

## مُلخَص

تعدُّ الأمراض المرتبطة بما يسمى "البيوفيلم" (Biofilm)، إضافة إلى انتشار المقاومة الجرثوميَّة لمعظم المضادات الحيوية من أكبر المشاكل التي تهدِّد الصحة العامة في جميع أنحاء العالم. فكلاهما من الأسباب التي ساهمت في إرتفاع نسبة الأمراض المستشفويَّة و مجموعة أخرى من الإلتهابات المزمنة. في هذا الصدد ، على الرغم من كونها تعيش على جسم الإنسان ، تعتبر "كانديدا ألبكانس" (*Candida albicans*) من أهم وأخطر الجراثيم الممرضة بالخصوص لدى الأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة.

في سياق التخفيف من الإشكالات المترتبة عن هذا الفطر، قمنا في هذا البحث بدراسة أحد الميكروبات بعد عزلها من تربة الرِّيزوسفير الخاصة ب (*Calotropis procera*)، و التي أبانت عن قدرتها على كبح نموّ (*C. albicans*). كما قمنا بتقييم تأثيرها على خاصية الإلتصاق (adhésion) التي تمتاز بها هذه الخميرة على سطح سبيكتين تستعملان في صناعة أدوات و أجهزة طب الأسنان.

قمنا في البداية بإنتقاء سلالة من أصل 65 سلالة جرثومية فعَّالة ، نظرا لمفعولها القوي و المضاد لنمو (*C. albicans*) الذي تميزت به عن سائر السلالات المحصَّل عليها. وقد أظهرت الإختبارات الفيزيولوجية والوراثية التي أجريت على هذه السلالة على أنها بكتيريا تنتمي لنوع "باسيلوس" (*Bacillus*). في حين أبان مستخلصها الفعَّال على خصائص ذات أهمية بيوتكنولوجيَّة كبيرة ، بحيث أظهر مقاومته لدرجات حرارية مرتفعة وكذا مقاومته لتأثير أنزيمين مُحلِّلين للبروتينات ، فضلا عن إستقرار مفعوله في الوسطين الحمضي والقاعدي.

أدَّى المستخلص الفعَّال بتركيز أقل من التَّركيز الكابح لنمو (*C. albicans*) إلى إنخفاض في خاصية كره الماء (hydrophobicité) لسطحها الخلوي ، مصحوبا بارتفاع في خاصية منح الإلكترونات (caractère donneur d'électrons).

من ناحية أخرى ، أدت معالجة سطح سبيكتين مكونتين من الكوبالت – الكروم والنيكل – الكروم بواسطة المستخلص الفعَّال ل (*Bacillus*) إلى انخفاض في خاصية كره الماء وإرتفاع في خاصية منح الإلكترونات بالنسبة للسَّيكة المكوَّنة من الكوبالت و الكروم ، في الوقت الذي لاحظنا فيه تأثيرا عكسيا على سطح السَّيكة المكوَّنة من النيكل و الكروم.

في الاخير، تمت دراسة إلتصاق (*C. albicans*) على سطح السبيكتين بعد معالجتهم بالمستخلص الفعَّال وذلك بتطبيق نظرية (XDLVO) وبإختبار تجريبي بالمجهر الإلكتروني الماسح. وأكدت النتائج المحصَّل عنها على أن الإلتصاق النظري على سطح السَّيكة المكوَّنة من الكوبالت و الكروم قد إنخفض بالتناسب مع مدة معالجة سطح هذه السَّيكة بالمستخلص. وهذا ما أكده لنا الإختبار التجريبي بنسبة إلتصاقٍ منعدمة. أما بالنسبة للسَّيكة المكوَّنة من النيكل و الكروم فقد سجَّل ارتفاع طفيف في نسبة الإلتصاق نظرياً وتجريبياً.

هذه النتائج الواعدة تستحق أن تُستغل ، من جهة ، لتطوير مضاد جديد ل (*C. albicans*)، ومن جهة أخرى ، لتصميم أغلفة مستقرة ومضادة للإلتصاق على السبيكة المكوَّنة من الكوبالت و الكروم ، ولم لا توسيع نطاق تطبيقها لتهمَّ مواد حيوية أخرى شائعة الاستخدام في أجهزة طب الأسنان.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>I. <i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>5</b>
1. Classification et reproduction.....	5
2. Caractéristiques morphologiques .....	5
3. Caractéristiques écologiques .....	6
4. Organisation cellulaire et moléculaire.....	6
4.1. Organites intracellulaires.....	6
4.2. Paroi cellulaire.....	7
5. Facteurs de virulence.....	8
5.1. Adhésion et colonisation .....	9
5.2. Filamentation et thigmotropisme .....	9
5.3. Sécrétion des enzymes .....	10
5.4. Protéines de réponse au stress .....	11
6. Résistance aux antifongiques .....	12
<b>II. Biofilms microbiens.....</b>	<b>12</b>
1. Généralités.....	12
2. Formation du biofilm .....	13
2.1. Transport .....	15
2.2. Adhésion.....	15
2.3. Division et maturation .....	16
2.4. Détachement et dispersion .....	17
3. Contribution des biofilms à la tolérance vis-à-vis des antifongiques.....	18
<b>III. Phénomène de l'adhésion.....</b>	<b>19</b>
1. Adhésion non spécifique .....	20
1.1. Modèle prédictif de l'adhésion.....	20
1.2. Facteurs influençant l'adhésion.....	24
2. Adhésion spécifique .....	35
<b>IV. Candidoses buccales et biofilms à <i>Candida albicans</i> sur les appareils dentaires.....</b>	<b>36</b>
1. Généralités.....	36
2. Candidoses buccales.....	37
3. Appareils et matériaux dentaires .....	38
3.1. Généralités.....	38
3.2. Matériaux en dentisterie .....	40
4. Biofilms à <i>Candida albicans</i> sur les appareils dentaires.....	42
<b>V. Cibles et stratégies antiadhésives et antibiofilms .....</b>	<b>44</b>
1. Surfaces antiadhésives.....	45
2. Surfaces antimicrobiennes.....	46
3. Surfaces avec des nanostructures .....	47
4. Molécules antibiofilms .....	48
5. Autres stratégies .....	49

<b>VI. Bactéries de la rhizosphère : une source de nouvelles molécules antimicrobiennes et antiadhésives .....</b>	<b>50</b>
1. Généralités .....	50
2. Microorganismes du sol rhizosphérique .....	51
3. Production de métabolites bioactifs par les bactéries de la rhizosphère : Cas de <i>Bacillus</i> spp. 53	
3.1. Caractéristiques du genre <i>Bacillus</i> .....	54
3.2. Métabolites bioactifs produits par <i>Bacillus</i> spp. ....	55
<b>DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre I : Isolement et criblage des microorganismes rhizosphériques producteurs de substances antimicrobiennes .....</b>	<b>58</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>58</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>59</b>
1. Echantillonnage et isolement des souches microbiennes .....	59
1.1. Prélèvement des échantillons .....	59
1.2. Isolement, purification et conservation des microorganismes .....	60
2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats : Criblage antimicrobien ...	61
2.1. Microorganismes tests .....	61
2.2. Préparation de l'inoculum microbien .....	62
2.3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne .....	62
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>63</b>
1. Souches microbiennes isolées .....	63
2. Résultats du criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques .....	64
3. Comparaison des pourcentages des isolats rhizosphériques actifs des trois plantes .....	68
4. Comparaison de l'activité antagoniste en fonction du type d'isolat et du spectre d'activité.....	70
5. Comparaison de la sensibilité des souches indicatrices aux isolats .....	72
<b>Conclusion.....</b>	<b>73</b>
<b>Chapitre II : Identification de l'isolat Cp-LMA-16, production, extraction et isolement de la fraction antifongique.....</b>	<b>75</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>75</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>76</b>
1. Identification moléculaire par séquençage de l'ADNr 16 S.....	76
1.1. Extraction de l'ADN génomique total .....	77
1.2. Réaction d'amplification de l'ADNr 16 S par PCR .....	77
1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	78
1.4. Séquençage de l'amplifiât .....	79
1.5. Analyse bioinformatique des séquences .....	80
2. Tests biochimiques .....	80
2.1. Coloration de Gram, des spores et le test catalase .....	80
2.2. Caractères morphologiques .....	81
2.3. Caractères biochimiques .....	81
2.4. Croissance à différentes conditions de culture .....	81
3. Culture microbienne et choix du milieu de production.....	81
3.1. Production dans les milieux liquides.....	81

3.2. Production dans les milieux solides .....	82
4. Cinétique de croissance et de production antifongique.....	82
5. Extraction du principe actif .....	82
6. Spectre d'action antimicrobienne de l'extrait .....	83
7. Tests antifongiques.....	84
7.1. Méthode de diffusion sur plots d'agar.....	84
7.2. Méthode de diffusion sur disques.....	84
7.3. Méthode de diffusion sur des puits .....	84
7.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale fongicide (CMF).....	85
8. Effet du pH, de la chaleur et de l'action des protéases sur l'activité inhibitrice .....	86
9. Séparation chromatographique et bioautographie.....	87
9.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	87
9.2. Bioautographie .....	87
9.3. Chromatographie préparative sur couche mince (CCM) .....	87
9.4. Fractionnement.....	88
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>89</b>
1. Identification de l'isolat Cp-LMA-16 .....	89
1.1. Activité antifongique de l'isolat Cp-LMA-16 : critère de choix.....	89
1.2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques.....	89
1.3. Identification moléculaire.....	90
2. Cinétique de croissance et de production antifongique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16....	91
3. Production, extraction et spectre d'activité de l'extrait actif.....	91
3.1. Choix du milieu de production du principe antifongique .....	91
3.2. Extraction des composés antifongiques .....	93
3.3. Spectre d'activité de l'extrait méthanolique et détermination de la CMI/CMF .....	95
4. Effet du traitement thermique, du changement de pH et des protéases sur l'activité de l'extrait méthanolique .....	96
5. Isolement de la fraction active.....	98
5.1. Chromatographie sur couche mince et bioautographie .....	98
5.2. Isolement de la fraction active par chromatographie sur colonne.....	100
6. Discussion générale.....	100
<b>Conclusion.....</b>	<b>101</b>
<b>Chapitre III : Effet du traitement de <i>C. albicans</i> et de deux alliages dentaires par l'extrait méthanolique sur leurs propriétés physicochimiques de surface, et étude de l'adhésion fongique aux alliages traités .....</b>	<b>103</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>103</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>105</b>
1. Conditions de culture, exposition de <i>C. albicans</i> à l'extrait méthanolique et préparation du film microbien .....	105
2. Préparation des alliages dentaires et traitement de leur surface par l'extrait méthanolique .....	105
2.1. Prétraitements des alliages dentaires.....	105
2.2. Traitement de la surface des alliages dentaires par l'extrait méthanolique.....	106
3. Détermination des propriétés physicochimiques de surface par la mesure des angles de contact couplée aux calculs par l'équation de Young.....	106



3.1.	Principe de la caractérisation physicochimique .....	107
3.2.	Détermination des propriétés physicochimiques de surface de <i>C. albicans</i> et des alliages dentaires avant et après leur traitement par l'extrait méthanolique .....	107
4.	Influence du préconditionnement de la surface des alliages dentaires sur l'adhésion théorique de <i>C. albicans</i> évaluée par l'approche XDLVO .....	109
5.	Évaluation de l'adhésion expérimentale de <i>C. albicans</i> sur la surface des alliages dentaires préconditionnés .....	110
5.1.	Prétraitement des alliages dentaires .....	110
5.2.	Préparation de la suspension fongique .....	110
5.3.	Test de l'adhésion.....	111
5.4.	Observation par microscopie électronique à balayage .....	111
6.	Analyses statistiques .....	111
	<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>112</b>
<b>I.</b>	<b>Effet de l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 sur les propriétés physicochimiques de surface de <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>112</b>
1.	Propriétés physicochimiques de surface de <i>C. albicans</i> .....	112
2.	Impact du traitement par l'extrait antifongique sur les propriétés physicochimiques de <i>C. albicans</i> .....	114
3.	Contribution des propriétés physicochimiques de <i>C. albicans</i> au pouvoir pathogène et à l'adhésion .....	117
<b>II.</b>	<b>Effet de l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 sur les propriétés physicochimiques de surface des alliages dentaires .....</b>	<b>119</b>
1.	Propriétés physicochimiques de surface des alliages dentaires.....	119
1.1.	Alliage dentaire Co-Cr .....	119
1.2.	Alliage dentaire Ni-Cr.....	119
1.3.	Comparaison et discussion des propriétés physicochimiques de surface des deux alliages dentaires .....	120
2.	Impact du préconditionnement par l'extrait méthanolique de <i>Bacillus</i> sp. Cp-LMA-16 sur les propriétés physicochimiques de surface des alliages dentaires .....	122
2.1.	Alliage dentaire Co- Cr .....	122
2.2.	Alliage dentaire Ni-Cr.....	125
2.3.	Comparaison de l'impact du préconditionnement sur les propriétés physicochimiques de surface des deux alliages .....	126
<b>III.</b>	<b>Adhésion théorique et expérimentale de <i>C. albicans</i> : effet du préconditionnement de surface des alliages dentaires .....</b>	<b>129</b>
1.	Adhésion théorique de <i>C. albicans</i> sur les alliages dentaires : approche XDLVO.....	129
1.1.	Alliage dentaire Co-Cr .....	129
1.2.	Alliage dentaire Ni-Cr.....	130
1.3.	Effet du préconditionnement des alliages sur l'adhésion théorique de <i>C. albicans</i> : discussion et comparaison entre les deux alliages .....	131
2.	Quantification de l'adhésion expérimentale de <i>C. albicans</i> aux alliages dentaires .....	134
2.1.	Critères de choix des conditions expérimentales .....	134
2.2.	Résultats de la quantification de l'adhésion expérimentale de <i>C. albicans</i> aux alliages dentaires .....	135
3.	Comparaison entre les prédictions théoriques et les résultats expérimentaux .....	137
	<b>Conclusion.....</b>	<b>140</b>

**CONCLUSION GENERALE .....143**  
**PERSPECTIVES.....146**  
**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....147**  
**ANNEXES.....170**

## INTRODUCTION GENERALE

Les maladies infectieuses microbiennes ont jadis représenté la principale cause de mortalité dans le monde. Heureusement, leur endiguement était possible grâce au développement de l'hygiène et de l'assainissement urbain, ainsi que l'avènement des antibiotiques et des antifongiques (Carlet 2011). Toutefois, cet âge d'or n'a pas duré pour longtemps, les antibiotiques sont menacés de perdre leur efficacité après avoir sauvé d'innombrables vies. Ces dernières décennies plusieurs voix n'ont pas cessé de tirer la sonnette d'alarme afin de mobiliser la communauté scientifique, les autorités publiques et d'autres spécialistes aussi bien que le grand public. La racine du problème est en majeure partie liée à l'émergence de la résistance aux antibiotiques, voire à tous les antibiotiques, qui a été développée par des microorganismes pathogènes ou opportunistes responsables des infections nosocomiales et communautaires (Tumbarello *et al.* 2011, Ashley *et al.* 2018). En conséquence, la prévalence de ces infections est en continuelle augmentation et la survenance des échecs thérapeutiques lourds est devenue quasi habituelle (Puchter *et al.* 2018, Wieland *et al.* 2018). D'ailleurs, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a attesté, dans son rapport sur la surveillance mondiale de la résistance aux antimicrobiens en 2014, que la résistance aux antibiotiques n'est plus un risque pour l'avenir, mais plutôt une évidence qui compromet le traitement des infections nosocomiales et communautaires dans le monde entier (OMS 2015). Ce phénomène de résistance n'est en fait que l'une parmi de nombreuses manifestations des processus d'adaptation conduisant à l'évolution des espèces, qui exige que seuls les individus les mieux armés génétiquement survivent et se multiplient dans un environnement évolutif et plutôt hostile (Mayers *et al.* 2017). Ainsi, par l'usage souvent débridé et inapproprié des antibiotiques en santé humaine et animale, nous avons dopé cette résistance par la pression de la sélection naturelle.

Par ailleurs, depuis leur première introduction en médecine par Costerton en 1982, il a été vite démontré que les biofilms sont à l'origine de nombreuses infections microbiennes très graves (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Le biofilm, comme étant un amas de microorganismes attachés à une surface et enrobés dans une matrice d'exopolymères, est une structure compacte et harmonieuse qui réunit les microorganismes et leur permet de surmonter les conditions environnementales défavorables (York 2017). Les microorganismes, qui ont utilisé ce mode de vie pour résister et

subsister dans leurs habitats naturels, l'ont adopté pour contourner les agressions, qu'ils peuvent subir par l'intermédiaire des effecteurs de notre système de défense ou par les différentes molécules désinfectantes et antibiotiques (O'Toole *et al.* 2000). Cette récalcitrance à l'égard des traitements antimicrobiens et des défenses immunitaires est une caractéristique multifactorielle et typique des maladies associées aux biofilms qui fait toute la gravité, et qui leur confère des caractères de chronicité, de persistance et de recrudescence (Del Pozo 2018). Elle constitue en quelque sorte le défi thérapeutique à l'égard de cette problématique.

Les pathologies associées aux biofilms ont été décrites chez des patients atteints par des maladies chroniques, telles que la mucoviscidose, la tuberculose, l'endocardite, les caries dentaires, etc. (Head *et al.* 2017, Rastogi *et al.* 2017, Rieckmann *et al.* 2017, Oluyombo *et al.* 2018). Or, d'une manière générale, elles sont associées au port des prothèses et des dispositifs médicaux implantables (Percival *et al.* 2015, Del Pozo 2018). D'après l'OMS, 60 % des infections nosocomiales seraient dues aux dispositifs médicaux implantables (Espinasse *et al.* 2010). L'impact socioéconomique de ces infections est très lourd, elles sont responsables de la prolongation des séjours hospitaliers en adjoignant plus de 1000 Milliards de dollars au total des frais d'hospitalisation, et elles contribuent annuellement à un demi-million de décès aux États-Unis (Shirliff et Leid 2009). L'émergence des infections liées aux biofilms s'est déclenchée principalement à cause de l'accroissement des patients porteurs de dispositifs médicaux (qui est accentué par le vieillissement de la population), et par l'usage croissant des immunosuppresseurs, des antinéoplasiques et des antibiotiques à large spectre (Percival *et al.* 2015).

Actuellement, vu l'indisponibilité des options thérapeutiques efficaces contre les biofilms, les praticiens n'ont alors que deux options : l'antibiothérapie non-curative à long terme ou l'élimination chirurgicale du foyer de l'infection, qui est le plus souvent onéreuse, compliquée, voire impossible dans certains cas (Shirliff et Leid 2009). En parallèle, la recherche fondamentale continue d'étudier le rôle des biofilms dans l'instauration de ces pathologies en fournissant des stratégies et des modèles qui peuvent constituer de nouvelles perspectives thérapeutiques pour la prévention et la prise en charge de ce type d'infections (Flemming *et al.* 2016, Koo *et al.* 2017).

Toutefois, ce problème à double facette (résistance microbienne et biofilms) est d'autant plus préoccupant. Ce qu'on sait moins, c'est que la majorité des antibiotiques et des antifongiques sont impliqués dans la formation des biofilms (Kaplan 2011). Raison pour laquelle, il s'avère judicieux d'étudier l'impact des molécules antimicrobiennes sur l'aptitude de leurs cibles de

s'adhérer et de former des biofilms. Pour enfin assurer le développement d'une nouvelle génération des antimicrobiens efficaces contre les maladies infectieuses par excellence.

Parmi les microorganismes pathogènes pour l'Homme, *Candida albicans*, un agent commensal des muqueuses humaines, est l'un des champignons les plus impliqués dans des mycoses. Il s'agit d'un agent opportuniste, qui avec d'autres espèces du même genre (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, etc.) sont responsables de nombreuses infections superficielles et invasives qui peuvent se révéler mortelles, surtout chez les patients immunodéprimés (Pfaller et Diekema 2007, Silva *et al.* 2012). Sa résistance à l'encontre de toutes les classes des antifongiques et sa capacité de former des biofilms sont des facteurs, parmi d'autres, qui contribuent partiellement à sa virulence et à sa pathogénicité incontrôlables (Nobile et Johnson 2015). En somme, ceci fait de lui un exemple-type des pathogènes fongiques nosocomiaux.

Dans la cavité orale par exemple, la formation des biofilms par *C. albicans* est, en partie, responsable des stomatites prothétiques, des péri-implantites et d'autres infections associées aux prothèses et aux implants dentaires. D'ailleurs, de nombreuses études antérieures ont démontré que *C. albicans* colonise et forme des biofilms sur la surface des biomatériaux utilisés dans la fabrication des dispositifs dentaires, y compris les résines acryliques, les alliages dentaires, la céramique, etc. (Busscher *et al.* 2010, Santos *et al.* 2016). Ainsi, elle participe à l'augmentation incessante des échecs et des complications d'implantation, malgré les progrès technologiques dans ce domaine (Armellini *et al.* 2009, Perić *et al.* 2018).

Aujourd'hui, l'enjeu principal est donc de mettre à la disposition des thérapeutes de nouvelles molécules antimicrobiennes et antibiofilms et des stratégies de traitement novatrices. Bien que la contribution des molécules synthétiques et semi-synthétiques dans ce cadre soit très importante, mais la controverse liée à leurs effets indésirables et leur nocivité pour l'organisme et pour l'environnement a encouragé le retour vers les substances naturelles (Harvey 2008, Monciardini *et al.* 2014). Essentiellement, les métabolites produits par les microorganismes ont une place fondamentale à cet égard. D'ailleurs, plus de 22 000 substances microbiennes dotées des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, anticancéreuses et immunosuppressives (Solecka *et al.* 2012) ont été assurées au fil des années. Plusieurs biotopes ont été explorés pour cette fin, tels que les sols (Aouiche *et al.* 2012), les plantes (Santos *et al.* 2017), les eaux marines (Corinaldesi *et al.* 2017), les animaux terrestres et marins (Zheng *et al.* 2005, Kumar *et al.* 2013).

Pour ces raisons, la présente étude a pour objectif le développement de nouvelles molécules antimicrobiennes et antibiofilms, en particulier vis-à-vis du fameux pathogène *Candida albicans*.

Elle s'articule donc autour de quatre axes principaux :

- i) La recherche de nouveaux métabolites antimicrobiens produits par des microorganismes isolés de la rhizosphère de trois plantes médicinales : *Calotropis procera*, *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* qui n'ont jamais fait l'objet d'une telle étude auparavant ;
- ii) L'étude approfondie du pouvoir antifongique de l'isolat qui a montré la plus forte activité et son influence sur les paramètres physicochimiques de surface de *C. albicans* ;
- iii) L'étude de l'impact du préconditionnement de la surface de deux alliages dentaires (à base de cobalt-chrome et de nickel-chrome) par l'extrait antifongique de l'espèce bactérienne sélectionnée sur leurs propriétés physicochimiques ;
- iv) L'évaluation de la répercussion de ce préconditionnement sur l'adhésion de *C. albicans* d'un point de vue physicochimique et expérimental afin de contribuer à la prévention contre la formation des biofilms sur la surface des deux alliages dentaires.

# **Revue Bibliographique**

## PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

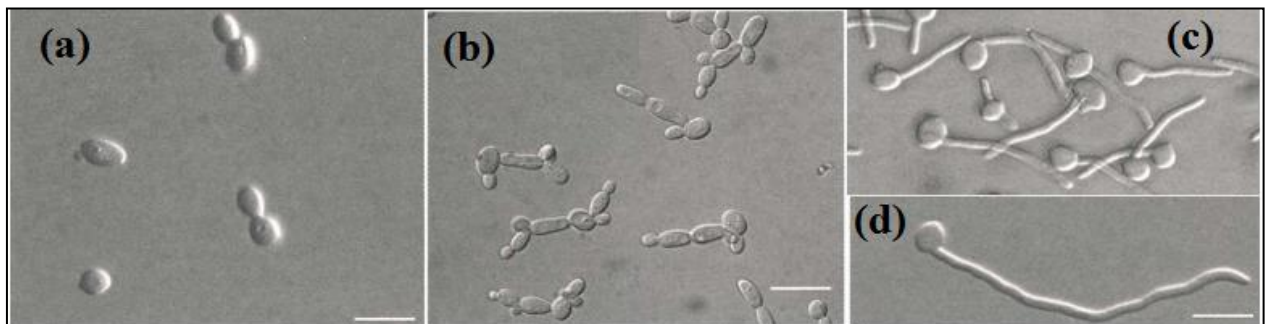
### I. *Candida albicans*

#### 1. Classification et reproduction

*Candida albicans* est une levure, appartenant à la division des *Ascomycota*, classe des *Saccharomycetes*, famille des *Saccharomycetaceae*. Elle est non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde possède un matériel génétique (15 Mb) qui se répartit en huit paires de chromosomes (Jones *et al.* 2004). Sa reproduction, essentiellement asexuée, se fait par bourgeonnement multilatéral à partir d'une cellule mère appelée blastospore. La cellule fille se sépare ainsi par la formation d'un septum, ou par scission de la cellule mère (Sudbery *et al.* 2004).

#### 2. Caractéristiques morphologiques

Au niveau morphologique, *C. albicans* est communément connue par sa forme unicellulaire ovoïde ou blastospore (3  $\mu\text{m}$  de diamètre). Néanmoins, elle peut se développer en filaments mycéliens, ou vrais hyphes (15  $\mu\text{m}$ ), qui s'instaurent à partir des tubes germinatifs émis par les blastospores formant ainsi des mycéliums divisés par des septums. Outre les vrais hyphes, *C. albicans* peut développer des pseudohyphes par bourgeonnement à partir du blastospore, mais qui ne parviennent pas à s'y détacher et à s'étendre vers l'extérieur comme de véritables hyphes. Ainsi, *C. albicans* est dénommée champignon polymorphe étant donné son aptitude à générer toutes ces formes *in vitro* et *in vivo* (Figure 1).



**Figure 1 :** Formes de croissance de *C. albicans* ; a) Blastospores ; b) Pseudohyphes ; c) Tubes germinatifs ; d) Véritable hyphe, (la barre = 10  $\mu\text{m}$ ) (Sudbery *et al.* 2004)



Cette morphogénèse est influencée par certains paramètres environnementaux, notamment ceux liés à la croissance, tels que le pH, la température et la richesse du milieu en nutriments (Sudbery *et al.* 2004). La forme ovoïde joue un rôle important dans la dissémination du champignon, alors que la forme filamenteuse est généralement associée à la colonisation (Sudbery *et al.* 2004, Höfs *et al.* 2016). Toutefois, il a été affirmé que la formation des hyphes par *C. albicans* n'est pas indispensable pour sa pathogénicité (Gow *et al.* 2002).

Par ailleurs, dans des conditions extrêmes, *C. albicans* est capable de produire des structures terminales ou latérales arrondies appelées chlamydospores. Il s'agit d'une forme de résistance qui possède une paroi épaisse et qui mesure deux fois la taille du blastospore. Ces chlamydospores sont rarement mises en évidence *in vivo* et font partie des critères d'identification de *C. albicans* au laboratoire (Shannon 1981, Mosaid *et al.* 2001).

### 3. Caractéristiques écologiques

*C. albicans* se trouve à l'état commensal saprophyte dans les muqueuses humaines et celles des animaux à sang chaud. Ses fréquences d'isolement s'échelonnent, en fonction des sites de prélèvement et par rapport à la flore normale, chez un sujet sain comme suit : peau (3%), vagin (13%), tractus anorectal (15%), cavité buccale (18%), estomac et duodénum (36%), et jéjunum et iléon (41%). Ainsi, le tube digestif est le réservoir principal avec une fréquence de portage qui varie selon les sujets (Lagane 2007).

À l'état saprophyte, *C. albicans* se développe en blastospores. Néanmoins, plusieurs facteurs favorisent la rupture de l'équilibre entre le mode saprophyte de la levure et les défenses immunitaires de l'hôte. Cette rupture est traduite par une transition de la forme commensale à la forme parasite filamenteuse (hyphes ou pseudohyphes), menant ainsi à l'état pathogène (Höfs *et al.* 2016).

### 4. Organisation cellulaire et moléculaire

#### 4.1. Organites intracellulaires

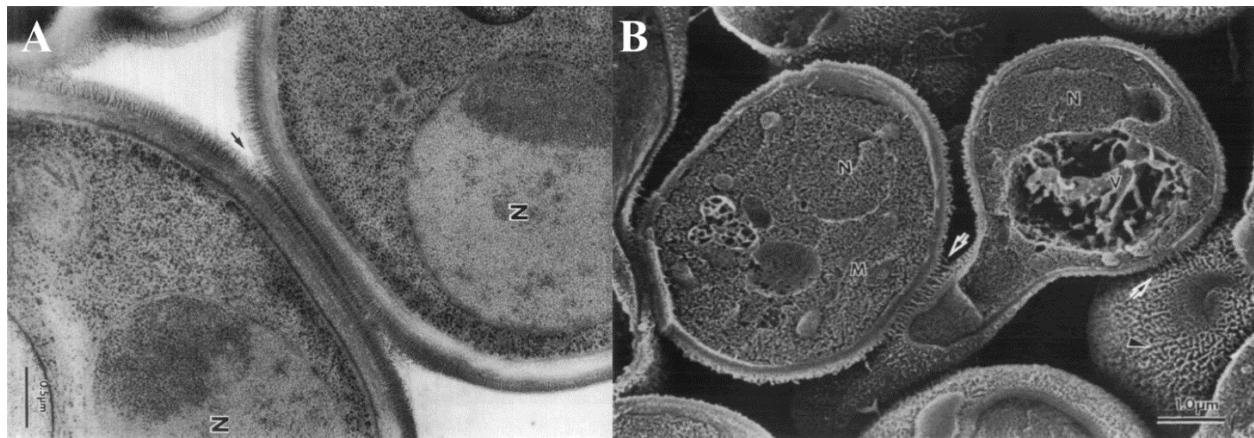
La structure et la morphologie de *C. albicans* ont été magnifiquement explorées en trois dimensions par Isola *et al.* (2009) via la microscopie électronique à haute résolution (Figure 2). Dans cette étude, des organites intracellulaires caractéristiques d'une cellule eucaryote ont été observés, en plus d'une structure spécifique, le système vaculo-vésiculaire, évoluant en relation

avec le cycle cellulaire et qui joue un rôle dans la virulence ainsi que dans la formation de la paroi (Palanisamy *et al.* 2010, Sarazin 2010).

#### 4.2. Paroi cellulaire

La paroi cellulaire constitue 30 % du poids sec de la levure. Elle a une structure complexe et une composition particulière. Conçue essentiellement de mannoprotéines (35 à 40%),  $\beta$ -1-3-glucanes (40 %),  $\beta$ -1-6-glucanes (20 %) et chitine (1-2 %), la paroi est un élément crucial et indispensable pour de nombreux aspects biologiques et pathogéniques de *C. albicans*. Elle constitue une barrière de protection et une interface de contact et de communication avec l'extérieur, et elle maintient également les caractéristiques morphologiques de la levure (Klis *et al.* 2001).

L'ultrastructure de la paroi cellulaire résulte de l'empilement de quatre couches différentes comme illustré sur la Figure 2. Outre la couche fibrillaire située vers l'extérieur et constituée de glycoprotéines, deux couches denses aux électrons séparées par une couche claire et épaisse sont clairement visualisées au microscope électronique.



**Figure 2 :** Ultrastructure de *C. albicans* visualisée par microscopie électronique : A) Noyau, ribosomes et paroi cellulaire (Grossissement 40 000) ; B) Blastospore et cellule en germination (Grossissement 15 000). (N) : Noyau, (M) : Mitochondrie : (V) : système vaculo-vésiculaire (Tokunaga *et al.* 1986)

Les deux couches sombres correspondent à des mannoprotéines dont la fraction glucidique est constituée par des mannanes (mannooligosaccharides 10% et mannopolysaccharides 90%). Les mannooligosaccharides se lient à la fraction protéique par des liaisons covalentes de types O-

glycosidiques avec des résidus sérine et thréonine, alors que les mannosyloligosaccharides établissent des liaisons N-glycosidiques avec les résidus asparagine. En fait, c'est cette fraction glucidique qui définit les deux sérotypes A et B de *C. albicans* (Fukazawa et Kagaya 1997).

La couche claire est constituée principalement de glucanes. Au niveau de cette couche médiane, les  $\beta$ -1-3-glucanes et les  $\beta$ -1-6-glucanes forment un réseau fibreux. En réalité, cette couche peut être subdivisée en deux sous-couches, l'une constituée exclusivement des  $\beta$ -glucanes et l'autre correspond aux  $\beta$ -glucanes liés à la chitine par des liaisons covalentes (Tokunaga *et al.* 1986).

En outre, la paroi de *C. albicans* contient des protéines multiples qui assurent des rôles associés à la protection vis-à-vis des hydrolases et des composés toxiques exogènes, et qui sont impliquées également dans l'hydrophobicité de la surface, l'adhésion et la virulence de la cellule (Klis *et al.* 2001). De plus, des enzymes telles que, la N-acétylglucosaminidase, phosphatase acide, protéinase, glucanase et chitinase se trouvent souvent liées à la paroi cellulaire (Fukazawa et Kagaya 1997).

La paroi cellulaire de *C. albicans* est une entité dynamique, régulée par plus de 1000 gènes. Sa structure et sa composition sont fortement affectées par la phase de croissance et les conditions environnementales, contribuant ainsi à la plasticité notoire de cette levure (McCullough *et al.* 1996, Klis *et al.* 2001). Ces changements structuraux affectent la sous-couche de  $\beta$ -glucanes-chitine, qui surcroît au profit de la couche externe, alors que cette dernière endure localement un éraîlement progressif (Fukazawa et Kagaya 1997). En effet, la chitine est présente en plus grande quantité dans la paroi des tubes germinatifs et celle des hyphes, ce qui leur confère une rigidité plus importante.

## 5. Facteurs de virulence

La pathogénicité de *C. albicans* est liée à un arsenal de facteurs de virulence tout puissant et versatile, incluant la production des hyphes, des enzymes hydrolytiques et des protéines de choc thermique, le thigmotropisme, l'adhésion et la formation de biofilms (O'Donnell *et al.* 2015). L'expression de ces facteurs de virulence dépend du type, du site et de la phase de l'infection, et aussi de la nature de la réponse immunitaire mise en place chez l'hôte (Hube et Naglik 2001).

### 5.1. Adhésion et colonisation

Il est évident qu'avant tout signe d'infection, *C. albicans* doit d'abord adhérer et ensuite coloniser les tissus de l'hôte ou les surfaces abiotiques.

Pour ce qui est de l'adhésion, le concept adopté et celui qui décrit l'adhésion en deux phases, une phase non spécifique (*cf.* Adhésion non spécifique. p : 20) suivie d'une phase spécifique qui implique des liaisons covalentes ou non covalentes entre des molécules de surface de *C. albicans* et des récepteurs de l'hôte.

Les protéines jouent un rôle crucial dans l'adhésion spécifique de *C. albicans* aux cellules épithéliales, notamment la famille des ALS (*Agglutinin-like sequence proteins*). L'ALS3 est la plus importante des huit ALS connues puisqu'elle est surexprimée lors de l'infection. Elle se lie aux cadhérines des cellules hôtes induisant l'endocytose de la levure (Murciano *et al.* 2012). De même, l'adhésine Hwp1 (*Hyphal associated GPI-linked protein*) est capable de nouer entre les hyphes et les cellules hôtes via des liaisons covalentes contribuant ainsi à l'adhésion et à l'invasion fongique (Sundstrom *et al.* 2002, Phan *et al.* 2007).

Des études ont montré que l'ALS3 et la Ssa1, une protéine appartenant à la famille des HSP70 des protéines de choc thermique, en se liant à des E-cadhérines des cellules hôtes induisent l'endocytose du pathogène (Phan *et al.* 2007, Sun *et al.* 2010).

D'autres adhésines ont été identifiées chez *C. albicans*. En effet, il a été démontré que la suppression d'une seule adhésine n'induit qu'une réduction partielle de l'adhésion, ce qui suggère l'implication de plusieurs adhésines dans ce phénomène (Baldo *et al.* 2007).

L'adhésion est suivie par une prolifération, filamentation et enchâssement dans une matrice extracellulaire protectrice (formation du biofilm), pour ensuite infliger des dommages aux tissus de l'hôte (Kumamoto 2002, Ramage *et al.* 2009, Soll et Daniels 2016). Pour cette raison, la formation de biofilm par *C. albicans* est considérée comme étant un facteur de virulence.

### 5.2. Filamentation et thigmotropisme

Les hyphes jouent un rôle important dans l'adhésion et la formation d'un biofilm mature avec une architecture tridimensionnelle stable (Jacobsen *et al.* 2012, O'Donnell *et al.* 2015, Soll et Daniels 2016).

Il a été démontré auparavant que les tubes germinatifs produits par *C. albicans* expriment à leur surface plus d'adhésines qui reconnaissent certaines protéines plasmatiques, mais aussi qui stimulent l'adhésion à des surfaces de plastique (Tronchin *et al.* 1991).

Bien que la filamentation ne soit pas indispensable pour la pathogénicité de *C. albicans*, de nombreuses études ont associé la capacité de colonisation et d'invasion des tissus hôtes à la formation des hyphes (Höfs *et al.* 2016). Ainsi, les espèces et les souches capables de former des hyphes ou des pseudohyphes sont les plus virulentes. En effet, les hyphes pénètrent plus facilement dans les cellules hôtes, épithéliales en particulier, comparés à la forme blastospore, favorisant ainsi l'invasion (Jacobsen *et al.* 2012). Cette capacité de pénétration peut être expliquée par la pression générée au niveau de l'extrémité apicale des hyphes (Gow *et al.* 2002) et aussi la sécrétion, à ce niveau, des hydrolases qui dégradent et affaiblissent la membrane de la cellule de l'hôte (Naglik *et al.* 2011, Wächtler *et al.* 2011). Des dommages sont donc induits aux tissus hôtes se manifestant par deux processus, apoptose ou nécrose (Naglik *et al.* 2011).

Par ailleurs, la formation des hyphes par *C. albicans* est associée à sa résistance à la phagocytose, en perçant les macrophages ou en induisant leur apoptose (Uwamahoro *et al.* 2014). Le thigmotropisme (i.e. tropisme qui répond à un stimulus tactile), phénomène connu chez certaines plantes, a été également décrit chez *C. albicans*. Le stimulus étant le contact des extrémités apicales des hyphes avec la surface tissulaire de l'hôte. Les hyphes fongiques sont orientés vers les zones fragiles pour qu'ils s'infiltreront facilement dans le tissu infecté (Watts *et al.* 1998, Chen *et al.* 2011).

### 5.3. Sécrétion des enzymes

*C. albicans* sécrète différentes hydrolases notamment des protéases, des phospholipases et des lipases (O'Donnell *et al.* 2015). Les plus importantes sont les protéinases SAPs (*Secreted Aspartyl Proteinases*) qui comprennent dix membres. Certaines sont sécrétées alors que d'autres restent attachées à la surface cellulaire via le glycosylphosphatidylinositol (GPI). En utilisant des inhibiteurs de protéases et des mutants déficients au niveau des SAPs, il a été affirmé que ces protéinases contribuent à l'adhésion et aussi à l'invasion via la dégradation des protéines des cellules hôtes et des molécules et/ou des cellules du système immunitaire (Hube et Naglik 2001). En effet, les protéines visées par les SAPs comprennent les E-cadhérines, qui sont concentrées dans les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales. Leur dégradation entraîne une perte de

l'intégrité de l'épithélium. Les mucines sont aussi visées par les SAPs et leur dégradation entraîne une perte de la barrière protectrice générée par ces protéines (Höfs *et al.* 2016). Par ailleurs, une corrélation positive a été démontrée entre l'expression des SAPs et la formation du biofilm par *C. albicans* (Naglik *et al.* 2003).

D'autres enzymes appartenant à différentes familles de phospholipases PLA, PLB, PLC et PLD sont sécrétées. Elles endommagent les membranes cellulaires hôtes par hydrolyse des phospholipides exposant ainsi de nouveaux sites convenables pour l'adhésion et la pénétration par des hyphes (Pereira *et al.* 2016).

Par ailleurs, les lipases sont impliquées dans la désintégration des tissus de l'hôte par hydrolyse des triacylglycérols. Chez *C. albicans*, dix gènes ont été associés à la production des lipases (LIP-1-10) (Silva *et al.* 2012). Ainsi, une souche de *C. albicans* mutante pour LIP 8 a montré une virulence atténuée chez le rat par rapport à la souche sauvage (Hube *et al.* 2000).

#### 5.4. Protéines de réponse au stress

Afin de contrer les agressions auxquelles peut être soumis un organisme vivant (température très élevée, carence nutritive, stress oxydatif, etc.), les protéines de choc thermique HSPs (*Heat Shock Proteins*) sont exprimées d'une façon rapide et transitoire pour maintenir l'homéostasie et la survie de l'organisme. En tant que chaperons, les HSPs préviennent le déploiement, la dénaturation et l'agrégation des protéines cellulaires essentielles (Lanneau 2010).

Jusqu'à présent, six protéines de choc thermique ont été retrouvées chez *C. albicans* ; HSP90, HSP60, HSP104, HSP78 et deux membres de HSP70 (Ssa1 et Ssa2) (Mayer *et al.* 2013).

Les HSP90 gouvernent la morphogénèse température-dépendante et sont impliquées dans la résistance à quelques antifongiques chez *C. albicans*, et elles interviennent, comme les HSP104, dans la formation des biofilms (Becherelli *et al.* 2013). Quant aux HSP78, elles régulent la réponse du microorganisme à la phagocytose. Les Ssa1 et Ssa2 sont exprimées aussi bien à la surface des hyphes qu'à celle des blastospores.

Par ailleurs, *C. albicans* produit différentes enzymes face au stress oxydatif infligé par les cellules immunitaires de l'hôte (Brown *et al.* 2014). Des superoxyde dismutases (Sod1, Sod5) et une catalase (Cta1) protègent la levure contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO), alors qu'une protéine apparentée à la flavohémoglobine (Yhb1) protège la cellule contre les espèces

réactives de l'azote (ERA) (Brown *et al.* 2012, Dantas *et al.* 2015). En fait, des études ont montré que des délétions touchant chacune de ces protéines entraînent l'atténuation de la virulence testée dans un modèle *in vivo* de la candidose systémique chez les rats (Hwang *et al.* 2002, Hromatka *et al.* 2005).

## 6. Résistance aux antifongiques

Le traitement des mycoses en général et des candidoses en particulier est basé principalement sur les différentes classes d'antifongiques : polyènes, azolés, échinocandines et analogues de la pyrimidine (*cf.* Annexe 1) (Dannaoui 2013). Toutefois, l'augmentation de l'utilisation des antifongiques d'une manière irrationnelle et inappropriée dans tous les secteurs concernés notamment en élevage, est responsable de l'apparition et l'émergence des résistances à tous les antifongiques sans exception (Jensen *et al.* 2015, Gonçalves *et al.* 2016, Owotade *et al.* 2016). C'est en effet un problème majeur et croissant pour la santé publique mondiale, augmentant ainsi le taux des échecs thérapeutiques, ainsi que le taux de mortalité et de morbidité (Gonçalves *et al.* 2016). Partant de ce fait, la résistance aux antifongiques est perçue par plusieurs chercheurs comme un facteur de virulence. De plus, comme l'atteste l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dans son rapport sur la surveillance mondiale de la résistance aux antimicrobiens en 2014, la résistance aux antibiotiques n'est plus un risque pour l'avenir, mais une réalité qui compromet le traitement des infections communautaires et nosocomiales dans le monde entier (OMS 2015).

## II. Biofilms microbiens

### 1. Généralités

Depuis leur première découverte en 1936, les biofilms acquirent l'attention des chercheurs dans tout le globe. Dans les années 1970s et grâce aux pionniers des biofilms Bill Costerton et Niels Hoiby, la définition des biofilms s'est éclaircie de plus en plus (Costerton *et al.* 1995). Ainsi, le terme biofilm fut défini comme étant une communauté de microorganismes adhérents à une surface biotique (e.g. tissus) ou abiotique (e.g. prothèses, cathéters, acier, bois), et englobés dans une matrice extracellulaire issue de leurs propres sécrétions (Costerton *et al.* 1999).

Selon ce nouveau concept, le mode de vie sessile fut reconnu comme la forme d'existence prédominante de la biomasse microbienne dans les différents écosystèmes naturels et industriels (Hall-Stoodley *et al.* 2004, Srey *et al.* 2013).

Bien que certains biofilms soient utiles pour leurs implications dans des processus de bioremédiation (Singh *et al.* 2006, Briandet *et al.* 2012, Łaskawiec 2015), ceux-ci constituent la principale cause de la plupart des infections humaines difficilement curables et posent d'innombrables problèmes dans le secteur industriel et hospitalier (Costerton *et al.* 1999, Srey *et al.* 2013). En effet, de nombreuses études ont montré que le caractère récalcitrant des microorganismes à l'égard des agents antimicrobiens et des moyens de défense de l'hôte est attribué, en grande partie, à ces consortiums microbiens sessiles, ce qui est à la racine de la plupart des maladies infectieuses chroniques chez l'Homme (Costerton *et al.* 1999, Williams et Ramage 2015).

En effet, les infections associées aux appareils médicaux étaient les premières à mettre en question l'implication des biofilms dans l'instauration et le développement de ces infections. Cette reconnaissance date depuis le début des années 1980s, lorsque l'examen par microscopie électronique montra la déposition des bactéries sur des cathéters intraveineux et des stimulateurs cardiaques (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Récemment, l'utilisation des appareils médicaux qui peuvent être installés ou implantés partout dans le corps humain s'est amplifiée. Tous ces outils exposent des surfaces propices pour l'adhésion et le développement des biofilms, engendrant ainsi des infections associées aux appareils médicaux (*Device-associated infections* en anglais) qui partagent toutes le caractère de résistance aux traitements antimicrobiens et de récurrence ou de chronicité (Shirliff et Leid 2009). Pour ces raisons, de nombreux travaux se sont penchés sur l'étude des biofilms, leur formation, leurs implications pathologiques, afin de développer des stratégies de lutte efficaces pour contrer ces derniers.

## 2. Formation du biofilm

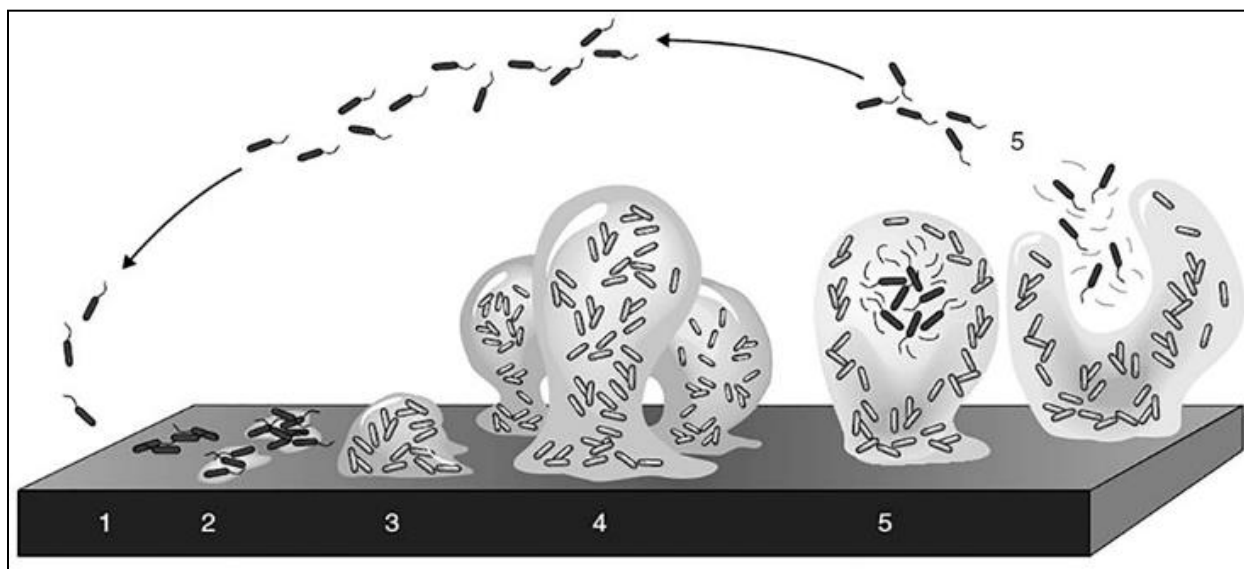
La formation du biofilm survient en réponse à de nombreux signaux extracellulaires, présents dans l'environnement ou produits par des cellules. En effet, plusieurs études suggèrent que la transition du mode de vie planctonique au mode sessile est une réponse à des conditions



environnementales hostiles, dans l'ultime but d'assurer la survie quand le milieu s'appauvrit en nutriments ou en eau, ou en réponse aux agressions par des agents antimicrobiens (Kaplan 2011, Lagha *et al.* 2014, Han *et al.* 2016, Weiser *et al.* 2016). Toutefois, il a été rapporté qu'un environnement riche en nutriments induit également la formation de biofilm chez certaines bactéries à Gram-négatif (O'Toole *et al.* 2000).

Le biofilm, qu'il soit mono-espèce ou multi-espèces (coexistence de plusieurs espèces), est un phénomène stable dans un cycle biologique comprenant des phases progressives ; initiation, maturation, maintenance et dispersion.

Habituellement, la formation d'un biofilm microbien dans un milieu aqueux se résume en cinq phases (Figure 3) ; 1) transport des microorganismes planctoniques vers la proximité de la surface ; 2) adhésion des microorganismes et formation des microcolonies ; 3) division active au sein des microcolonies et production de la matrice extracellulaire ; 4) maturation du biofilm ; 5) détachement et dispersion des cellules planctoniques à partir du biofilm.



**Figure 3 :** Illustration des étapes de formation d'un biofilm (Srivastava et Bhargava 2016)

Nous discuterons chaque phase et nous détaillerons l'étape de l'adhésion dont la compréhension des mécanismes et des facteurs qui l'influencent aidera mieux à développer des stratégies préventives à l'encontre de la formation des biofilms.

## 2.1. Transport

Les microorganismes planctoniques, dans leur milieu, ont tendance à se déplacer vers les surfaces (biotiques ou abiotiques). Le transport actif, le mouvement brownien et la sédimentation sont les principales formes de transport des microorganismes vers une surface. Néanmoins, les stimulus qui gouvernent la direction du transport sont plus complexes (Marshall 1985, Kanematsu et Barry 2015). D'un point de vue biologique, le chimiotactisme oriente les microorganismes vers les zones riches en nutriments. En réalité, un film conditionnant, comprenant des particules et des nutriments du milieu environnant, se forme par adsorption sur la surface en question. Ces nutriments comprennent généralement des sources de carbones (carbohydrates, acides aminés, protéines, etc.) (Kanematsu et Barry 2015).

Physiquement parlant, le type de flux (laminaire, turbulent ou mixte) et l'effet thermique ou gravitationnel influencent significativement le mouvement (Kanematsu et Barry 2015) et affectent ainsi la disposition des microorganismes sur une surface (Baillif *et al.* 2010).

## 2.2. Adhésion

Les cellules microbiennes qui arrivent à proximité de la surface n'adhèrent que si les facteurs qui gouvernent l'adhésion sont favorables. Dans le cas contraire, les cellules restent non attachées et facilement transportées.

La littérature scientifique décrit l'adhésion microbienne, notamment sur des surfaces abiotiques, comme un phénomène comprenant deux phases ; une phase initiale, non spécifique, instantanée, physique et réversible, suivie d'une phase spécifique, irréversible et temps-dépendante (Hori et Matsumoto 2010).

La première phase de l'adhésion est régie par des interactions physicochimiques entre la surface de la cellule et la surface du matériau. En bref, ces interactions sont classées en interactions à longue portée opératives à une distance supérieure à 50 nm (interaction de van der Waals et électrostatiques), et des interactions à courte portée opératives à une distance inférieure à 5 nm (notamment les interactions acide-base de Lewis). Lorsque la résultante de ces interactions physicochimiques entre les deux surfaces est attractive, les microorganismes s'adsorbent sur le matériau et la deuxième phase de l'adhésion (spécifique) peut ainsi avoir lieu (Hori 2015, Han *et al.* 2016).

L'adhésion spécifique par contre implique des liaisons non covalentes ou covalentes qui permettent ainsi de nouer irréversiblement les microorganismes à la surface en question (Hori 2015).

### 2.3. Division et maturation

Les cellules adhérentes s'agglutinent grâce aux adhésines exprimées sur leur surface cellulaire et se divisent activement pour former des microcolonies sur la surface du matériau (deux à cinq couches de microorganismes) (Chapman 2015a).

Dans une étude examinant la formation du biofilm par *C. albicans* sur le polyméthylmethacrylate, l'analyse microscopique à fluorescence a décelé trois phases distinctes. Une phase précoce (de 0 à 11 h), une phase intermédiaire (de 12 à 30 h), et une phase de maturation (de 38 à 72 h) (Chandra *et al.* 2001). Durant les deux premières heures, les cellules fongiques se trouvaient attachées à la surface sous forme de blastospores, ensuite des microcolonies distinctes apparaissaient dans les deux heures suivantes (Chandra *et al.* 2001).

Après 12-14 heures d'incubation, un film contenant du matériel anucléé (i.e. matrice extracellulaire) qui couvre les microcolonies de *C. albicans* a été visualisé. En utilisant une coloration spécifique, il s'est avéré que cette matrice est constituée majoritairement de polysaccharides similaires à ceux de la paroi de la levure ( $\beta$ -glucane et chitine) (Chandra *et al.* 2001). Durant la phase de maturation, la visualisation des blastospores basales était gênée, à cause de la quantité de la matrice extracellulaire qui augmentait avec le temps d'incubation jusqu'à ce que toutes les cellules fongiques deviennent cachées (Chandra *et al.* 2001). Il a été rapporté que la matrice extracellulaire de *C. albicans* est composée de glycoprotéines (55%), carbohydrates (25%), lipides (15%) et acides nucléiques (5%) (Gulati et Nobile 2016). À ce stade, l'ensemble forme ce qu'on appelle biofilm mature hautement résistant aux biocides et aux défenses immunitaires de l'hôte.

Par ailleurs, plusieurs facteurs influencent la structure du biofilm mature, notamment le type et la force de flux du milieu ambiant, le type de la surface colonisée, ainsi que les relations intercellulaires avec les autres microorganismes (dans le cas du biofilm hétérogène).

Généralement, la maturité des biofilms implique une structure tridimensionnelle qui assure la survie de la communauté microbienne sessile en établissant différents gradients au sein du biofilm, (i.e. eau, molécules-signal, nutriments et déchets) (Chapman 2015a). Pour ces raisons, un

biofilm mature est une organisation, qui peut être simulée à un tissu eucaryote, où les microorganismes de diverses régions du biofilm peuvent exprimer des gènes différents grâce à une coordination entre ces microorganismes via une communication intercellulaire ou *quorum sensing* (Costerton *et al.* 1999).

Le *quorum sensing* est considéré comme un ensemble de mécanismes régulateurs qui assurent, chez les microorganismes, une bonne intégrité de biofilm en prévenant la surpopulation inutile et en gérant la compétition pour les nutriments au sein de biofilm (Ramage *et al.* 2005). Cette signalisation repose principalement sur la synthèse et la diffusion, de cellule à cellule, de petites molécules-signal équivalentes aux hormones chez les organismes supérieurs. En effet, des études antérieures ont montré que le farnesol est une molécule régulatrice produite *in situ* dans le biofilm mature à *C. albicans*, et qui a pour effet (lorsqu'une concentration seuil est atteinte) d'inhiber la filamentation. En outre, il s'est avéré que cette molécule régule l'expression génétique de certains gènes associés à la résistance aux antifongiques, à des protéines impliquées dans la maintenance de la paroi cellulaire, au transport de fer et certains gènes de la réponse au choc thermique (Ramage *et al.* 2005). De même, le tyrosol et d'autres composés jouent également un rôle régulateur dans la formation du biofilm chez *C. albicans* (Kruppa 2009).

Cette communication permet une harmonisation des cellules et favorise l'expression des facteurs de virulence appropriés, pour coloniser et endommager l'hôte en fonction des variables extrinsèques (Costerton *et al.* 1999, Kruppa 2009).

#### **2.4. Détachement et dispersion**

Pour qu'une communauté microbienne sessile puisse continuer de survivre, elle doit coloniser d'autres locus inoccupés. En fait le mécanisme de détachement et de dispersion des cellules planctoniques à partir du biofilm en est une étape clé.

D'un point de vue physique, le processus de détachement peut être vu comme un résultat d'une desquamation, une érosion, ou une abrasion due à la collision entre des particules extérieures et la surface de biofilm (Chapman 2015b). Néanmoins, biologiquement parlant, plusieurs travaux ont confirmé le rôle du *quorum sensing* dans cette étape qui opère en fonction des facteurs environnementaux (Kaplan 2010) et de la densité de cellules dans le biofilm. Bien qu'ils soient divers, les signaux qui induisent le détachement agissent notamment par ; i) induction de l'expression des enzymes qui dégradent les polymères de la matrice extracellulaire (Kaplan 2010,

Tremblay *et al.* 2014) ; ii) atténuation ou répression des gènes impliqués dans le *twitching* et dans la synthèse des polymères de la matrice (Chapman 2015b), iii) ou par production des surfactants (e.g. rhamnolipides chez *P. aeruginosa*) (Rybtke *et al.* 2011).

En ce qui concerne les enzymes hydrolysant les polymères de la matrice extracellulaire, le rôle des cellulases, pectinases, chitinases,  $\beta$ -glucanases, dispersine B, alginate lyases, protéases et ADNases dans le mécanisme du détachement a été affirmé par plusieurs travaux (Kaplan 2010, Chapman 2015b). Ainsi, Al-fattani et Douglas (2006) ont suggéré, dans une étude récente, que la protéinase K, la chitinase, l'ADNase I, la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase, et plus particulièrement la lyticase (qui dégrade les  $\beta$ -1,3 glucanes) hydrolysent la matrice extracellulaire du biofilm à *C. albicans* et favorisent ainsi son détachement.

En somme, le détachement et la dispersion des microorganismes d'un biofilm jouent un rôle important dans l'expansion de l'infection, et c'est pourquoi, d'un point de vue médical, le biofilm est considéré comme un réservoir des microorganismes pathogènes permettant la propagation de l'infection et aussi sa récurrence (Costerton *et al.* 1999, Kaplan 2010).

### 3. Contribution des biofilms à la tolérance vis-à-vis des antifongiques

Il est primordial de distinguer entre la résistance et la tolérance des microorganismes face au pouvoir des substances antimicrobiennes. La résistance est un phénomène qui permet au microorganisme de se multiplier en présence de l'agent antimicrobien. Cette résistance est transmise d'une génération à l'autre. Tandis que la tolérance signifie que les microorganismes sont inhibés, mais l'agent antimicrobien est incapable de les tuer même au-delà des concentrations thérapeutiques (Lebeaux et Ghigo 2012). Autrement dit, la tolérance des biofilms est une caractéristique phénotypique qui disparaît lorsque les microorganismes du biofilm sont mis en suspension. Les biofilms peuvent tolérer des concentrations 1000 fois supérieures à celles capables d'inhiber les cellules planctoniques (Taff *et al.* 2013). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que le mode de vie sessile confère une tolérance à plusieurs agressions (agents biocides, molécules et cellules immunitaires), ce qui a une répercussion funeste manifestée particulièrement par les maladies infectieuses chroniques incurables qui sont, pour la plupart, associées à la formation des biofilms (Otto 2014).

L'origine de la tolérance des biofilms aux antimicrobiens reste jusqu'à présent énigmatique, malgré les efforts déployés par la communauté scientifique afin de comprendre l'origine et les mécanismes du caractère récalcitrant des biofilms, probablement à cause de leur multiplicité comme le rapportent Lebeaux et Ghigo (2012).

À priori, la majorité des auteurs attribuent cette tolérance aux polymères de la matrice extracellulaire. Chez *C. albicans*, cette matrice polymérique constitue une barrière de diffusion des molécules antifongiques au sein du biofilm (Nobile et Johnson 2015). De plus, il s'est avéré que les pompes à efflux, qui sont surexprimées inductivement chez *C. albicans* en mode planctonique en réponse à un antifongique, sont surexprimées constitutivement chez les cellules en biofilm, participant ainsi à sa récalcitrance à l'égard des traitements antifongiques (Yeater *et al.* 2007, Nobile *et al.* 2012).

Par ailleurs, un autre facteur souvent ignoré, et qui semble être plus redoutable que les cellules multi-résistantes, est l'existence des cellules dites persistantes (*Persister cells*). Il s'agit d'une petite sous-population de cellules qui entrent spontanément en dormance et qui reprennent un mode de division normal d'une manière encore mal comprise. En effet, lorsque le biofilm est traité par l'agent antimicrobien, celui-ci affecte les cellules actives du pathogène (qui se multiplient), alors que les cellules persistantes subsistent (Lewis 2010). Chez *C. albicans* des cellules persistantes sont retrouvées au cours du stade biofilm et non pas pendant la phase exponentielle ou stationnaire de croissance planctonique (Lafleur *et al.* 2006).

### III. Phénomène de l'adhésion

Certes, l'adhésion est une étape cruciale dans la colonisation et la formation du biofilm, ce qui est à l'origine de la plupart des infections chroniques, mais la complexité de ce phénomène est flagrante. Comme nous l'avons évoqué précédemment, le concept le plus courant est celui qui décrit ce phénomène en deux phases (adhésion non spécifique et adhésion spécifique).

Dans ce chapitre, la phase de l'adhésion non spécifique sera détaillée et les modèles qui permettent sa prédiction, ainsi que les facteurs influençant cette phase seront discutés. Tandis que la phase de l'adhésion spécifique sera décrite brièvement.

## 1. Adhésion non spécifique

À proximité de la surface du matériau, l'attachement des microorganismes dépend des interactions physicochimiques qui peuvent être attractives ou répulsives. Ces interactions complexes sont régies par les propriétés de la surface du microorganisme, la surface du matériau ainsi que le milieu ambiant.

Afin de mieux comprendre les forces qui interviennent dans ce processus évolutif dans le temps, de nombreux chercheurs ont simulé la cellule microbienne à une particule colloïdale pour pouvoir appliquer les modèles théoriques de la chimie des colloïdes sur l'adhésion. Généralement, la théorie Derjaguin, Landau, Verveij, et Overbeek (DLVO), l'approche thermodynamique et la théorie DLVO développée XDLVO (*extended DLVO*) ont été appliquées pour décrire l'adhésion microbienne sur des surfaces abiotiques (Katsikogianni et Missirlis 2004).

### 1.1. Modèle prédictif de l'adhésion

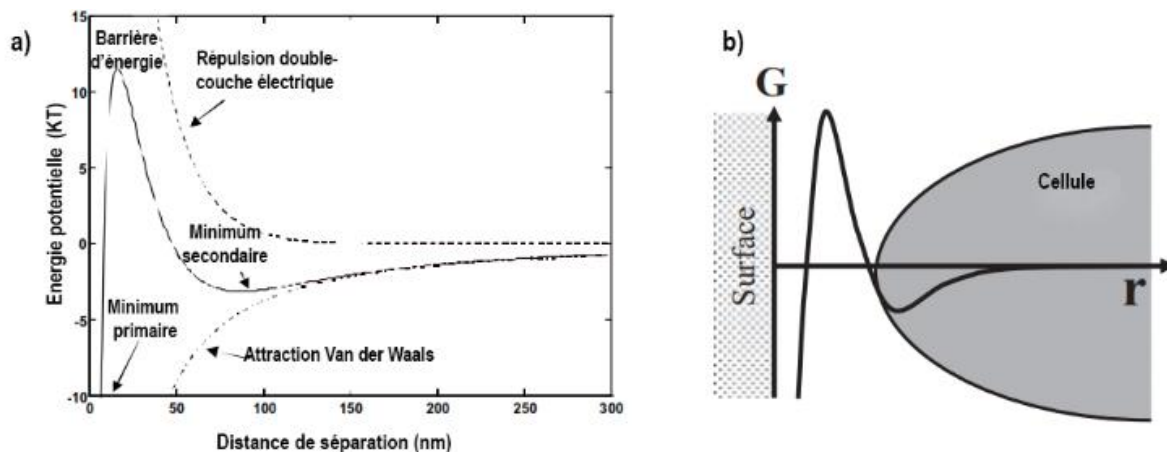
#### 1.1.1. Théorie DLVO

La théorie conventionnelle Derjaguin, Landau, Verveij, et Overbeek (DLVO) fut adoptée pour décrire l'interaction nette entre une cellule microbienne et une surface. C'est une résultante ou une balance des interactions physicochimiques à longue portée (*Long-rang interactions*), qui comprennent les interactions de Van der Waals et les interactions électrostatiques (Hori et Matsumoto 2010).

En premier lieu, les forces van der Waals, qui sont généralement attractives, ne laissent pas le microorganisme s'échapper par un simple mouvement brownien. En s'éloignant de la surface, les forces de van der Waals diminuent fortement, et par conséquent les forces électrostatiques sont plus opératives et plus dominantes.

À l'égard des forces électrostatiques, elles sont généralement répulsives entre une surface naturelle et une cellule microbienne. En effet, quand le milieu ambiant est riche en particules chargées, les ions de charge opposée (contre-ions) sont attirés par chaque surface (cellule et matériau), formant ainsi une double couche électrique. Étant donné que les cellules microbiennes sont habituellement chargées négativement, de même que les surfaces naturelles, une répulsion électrostatique est générée par les interactions double-couche électrique (*Electrical double-layer interactions*) de la surface cellulaire et celle du matériau (Hori et Matsumoto 2010).

Or, les forces électrostatiques sont fortement influencées par la force ionique du milieu ambiant. En effet, à faible force ionique, quand la cellule s'approche de la surface, il existe une barrière d'énergie caractérisée par une prise d'ampleur des forces électrostatiques répulsives empêchant la cellule d'atteindre la surface par transport actif ou par mouvement brownien (Figure 4). Alors que cette barrière d'énergie est quasi inexistante quand la force ionique du milieu est très importante, la cellule peut ainsi atteindre facilement et rapidement la phase irréversible de l'adhésion (An *et al.* 2000). Autrement dit, selon cette théorie la cellule microbienne planctonique arrive par transport jusqu'au minimum d'énergie secondaire, séparé de la surface de quelques dizaines de nanomètres en fonction de la force ionique du milieu, en dehors de la barrière d'énergie et adhère réversiblement à la surface, c'est la première étape de l'adhésion (Figure 4) (Hori 2015). D'ailleurs, le temps nécessaire pour cette adhérence varie exponentiellement avec la hauteur de la barrière d'énergie.



**Figure 4 :** a) Représentation graphique de l'énergie libre d'interaction entre une particule colloïdale et une surface en fonction de la distance de séparation selon la théorie DLVO (An *et al.* 2000) ; b) Adhésion réversible d'une cellule microbienne sur une surface selon la théorie DLVO (Hori et Matsumoto 2010)

Par ailleurs, les travaux ayant illustré la corrélation positive qui existe entre la force ionique du milieu et l'adhésion microbienne sont nombreux et confirment en réalité la théorie DLVO (Abbott *et al.* 1983, Abu-lail et Camesano 2003).

Contrairement à une particule colloïdale, la cellule microbienne est un être vivant qui exprime une surface de structure complexe, hétérogène et versatile, compliquant ainsi la



quantification de l'adhésion microbienne par ce modèle, et par tous les modèles qui ne tiennent pas compte de ce facteur (An *et al.* 2000, Sharp et Dickinson 2005).

### 1.1.2. Approche thermodynamique

Dans cette approche, les interactions attractives et répulsives (van der Waals, électrostatiques ou dipôles) sont incluses, mais elles sont thermodynamiquement exprimées sous forme d'énergie libre de surface (Katsikogianni et Missirlis 2004). L'approche thermodynamique présume que l'effet des interactions électrostatiques et celui des interactions biochimiques spécifiques (ligand- récepteur) peuvent être négligés (Absolom *et al.* 1983, Morra et Cassinelli 1997). Ainsi, l'adhésion est évaluée par le calcul de l'enthalpie libre ou l'énergie de Gibbs (Equation 1) en estimant les énergies libres de surface du microorganisme et de la surface étudiée, et la tension de surface du fluide ambiant (Katsikogianni et Missirlis 2004).

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sm} - \gamma_{sl} - \gamma_{ml} \quad (\text{Equation 1})$$

Où,  $\gamma_{sm}$ ,  $\gamma_{sl}$  et  $\gamma_{ml}$ , sont les énergies libres des interfaces solide-microorganisme, solide-liquide, et microorganismes-liquide respectivement.

Donc, si l'enthalpie libre est négative l'adhésion est favorable, ce qui signifie que l'attachement spontané est accompagné par une diminution de l'énergie libre du système (Deuxième loi de la thermodynamique) (Katsikogianni et Missirlis 2004).

Or, plusieurs approches thermodynamiques ont été adoptées par différents auteurs, celle de Neumann utilisée par Marchant et ses collègues, celle de la dispersion polaire par Pitt et ses collègues, et l'approche Lewis acide-base adoptée par Morra et Cassinelli (1997).

L'approche thermodynamique avec ses variantes ne peut pas être appliquée au niveau du minimum d'énergie secondaire décrit précédemment dans la théorie DLVO, car l'interface solide-microorganisme n'est pas encore formée. Alors, contrairement à l'approche DLVO selon laquelle l'adhésion est décrite comme un processus qui dépend de la distance de séparation entre le microorganisme et la surface, l'approche thermodynamique considère ce phénomène comme étant un équilibre et non pas une cinétique (Hori 2015).

Bien que l'effet des interactions électrostatiques soit ignoré par l'approche thermodynamique, celle-ci prévoit mieux le fait que des cellules hydrophobes adhèrent mieux sur

les surfaces hydrophobes et les cellules hydrophiles sur les surfaces hydrophiles (An et Friedman 1998).

### 1.1.3. Théorie XDLVO

La dernière constatation citée dans le paragraphe précédent montre que l'hydrophobicité est certainement un facteur d'une importance capitale, vu qu'elle influence fortement l'adhésion, l'agrégation, et l'autoagrégation des microorganismes (An et Friedman 1998).

Selon Van Oss, l'énergie de l'attraction hydrophobe entre deux entités apolaires, ou une entité polaire et une autre apolaire, quand elles sont immergées dans l'eau est la conséquence de l'énergie de cohésion des liaisons hydrogènes des molécules d'eau entourant ces entités (Van Oss 1995). Généralement, les ponts hydrogènes peuvent être vus sous forme de donneur d'électrons et accepteur d'électrons, autrement dit acide et base de Lewis (Van Oss 1991).

En conséquence, selon Van Oss, l'énergie ou la tension de surface comporte une composante décrivant les forces de van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ) et une composante des forces acide-base de Lewis ( $\gamma^{AB}$ ). La composante  $\gamma^{LW}$  se base sur l'approche Lifshitz qui décrit à son tour la force de van der Waals avec ses trois origines ; effets de dispersion ou forces de London, effets d'orientation ou forces Keesom et effets d'induction ou forces de Debye (Van Oss 1991).

Ces conclusions ont permis à van Oss de développer l'approche DLVO en y intégrant les interactions acide-base de Lewis entre les deux surfaces qui interagissent, c'est l'approche XDLVO. Autrement dit, outre les interactions à longue portée, l'approche XDLVO implique les forces acide-base de Lewis qui décrivent les interactions hydrophobes et qui représentent 90 % des interactions non covalentes dans un milieu aqueux (Van Oss 2003). Les interactions acide-base de Lewis sont considérées comme des interactions à courte portée (*short-range interactions*), et des études antérieures ont montré que ces interactions ne sont opératives qu'à une distance inférieure à 5 nm de la surface (Bos *et al.* 1999). Toutefois, elles sont 10 à 100 fois plus fortes que les interactions de van der Waals (Katsikogianni et Missirlis 2004).

Ainsi, l'énergie libre totale de l'adhésion est exprimée selon l'équation 2.

$$\Delta G_{adh} = \Delta G^{vdW} + \Delta G^{dl} + \Delta G^{AB} \text{ (Equation 2)}$$

Où  $\Delta G^{vdW}$  exprime les interactions Lifshitz-van der Waals,  $\Delta G^{dl}$  pour les interactions électrostatiques ou double-couche électrique, et  $\Delta G^{AB}$  exprime les interactions acide-base de Lewis.

En somme, l'approche XDLVO qui combine la théorie DLVO classique et l'approche thermodynamique est considérée comme une approche prometteuse pour l'étude de l'adhésion microbienne et plusieurs travaux récents qui l'ont adoptée ont illustré une bonne corrélation entre les prédictions théoriques et les résultats expérimentaux de l'adhésion (Sadiki *et al.* 2015, Nguyen *et al.* 2016).

## **1.2. Facteurs influençant l'adhésion**

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'adhésion microbienne est un processus complexe où plusieurs facteurs interviennent et interagissent.

Ces facteurs sont associés à la surface du microorganisme, à la surface du matériau et à des conditions environnementales liées au milieu ambiant. De ce fait, leur compréhension est impérieusement indispensable pour pouvoir contrôler l'adhésion microbienne.

### **1.2.1. Facteurs liés au microorganisme**

Sur une surface donnée, différents genres et espèces de microorganismes peuvent adhérer ou non avec des pourcentages très différents. Ce fait est généralement dû à des différences au niveau des propriétés physicochimiques de leur surface cellulaire, qui varient d'une souche à l'autre (An et Friedman 1998) et qui sont affectées par les conditions de croissance (Briandet *et al.* 1999).

#### **- Hydrophobicité/hydrophilicité**

L'hydrophobicité de la surface d'une cellule microbienne est un facteur décisif pour son adhésion ou non sur une surface donnée. En effet, les microorganismes ayant une surface hydrophobe adhèrent facilement sur les surfaces hydrophobes et ceux ayant une surface hydrophile préfèrent les surfaces hydrophiles (Klotz *et al.* 1985).

En règle générale, les cellules hydrophobes adhèrent et forment le biofilm plus fréquemment que les cellules hydrophiles. C'est pourquoi l'hydrophobicité est considérée par certains chercheurs comme un facteur de virulence conférant aux microorganismes la capacité et la faculté de coloniser et d'instaurer l'infection (Pereira *et al.* 2016).

Par ailleurs, la surface des appareils médicaux constitués habituellement de silicone, acier inoxydable ou téflon, qui sont de nature hydrophobe, favorise généralement l'adhésion des microorganismes hydrophobes. Ce fait est confirmé par plusieurs études qui ont rapporté une corrélation positive entre le degré d'hydrophobicité de la surface cellulaire et l'adhésion (Van Loosdrecht *et al.* 1987a, Grivet *et al.* 2000, Panagoda *et al.* 2001, Hamadi *et al.* 2008).

L'adhésion des microorganismes aux solvants (*Microbial adhesion to hydrocarbons* MATH), la partition des microorganismes dans un système aqueux à deux phases, la chromatographie d'interaction hydrophobe et la mesure de l'angle de contact sont des méthodes qui permettent d'évaluer l'hydrophobicité de surface des microorganismes (Krekeler *et al.* 1989). Toutefois, la mesure de l'angle de contact est la méthode la plus recommandée (Krekeler *et al.* 1989, Van der Mei *et al.* 1998).

Par ailleurs, il est important de souligner que l'hydrophobicité des microorganismes est un paramètre qui varie selon la souche et l'espèce (Van der Mei *et al.* 1998). Elle est fortement affectée par la phase de croissance et les conditions de culture du microorganisme (Sanin *et al.* 2003, Blanco *et al.* 2008). En effet, Kjelleberg et Hermansson (1984) ont montré que durant la phase exponentielle de croissance l'hydrophobicité de surface augmente chez *C. albicans* et *C. glabrata*, et que la carence nutritive influence fortement les propriétés physicochimiques de surface de ces deux espèces. De même, l'effet de la température de croissance et le type du milieu de culture sur l'hydrophobicité ont été précédemment rapportés (Hazen *et al.* 1986, Briandet *et al.* 1999).

La contribution des constituants cellulaires qui s'expriment à la surface du microorganisme dans l'hydrophobicité de surface est importante. C'est le cas par exemple de l'acide lipotéichoïque, des protéines et des lipides membranaires ou capsulaires externes, des fibrilles de surface, des fimbriae et des cores oligosaccharides (Krasowska et Sigler 2014).

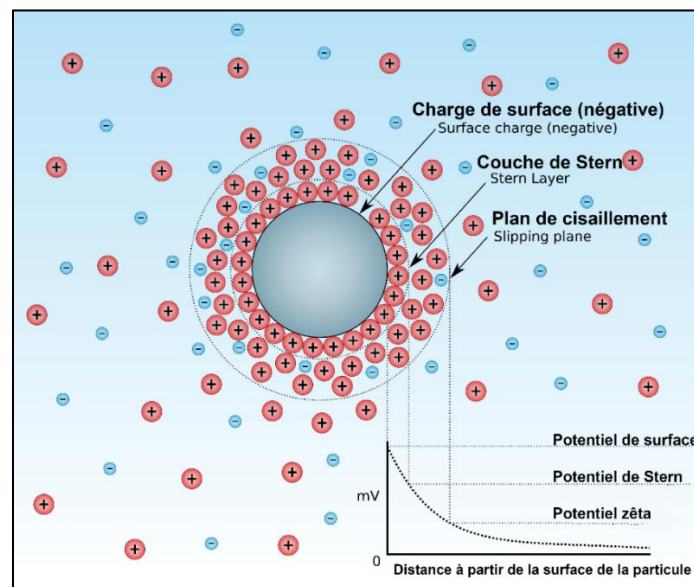
Finalement, Van der Mei *et al.* (1998) ont associé, dans une publication qui liste les angles de contact de 142 isolats microbiens, la différence de l'hydrophobicité de surface des microorganismes est liée à la différence de leurs caractères acide-base de Lewis. De plus, l'auteur et ses collègues ont montré qu'il est difficile de faire des généralisations concernant les propriétés physicochimiques de surface des microorganismes.

### - Charge de la surface cellulaire

En milieu aqueux, et en fonction du pH, l'ionisation des groupements (i.e. carboxylate, phosphate, amines) présents à la surface cellulaire des microorganismes leur confère des charges électriques (Wilson *et al.* 2001).

Depuis l'année 1924, les bactériologistes ont essayé de déterminer la charge de la surface des bactéries. Néanmoins, les techniques qui existèrent et subsistent jusqu'à nos jours ne permettent qu'une détermination indirecte de ce paramètre, notamment par l'accès au potentiel électrique de l'interface cellule-milieu aqueux environnant, appelé encore potentiel zêta ( $\zeta$ ) (Figure 5) (Wilson *et al.* 2001).

La détermination de la mobilité électrophorétique des microorganismes est couramment utilisée pour déterminer leurs potentiels zêta via l'équation de Smoluchowski et d'en déduire la charge de surface (Krekeler *et al.* 1989, Hori 2015).



**Figure 5 :** Illustration de la double couche électrique et différence du potentiel électrique en fonction de la distance à la surface d'une particule chargée négativement en solution (An *et al.* 2017)

De plus, la chromatographie des interactions électrostatiques en utilisant des résines échangeuses d'ions est utilisée pour exprimer la charge de surface des bactéries, les résultats obtenus sont souvent exprimés sous forme de ratio (cellules retenues/cellules éluées) (Dickson et

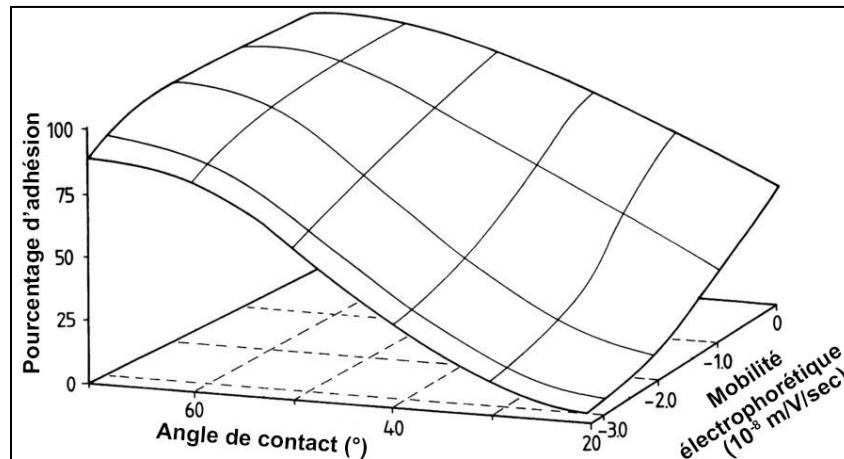
Koohmaraie 1989). Néanmoins, cette méthode ne permet pas d'accéder au potentiel zêta. C'est aussi pareil pour la technique de partition dans un système à deux phases (Wilson *et al.* 2001). La détermination du point isoélectrique (équilibre isoélectrique) fournit des résultats permettant de calculer le potentiel zêta, mais cette méthode est rarement utilisée à cause de sa complexité (Wilson *et al.* 2001).

Bien que la plupart des microorganismes expriment à leur surface une charge nette négative, celle-ci est variable d'une souche à l'autre, et elle est de surcroît fortement influencée par le pH et la force ionique du milieu, la température, la phase de croissance (âge) ainsi que la structure de la surface cellulaire (Van Loosdrecht *et al.* 1987b, Briandet *et al.* 1999, Wilson *et al.* 2001). D'ailleurs, Sharp et Dickinson (2005) ont démontré que l'électronégativité de la surface de *C. albicans* diminue proportionnellement avec l'augmentation de la force ionique du milieu, et que le comportement de *C. albicans* est approximativement comparable à une particule colloïdale, puisque le potentiel zêta tend vers 0 à une force ionique très élevée (100 mM de NaCl).

La contribution de ce paramètre dans l'adhésion est exprimée essentiellement par les forces électrostatiques dans l'approche DLVO et XDLVO (Sharp et Dickinson 2005).

Certes, le potentiel de surface de la cellule affecte le processus de l'adhésion, mais les études rapportent des résultats divergents et parfois contradictoires (Dickson et Koohmaraie 1989, Gilbert *et al.* 1991). Afin d'expliquer ces divergences, Van Loosdrecht *et al.* (1987b) ont étudié les effets des caractéristiques physicochimiques de surface des bactéries (l'hydrophobicité exprimée par l'angle de contact vis-à-vis de l'eau et la charge de surface exprimée par la mobilité électrophorétique) sur l'adhésion. Les auteurs ont montré que les deux propriétés étudiées présentent une corrélation significative avec l'adhésion bactérienne. De plus, ils ont illustré que chez les cellules hydrophiles la charge de surface influence fortement l'adhésion, tandis que le degré de l'hydrophobicité est plus influençant chez les cellules hydrophobes (Figure 6).

D'ailleurs, Gilbert *et al.* (1991) ont remarqué que l'augmentation de l'électronégativité de surface chez *E. coli* est corrélée avec une diminution de l'adhésion, alors que chez *S. epidermidis* le contraire a été constaté. Ce qui s'explique par le fait que le degré d'hydrophobicité de *S. epidermidis* est très élevé de sorte que le facteur de la charge de surface n'est plus influençant par rapport à *E. coli* qui est plus hydrophile.



**Figure 6 :** Relation entre l'adhésion microbienne et les caractéristiques physicochimiques de la surface cellulaire du microorganisme (Van Loosdrecht *et al.* 1987b)

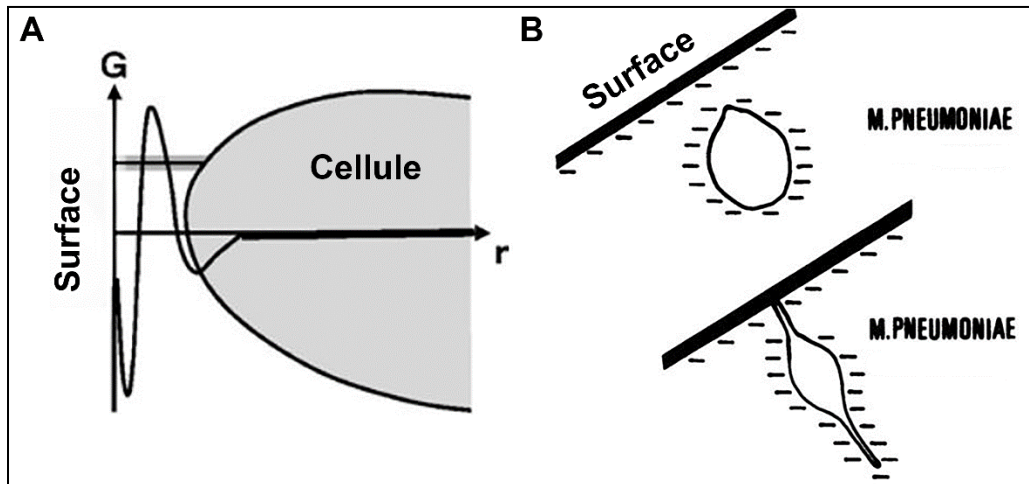
#### - Molécules de surface et forme de la cellule

D'un point de vue physicochimique, les microorganismes pendant la phase d'adhésion réversible arrivent au niveau du minimum secondaire d'énergie, et contrairement aux particules colloïdales, ils peuvent réduire leur rayon au niveau de la région de contact avec la surface pour faciliter l'adhésion définitive (Hermansson 1999).

Des polymères exposés sur la surface cellulaire, tels que les nanofibrilles, les fimbriae, les pili et le glycocalyx jouent un rôle majeur dans l'adhésion des microorganismes sur des surfaces biotiques et abiotiques (Skvarla 1993, An et Friedman 1998). Ainsi, il a été suggéré que ces structures peuvent relier une cellule, qui se trouve au niveau du minimum secondaire d'énergie à une distance de 20 jusqu'à 100 nm, à une surface (Hermansson 1999).

Ces structures et grâce à leur faible rayon, sont capables de briser la barrière d'énergie qui sépare la surface cellulaire de la surface du matériau (Figure 7 A) (Hori 2015), en établissant des liaisons non covalentes (hydrophobes ou hydrogènes) ou covalentes avec des sites sur la surface ou des molécules du film conditionnant, et d'amorcer ainsi l'adhésion irréversible (An *et al.* 2000).

D'autre part, il a été suggéré que *Mycoplasma pneumoniae* est capable de passer de sa forme ovoïde à une forme allongée et traverse ainsi la barrière d'énergie par son tube pointu (Figure 7 B) (Feldner *et al.* 1983).



**Figure 7 :** A) Connexion entre la cellule et la surface et début de l'adhésion irréversible (Hori et Matsumoto 2010) ; B) Déformation de *Mycoplasma pneumoniae* pour franchir la barrière d'énergie (Feldner *et al.* 1983)

### 1.2.2. Facteurs environnementaux

#### - Force ionique

Lorsque la force ionique du milieu est élevée, l'épaisseur de la double couche électrique diffuse (Figure 5) appelée longueur de Debye est compressée, ce qui diminue fortement les forces électrostatiques répulsives et favorise ainsi l'adhésion.

En effet, comme nous l'avons déjà évoqué, plusieurs études ont démontré la corrélation positive qui existe entre la force ionique et l'adhésion microbienne, ce qui corrobore les prédictions de la théorie DLVO (Abbott *et al.* 1983, Abu-lail et Camesano 2003).

Ces études ont montré que l'adhésion évolue proportionnellement avec la force ionique du milieu jusqu'à un seuil à partir duquel l'adhésion évolue indépendamment de ce paramètre. Effectivement la barrière d'énergie est éliminée à ce stade et la contribution des forces électrostatiques est nulle (Hermansson 1999). Or, certains auteurs ont remarqué l'absence de corrélation entre l'adhésion de certaines espèces bactériennes sur des surfaces hydrophobes et hydrophiles et la force ionique du milieu (Mceldowney et Fletcher 1986). Pourtant, les études menées sur l'effet de la force ionique dans des systèmes en dehors du laboratoire ont confirmé que les prédictions faites par la théorie DLVO expliquent l'adhésion dans les environnements naturels, tels que le sol et les biotopes aquatiques (Hermansson 1999).



### - Forces hydrodynamiques

Certes, la plupart des études sur l'adhésion microbienne sont menées dans des conditions statiques, mais dans la nature ce n'est pas toujours le cas.

D'une part, la force et la direction des mouvements des bactéries dans un fluide sont régies par les forces hydrodynamiques, notamment le flux au sein du fluide. D'autre part, la répartition des microorganismes sur un support est également modélisée par l'intensité et le type de flux (Kanematsu et Barry 2015).

Ainsi, sous un flux laminaire (Nombre de Reynolds  $<2000$ ), la proximité de la surface est caractérisée par un faible flux, ce qui engendre un biofilm épais mais moins compact, car les microorganismes ont tendance à s'organiser en agrégats amorphes grossiers. Tandis que sous un flux turbulent (Nombre de Reynolds  $>4000$ ), le biofilm formé est généralement dense et mince (Kanematsu et Barry 2015).

En outre, Stoodley et ses collaborateurs ont observé que sous un flux laminaire, les microcolonies formées par *P. aeruginosa* se répartissaient d'une façon isotropique (dans toutes les directions) à la surface du biomatériau, et que des cellules isolées sont également visualisées entre ces microcolonies, tandis que sous un flux turbulent toutes les cellules se regroupaient sous forme de bandelettes parallèles au sens du courant, et aucune bactérie isolée n'était observée entre les microcolonies (Stoodley *et al.* 2002).

### - Température

D'une manière générale, la température a une grande influence sur les réactions biochimiques de la cellule, notamment les réactions enzymatiques, ce qui semble avoir un effet indirect sur l'adhésion et la formation de biofilm (Roger *et al.* 2008, Baillif *et al.* 2010). En effet, certaines études ont montré que l'augmentation de la température favorise l'adhésion des microorganismes et la formation de biofilm, et ce fait a été associé à la modification de l'hydrophobicité (Bonaventura *et al.* 2008), la mobilité (Duffy et Sheridan 1997) ou la coagrégation des cellules (Kennedy et Sandin 1988).

### - Composition du milieu

La composition qualitative et quantitative du milieu ambiant est capable de moduler fortement l'adhésion (Mceldowney et Fletcher 1986, Duffy et Sheridan 1997). Ainsi, il a été affirmé que l'adhésion de *P. aeruginosa* est influencée par des conditions limitantes de la source du carbone et/ou de l'azote (Cowell *et al.* 1999). De plus, la concentration et le type de sels peuvent affecter l'adhésion. En fait, il a été rapporté que la substitution de NaCl par KCl favorise l'adhésion de certaines bactéries sur des cellules épithéliales humaines (Gandhi et Shah 2016).

Il a été également observé que lorsque le glucose, le phosphate, le magnésium le chlore, ou des éléments minéraux traces manquent dans le milieu, la production des exopolysaccharides extracellulaires et capsulaires par *Aeromonas salmonicida* est réprimée. De plus, il a été démontré que cette production est fortement influencée par le ratio C/N (source de carbone/source d'azote) (Bonet *et al.* 1993).

Concernant *C. albicans*, Kennedy et Sandin (1988) ont rapporté l'effet de la composition du milieu et des conditions de culture sur l'hydrophobicité de surface et l'ultrastructure de la paroi de *C. albicans*, ainsi que sur sa capacité d'adhésion.

Les protéines du milieu ambiant ont certes une influence sur l'adhésion, quels que soient leurs états adsorbées sur la surface ou dissoutes dans le milieu. Or, cette influence est protéine-dépendante. En effet, Fletcher a montré que l'albumine, la gélatine, le fibrinogène et la pepsine diminuent l'adhésion bactérienne sur le polystyrène, notamment lorsqu'elles sont dissoutes dans le milieu (par rapport au prétraitement des cellules ou des surfaces par ces protéines). Alors que les protéines basiques n'affectent pas cette adhésion (Fletcher 1976).

Dans le domaine agroalimentaire et dans l'objectif de comprendre le mécanisme d'adhésion sur l'acier inoxydable, il a été démontré que les protéines et les lipides du lait réduisent l'adhésion bactérienne (Barnes *et al.* 1999, Hamadi *et al.* 2014).

Finalement, il a été également rapporté dans une autre étude que l'albumine diminue l'adhésion, alors que la fibronectine l'augmente indépendamment de la mouillabilité de la surface (Tamada et Ikada 1993).

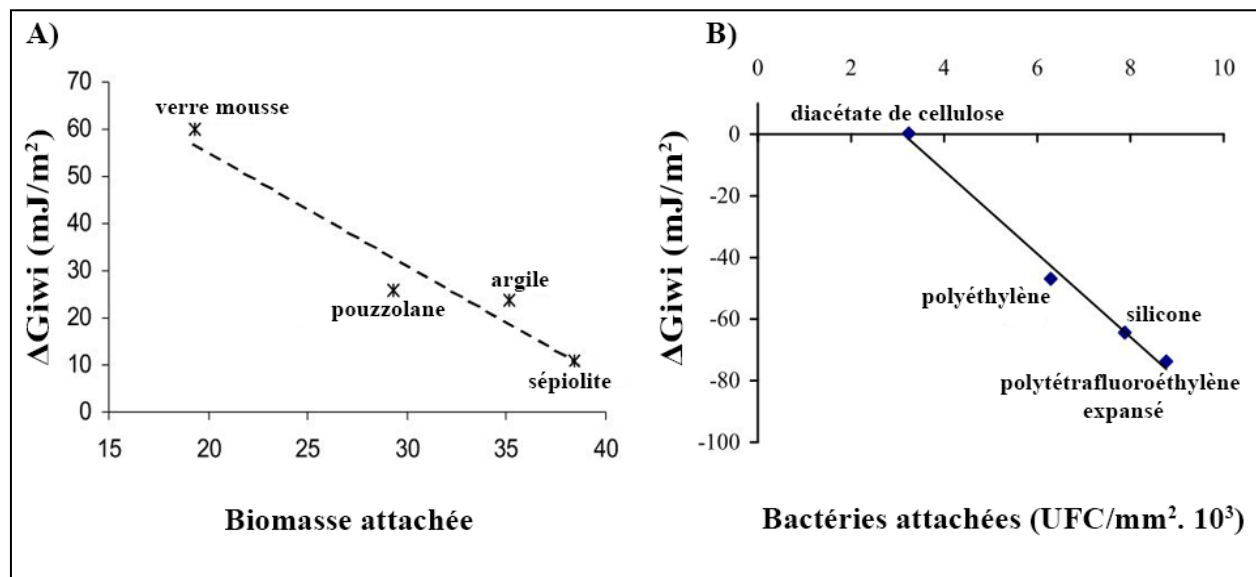
### 1.2.3. Facteurs liés à la surface

#### - Hydrophobicité

L'hydrophobicité de la surface des matériaux est souvent évaluée par la mesure de l'angle de contact, permettant ainsi une détermination qualitative de l'hydrophobicité (angle de contact vis-à-vis de l'eau), et quantitative via le calcul de l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ) (Van Oss 1995). Généralement, une faible énergie libre d'interaction ( $< 0$ ) indique le caractère hydrophobe de celle-ci, et une énergie libre d'interaction ( $> 0$ ) indique le caractère hydrophile de la surface étudiée.

Évidemment, l'hydrophobicité de la surface du matériau exerce une influence décisive sur l'adhésion (Oliveira *et al.* 2001). En effet, plusieurs études ont démontré une corrélation positive entre le degré d'hydrophobicité de la surface et l'adhésion microbienne (Saeki *et al.* 2016). Ainsi, la figure ci-dessous montre cette corrélation dans un environnement naturel sur des surfaces de matériaux inorganiques (Figure 8 A), et au laboratoire sur divers biomatériaux (Figure 8 B).

Par ailleurs, il est très important de rappeler que la formation du film conditionnant par adsorption des molécules organiques sur le support est dictée par l'hydrophobicité de sa surface, et que ce film est la nouvelle surface qui interagit avec le microorganisme (Vroman *et al.* 1975).



**Figure 8 :** Relation entre l'adhésion et l'hydrophobicité de surface du substrat A) Relation entre la biomasse anaérobie attachée et le degré d'hydrophobicité de divers supports inorganiques ; B) Relation entre le nombre de cellules de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 adhérentes et le degré d'hydrophobicité de différents types de substrats (Oliveira *et al.* 2001)

### - Charge de surface

Comme il a été précédemment évoqué pour la charge de la surface cellulaire, les groupements de la surface du matériau acquièrent, dans une solution aqueuse, une charge électrique, ce qui aboutira par la suite à la formation de la double couche électrique comme celle présentée dans la Figure 5.

La composition chimique de la surface influence fortement sa charge nette. Ainsi, les surfaces oxydes sont électriquement chargées du fait de l'interaction de leurs groupements (-OH) avec les ions hydroxydes de la solution, bien que ceci dépendrait fortement du pH (Han *et al.* 2016). Pour ces raisons, les traitements des surfaces ont souvent pour objectif d'altérer les propriétés physicochimiques de ces dernières, l'hydrophobicité et la charge nette en particulier, afin de minimiser l'adhésion (Desrousseaux *et al.* 2013).

Il est aussi important de noter qu'une charge nette de surface très élevée reflète le caractère hydrophile de celle-ci, néanmoins quelquefois des surfaces hydrophobes avec une charge nette non nulle sont également retrouvées. Ainsi, étant donné que la surface de la plupart des microorganismes est chargée négativement, une charge négative de la surface du matériau aurait un effet répulsif, alors qu'une surface positivement chargée serait attractive (Guo *et al.* 2013, Song *et al.* 2015).

Selon une étude menée sur l'adhésion d'une souche marine de *Pseudomonas* sp. sur différents matériaux, il s'est avéré que son attachement était important sur des surfaces de plastiques hydrophobes avec une charge faible ou nulle, alors qu'il était modéré sur des surfaces métalliques hydrophiles avec une charge positive ou neutre, et sur des surfaces hydrophiles et négativement chargées l'adhésion était trop faible (Fletcher et Loeb 1979).

### - Rugosité

La rugosité d'une surface est un paramètre bidimensionnel. Elle est déterminée par un rugosimètre ayant la capacité de détecter le motif de granularité d'une surface, d'y étudier les caractéristiques et de les reproduire sous forme de relief pour enfin calculer l'amplitude de celui-ci, à savoir la différence entre le point le plus haut et le plus bas de la surface. Elle est souvent exprimée en valeur moyenne Ra (An et Friedman 1998).

Plusieurs études ont montré que des surfaces rugueuses sont plus propices à l'adhésion microbienne que des surfaces identiques mais lisses (Tang *et al.* 2008, Baciuc *et al.* 2015, Bohinc

*et al.* 2016, Han *et al.* 2016). En effet, une surface rugueuse présente une surface de contact avec le milieu ambiant plus importante, avec des irrégularités qui échappent aux facteurs exogènes, tels que les flux (An et Friedman 1998). Pour ces raisons, des techniques de polissage et de finition sont souvent utilisées pour concevoir des matériaux avec des surfaces lisses.

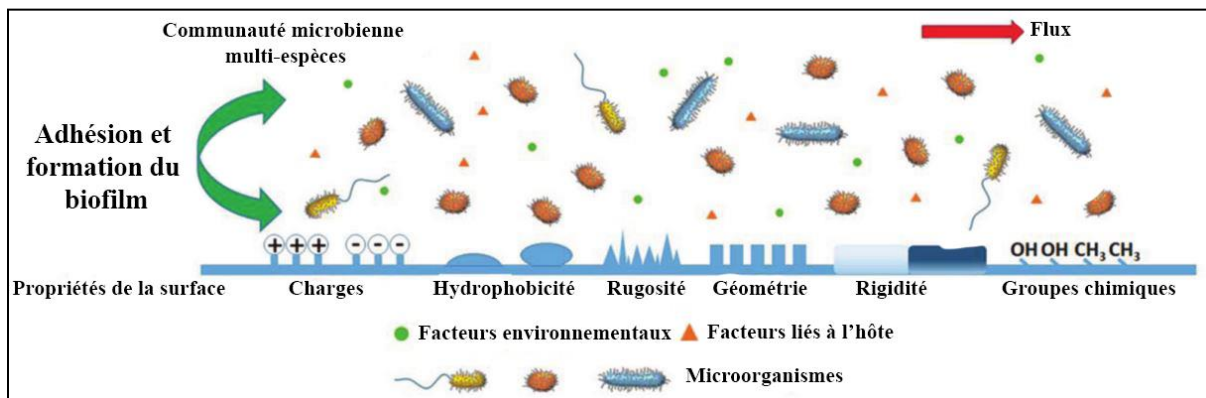
### - Géométrie

Contrairement à la rugosité, la géométrie de la surface est un paramètre physique complexe. Il s'agit d'une description morphologique sous sa forme tridimensionnelle de la surface, à savoir sa porosité et ses irrégularités, déterminée souvent par microscopie électronique.

Préférentiellement, les microorganismes colonisent les matériaux poreux et se regroupent au niveau des aspérités, des anfractuosités, des ruptures de courbure, des plis et des coins (Whitehead et Verran 2006, Desrousseaux *et al.* 2013). En réalité, l'accumulation des biofilms à la surface des matériaux se réalise dans les zones où les flux de fluide ambiant sont freinés par les parois de la surface (Baillif *et al.* 2010).

### - Autres paramètres

Outre la rugosité et la géométrie, la rigidité de la surface est également un facteur qui peut influencer non seulement l'adhésion, mais aussi la sensibilité des microorganismes adhérents à l'encontre des agents antimicrobiens (Song *et al.* 2015). Néanmoins, ce facteur est peu étudié dans la littérature.



**Figure 9 :** Schéma récapitulatif des facteurs liés aux propriétés de la surface qui influencent l'adhésion microbienne dans un environnement complexe (Song *et al.* 2015)

Il est aussi très important de souligner l'existence des interactions entre certains facteurs. À titre d'exemple, la rugosité et la topographie de la surface influencent fortement l'énergie de surface et l'hydrophobicité de surface (de Foggi *et al.* 2014). Ainsi, Decuzzi et Ferrari (2010) ont élaboré un modèle mathématique qui permet la prédiction quantitative de l'adhésion sur des surfaces qui diffèrent par leur rugosité, ce modèle est en fonction de l'énergie de surface.

## 2. Adhésion spécifique

L'étape qui suit l'adhérence est une étape irréversible, spécifique et temps-dépendante. Elle implique des interactions moléculaires entre les structures de surface de la cellule microbienne et la surface du matériau (ou les molécules du film conditionnant préformé). Comme nous l'avons cité auparavant, ces structures cellulaires ont la capacité de percer la barrière d'énergie et d'établir des liaisons avec la surface (si la distance entre le niveau minimum secondaire est la surface est raisonnable).

Parmi ces structures, on reconnaît les pili, les flagelles, la couche fibrillaire, les polymères capsulaires ou extracellulaires et d'autres. Ces structures sont toutes désignées par le terme appendices (*appendages*) (Hori et Matsumoto 2010).

La cinétique de l'adhésion de *C. albicans* aux cellules épithéliales a été étudiée. D'après les résultats trouvés, il s'est avéré que *C. albicans* adhèrent réversiblement dans 20 min tout au plus, passé ce temps les cellules se lient d'une manière relativement irréversible (Sandin 1987). Plusieurs études ont montré que l'adhésion irréversible de cette levure (adhérée au niveau minimum primaire d'énergie) est médiatisée par des adhésines (Murciano *et al.* 2012, Cuellar-Cruz *et al.* 2013).

Certes, le rôle des adhésines est plus important dans l'adhésion sur des tissus, mais plusieurs adhésines chez *C. albicans* jouent également un rôle dans l'adhésion aux biomatériaux (Kennedy *et al.* 1992). Le rôle possible de la chitine, les glucanes, les mannanes, les mannoprotéines et les lipides dans cette étape a été déjà rapporté (Kennedy *et al.* 1992). En outre, la coagréation, l'attachement aux microorganismes déjà adhérents, les tubes germinatifs, la matrices d'exopolysaccharides et le *switching* sont tous des facteurs qui ont été associés à l'adhésion chez *C. albicans* (Kennedy *et al.* 1992).

## IV. Candidoses buccales et biofilms à *Candida albicans* sur les appareils dentaires

### 1. Généralités

Le genre *Candida* renferme environ 150 espèces hétérogènes, dont une minorité est reconnue comme pathogènes pour l'Homme (Moran *et al.* 2012). Outre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* sont également des agents responsables de candidoses (Silva *et al.* 2012).

*C. albicans*, l'agent étiologique majeur des candidoses et qui fait partie de la flore commensale cutanéomuqueuse de l'Homme devient un pathogène très dangereux lorsque les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte s'affaiblissent. Dans ces circonstances, des affections superficielles de la peau et des muqueuses humaines qui sont plus ou moins invasives (Candidoses) sont souvent causées, et dans certains cas des affections systémiques (Candidémies) peuvent se développer (Gonçalves *et al.* 2016).

Cette transition subie par le champignon du commensalisme au parasitisme peut être ainsi déclenchée par plusieurs facteurs d'origine locale, physiologique, pathologique, ou iatrogène (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Facteurs favorisant le développement des candidoses cutanées ou muqueuses (Caumes 1998)

Origine	Facteurs
Locale	Macération humide, abrasion, obésité, pH acide, hygiène défectueuse, irritations chroniques (prothèses et implants dentaires, mucite post-radique ...) et xérostomie.
Physiologique	Grossesse et âges extrêmes de la vie (néonatalité ou grand âge).
Pathologique	Immunodépression (Hémopathies, infection à VIH et diabète).
Iatrogène	Antibiothérapie à large spectre, immunosuppresseurs, chimio et radiothérapie, corticothérapie générale, etc.

En milieu hospitalier, *C. albicans* est une cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique. Elle figure ainsi au premier rang dans la liste des champignons responsables des infections nosocomiales systémiques aux États-Unis (Pfaller et Diekema 2010, Höfs *et al.* 2016). Outre la candidémie, les candidoses invasives comprennent un large nombre

d'infections non muqueuses, ce qui montre que *Candida* sp. est capable d'infester n'importe quel organe après son accès à la circulation sanguine, ou lorsqu'il est introduit directement à la suite des procédures médicales ou des traumatismes (Clancy et Nguyen 2012).

Bien que les candidoses muqueuses seraient plus fréquentes que les candidoses cutanées, invasives et systémiques, les études ont montré que *C. albicans* est toujours pathogène quand elle est isolée à partir des lésions cutanées (CEDEF 2012). Généralement, le diagnostic des candidoses est fondé sur l'examen clinique avec, dans certains cas atypiques, une confirmation par examen mycologique rapide.

## 2. Candidoses buccales

Les manifestations cliniques des candidoses buccales sont diverses et fréquentes notamment chez les nouveau-nés et les sujets âgés. Elles peuvent être subdivisées en fonction du site de l'infection en (CEDEF 2012, Millsop et Fazel 2016) ;

- Perlèches qui sont très courantes en hiver et caractérisées par une inflammation du pli commissural des lèvres. Leur caractère récidivant est très connu (Figure 10 a).
- Stomatites qui sont des inflammations étendues sur toute la cavité buccale, et qui lorsqu'elles sont candidosiques prennent un aspect caractéristique appelé muguet buccal (Figure 10 c).



**Figure 10 :** Candidoses buccales superficielles ; a) Perlèche candidosique ; b) Glossite érythémateuse et perlèche bilatérale ; c) Stomatite candidosique constituée sous forme de muguet buccal (Caumes 1998)



- Glossites qui atteignent exclusivement ou principalement la langue, et qui se manifestent sous différents aspects cliniques caractéristiques ; glossites érythémateuses (Figure 10 b), classiques, chroniques et losangiques.
- Ouranites caractérisées par une lésion érythémateuse du palais, et qui peuvent se développer après une glossite losangique, à cause du contact prolongé avec la langue infectée.

Chez l'adulte, les candidoses buccales sont très souvent d'origine systémique, reflétant ainsi des désordres d'ordre général, métabolique ou immunitaire. Les formes fréquentes comprennent la candidose buccale profuse au cours de l'infection à VIH, les granulomes candidosiques qui apparaissent au cours des immunodépressions sévères et les candidoses qui surviennent chez les sujets diabétiques ou des sujets ayant reçu une radiothérapie et les candidoses prothétiques (Ahariz *et al.* 2010).

### **3. Appareils et matériaux dentaires**

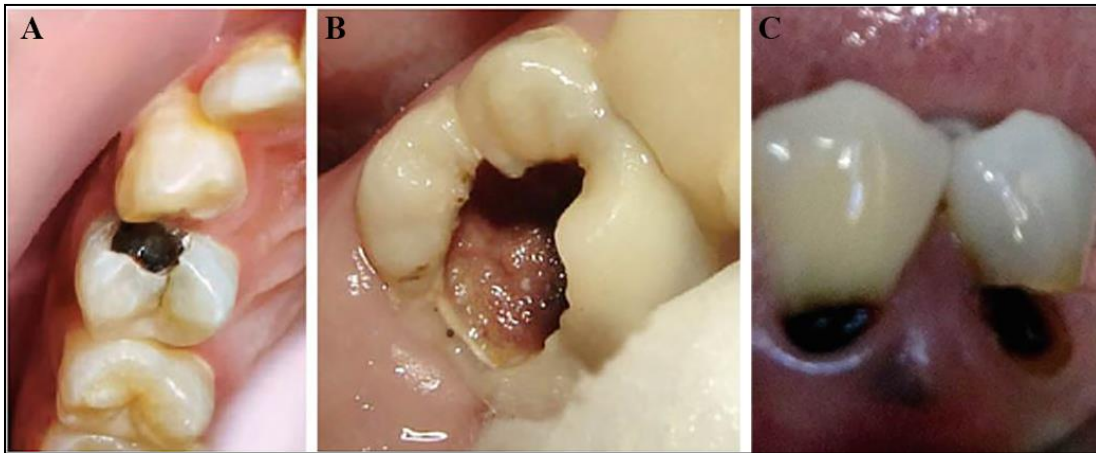
#### **3.1. Généralités**

Les dents constituent un élément essentiel dans la cavité buccale. Elles sont composées de trois tissus calcifiés (Email, dentine et cément) et maintenues par l'os alvéolaire et les tissus parodontaux. Elles assurent de nombreuses fonctions incluant la mastication, l'esthétique et la phonation. Certes, leur forme harmonieuse, contour, couleur, alignement et leur position sont des éléments cruciaux pour l'apparence physique de l'Homme.

Toutefois, une atteinte des dents par des caries, usures, traumatismes, ou par lésions congénitales perturbe leurs fonctions et entraîne des complications de gravité variable (Figure 11).

Des produits d'hygiène bucco-dentaire et des applications de vernis fluoré sont recommandés par l'OMS, quel que soit l'âge, pour la prévention et le traitement des problèmes à leur stade précoce (OMS 2016). Ces soins ont pour rôle d'éliminer ou réduire la plaque dentaire et d'augmenter la concentration des substances reminéralisantes (Rinastiti 2016).

Par ailleurs, l'orthodontie s'intéresse à l'alignement des dents pour en améliorer l'apparence et le fonctionnement. En plus de la chirurgie (dans certains cas), des appareils orthodontiques fixes ou amovibles sont conçus pour atteindre cet objectif.



**Figure 11 :** Lésions carieuses de différents stade d'évolution ; A) Lésion carieuse de la dentine ; B) Lésion carieuse extensive de la dentine ; C) Lésion par abfraction (Rinastiti 2016)

La dentisterie restauratrice a bien profité des avancées technologiques novatrices dans l'ultime objectif d'assurer une denture esthétique parfaite et idéale. Les amalgames, les prothèses et les implants dentaires sont les principaux outils de la dentisterie restauratrice (Figure 12). En effet, si une partie de la dent endommagée persiste, la reconstitution coronaire implique une technique directe d'obturation (*Fillings*), ou indirecte par *inlay* ou *onlay*. La première technique consiste à restaurer la perte de substance en utilisant des biomatériaux (l'amalgame, la résine composite ou les verres ionomères) (Rinastiti 2016). Tandis que la méthode de reconstitution indirecte par *inlay* ou *onlay* consiste à prendre d'abord empreinte de la cavité qui doit être obturée, et de construire ensuite la pièce manquante. Les alliages dentaires, la céramique ou la porcelaine et la résine cuite sont les biomatériaux les plus employés dans cette technique.



**Figure 12 :** A) Prothèse amovible complète supérieure ; B) Prothèse amovible partielle en cobalt-chrome; C) Implant dentaire inséré (Hollins 2015)

Par ailleurs, les prothèses dentaires ont pour objectif de remplacer les dents partiellement ou entièrement dégradées. La couronne et le bridge sont des éléments prothétiques principaux, ils sont fabriqués de biomatériaux divers.

Le substitut de la racine dentaire est appelé implant dentaire. Il est fait essentiellement d'un alliage dentaire. Ainsi, l'implantologie dentaire utilise des implants qui peuvent servir d'ancrage à une prothèse amovible ou comme une base de nouvelles dents prothétiques fixes. Ce qui assure de meilleurs résultats esthétiques et fonctionnels à long terme par rapport aux autres techniques restauratrices.

### **3.2. Matériaux en dentisterie**

#### **3.2.1. Alliages dentaires**

Un alliage dentaire est défini comme étant un matériau métallique, formé par la combinaison de deux métaux au moins, ou un métal au moins et un élément non-métal (Elshahawy et Watanabe 2014). Les alliages dentaires jouent un rôle important dans les restaurations prothétiques (Elshahawy et Watanabe 2014).

En effet, les restaurations et les implants dentaires datent depuis l'âge des anciens Égyptiens et Étrusques (Roach 2007). À la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, l'ère moderne s'introduisit avec l'utilisation des métaux précieux ainsi que des tentatives d'utilisation de zinc, acier, cuivre et laiton (Roach 2007). Cependant, le succès de certains de ces matériaux ainsi que les fluctuations du coût et de la disponibilité de l'or orientèrent la dentisterie vers le développement et l'utilisation d'alliages métalliques alternatifs (Wataha 2002). Ainsi, le dur labeur des chercheurs pendant de longues années conduisit à l'élaboration de nouveaux alliages non seulement moins coûteux, mais qui offrent de meilleures solutions dans certaines situations.

Aujourd'hui, l'association dentaire américaine classe les alliages dentaires, en fonction de la teneur en métaux précieux, en trois catégories (Wataha 2002) ;

- "High noble" : comprenant un taux de métaux nobles supérieur ou égal à 60 % de la masse totale de l'alliage, avec un minimum de 40% d'or.
- "Noble" : comprenant un taux de métaux nobles supérieur ou égal à 25 % sans précision pour l'or.
- "Base métal" : alliages non précieux, comprenant un taux strictement inférieur à 25 % de métaux nobles

Sur le plan biologique, les alliages précieux sont avantageux par leur résistance à la corrosion, leur biocompatibilité et leur ductilité conférées par l'or (Au), qui augmente aussi la densité et le durcissement de l'alliage (Manaranche et Hornberger 2007).

En pratique, les alliages base métal ne contiennent pas de métaux nobles, ils sont représentés par trois classes ; alliages à base de titane, alliages à base de nickel et de chrome (Ni-Cr) et alliages à base de cobalt et de chrome (Co-Cr) (Roach 2007).

Le titane (Ti) employé en odontologie est le plus souvent sous forme pure ou alliée. Sans doute, les alliages à base de titane ont pris une place de plus en plus importante dans le domaine médical, vu qu'ils offrent une bonne biocompatibilité et de bonnes propriétés physiques et mécaniques. Ces alliages sont résistants à la corrosion, néanmoins leur rugosité affecte significativement cette résistance (Kuphasuk *et al.* 2001).

Les alliages base métal Co-Cr et Ni-Cr sont moins coûteux et possèdent généralement des propriétés mécaniques supérieures aux alliages précieux. Ils ont pris une place importante dans la fabrication des appareils dentaires en particulier (Wataha 2002, Roach 2007). Ils ont été introduits pour la fabrication des couronnes, des bridges, des prothèses partielles et par la suite des prothèses fixes et des implants (Jabbari 2014). Bien que l'emploi de ces alliages présente certains inconvénients, il est admis que les alliages à base du nickel contenant plus de 20% de chrome sont considérés comme stables en milieu buccal, tout comme les alliages Co-Cr. Chez les personnes allergiques au nickel, l'alliage à base de cobalt constitue une alternative certaine (Jabbari 2014).

Par ailleurs, l'acier inoxydable (*Stainless steel*) fut également utilisé depuis longtemps en dentisterie, et récemment divers types d'acier inoxydable avec de faibles teneurs en nickel et de meilleures propriétés sont conçus pour des restaurations dentaires et des applications orthodontiques (Roach 2007).

### **3.2.2. Autres matériaux**

En raison de leurs meilleures propriétés esthétiques et leur capacité de se lier aux structures des dents, la céramique et la porcelaine constituent des matériaux de choix pour la fabrication des appareils dentaires (Rinastiti 2016).

D'autre part, les résines composites, constituées au moins par deux classes de ces matériaux, sont de plus en plus utilisées pour la restauration des tissus dentaires endommagés ou

pour la reconstitution des dents manquantes. Elles subissent ainsi continuellement des améliorations pour assurer de meilleurs résultats (Rinastiti 2016).

#### 4. Biofilms à *Candida albicans* sur les appareils dentaires

Depuis le premier modèle du biofilm de *C. albicans* décrit par Hawser et Douglas (entre 1994 et 1998), le nombre des articles publiés par an sur ce sujet est en croissance quasi-exponentielle (Soll et Daniels 2016). Ainsi, des études *in vivo* et *in vitro* ont montré la présence certaine de la levure dans les biofilms sur des cathéters, fils de sutures, implants et prothèses dentaires (Kojic et Darouiche 2004, Trindade *et al.* 2015).

D'une manière générale, des études ont suggéré que les défenses de l'hôte vis-à-vis des microorganismes sont compromises en présence des biomatériaux dans le corps. À titre d'exemple, il a été affirmé que seulement 200 cellules de *Staphylococcus aureus* sont capables de produire l'infection en présence d'un fil de suture sous-cutané au lieu de  $10^6$  cellules lors de son absence (Gottenbos *et al.* 1999). De plus, *S. epidermidis* normalement incapable d'instaurer une infection chez l'Homme est l'une des bactéries les plus impliquées dans les infections liées aux appareils médicaux.

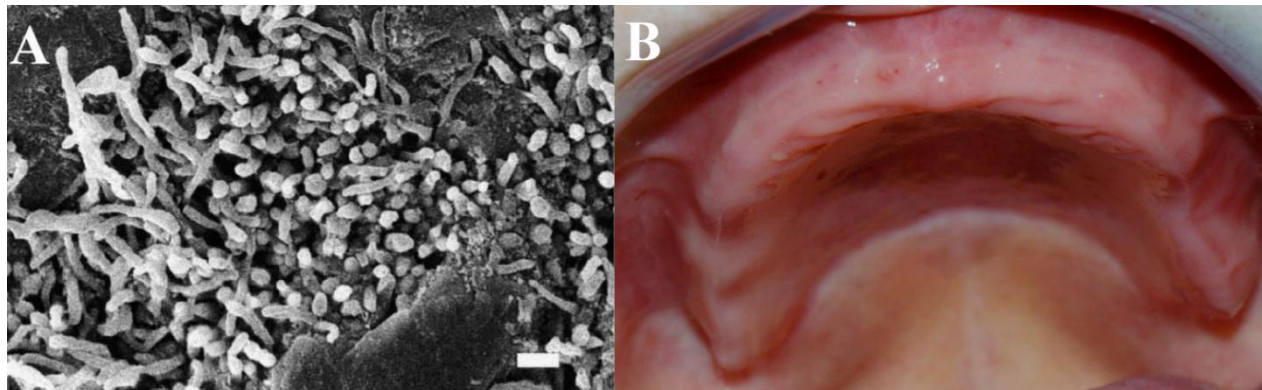
Sans doute, cette constatation est due à l'agilité et à l'aisance avec lesquelles les microorganismes s'attachent, se multiplient et colonisent des surfaces abiotiques exposées par les appareils médicaux au sein du corps humain.

Les appareils dentaires se comportent comme des corps étrangers dans la cavité orale et peuvent provoquer une inflammation de la muqueuse par frottement, intolérance au matériau ou à cause d'une mauvaise hygiène buccodentaire. De plus, ils offrent le plus souvent des surfaces propices à la colonisation par des microorganismes, y compris *C. albicans* (Figure 13 A). En conséquence, le développement par exemple des stomatites prothétiques prenant souvent un tour chronique et caractérisées par un érythème sur les zones de contact des prothèses, avec extension périphérique en dehors de la prothèse est manifeste (Figure 13 B), notamment avec les facteurs de risques déjà évoqués dans le Tableau 1 (Ahariz *et al.* 2010), ou à l'origine des gingivites, parodontites et peri-implantites (Millsop et Fazel 2016, Santos *et al.* 2016). Ces affections sont très fréquentes avec une prévalence variant de 35% à 75% selon la population étudiée (Wanderley *et al.* 2016), et sont ainsi les plus fréquentes des candidoses buccales (25-65%) (Salerno *et al.* 2011).

Parmi les biomatériaux souvent utilisés pour la fabrication des prothèses, des implants dentaires, des prothèses maxillofaciales, des appareils orthodontiques, et d'autres, qui sont propices pour le développement du biofilm à *C. albicans*, nous listerons surtout les résines acryliques (Pereira-Cenci *et al.* 2007), le silicone (Atay *et al.* 2013, Al-Askari *et al.* 2014), l'hydroxyapatite (Panagoda *et al.* 2001, Henriques *et al.* 2004, Serrano-Granger *et al.* 2005) et différents alliages dentaires (Li *et al.* 2012, Baciú *et al.* 2015).

De même, la formation des biofilms à *C. albicans* a été également prouvée sur plusieurs polymères inertes, souvent utilisés pour préparer les outils prothétiques ou autres, tels que ; le polytetrafluoréthylène (Téflon), le polyéthylenterephthalate, le polyméthylmethacrylate, le chlorure de polyvinyle, le polystyrène, le caoutchouc de silicone, le polypropylène et le polyuréthane (Klotz *et al.* 1985, Chandra *et al.* 2005, Singh *et al.* 2011).

Les biofilms formés sur les prothèses et les implants dentaires qui sont à l'origine des stomatites sous prothétiques sont souvent multi-espèces (hétérogènes) (Øilo et Bakken 2015). Toutefois, *Candida albicans* est un agent étiologique majeur de ces stomatites (Santos *et al.* 2016), étant donné sa virulence et sa capacité de former des biofilms et d'instaurer des infections résistantes aux défenses immunitaires et aux traitements par les antifongiques conventionnels (Carolina *et al.* 2015).



**Figure 13 :** A) Biofilm à *C. albicans* sur des irrégularités d'une prothèse dentaire visualisé par microscopie électronique (barre = 5  $\mu$ m) (Ramage *et al.* 2004) ; B) Photo d'un érythème de la muqueuse palatine dessinant le contour d'une prothèse amovible supérieure contaminée par *Candida albicans* (Ahariz *et al.* 2010)

Par ailleurs, des bactéries orales notamment *Streptococcus*, *Actinomyces*, et *Fusobacterium*, et des bactéries non orales notamment *S. aureus* et *Escherichia coli* adhèrent également à des

surfaces prothétiques et forment des biofilms hétérogènes avec *C. albicans* et augmentent ainsi la sévérité de l'infection (Harriott et Noverr 2009, Carolina *et al.* 2015, Cavalcanti *et al.* 2016). En fait, les différents facteurs de virulence de *C. albicans*, et particulièrement sa capacité à former des biofilms, ainsi que son interaction avec les différentes bactéries ou même d'autres souches du genre *Candida* sont tous des éléments décisifs dans l'instauration, l'évolution et la sévérité de l'infection (Williams et Ramage 2015, Gulati et Nobile 2016). Ceci risque en effet de compromettre la santé buccodentaire ce qui aurait de graves répercussions sur la santé générale de l'individu (Ramage *et al.* 2004, Santos *et al.* 2016).

Dans ces circonstances, la décontamination de l'appareil est impérieusement requise. Or, l'usage des antifongiques (e.g. azolés, nystatine) moins actifs contre les biofilms et pouvant entraîner des résistances est prohibé (Ahariz *et al.* 2010). Par ailleurs, l'élimination ou la reconstitution des appareils dentaires sont très coûteuses et parfois contraindiquées.

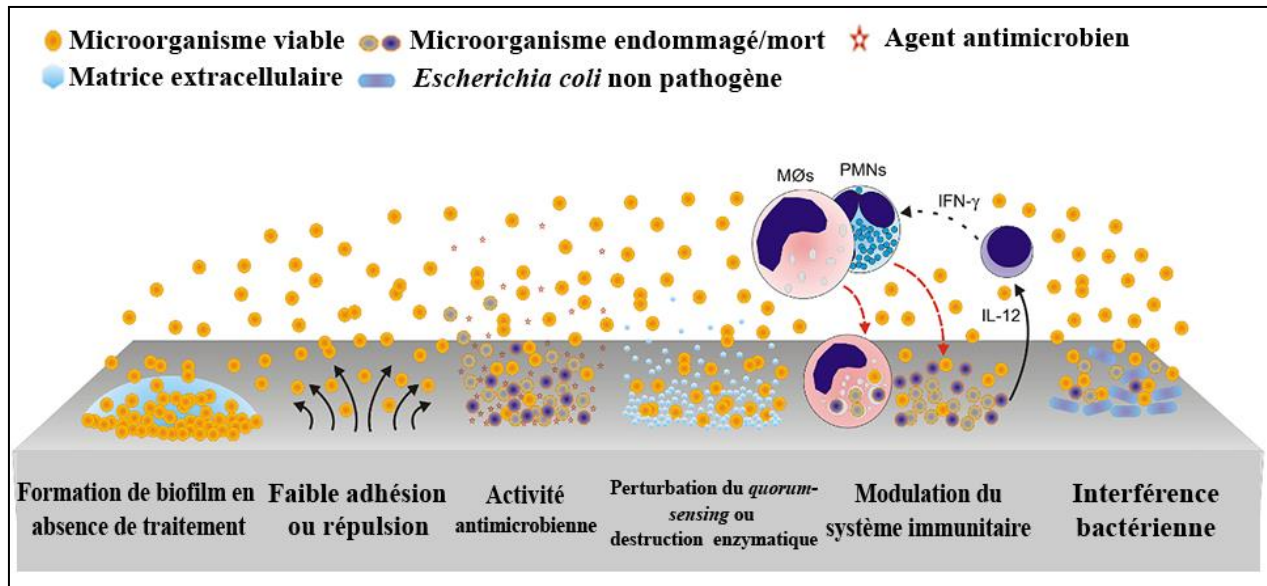
## V. Cibles et stratégies antiadhésives et antibiofilms

Les biofilms sont difficiles à éradiquer en raison de leur grande tolérance vis-à-vis des molécules antimicrobiennes conventionnelles et l'absence, jusqu'à présent, de molécules antibiofilms spécifiques sur le marché.

Par conséquent, de nombreuses recherches s'intéressent aujourd'hui au développement de nouvelles approches multidisciplinaires efficaces contre la formation et le développement des biofilms.

Dans ce paragraphe, nous discutons les approches et les stratégies qui ont été envisagées et même celles qui sont en cours de développement pour la prévention et l'éradication des biofilms (Figure 14).

Outre la recherche de nouvelles molécules antibiofilms, les approches antiadhésives et/ou antibiofilms se basent, d'une part, et d'une manière générale sur des modifications concernant la surface du biomatériau afin de générer des surfaces dites antiadhésives et des surfaces antimicrobiennes. D'autre part, la disruption de la communication intercellulaire au sein du biofilm (*quorum quenching*), la stimulation du système immunitaire de l'hôte ou l'introduction de certains microorganismes compétitifs et non pathogènes sont avérées de fortes stratégies antiinfectieuses (Campoccia *et al.* 2013) (Figure 15).



**Figure 14 :** Différentes stratégies pour limiter l'établissement des infections associées aux appareils médicaux (Campoccia *et al.* 2013)

### 1. Surfaces antiadhésives

Cette approche préventive repose sur l'inhibition du biofilm avant sa formation en empêchant ou en minimisant le taux d'adhésion initiale. Les microorganismes restent ainsi à l'état planctonique ou isolés sensibles aux effecteurs du système immunitaire et aux agents antimicrobiens.

Le blocage de cette étape précoce est possible autant par altération des propriétés de surface du biomatériau ou par revêtement ou intégration des molécules antimicrobiennes dans le biomatériau.

La modification des propriétés de surface du biomatériau peut s'intéresser à ses propriétés physicochimiques ou à ses propriétés morphologiques et topographiques par la conception des surfaces micro ou nanostructurées (i.e. ayant une régularité d'ordre nanométrique) (Singh *et al.* 2011).

Généralement, les propriétés physicochimiques requises pour concevoir des surfaces antiadhésives se résument à des surfaces hydratées, hautement hydrophiles et non chargées (Campoccia *et al.* 2013). Or, des surfaces hautement hydrophobes peuvent être également antiadhésives à cause de leur capacité autonettoyante (*self-clean*) et leur pouvoir d'inhiber l'adsorption des protéines (Zhang *et al.* 2013).



Par ailleurs, dans un milieu ambiant riche en protéines, l'adsorption de celles-ci sur la surface du biomatériau complique encore plus le processus de l'adhésion. Dans ces circonstances, il est impératif de prendre en compte ce fait. Ainsi, l'adsorption des protéines peut être réduite par greffage des molécules avec des groupements fonctionnels qui confèrent des forces répulsives de longue portée très importantes (Sadekuzzaman *et al.* 2015).

De même, le conditionnement des surfaces par une préadsorption de certaines molécules qui altèrent le degré de l'hydrophobicité ou de la charge de surface et qui possèdent une activité biocide a prouvé son efficacité antiadhésive. D'ailleurs, le pré-conditionnement des surfaces par des biosurfactants d'origine microbienne (Nitschke *et al.* 2009, Cochis *et al.* 2012), par des extraits et des molécules de plantes, comme l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* et le citronellal (Trindade *et al.* 2015) ont conféré un effet antiadhésif vis-à-vis de *C. albicans*. Dans le même contexte, un revêtement avec une formulation contenant la chlorhexidine a réduit de 98% la formation du biofilm à *C. albicans*. Cette réduction est plus importante que celle conférée par une formulation contenant la nystatine et l'amphotéricine B (Girardot et Imbert 2016).

Plusieurs points doivent être considérés lors de la conception des surfaces antiadhésives, tels que la manière avec laquelle le revêtement est fait et à quel point il est stable sur la surface revêtue. En effet, Campoccia *et al.* (2013) ont listé les différents polymères et les stratégies pour établir un revêtement fonctionnel antiadhésif sur une surface.

## 2. Surfaces antimicrobiennes

Dans cette approche, le but consiste à générer des surfaces avec une activité antimicrobienne intrinsèque qui agissent par contact ou qui libèrent continuellement de faibles doses de molécules biocides.

D'une part, ces surfaces sont obtenues par conditionnements et revêtements avec des molécules antimicrobiennes (et non pas antiadhésives). Ces revêtements utilisent soit des métaux (e.g. l'argent, le zinc et le cuivre), soit des polymères (e.g. chitosane et ses dérivés) connus par leur activité biocide, et sont réalisés soit par simple adsorption, ou par greffage par des liaisons covalentes avec la surface (Campoccia *et al.* 2013). Or, la biocompatibilité, la corrosion dans les solutions physiologiques, la bioaccumulation et l'absence de spécificité limitent fortement l'usage des métaux biocides.

D'autre part, les molécules ou les polymères antimicrobiens peuvent être incorporés dans la composition du matériau lors de sa fabrication. D'ailleurs, des matériaux constitués de polymères contenant des molécules antimicrobiennes ont été décrits (Girardot et Imbert 2016), c'est l'exemple des co-polymères ; poly (2-tert-butylaminoethyl) méthacrylate (Carolina *et al.* 2013), de 2-hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA) et l'eugenyl methacrylate (EgMA) ou l'ethoxyeugenyl méthacrylate (EEgMA) qui contiennent l'eugénol (Rojo *et al.* 2008). En outre, certains peptides antimicrobiens, amines quaternaires, et des N-halamines peuvent être également incorporés dans certains matériaux pour donner des surfaces dites biocides par contact (Williams et Worley 2000, Ribeiro *et al.* 2016).

À l'instar des surfaces antimicrobiennes par contact, il existe des matériaux libérateurs de molécules antimicrobiennes (*Biomaterials delivering antimicrobials*) (Coad *et al.* 2016). Les substances antimicrobiennes (incorporées durant la phase de production du biomatériau, greffées par liaisons covalentes à sa surface, adsorbées sur des pores, ou incorporées dans le revêtement) seront relarguées dans le milieu ambiant par différentes modalités (i.e. érosion, diffusion, hydrolyse des liaisons covalentes, etc.) (Campoccia *et al.* 2013). Bien que, cette approche a été utilisée depuis longtemps notamment par imprégnation des cathéters dans une solution d'antiseptiques, aujourd'hui, l'usage des combinaisons de substances antimicrobiennes (e.g. argent-sulfadiazine, chlorhexidine, argent-sulfadiazine-chlorhexidine, et des antibiotiques) a amélioré les résultats.

Cependant, des essais cliniques ont dévoilé un inconvénient des biomatériaux libérateurs d'agents antimicrobiens qui consiste à une diminution progressive de leur effet antimicrobien avec le temps, de surcroît cette efficacité est fortement influencée par le site anatomique d'insertion du biomatériau (Campoccia *et al.* 2013). De plus, d'un côté l'usage des antibiotiques en routine dans cette approche favorise la sélection et l'émergence des souches résistantes. D'un autre côté, plusieurs études ont montré que des doses des agents antimicrobiens inférieures à leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) favorisent la formation des biofilms (Kaplan 2011).

### 3. Surfaces avec des nanostructures

L'objectif de cette approche est de produire des surfaces parfaitement caractérisées avec une régularité à l'échelle nanométrique via des nanoparticules. De plus, les nanoparticules sont également douées d'une activité antimicrobienne attribuée à leur petite taille, notamment avec des tailles inférieures à 30 nm, et qui peut être améliorée par des revêtements combinés avec l'argent,

des molécules antimicrobiennes, des anticorps, des espèces libérateurs du NO, etc. (Holban *et al.* 2016, Ribeiro *et al.* 2016, Srivastava et Bhargava 2016).

#### 4. Molécules antibiofilms

Récemment, des molécules d'origine microbienne, végétale ou issues de la synthèse chimique qui sont douées d'une activité antibiofilms ont été découvertes. Elles comprennent des enzymes, des molécules capables de lyser des microorganismes même à l'état sessile, des molécules qui interfèrent avec le *quorum-sensing* et induisent la dispersion et des molécules qui répriment l'expression des polymères de la matrice extracellulaire. De plus, des combinaisons entre ces familles de molécules, en association ou non avec des antifongiques conventionnels, ont été envisagées et plusieurs études ont confirmé des interactions synergétiques prometteuses (Martins *et al.* 2012, Campoccia *et al.* 2013, Holban *et al.* 2016, Ribeiro *et al.* 2016).

Par ailleurs, le diclofenac sodique, l'aspirine et l'ibuprofène exercent un pouvoir antibiofilm vis-à-vis de *Candida albicans*, toutefois des interrogations sur leurs mécanismes d'action ne sont pas encore dissipées. Néanmoins, une interférence avec le *quorum-sensing* chez *P. aeruginosa*, et un blocage de la biosynthèse des prostaglandines (souvent produites par *C. albicans* en état sessile et planctonique) ont été suggérés (Ribeiro *et al.* 2016).

Une autre voie consiste à rechercher des molécules qui peuvent sensibiliser les biofilms vis-à-vis des agents antimicrobiens conventionnels. À titre d'exemple, l'action synergique de la cyclosporine A avec plusieurs molécules antifongiques a été proposée (Shinde *et al.* 2012). De plus, l'acide arachidonique a considérablement réduit le biofilm à *C. albicans* en présence de faibles concentrations du fluconazole et de la terbinafine (Nath Mishra *et al.* 2014). Martins et ses collaborateurs ont montré que l'ajout de l'ADNase renforce l'activité de l'amphotéricine B contre le biofilm à *C. albicans*, alors que cette enzyme n'avait aucun effet avec le fluconazole (Martins *et al.* 2012).

Par ailleurs, plusieurs molécules issues des plantes (Phytomolécules), ou des extraits bruts et volatiles (huiles essentielles) ont montré une activité antibiofilms (Sadekuzzaman *et al.* 2015). Ainsi, les huiles essentielles de *Melaleuca alternifolia* et d'eucalyptus, l'extrait de *Hibiscus sabdariffa* et la purpurine ont prouvé leur effet *in vitro* contre le biofilm à *C. albicans* (Agarwal *et al.* 2008, Tsang *et al.* 2012, Alshami et Alharbi 2014, de Campos Rasteiro *et al.* 2014).

Les peptides antimicrobiens synthétiques constituent une nouvelle source de molécules antibiofilms. Ces peptides peuvent agir sur différentes étapes de la formation du biofilm (Ribeiro *et al.* 2016), et ils sont également actifs sur les souches multirésistantes (Bujdáková 2016).

## 5. Autres stratégies

Compte tenu du contexte actuel des biofilms, de nouvelles approches sont développées pour lutter contre les biofilms et les maladies infectieuses en général. Nous en citerons quelques-unes ;

- La chimiothérapie antimicrobienne photodynamique se base sur la combinaison entre un agent photoactivable et la lumière visible pour induire l'effet toxique (Carolina *et al.* 2015). Cette technique est utilisée contre les bactéries, les levures, les virus, les parasites et même les cellules tumorales (Bujdáková 2016). Ainsi, l'effet photodynamique de la curcumine et la photofrine contre *C. albicans* a été affirmé (Bliss *et al.* 2004, Dovigo *et al.* 2011).
- La modulation du système immunitaire en se basant sur l'utilisation des cytokines, à titre d'exemple la MPC-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) et l'interleukine 12, pour stimuler localement les défenses immunitaires de l'hôte a été proposée (Li *et al.* 2009, 2010, Ribeiro *et al.* 2016).
- Les acides nucléiques peptidiques constituent une autre stratégie qui peut être utilisée contre les biofilms. Ce sont en fait des peptides synthétisés artificiellement et qui contiennent un squelette formé par des unités N-(2-aminoethyl)-glycine. Sur ce squelette, les bases azotées similaires à celles de l'ADN ou l'ARN viennent se lier par des liaisons méthyl-carbonyl. Ils agissent comme des molécules anti-sens pour réprimer l'expression des gènes ciblés. En effet, Hu *et al.* (2011) ont ciblé le gène *motA* qui est impliqué dans les étapes précoces de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*.
- L'interférence bactérienne repose sur l'inhibition de certains microorganismes par compétitivité pour les nutriments avec d'autres. Ainsi, *Streptococcus salivarius* a été utilisé pour prévenir la colonisation des appareils dentaires par certains pathogènes incluant *C.albicans* (Ishijima *et al.* 2012, Shah *et al.* 2013). Bien que cette technique est récente et en cours de développement, son association avec l'utilisation de bactériophages a permis

d'obtenir des résultats impressionnants contre les biofilms bactériens sur des biomatériaux (Liao *et al.* 2012).

En somme, de nombreuses stratégies alternatives aux traitements antimicrobiens conventionnels sont en cours de développement pour être appliquées contre les maladies infectieuses liées aux biofilms. Toutefois, il est très important de souligner que les meilleures d'entre elles et les plus prometteuses sont celles capables de prévenir la formation des biofilms ou de les éradiquer avec des effets indésirables minimales en offrant un bon rapport coût-efficacité.

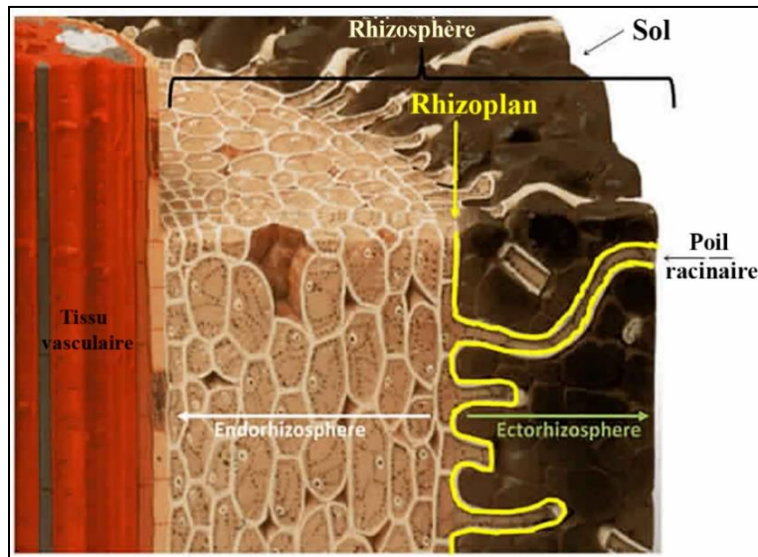
## **VI. Bactéries de la rhizosphère : une source de nouvelles molécules antimicrobiennes et antiadhésives**

### **1. Généralités**

La rhizosphère, un terme qui a été introduit par Hiltner en 1904 pour décrire la zone qui est sous l'influence des racines de la plante. Au début, Hiltner avait fondé ses observations sur des interactions symbiotiques entre les bactéries fixatrices d'azote et les racines des légumineuses, pour englober par la suite toutes les interactions au sein de cette zone (Morgan *et al.* 2005).

La rhizosphère s'étend de quelques dizaines de micromètres à plus de 5 mm de la surface racinaire. Elle se décompose ainsi en trois régions; l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface des racines) et l'ectorhizosphère (sol adhérent aux racines ou sol rhizosphérique) (Figure 15) (Kennedy et de Luna 2004, McNear 2013).

La rhizosphère est une niche dynamique. Le fait d'être constamment sous l'influence des exsudats racinaires lui confère une activité biologique intense. Ces exsudats modulent la quantité et la qualité de la communauté microbienne qui vit au sein de ce biotope, c'est l'effet rhizosphère (Kennedy et de Luna 2004)



**Figure 15 :** Schéma d'une section racinaire montrant la structure de la rhizosphère (McNear 2013)

## 2. Microorganismes du sol rhizosphérique

Les microorganismes habitant le sol en général et la rhizosphère en particulier sont généralement hétérotrophes. Au sein de la rhizosphère, la population microbienne est plus importante et plus diversifiée par rapport à celle habitant le sol non rhizosphérique (Jjemba et Alexander 1999). Ces microorganismes tirent le carbone indispensable à leur croissance de la rhizodéposition par la plante. En contrepartie, ce coût investi par la plante est récompensé par les éléments minéraux fournis par les microorganismes qui décomposent et minéralisent la matière organique assimilée. En effet, ces relations trophiques impliquant des coûts et des bénéfices sont à la base des interactions plante-microorganismes (Morgan *et al.* 2005).

Dans la rhizosphère, les microorganismes sont influencés par différents facteurs liés à la plante, au microorganisme et à l'environnement (sol) (Kennedy et de Luna 2004). En général, les exsudats racinaires relargués par la plante sont prédominés par des molécules de faible poids moléculaire (glucides, acides aminés, vitamines, tannins, alcaloïdes, flavonoïdes et d'autres molécules phénoliques), alors que les molécules de haut poids moléculaire (polysaccharides (mucilages) et des protéines) sont minoritaires (Chaudhry *et al.* 2005, Walker *et al.* 2014).

Pour longtemps, la caractérisation des microorganismes rhizosphériques se limitait à ceux qui sont cultivables (1% de la flore totale), mais de nos jours, les outils d'analyse associés aux

sciences des omiques (génomique, transcriptomique protéomique...) et les méthodes d'échantillonnage, ont permis une exploration profonde des microorganismes rhizosphériques, ainsi qu'une bonne compréhension des associations et des interactions plante-microbes (Cooper et Rao 2006, Bandyopadhyay *et al.* 2016).

Les bactéries constituent la majeure partie de la biomasse rhizosphérique ( $10^8$  à  $10^{12}$  bactéries/g de sol) (Kennedy et de Luna 2004), et elles sont, pour la majorité, bénéfiques pour la plante. Les plus connues et les plus nombreuses sont des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes appelées PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) constituant environ les deux tiers des bactéries rhizosphériques cultivables. Ces bactéries favorisent la croissance des plantes en agissant directement par amélioration de la disponibilité des nutriments (biofertilisants par fixation de l'azote ou solubilisation du phosphate), par sécrétions des phytohormones, ou par augmentation de la résistance de la plante contre les phytopathogènes. Elles peuvent également agir indirectement par inhibition de la croissance des organismes phytopathogènes en sécrétant des biopesticides (Cooper et Rao 2006). À titre d'exemple, des souches de *Azospirillum* spp. sont des fixatrices de l'azote atmosphérique et des productrices de phytohormones, alors que des souches de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Bacillus* spp. et *Streptomyces* spp. sont capables d'induire une résistance systémique chez la plante à l'encontre des phytopathogènes.

*Bacillus* spp. et *Streptomyces* spp. sont de surcroît connues par leur effet antagoniste contre plusieurs pathogènes (Schippers *et al.* 1987, Schrey *et al.* 2015). Par ailleurs, les *Rhizobium* spp. et d'autres *Alphaproteobacteria* sont souvent rencontrées dans les associations endosymbiotiques avec les légumineuses, où elles induisent la formation des nodules (lieu de la fixation de l'azote atmosphérique) (Schrey *et al.* 2015).

En revanche, quelques bactéries telles que *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, *Erwinia* spp. et certaines souches de *Streptomyces* spp. sont des phytopathogènes qui peuvent avoir un effet délétère sur la plante (Schrey *et al.* 2015).

Concernant les champignons rhizosphériques, ils peuvent être subdivisés généralement en trois groupes ; les décomposeurs, les mycorhiziens et les phytopathogènes.

Les décomposeurs sont des saprophytes qui s'attaquent aux grands polymères (cellulose et lignine). Ils sont responsables de la décomposition de la matière organique (Kennedy et de Luna

2004). Les champignons mycorhiziens forment des associations symbiotiques avec les racines appelées mycorhizes (arbusculaires ou ectomycorhiziennes). La plante bénéficie ainsi d'un apport en minéraux, notamment le phosphore et l'azote. En contrepartie, de la matière organique est relarguée par la plante.

Pour ce qui est des champignons phytopathogènes, ce sont les parasites principaux des plantes. Ils appartiennent aux ascomycètes et aux basidiomycètes et aussi des oomycètes. Les ascomycètes phytopathogènes les plus connus sont *Fusarium* spp., *Thielaviopsis* spp., *Verticillium* spp., *Magnaporthe grisea* et *Sclerotinia sclerotiorum*, alors que les basidiomycètes comprennent *Ustilago* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phakospora pachyrhizi*, et *Puccinia* spp (Glick 2015).

Finalement, d'autres micro- et macro-organismes tels que des protozoaires, des rotifères, des nématodes, des microarthropodes, des lombrics, des millipèdes, des centipèdes et des insectes qui vivent à proximité des racines ont une grande influence sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la rhizosphère (Alphei *et al.* 1996), et ces organismes peuvent avoir des relations bénéfiques ou délétères sur la plante.

### **3. Production de métabolites bioactifs par les bactéries de la rhizosphère : Cas de *Bacillus* spp.**

Les microorganismes rhizosphériques sont de véritables usines chimiques, capables de produire diverses substances naturelles pour assurer leurs fonctions et leur survie au sein de cette niche particulière.

Cette chimiodiversité représente une source pour la découverte de nouvelles molécules d'origine microbienne, qui présentent un intérêt majeur et qui trouvent leur place dans diverses applications biotechnologiques médicales, agricoles ou industrielles. D'ailleurs, les substances bioactives produites par microorganismes rhizosphériques ont prouvé un large éventail de propriétés biologiques d'intérêt, y compris l'activité antibactérienne, antifongique, antiadhésive, antibiofilms, anticancer, ainsi que d'autres activités pharmacologiques (Lievens *et al.* 1989, Prashith *et al.* 2013, Singh *et al.* 2013, Kennedy *et al.* 2015).

Les rhizobactéries du genre *Bacillus* sont parmi ces microorganismes d'intérêt. Compte tenu de leur excellente capacité de produire une multitude de molécules bioactives et de structures chimiques extrêmement différentes, les membres du genre *Bacillus* sont de meilleurs candidats sur



lesquels les chercheurs peuvent se pencher afin de développer des alternatives aux traitements antimicrobiens conventionnels ayant l'avantage d'être prometteuses sur le plan économique, naturelles et respectueuses de l'environnement.

### 3.1. Caractéristiques du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* spp. décrit pour la première fois par Ferdinand Cohen en 1872, figure dans le manuel de Bergey dans l'embranchement des firmicutes (*Firmicutes*), classe des bacilles (*Bacilli*), ordre des bacillales (*Bacillales*), famille des bacillacées (*Bacillaceae*).

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles à coloration de Gram positive, droits ou légèrement courbés avec un diamètre de 0,4 à 1,8  $\mu\text{m}$  et une longueur de 0,9 à 10,0  $\mu\text{m}$ . Elles se trouvent souvent isolées ou en paires, mais elles peuvent être aperçues en chaînes ou sous forme de longs filaments. Ces bacilles peuvent être non mobiles ou mobiles par des flagelles peu nombreux (Whithman 2009). Dans des conditions défavorables, les espèces de *Bacillus* forment des endospores (une par cellule).

Les bactéries du genre *Bacillus* sont hétérotrophes, catalase positive, aérobies ou anaérobies facultatifs. Au laboratoire, ils sont facilement cultivés sur des milieux de culture usuels (Luria-Bertani, gélose nutritive, gélose tryptone-soja) et encore mieux sur une gélose au sang. Sur ces milieux, ces bactéries forment des colonies avec un diamètre et une forme variables selon les espèces (Whithman 2009).

Leur comportement physiologique est variable d'une espèce à l'autre et même au sein de la même espèce. Une variabilité qui s'étend des psychrophiles aux thermophiles, des acidophiles aux basophiles, des halotolérantes aux halophiles.

Habituellement, les espèces de *Bacillus* sont dépourvues de la capsule, hormis pour *B. anthracis* qui est capable de l'exprimer *in vivo* (Whithman 2009). Toutefois, il a été rapporté que d'autres espèces comme *B. subtilis*, *B. megaterium*, et *B. licheniformis*, sont susceptibles d'exprimer des capsules contenant des homopolypeptides d'acide D- ou L-glutamique (Slepecky et Hemphill 2006).

Fort heureusement, la majorité des espèces de *Bacillus* ne sont pas pathogènes, à l'exception de *B. anthracis*, agent étiologique de la maladie du charbon (anthrax) (Edwards et Clancy 2006) et *B. cereus* responsable des intoxications alimentaires et des infections opportunistes. D'autres espèces comme *B. licheniformis* et *B. subtilis* ont été associées à des intoxications alimentaires

(Bhunia 2008). De plus, *B. thuringiensis* est un pathogène principal pour les invertébrés et qui est souvent employé pour lutter contre les insectes ravageurs des plantes (Sanchis et Bourguet 2008).

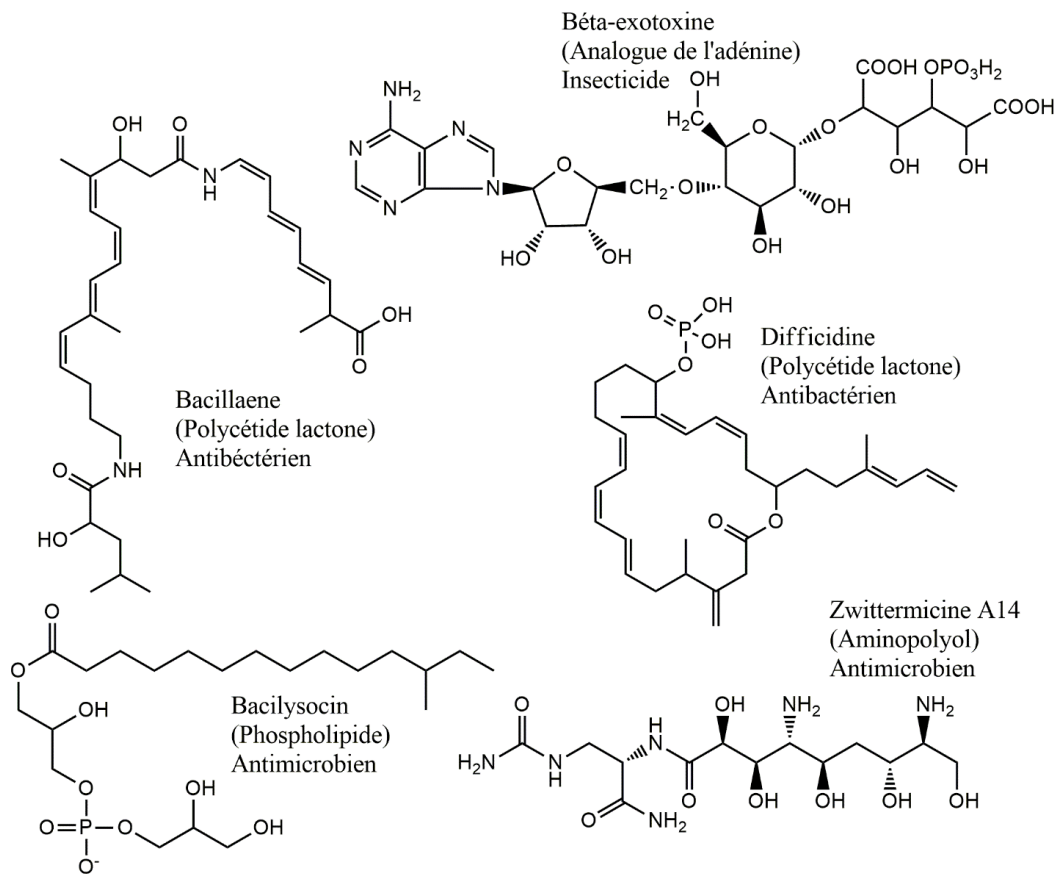
Les bactéries du genre *Bacillus* sont ubiquitaires, le sol étant leur principal habitat, néanmoins elles sont souvent retrouvées dans les environnements contaminés directement ou indirectement par le sol. Ainsi, elles peuvent être isolées à partir d'innombrables sources telles que les sols, les composts, les eaux douces et salées, l'air, les aliments, les spécimens cliniques et les sédiments (Whithman 2009).

### **3.2. Métabolites bioactifs produits par *Bacillus* spp.**

Les espèces du genre *Bacillus* produisent une large gamme de métabolites avec une immense diversité de structure et de fonction. Sansinenea et Ortiz (2011) ont énuméré plusieurs dans une revue de synthèse. Outre les structures chimiques de ces métabolites et les espèces productrices, leurs propriétés biologiques ont été également rapportées, incluant l'activité antibactérienne, antifongique, antivirale, insecticide, anticancéreuse et immunosuppressive.

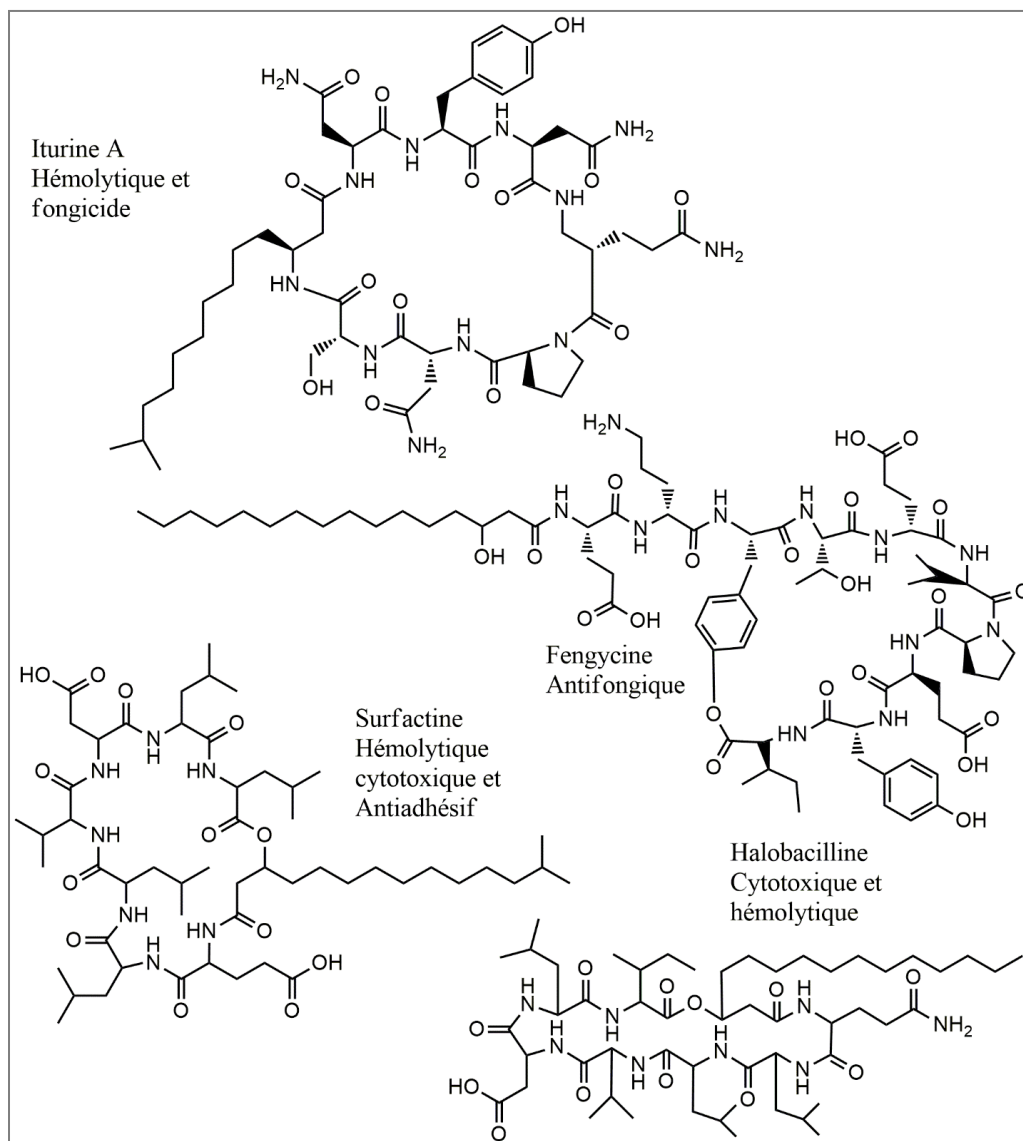
En effet, des peptides aux propriétés antibactériennes, la subtiline, la lichenine, la cereine et la megacine sont produits par *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* et *B. megaterium* respectivement. *B. subtilis* produit également la bacilysocine, un phospholipide antimicrobien (Tamehiro *et al.* 2002). Alors que *B. amyloliquefaciens* produit des polycétides lactone antibactériens comme la bacillaene et la difficidine (Figure 16).

D'autre part, *B. thuringiensis* qui est connu pour son pouvoir toxique vis-à-vis des insectes, produit plusieurs métabolites insecticides comme la  $\beta$ -exotoxine, un analogue de l'adénine, mais il produit également la zwittermicine, un aminopolyol antimicrobien (Figure 16).



**Figure 16 :** Structures chimiques de quelques métabolites secondaires produits par des espèces de *Bacillus* spp.

A l'égard des lipopeptides connus par leur effet tensioactif, la fengycine, l'iturine A, la bacillomycine D et la mycosubtiline produites par *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* sont connues par leurs activités antifongiques et hémolytiques, alors que l'halobacilline produite par *B. licheniformis* est un agent cytotoxique (Figure 17). Dans le même contexte, des études ont montré que la surfactine, un lipopeptide cyclique hémolytique et cytotoxique, possède une activité antiadhésive importante (Nitschke *et al.* 2009). Et comme il a été évoqué précédemment, des études ont montré que des biosurfactants produits par *Bacillus* spp. sont doués d'une activité antiadhésive, et préviennent de ce fait la formation du biofilm par des souches pathogènes comme *E. coli* et *S. aureus* (Rivardo *et al.* 2009).



**Figure 17 :** Structures chimiques de quelques lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* et *Bacillus amyloliquefaciens*

Afin de concevoir des surfaces antiadhésives, des applications de ces molécules ont déjà montré leur efficacité. Récemment, l'adhésion de *Listeria monocytogenes* sur le polystyrène en présence des nanofibres chargées de la surfactine a été réduite significativement (Ahire *et al.* 2017). De même, le revêtement des disques de silicone par un lipopeptide AC7 produit par *B. subtilis* a permis d'inhiber la formation du biofilm par *C. albicans*, et une activité synergique a été observée avec l'amphotéricine B. En outre, la capacité de deux lipopeptides produits par *B. subtilis* V9T14 et *B. licheniformis* V19T21 d'inhiber la formation du biofilm par des bactéries pathogènes sur le polystyrène a été démontrée (Rivardo *et al.* 2009).

**DEUXIEME PARTIE :**

# **Travaux expérimentaux**

## ***CHAPITRE I***

**ISOLEMENT ET CRIBLAGE DES MICROORGANISMES  
RHIZOSPHERIQUES PRODUCTEURS DE SUBSTANCES  
ANTIMICROBIENNES**

# Chapitre I : Isolement et criblage des microorganismes rhizosphériques producteurs de substances antimicrobiennes

## Introduction

Depuis les premières études alarmantes sur l'émergence des phénotypes de résistance et parfois de multi-résistance chez les microorganismes, les recherches se sont intensifiées pour faire face à ce fléau mondial. D'ailleurs, les technologies de génomique et des outils d'automatisation innovants ont permis d'identifier plusieurs cibles et d'effectuer un nombre énorme de tests biologiques avec les systèmes de criblage à haut débit (*High-throughput screening*). Pourtant, il est aujourd'hui évident que toutes ces avancées de surcroît à la contribution des bibliothèques synthétiques et combinatoires, n'ont pas pu aboutir à développer suffisamment d'agents antimicrobiens efficaces (Monciardini *et al.* 2014). En outre, la nocivité des molécules chimiques de synthèse sur l'organisme et sur l'environnement a réorienté la recherche vers les substances naturelles (Donadio *et al.* 2002, Demain 2014), dont une grande majorité sont d'origine microbienne et qui sont approuvées pour des usages thérapeutiques.

La rhizosphère, comme plusieurs niches biologiques, détient une énorme population microbienne très diversifiée qui dépasse de loin celle du sol non rhizosphérique (Jjemba et Alexander 1999, Tamilarasi *et al.* 2008). Une différence qui est due essentiellement aux ressources nutritives relarguées dans le sol sous forme d'exsudats racinaires représentant 5 à 21 % du carbone fixé par la plante. Pour être compétitifs, ces microorganismes ont développé différentes stratégies, telles que la production des substances antimicrobiennes diffusibles ou volatiles, l'inhibition contact-dépendante, le comportement coordonné, la mobilité, etc. (Hibbing *et al.* 2010, Westhoff *et al.* 2017).

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés au pouvoir de production des substances antimicrobiennes. L'exploration des habitats inexplorés pour l'isolement de nouveaux producteurs de substances bioactives est une approche préconisée par plusieurs spécialistes (Yarbrough *et al.* 1992). Illuminés par cette approche, nous nous sommes orientés vers des plantes dont les rhizosphères, à notre connaissance, ne sont pas étudiées auparavant. Il s'agit de *Calotropis procera* Ait., *Pistacia lentiscus* L. et *Myrtus communis* L.,. Après échantillonnage des sols

rhizosphériques, nous avons procédé par un isolement des microorganismes cultivables en utilisant la méthode directe de dilutions. Par un criblage antimicrobien nous avons sélectionné ceux qui sont dotés d'un potentiel antimicrobien.

## **Matériel et méthodes**

### **1. Echantillonnage et isolement des souches microbiennes**

#### **1.1. Prélèvement des échantillons**

La première partie de ce travail s'est basée sur la constitution d'une banque de microorganismes isolés à partir de la rhizosphère de certaines plantes médicinales et aromatiques, et qui a subi par la suite un criblage pour l'activité antimicrobienne. Parmi les plantes choisies, nous avons rapporté dans ce manuscrit trois plantes sauvages : *Calotropis procera* Ait. (Pommier de Sodome ou arbre de satan en arabe), *Myrtus communis* L. (Myrte ou "Rihan" en arabe) et *Pistacia lentiscus* L. (Lentisque ou "edhaarou" en arabe) appartenant aux *Apocynaceae*, *Myrtaceae* et *Anacardiaceae*, respectivement.

L'échantillonnage a concerné les sols rhizosphériques ainsi que des spécimens de chaque plante (feuilles, tige et racines), qui ont servi pour l'identification botanique par Pr. Abdesalam Ennabili (Département de Phytologie, Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques-Taounate) (Figure 18). Les noms scientifiques des plantes, la période d'échantillonnage ainsi que les coordonnées de leurs sites géographiques sont résumés dans le Tableau 2.

Conformément à la méthode décrite par Tardieux et Pochon (1962), les sols rhizosphériques sont prélevés en écartant les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol. Ensuite, de la couche sous-jacente (entre 5 et 15 cm de profondeur), 100 à 150 g du sol entourant les racines sont prélevés avec une spatule stérilisée par flambage à l'éthanol absolu, et déposés sur un morceau de papier aluminium préalablement stérilisé. Enfin, les gros débris sont écartés, et environ 50 g du sol sont placés dans des boîtes de polystyrène avant qu'elles soient transportées le plus rapidement possible au laboratoire pour être conservées à 4 °C. Pour chaque plante, trois échantillons de sol ont été collectés, chacun sur un pied différent, et chaque échantillon a fait l'objet de l'isolement des microorganismes.





**Figure 18 :** Photos des plantes sélectionnées pour l'échantillonnage de leur sol rhizosphérique ; A) *Calotropis procera* Ait. ; B) *Myrtus communis* L. ; C) *Pistacia lentiscus* L.

**Tableau 2 :** Plantes sélectionnées pour l'échantillonnage et leurs sites géographiques

Plante	Région	Coordonnées	Élévation (m)	Période d'échantillonnage
<i>Calotropis procera</i> Ait.	Er-Rachidia (Maroc)	N 31°07'05.6" W 004°59'20.2"	-	Août 2012
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Taounate (Maroc)	N 34°35.218' W 004° 38.526'	474	Novembre 2013
<i>Myrtus Communis</i> L.	Taounate (Maroc)	N 34°35.186' W 004° 38.567'	459	Novembre 2013

## 1.2. Isolement, purification et conservation des microorganismes

À partir des échantillons du sol prélevés et conservés dans un réfrigérateur à 5°C, un isolement des microorganismes cultivables est réalisé via la méthode de dilutions directe (Kumar *et al.* 2010). Cette méthode consiste à mettre en suspension (aseptiquement) 2 g du sol rhizosphérique dans 20 ml de l'eau physiologique (NaCl à 0,9 % p/v) stérile. Cette suspension est en fait la dilution ( $10^{-1}$ ), elle est mélangée au vortex et utilisée pour préparer une série de dilutions décimales, allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-5}$  dans l'eau physiologique stérile. Ensuite, un volume de 100  $\mu$ l de chaque dilution est étalé à la surface des milieux gélosés d'isolement (*cf.* Annexe 2). Les gélosesensemencées sont par la suite incubées à 30 °C pendant 20 jours. Les boîtes ont été quotidiennement examinées et les colonies qui apparaissent sont repiquées dans des géloses stériles. Par des repiquages successifs, des cultures pures de chaque isolat ont été obtenues, et seuls les microorganismes qui ont poussé dans les trois échantillons récoltés pour chaque sol ont été gardés pour la suite de l'étude.

Les cultures microbiennes pures sont conservées dans des géloses inclinées à 4 °C pour qu'elles soient utilisées comme stocks à court terme. Parallèlement, des stocks de chaque isolat sont annuellement préparés dans une solution de glycérol à une concentration finale de 20 % (v/v), et conservés à -20 °C. Le glycérol (à 40 % v/v) est stérilisé par filtration à travers une membrane millipore de 0,45 µm.

A l'égard des géloses utilisées pour l'isolement, ce sont toutes des milieux de culture riches non sélectifs, à savoir la gélose Luria-Bertani (LB), la gélose dextrosée à la pomme de terre (potato-dextrose-agar (PDA)), la gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt (LMA) et la gélose glucosée à l'extrait de levure (GYEA). La composition de chacun de ces milieux figure dans l'Annexe 2. Le pH de chaque milieu est ajusté à  $7,0 \pm 0,2$  avec des solutions de NaOH (1 N) et HCl (1 N) avant l'ajout de l'agar. Après stérilisation, les géloses liquéfiées (50 °C) sont coulées dans des boîtes de Pétri préalablement stérilisées.

## **2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats : Criblage antimicrobien**

### **2.1. Microorganismes tests**

Sept microorganismes de référence sont utilisés comme souches indicatrices (i.e. souches sur lesquelles est testée l'action inhibitrice des isolats) (Tableau 3).

**Tableau 3 :** Souches microbiennes utilisées comme microorganismes indicateurs

<b>Espèce</b>	<b>Référence</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC* 29213
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

\* ATCC: American Type Culture Collection

Ces microorganismes sont généralement pathogènes pour l'Homme et fréquemment rencontrés dans le domaine médical ou dans les industries agroalimentaires. Ces souches, de la

Collection Américaine des Cultures Types (ATCC), nous ont été fournies par le laboratoire de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, France). Elles sont conservées dans des géloses inclinées à 4 °C pour l'usage en routine, et à -20 °C dans le glycérol à 20 % (v/v) comme stocks à long terme qui sont annuellement renouvelés. Avant leur utilisation, les souches microbiennes sont revivifiées par une ou deux subcultures à 30 °C pendant 18-24 heures, dans leurs milieux de culture appropriés (gélose LB pour les bactéries et la gélose glucosée et peptonée à l'extrait de levure (YPG) pour *C. albicans*) (cf. Annexe 2).

## **2.2. Préparation de l'inoculum microbien**

L'inoculum microbien est préparé par la méthode de la suspension directe à partir des colonies (*Direct colony suspension*) décrite par CLSI (2012).

Au départ, des standards 0,5 McFarland sont préparés en mélangeant 99,5 ml d'une solution de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 0,36 N avec 0,5 ml d'une solution de chlorure de baryum dihydraté (BaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O) à 0,048 M. La densité optique (DO) de la solution est vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à  $\lambda = 625$  nm, qui doit être comprise entre 0,08 et 0,12. Cette solution est ensuite versée dans des tubes à essai (10 ml chacun). Les tubes sont hermétiquement fermés, le niveau de liquide est marqué pour détecter toute évaporation possible, et les tubes sont couverts de papier aluminium et gardés à température ambiante. Les standards 0,5 McFarland sont renouvelés tous les trois mois.

Parallèlement, les microorganismes test sont cultivés en ensemençant, à partir de la culture stock, une gélose LB pour les bactéries ou YPG pour *C. albicans*. Après 24 heures d'incubation, 2-3 colonies sont prélevées aseptiquement et mises en suspension dans l'eau physiologique stérile (10 ml). Après agitation au vortex, la turbidité de cette suspension est ajustée à l'œil nu sur un arrière-plan blanc contrasté par des lignes noires, pour qu'elle soit équivalente à celle d'un standard de 0,5 McFarland. Selon la référence citée, la suspension bactérienne ajustée à 0,5 McFarland contient approximativement  $1 \times 10^8$  à  $2 \times 10^8$  UFC/ml. Pour *C. albicans*, elle contient approximativement  $1 \times 10^6$  à  $5 \times 10^6$  UFC/ml.

## **2.3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne**

Tous les isolats ont été soumis à un criblage antimicrobien qui avait pour objectif de sélectionner les isolats actifs. Pour cette fin, la méthode de diffusion sur des plots d'agar (*agar-*

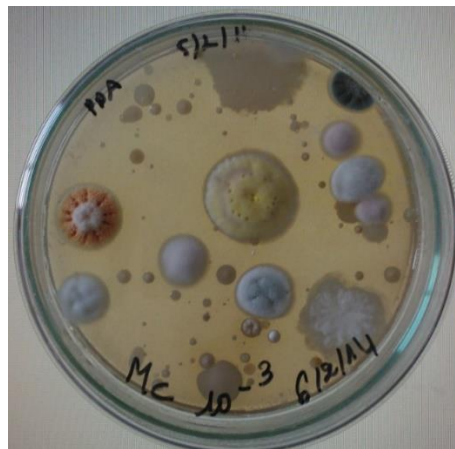
*plug diffusion method*) décrite par Elleuch *et al.* (2010) a été adoptée. Rapide et simple, cette méthode permet de cribler dans une boîte de Pétri une dizaine d'isolats. Le mode opératoire exige que chaque souche soit cultivée dans son milieu d'isolement. De ces cultures, des plots d'agar sont aseptiquement découpés de la gélose à l'aide d'un emporte-pièce et déposés, en duplique, sur des milieux gélosés préalablement inoculés par une suspension microbienne indicatrice préparée dans l'eau physiologique et ajustée à 0,5 McFarland. Les boîtes sont ensuite gardées à 4 °C pendant 2 heures pour assurer une bonne diffusion des molécules dans la gélose inoculée. Après 24 heures d'incubation à 37 °C pour les bactéries et 30 °C pour *C. albicans*, les zones d'inhibition sont mesurées en mm.

## Résultats et discussion

### 1. Souches microbiennes isolées

L'isolement des microorganismes à partir du sol rhizosphérique des plantes étudiées est réalisé par la méthode conventionnelle de l'isolement direct des souches microbiennes cultivables dans les quatre milieux de culture utilisés. La Figure 19 montre un exemple d'une gélose d'isolement (PDA) après 7 jours d'incubation.

Au total, 112 microorganismes ont été isolés à partir de la rhizosphère des trois plantes étudiées (*Calotropis procera* Ait. 30 isolats, *Myrtus communis* L. 42 isolats et *Pistacia lentiscus* L. 40 isolats).

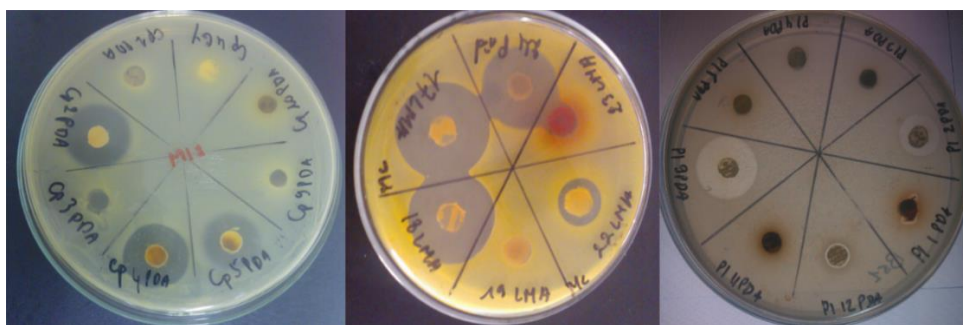


**Figure 19 :** Photo d'une boîte d'isolement (*M. communis* ; dilution  $10^{-3}$  ; milieu PDA)

## 2. Résultats du criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques

Après isolement et purification des isolats, ils ont subi un criblage ayant pour objectif la sélection de ceux qui produisent des substances antimicrobiennes. La méthode de diffusion sur des plots d'agar a été ainsi adoptée pour détecter leur activité antagoniste contre des souches de référence.

Le criblage antimicrobien a permis de sélectionner un total de 65 isolats (soit 58,04 % de la flore totale isolée) actifs contre, au moins, l'une des souches indicatrices utilisées. La Figure 20 montre des exemples de l'activité antagoniste de certains isolats.



**Figure 20 :** Photos montrant l'activité antimicrobienne de certains isolats rhizosphériques évaluée par la méthode de diffusion sur des plots d'agar

### 2.1. Résultats du criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de *Calotropis procera* Ait.

Les isolats rhizosphériques actifs à partir de *C. procera* (21 isolats) sont répartis en 8 actinomycètes, 7 champignons et 6 bactéries non filamenteuses. Approximativement, la moitié de ces isolats (10 isolats incluant 6 bactéries, 3 champignons et un actinomycète) sont actifs contre un seul microorganisme. *M. luteus* est le plus sensible à ces dix isolats, puisqu'il a été inhibé par 4 bactéries et deux champignons. *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. albicans* ont également été inhibés par les isolats de *C. procera* (Tableau 4).

Par ailleurs, l'isolat 9 (actinomycète) a montré une activité inhibitrice à large spectre dirigée contre tous les microorganismes test, excepté *E. coli*. De même, l'isolat 1 (un actinomycète) s'est révélé antagoniste à toutes les bactéries à Gram-positif testées, ainsi que la levure *C. albicans*. De plus, les deux isolats 3 et 4 (actinomycètes) ont montré un profil antimicrobien caractérisé par une spécificité aux bactéries à Gram-positif. Toutefois, l'activité inhibitrice de l'isolat 2 (champignon)

et de l'isolat 16 (bactérie) est dirigée exclusivement contre *P. aeruginosa* et *C. albicans*, respectivement.

**Tableau 4 :** Criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de *Calotropis procera* Ait.

Isolat	Type	Milieu d'isolement	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Isolat 1	A	PDA	26	30	-	26	-	25	19
Isolat 2	C		-	-	-	-	16	-	-
Isolat 3	A		20	22	-	28	-	34	-
Isolat 4	A		19	22	-	24	-	32	-
Isolat 5	C		12	14	-	-	-	-	-
Isolat 6	C		11	14	-	-	-	-	-
Isolat 7	A	GYEA	-	13	-	-	-	-	-
Isolat 8	A		-	23	-	15	-	-	-
Isolat 9	A		26	36	-	29	15	22	15
Isolat 10	C		-	-	-	14	-	-	-
Isolat 11	A		-	-	11	-	-	12	-
Isolat 12	C	LMA	-	-	-	24	-	-	-
Isolat 13	A		17	26	-	25	-	-	-
Isolat 14	C		-	15	-	23	-	-	-
Isolat 15	C		14	-	-	23	-	-	-
<b>Isolat 16*</b>	<b>B</b>		-	-	-	-	-	-	<b>37</b>
Isolat 17	B	LB	-	-	-	22	-	-	-
Isolat 18	B		-	-	-	19	-	-	-
Isolat 19	B		-	-	-	12	-	-	-
Isolat 20	B		12	-	-	-	-	-	-
Isolat 21	B		-	-	-	11	-	-	-

Les résultats sont exprimés en diamètre de la zone d'inhibition (mm). Le diamètre du plot (8 mm) est inclus.

A : actinomycète ; C : champignon ; B : bactérie non filamenteuse.

## 2.2. Résultats du criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de *Myrtus communis* L.

Vingt-trois isolats rhizosphériques de *M. communis*, dont 14 champignons, 5 actinomycètes et 4 bactéries, se sont avérés actifs vis-à-vis, au moins, d'un seul microorganisme test (Tableau 5). D'ailleurs, la plupart de ces isolats sont actifs contre un seul microorganisme test. En effet, 11 isolats (7 champignons, 2 actinomycètes et 2 bactéries non filamenteuses) ont exercé une activité

\* Isolat 16 : est la bactérie qui a été identifiée comme étant *Bacillus* sp. et sélectionnée pour l'étude de son activité antifongique et antiadhésive vis-à-vis de *C. albicans*.

inhibitrice uniquement contre *M. luteus*. C'est également le cas des isolats 5 et 8 (champignons) ainsi que l'isolat 11 (actinomycète) qui ont inhibé la croissance de *C. albicans* seulement.

D'un autre côté, les isolats 14, 15 et 20 ont exhibé une activité antibactérienne contre, au moins, quatre bactéries test, avec une spécificité aux bactéries à Gram-positif pour les isolats 15 et 20, alors que l'isolat 14 est également actif contre *P. aeruginosa* (Gram-négatif) (Tableau 5). A l'opposé, deux champignons (isolat 5 et 8), aussi bien qu'un actinomycète (isolat 11) ont exercé une activité antifongique en inhibant la croissance de *C. albicans*. Alors que les deux champignons (isolats 16 et 17) ont inhibé la croissance de *P. aeruginosa*.

**Tableau 5 :** Criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de *Myrtus communis* L.

Isolat	Type	Milieu d'isolement	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Isolat 1	C	PDA	-	-	-	12	-	-	-
Isolat 2	C		-	-	-	12	-	-	-
Isolat 3	C		-	-	-	16	-	-	-
Isolat 4	C		-	-	-	15	-	-	-
Isolat 5	C		-	-	-	-	-	-	16
Isolat 6	A		-	-	-	16	-	-	-
Isolat 7	A		18	-	-	25	-	-	-
Isolat 8	C		-	-	-	-	-	-	18
Isolat 9	A	GYEA	-	-	-	11	-	-	-
Isolat 10	C		-	-	-	14	-	-	-
Isolat 11	A		-	-	-	-	-	-	12
Isolat 12	C		-	-	-	17	-	14	-
Isolat 13	C	LMA	-	-	-	19	-	-	-
Isolat 14	A		23	24	-	27	13	22	-
Isolat 15	C		23	20	-	28	-	16	-
Isolat 16	C		-	-	-	-	13	-	-
Isolat 17	C		-	-	-	24	13	-	-
Isolat 18	C		-	22	-	15	-	-	-
Isolat 19	C		-	-	-	12	-	-	-
Isolat 20	B	LB	24	22	-	25	-	20	-
Isolat 21	B		-	18	-	15	-	-	-
Isolat 22	B		-	-	-	20	-	-	-
Isolat 23	B		-	-	-	14	-	-	-

Les résultats sont exprimés en diamètre de la zone d'inhibition en mm. Le diamètre du plot (8 mm) est inclus.  
A : actinomycète ; C : champignon ; B : bactérie non filamenteuse.

### 2.3. Résultats du criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de *Pistacia lentiscus* L.

A l'égard de *P. lentiscus*, 21 isolats rhizosphériques, dont 12 champignons, 5 actinomycètes et 4 bactéries non filamenteuses se sont montrés actifs contre, au moins, un seul microorganisme test (Tableau 6).

De même que pour les deux premières plantes, les isolats rhizosphériques actifs de *P. lentiscus* peuvent être classés en isolats dotés d'une activité antagoniste contre plusieurs microorganismes et d'autres qui ne le sont pas. Dans le premier camp, le potentiel antagoniste de l'isolat 6 (actinomycète) est remarquable. Il est dirigé contre la totalité des souches indicatrices, mis à part *E. coli*, avec un maximum noté vis-à-vis de *M. luteus* (46 mm) et un minimum vis-à-vis de *C. albicans* (15 mm).

**Tableau 6 :** Criblage antimicrobien des isolats rhizosphériques de *Pistacia lentiscus* L.

Isolat	Type	Milieu d'isolement	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Isolat 1	C	PDA	-	15	-	-	-	-	-
Isolat 2	C		-	17	-	24	-	19	-
Isolat 3	C		-	-	-	15	-	-	-
Isolat 4	C		-	-	-	14	-	-	-
Isolat 5	C		-	-	-	34	-	-	-
Isolat 6	A		25	27	-	46	20	28	15
Isolat 7	C		-	-	-	-	-	-	14
Isolat 8	C		-	12	-	15	-	-	-
Isolat 9	A		16	10	-	22	-	20	-
Isolat 10	C	GYEA	-	-	-	-	14	-	-
Isolat 11	C		-	-	-	-	12	-	-
Isolat 12	C		-	-	-	15	-	-	-
Isolat 13	A		15	-	-	20	-	-	-
Isolat 14	A	LMA	17	22	-	27	14	19	-
Isolat 15	A		-	-	-	-	-	-	16
Isolat 16	C		14	13	-	19	12	14	-
Isolat 17	C		-	-	-	20	-	-	-
Isolat 18	B	LB	-	-	-	11	-	-	-
Isolat 19	B		-	-	-	-	-	-	15
Isolat 20	B		-	14	-	16	-	-	-
Isolat 21	B		-	-	-	17	-	-	-

Les résultats sont exprimés en diamètre de la zone d'inhibition en mm. Le diamètre du plot (8 mm) est inclus.  
A : actinomycète ; C : champignon ; B : bactérie non filamenteuse.



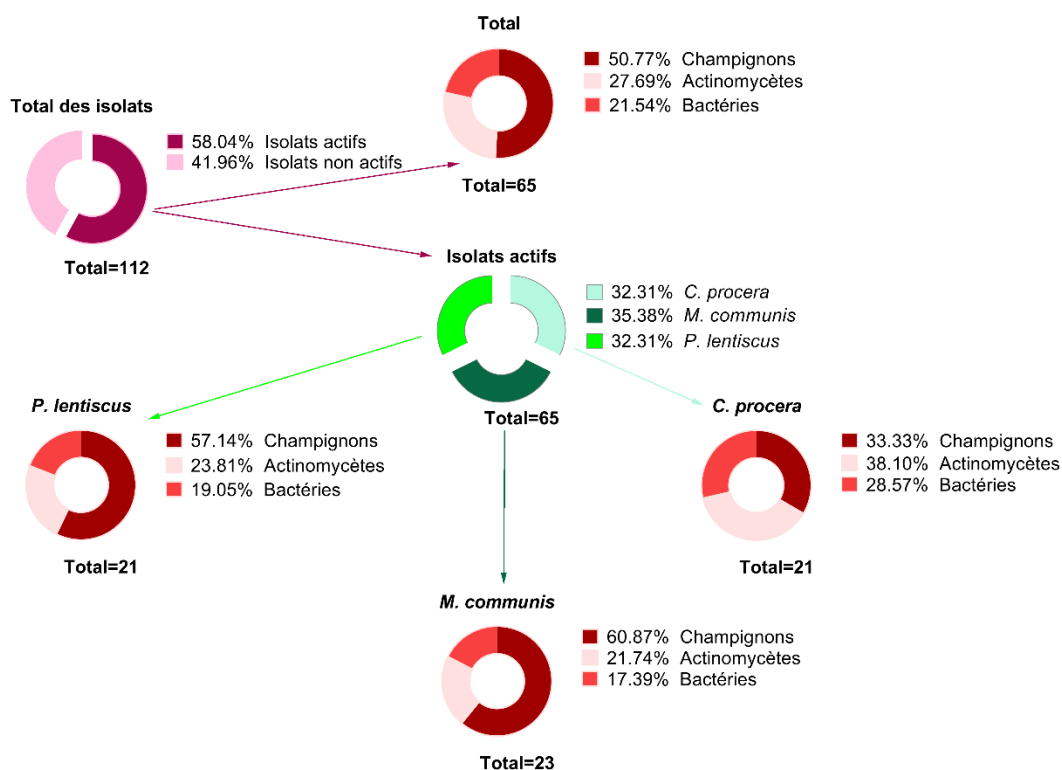
De plus, les isolats 9 et 14 (actinomycètes), ainsi que l'isolat 16 (champignon) sont dotés d'une activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les bactéries test, excepté *E. coli*, qui s'est avéré le microorganisme le plus résistant à l'activité des isolats étudiés.

Dans l'autre camp, l'inhibition de la croissance spécifique à *C. albicans* qui a été exercée par les isolats 7 (champignon), 15 (actinomycète) et 19 (bactérie), en est un exemple. Dans le même sens, les deux champignons (isolats 10 et 11) ont prouvé un pouvoir inhibiteur restreint dirigé uniquement contre *P. aeruginosa*.

### 3. Comparaison des pourcentages des isolats rhizosphériques actifs des trois plantes

En général, les isolats actifs sont prédominés par des champignons (soit 33 champignons), par rapport aux actinomycètes et aux bactéries non filamenteuses avec 18 et 14 isolats, respectivement (Figure 21).

Approximativement, les deux tiers (21/30) des souches rhizosphériques isolées de *C. procera* sont actives. Pour *M. communis* et *P. lentiscus* la fraction des isolats actifs constitue seulement 23/42 et 21/40, respectivement.



**Figure 21 :** Distribution du pourcentage des isolats actifs par type des microorganismes et par plante

Pour ces deux plantes, les champignons rhizosphériques actifs constituent environ 60 % des isolats actifs de chacune. De plus, les actinomycètes et les bactéries actifs montrent également des pourcentages (environ 20 %) qui sont proches pour ces deux plantes. Or, pour *C. procera*, c'est les actinomycètes qui dominent avec 38,1 % des isolats actifs, puis les champignons et les bactéries avec 33,33 % et 28,57 %, respectivement (Figure 21).

En fait, il est difficile d'expliquer ces différences, car l'objectif de cette étude ne s'intéressait pas à l'exploration de la diversité microbienne dans la rhizosphère de chaque plante. Il s'agit d'un isolement simple et aléatoire des microorganismes sur différents milieux de culture et avec certaines conditions d'incubation. Ce qui aurait influencé de façon qualitative et quantitative la flore microbienne cultivable isolée, comme il a été rapporté par Vieira et Nahas (2005). Toutefois, il est important de signaler que *M. communis* et *P. lentiscus* forment souvent une association végétale dans leurs habitats (Wahid 2013). De plus, les pieds que nous avons sélectionnés pour l'échantillonnage de leur sol rhizosphérique (qui a été réalisé dans la même période pour ces deux plantes) sont extrêmement proches et appartiennent à la même région géographique (Tableau 2). Il est très probable que ces faits ont contribué à ces pourcentages des isolats actifs très proches pour ces deux plantes.

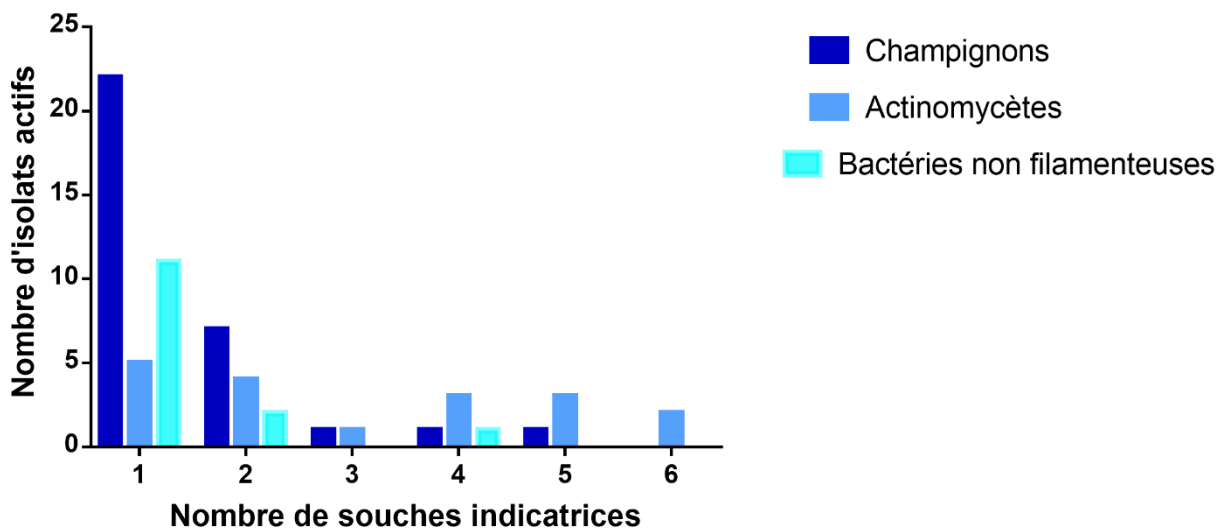
En effet, les facteurs associés à la région géographique, le climat, le sol et ses caractéristiques sont tous des éléments qui influencent la diversité microbienne tellurique (Buée *et al.* 2009, Lepinay 2013). Or, il faut rappeler que les exsudats racinaires, qui dépendent de chaque plante, exercent un effet capital sur la flore microbienne environnante en favorisant certains microorganismes aux dépens des autres (Kumar *et al.* 2013).

Quant à *C. procera*, sur les 30 microorganismes isolés de sa rhizosphère, la majorité (70 %) sont actifs avec une prédominance des actinomycètes (8 isolats). Contrairement au myrte et au lentisque, cette plante abrite les zones arides et semi-arides. Ces zones sont caractérisées par une faible activité de l'eau, une carence nutritive et par la présence des radiations. Tous ces éléments sont des facteurs supplémentaires qui affectent la concurrence entre les microorganismes au sein de la rhizosphère, en la rendant plus raboteuse. D'ailleurs, l'étude menée par Radha *et al.* (2017) sur les actinomycètes dans différents sols rhizosphériques a montré une diversité éminente des actinomycètes dans les régions arides et semi-arides. En outre, à l'image de la tolérance à la salinité, les bactéries à Gram-positif (y compris les actinomycètes), les champignons et les archées

(*Archaea*) tolèrent mieux le potentiel élevé de l'eau (faible teneur en eau), par rapport aux bactéries à Gram-négatif, car ils ont une paroi plus résistante (Yan *et al.* 2015).

#### 4. Comparaison de l'activité antagoniste en fonction du type d'isolat et du spectre d'activité

Comme nous l'avons illustré dans le diagramme (Figure 22), le pouvoir antagoniste exercé par les champignons et les bactéries non filamenteuses est généralement caractérisé par un spectre d'activité étroit, qui est dirigé uniquement contre une ou deux souches test, à l'exception de certains isolats. C'est le cas par exemple du champignon et de la bactérie isolés de *M. communis* (isolat 15 et 20, respectivement) ainsi que le champignon (isolat 16) isolé de *P. lentiscus*, qui sont actifs à la fois sur, au moins, quatre souches indicatrices. Alors que la moitié des actinomycètes actifs (8/18) ont inhibé, à la fois, quatre souches indicatrices au minimum.



**Figure 22 :** Nombre d'isolats actifs en fonction du nombre de souches indicatrices qui leur sont sensibles

De plus, en tenant compte de la puissance du pouvoir antimicrobien de nos isolats, et ce par exclusion de ceux qui ont exhibé une activité inhibitrice avec une zone d'inhibition inférieure à 15 mm, nous avons obtenu 21 champignons, 14 actinomycètes et 8 bactéries. Sauf que 14 champignons, 2 actinomycètes et 8 bactéries sont actifs uniquement sur *M. luteus* (le microorganisme le plus sensible à l'activité des isolats). En éliminant encore cette fraction

d'isolats, nous obtenons 8 champignons, 13 actinomycètes et 4 bactéries dotés d'une activité avec une zone d'inhibition supérieure à 15 mm contre, au moins, une souche test différente de *M. luteus*.

Il est important de noter que le spectre d'activité large discuté ici est relatif aux isolats, et qui ne pourrait pas en aucun cas, sans fractionnement de leurs extraits, renseigner sur le nombre de molécules actives sécrétées ou leur spectre d'action.

Quoi qu'il en soit, ces constatations sont en faveur du pouvoir antimicrobien très puissant et à large spectre de la majorité (13/18) des actinomycètes isolés.

D'une part, ce fait n'est pas surprenant dans la mesure où les actinomycètes sont des producteurs d'antibiotiques par excellence, et que 80 % des antibiotiques doivent leur existence sur le marché à ces bactéries (e.g.  $\beta$ -lactamines, aminoglycosides, tetracyclines, glycopeptides et phénicolés.) (Solecka *et al.* 2012).

Outre les différentes espèces du fameux genre *Streptomyces* qui est le plus répandu (Benedict 1953, Watve *et al.* 2001), d'autres actinomycètes rares sont également des producteurs de métabolites bioactifs, tels que : *Actinosynnema*, *Frankia*, *Dactylosporangium*, *Microtetraspora*, *Chainia* et d'autres (Berdy 2005). Certains auteurs pensent que l'exploitation de ces actinomycètes rares pourrait aboutir au développement de nouveaux antimicrobiens, les *Streptomyces* étant extensivement exploités (Lazzarini *et al.* 2001, Kurtböke 2012).

D'autre part, l'étude menée par Passari *et al.* (2015) sur les actinomycètes associés aux plantes médicinales et aromatiques a illustré qu'à partir de 560 tissus de différentes plantes, la majorité des actinomycètes isolés (soit 52,38 %) habitent les racines, puis les tiges (21,42 %), les feuilles (14,28 %), les fleurs (7,14 %) et les pétioles (4,76 %). Ces auteurs ont expliqué le pourcentage élevé de ces bactéries filamenteuses dans les racines par leur passage facile de la rhizosphère vers les racines. De plus, environ les deux tiers des actinomycètes isolés dans la même étude, et dont la plupart appartiennent au genre *Streptomyces*, ont inhibé toutes les souches indicatrices testées (Passari *et al.* 2015). En outre, il a été également rapporté que les actinomycètes endophytes des plantes non médicinales existent, mais ceux qui sont dotés d'un pouvoir antimicrobien sont très rares (Taechowisan *et al.* 2003).

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté le spectre d'activité large des actinomycètes rhizosphériques. Par exemple, 83 % des actinomycètes rhizosphériques isolés de différentes plantes

marocaines, y compris la plante endémique *Argania spinosa*, ont montré un large spectre d'activité antimicrobienne (Barakate *et al.* 2002).

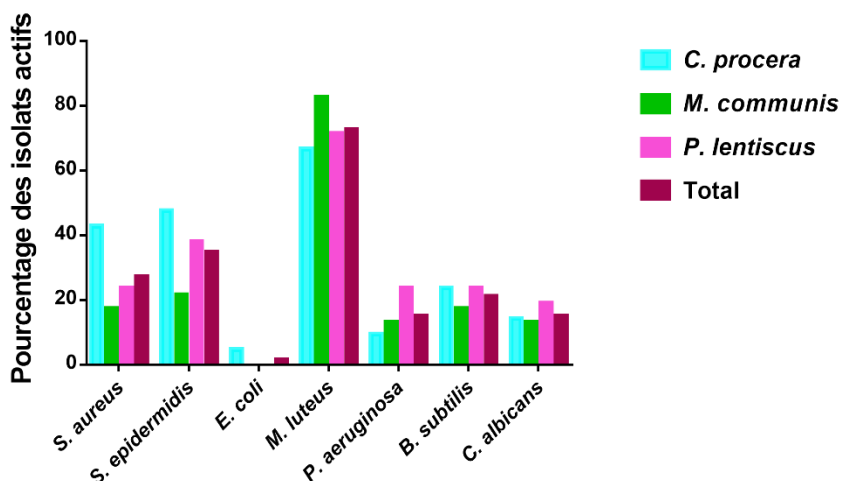
En revanche, peu d'études ont été menées sur les champignons et les bactéries non actinomycètes rhizosphériques et producteurs de substances antimicrobiennes, par rapport aux actinomycètes qui sont largement étudiés. Pourtant, les publications sur les champignons endophytiques dotés d'un potentiel antimicrobien sont très nombreuses (Gunatilaka 2006, Liang *et al.* 2012, Ibrahim *et al.* 2014).

### 5. Comparaison de la sensibilité des souches indicatrices aux isolats

L'analyse des profils de sensibilité des microorganismes test, qui sont dictés par l'activité antagoniste des isolats rhizosphériques de cette étude, a montré que les bactéries à Gram-positif, particulièrement *M. luteus*, sont les plus vulnérables (Figure 23).

D'ailleurs, *M. luteus* est inhibé par 72,73 % des isolats, dont la majorité provient de la rhizosphère de *M. communis* (82,61 %). De plus, les deux espèces appartenant au genre *Staphylococcus* : *S. epidermidis* et *S. aureus*, rejoignent *M. luteus* par leur sensibilité à 34,85 % et 27,27 % des isolats actifs, respectivement. La plupart des isolats antagonistes des deux espèces de *Staphylococcus* sont issus de *C. procera*, avec plus de 40 %.

Ensuite, *B. subtilis* s'est avéré la plus résistante parmi les bactéries à Gram-positif avec une sensibilité à 21,21 % des isolats rhizosphériques actifs.



**Figure 23 :** Pourcentages de sensibilité des souches microbiennes test aux isolats rhizosphériques

Parmi toutes les souches indicatrices utilisées, *E. coli* est évidemment la plus résistante au pouvoir inhibiteur des isolats rhizosphériques. Cette bactérie est modérément inhibée par un seul actinomycète (Isolat 11) isolé de *C. procera*. Alors que *P. aeruginosa* est modérément inhibé par 10 isolats, soit 15,15 % des isolats actifs dont la plupart proviennent de *P. lentiscus*.

Le seul champignon indicateur (*C. albicans*) est inhibé également par 10 isolats au total (soit 15,15 %). Ces isolats ont exprimé un pouvoir qui est exclusivement antifongique, mis à part l'isolat 6 de *P. lentiscus*, qui a exercé une activité antibactérienne.

En définitive, les microorganismes test peuvent ainsi être classés selon un ordre de sensibilité (estimée par le nombre d'isolats actifs) décroissant comme suit : *M. luteus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *E. coli* (Figure 23).

Cet ordre est tout à fait logique du fait que les bactéries à Gram-positif sont généralement plus sensibles aux antibiotiques que les Gram-négatif (Basilio *et al.* 2003). En effet, Basilio *et al.* (2003) ont observé le même profil de sensibilité vis-à-vis de l'activité inhibitrice des actinomycètes telluriques. Par ailleurs, Saadoun *et al.* (1999) ont obtenu un pourcentage élevé d'isolats actifs contre des bactéries à Gram-positif et un faible pourcentage contre *Mycobacterium vaccae*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

En outre, la résistance extravagante que nous avons constatée pour *Escherichia coli* a été également mentionnée par des études menées sur l'activité des actinomycètes rhizosphériques et telluriques (Jiménez-Esquilín et Roane 2005, Elbendary *et al.* 2017).

## **Conclusion**

La collection des isolats rhizosphériques actifs que nous avons pu construire est représentée par différents types de microorganismes (champignons, actinomycètes et bactéries non filamenteuses) qui incitent, par leur pouvoir antimicrobien prometteur, la poursuite de la recherche afin de développer de nouvelles molécules antimicrobiennes authentiques.

Parmi les 65 souches actives, et en dépit de 6 isolats ayant démontré une activité inhibitrice contre un large spectre de microorganismes, 12 isolats rhizosphériques sont qualifiés d'intéressants, et qui se distinguent par leur pouvoir inhibiteur de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et/ou de *Candida albicans*.

5 isolats de ce lot ont été actifs sélectivement vis-à-vis de *P. aeruginosa*, à savoir : l'isolat 2 de *C. procera*, les isolats 16 et 17 de *M. communis* et les isolats 10 et 11 de *P. lentiscus*. En effet, *P. aeruginosa*, l'exemple-type des bactéries opportunistes est parmi les bactéries les plus résistantes aux antibiotiques et également aux métabolites antimicrobiens d'origine végétale. Elle est très connue par sa capacité de former des biofilms impliqués dans de nombreuses infections, notamment les infections nosocomiales, et hautement résistants aux traitements classiques.

En outre, 8 isolats sont dotés d'un pouvoir antifongique vis-à-vis de *C. albicans*. Il s'agit de l'isolat 16 de *C. procera*, les isolats 5, 8 et 11 de *M. communis* et les isolats 7, 15 et 19 de *P. lentiscus*.

En définitive, l'isolat 16 (Cp-LMA-16) qui a exercé la plus puissante activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans*, qui témoigne de sa capacité potentielle à contrôler ce pathogène, a été sélectionné pour mener une étude plus approfondie sur son effet inhibiteur.

## ***CHAPITRE II***

**IDENTIFICATION DE L'ISOLAT Cp-LMA-16, PRODUCTION,  
EXTRACTION ET ISOLEMENT DE LA FRACTION  
ANTIFONGIQUE**



## Chapitre II : Identification de l'isolat Cp-LMA-16, production, extraction et isolement de la fraction antifongique

### Introduction

Les mycoses sont des infections causées par les champignons microscopiques parasites. Les mycoses superficielles touchent souvent la peau, le cuir chevelu, les ongles, la muqueuse orale ou vaginale, et elles sont traitées par des antifongiques appliqués localement ou administrés par voie orale dans certains cas (Bettayeb 2017). Or, quand ces infections atteignent le sang ou certains organes vitaux (poumons, cœur, reins ...), elles peuvent se révéler mortelles.

Les utilisations de plus en plus fréquentes, partout dans le monde, des antibiotiques à large spectre, des prothèses et des dispositifs médicaux implantables, des traitements anticancéreux et immunosuppresseurs ont participé à l'augmentation de l'incidence de ces mycoses invasives, avec une ampleur estimée à + 1,5 % par an (Owens *et al.* 2010, Bettayeb 2017). Cette situation est très préoccupante vu le nombre limité des antifongiques disponibles sur le marché (4 classes), par rapport aux antibiotiques (environ 20 classes). De plus, ces classes sont connues par leurs effets indésirables, leur toxicité en particulier, et par l'émergence de la résistance à leur égard (Cazenave *et al.* 2010, Arendrup *et al.* 2013).

Classées au quatrième rang, les levures du genre *Candida* représentent une cause majeure des septicémies nosocomiales aux États-Unis (Owens *et al.* 2010). Le traitement des candidoses superficielles ou systémiques fait appel aux polyènes, azolés ou échinocandines (Denieul et Faure 2009, Cazenave *et al.* 2010, Hennequin *et al.* 2010). Toutefois, la consommation de ces antifongiques a été récemment associée à l'augmentation de l'incidence des candidémies (Goemaere *et al.* 2018). Ceci résulte en fait de la résistance des isolats cliniques de *Candida* sp. qui est à l'origine des échecs thérapeutiques rapportés (Sitterlé *et al.* 2017).

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques et des molécules antifongiques prometteuses qui peuvent surmonter la réduction progressive de la puissance des antimycosiques classiques est indispensable pour endiguer le danger des infections aux champignons. La suite de notre étude s'inscrit dans ce cadre, et vise pour objectif le

développement un nouvel antifongique contre l'agent étiologique majeur des mycoses invasives, *Candida albicans*.

Pour ce faire, nous avons sélectionné l'isolat 16 obtenu à partir de la rhizosphère de *Calotropis procera* Ait. (Isolat Cp-LMA-16), qui a prouvé la plus puissante activité inhibitrice vis-à-vis de *C. albicans* pour pousser une étude multidisciplinaire avec ses volets microbiologiques (identification de l'isolat, fermentation et production des molécules actives) et chimiques (extraction, fractionnement et caractérisation partielle).

## **Matériel et méthodes**

### **1. Identification moléculaire par séquençage de l'ADNr 16 S**

L'identification bactérienne repose sur une taxonomie phylogénétique. Son but est d'assigner l'identité d'un isolat à une espèce précédemment décrite. Contrairement aux êtres vivants sexués, une définition moléculaire de l'espèce basée sur une communauté chromosomique de similitude ADN/ADN supérieure à 70 % a été proposée. Ensuite, une similitude de séquence du gène ADNr 16 S\* supérieure à 97 % a été préconisée par Stackebrandt et Goebel (1994).

L'ADNr 16 S est une séquence universelle de 1500 à 1600 pb souvent utilisée pour identifier les bactéries. Il représente l'outil le plus puissant pour l'identification bactérienne, d'une part, parce qu'il présente une conservation presque totale à ses extrémités 5' et 3' permettant d'utiliser des amorces universelles d'amplification et de séquençage et, d'autre part, en raison de la disponibilité de milliers de séquences bactériennes dans les banques de données (Drancourt 1998).

Cette méthodologie d'identification consiste à extraire l'ADN génomique à partir des cellules de l'isolat et amplifier une région sélectionnée du gène ADNr 16 S par la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (*Polymerase chaine reaction*) en utilisant des amorces universelles ou spécifiques. Par la suite, le séquençage de l'amplifiât permet de reconnaître la séquence nucléotidique du fragment amplifié et qui sera comparée avec l'ensemble des séquences disponibles dans les bases de données (Weisburg *et al.* 1991).

---

\* ADNr 16 S: gène codant l'ARN ribosomal 16 S bactérien.

### **1.1. Extraction de l'ADN génomique total**

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour extraire et purifier l'ADN génomique des cellules bactériennes. Dans cette étude, nous avons utilisé une méthode très simple et moins coûteuse, basée sur le choc thermique. Le mode opératoire adopté consiste à prélever, à partir d'une culture fraîche de l'isolat Cp-LMA-16 (24 h), une colonie et la disperser dans un tube eppendorf stérile contenant 50 µl d'eau bidistillée stérile. Le tube est ensuite incubé à -20 °C pendant 30 minutes, puis chauffé à 95 °C dans un bain marie pendant 10 minutes. Ces deux étapes ont été répétées trois fois afin d'éclater le maximum de cellules par choc thermique. Après centrifugation à 9000 rpm pendant 5 minutes, un volume de 2 µl du surnageant contenant de l'ADN matrice est utilisé pour la réaction d'amplification (PCR) (Mostakim *et al.* 2011).

### **1.2. Réaction d'amplification de l'ADNr 16 S par PCR**

L'ADN génomique extrait a subi une réaction d'amplification par PCR en ciblant une partie du gène ADNr 16 S par l'usage de deux amorces universelles 8 F et 1492 R dont les séquences nucléotidiques sont données dans le Tableau 7. La réaction d'amplification par PCR est opérée dans un thermocycleur permettant de programmer les durées et les températures des trois étapes d'un cycle ainsi que le nombre de cycles désirés (Mostakim *et al.* 2011).

**Tableau 7 :** Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification par PCR

<b>Amorce</b>	<b>Séquence nucléotidique</b>	<b>Référence</b>
8 F	p-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-OH	Turner <i>et al.</i> 1999
1492 R (S)	p-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-OH	Lane 1991

L'amplification est effectuée en préparant un mélange réactionnel de 20 µl contenant des réactifs qui sont ajoutés dans l'ordre indiqué dans le Tableau 8. Cette préparation est effectuée dans un bain de glace.

Le microtube contenant le mélange réactionnel ainsi que ceux correspondant au témoin négatif et positif sont placés dans un thermocycleur (Thechne, UK), préalablement réglé pour

exécuter une étape de pré-dénaturation à 94 °C pendant 4 minutes, suivie de 35 cycles d'amplification comprenant chacun trois étapes :

- ✓ Dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes ;
- ✓ Hybridation à 55 °C pendant 30 secondes ;
- ✓ Élongation à 72 °C pendant 1 minute.

Le dernier cycle est suivi d'une phase d'élongation terminale à 72 °C pendant 10 minutes. Après refroidissement à 4 °C, les produits amplifiés sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose.

**Tableau 8 :** Mélange réactionnel de l'amplification par PCR

Ordre	Réactif	Volume (µl)	Concentration finale
1	ADN génomique	2	-
2	Tampon de la Taq (5X)	4	1
3	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2	1,5 mM
4	Amorce 8 F (10 µM)	2	1 µM
5	Amorce 1492 R (10 µM)	2	1 µM
6	dNTPs (1 mM)	4	0,2 mM
7	H <sub>2</sub> O bi-distillée stérile	4,6	-
8	Taq polymérase (5 U/µl)	0,2	0,05 U/µl
	Volume totale	20	-

### 1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier si la région ciblée par les amorces utilisées a été amplifiée, le résultat de l'amplification est analysé sur gel d'agarose. Ainsi, une solution d'agarose à 1 % (p/v) est préparée dans le tampon TAE 1X (pour Tris, Acétate, EDTA ; pH = 8,2) (cf. Annexe 2) et chauffée jusqu'à dissolution complète. Cette solution est refroidie à 40 °C et additionnée de 4 µl du bromure d'éthidium (BET) à raison de 0,5 µg/ml, puis elle est coulée dans un support de gel, muni d'un peigne à 16 cupules. Après solidification du gel, le peigne est soigneusement retiré et le gel est introduit dans une cuve d'électrophorèse horizontale, de sorte qu'il soit immergé dans le tampon de migration, le TAE 1X.

Après amplification, 4 µl du produit de l'amplification est mélangé avec 2 µl d'une solution de charge. Cette solution est préparée dans l'eau distillée stérile et contenait 2,5 mg/ml du bleu de bromophénol (BBP) et 30 % (v/v) du glycérol (*cf.* Annexe 2). Le mélange est soigneusement déposé dans les puits du gel. Le BBP est un indicateur de pH qui se charge négativement à pH du milieu modéré. C'est pourquoi il migre dans la même direction que les acides nucléiques et c'est pour cette propriété que nous l'avons utilisé, permettant ainsi de suivre la migration de l'ADN avec sa couleur bleue en milieu neutre et alcalin. Quant au glycérol, il alourdit la solution et entraîne l'ADN au fond du puits.

Le générateur du courant électrique est réglé à un voltage de 70 V pendant 5 minutes pour permettre la sortie de l'ADN des puits, ensuite à 50 V pour le reste de la migration. Lorsque le témoin de migration (BBP) avait atteint les trois quarts de la longueur du gel, l'électrophorèse est arrêtée. Le BET, un agent intercalent des acides nucléiques génère une fluorescence orange après exposition à la lumière UV (254 nm).

#### **1.4. Séquençage de l'amplifiât**

Un séquençage automatique de l'amplifiât, qui est en fait une adaptation de la technique de Frederick Sanger où les quatre di-désoxyribonucléotides (ddNTPs) sont marqués spécifiquement par un fluorophore spécifique, a été effectué par un séquenceur automatique ABI 3130 (Applied Biosystems) à la Cité d'innovation (Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès).

En effet, une purification du produit de l'amplification a été faite par une technologie novatrice qui repose sur l'utilisation des billes magnétiques capables de retenir l'amplicon. Dans notre étude, nous avons eu recours au Kit Magnesil.

Pour la réaction de séquençage, qui consiste en une deuxième amplification, le kit de séquençage Big Dye Terminator v 1.1 a été utilisé conformément aux recommandations du fabricant.

Enfin, une deuxième étape de purification du produit de séquençage, qui a pour objectif d'éliminer tout matériel nucléaire (amorces, ddNTPs, dNTPs) pouvant gêner la lecture de la séquence, a été faite par la technique des billes magnétiques.

Lors de la migration électrophorétique, les fragments d'ADN possédants en leurs extrémités une molécule fluorescente sont détectés par une caméra CCD et le signal est converti en un électrophérogramme. Les fichiers générés sont lus par le logiciel ‘*Sequencing analysis v 1.3*’.

### **1.5. Analyse bioinformatique des séquences**

La séquence obtenue est étudiée par un logiciel spécifique (*Sequence Scanner v 1.3*, Applied Biosystems). Pour déduire la position taxonomique de l'isolat, elle est ainsi comparée ou alignée à l'ensemble des séquences disponibles sur la banque (GenBank) via l'algorithme BLASTN disponible en ligne à l'interface de recherche NCBI<sup>†</sup>.

La similarité est déterminée grâce aux insertions, délétions et identités/substitutions. Le résultat obtenu est présenté sous forme d'un classement de hits, c'est-à-dire, une paire de séquences ayant une ressemblance. Le classement s'effectue selon un score qui représente le degré de similarité et qui permet de comparer deux alignements et dire lequel est à priori le plus performant. Or, il est impératif de tenir compte des identités et de la longueur. C'est pour cette raison qu'il faut aussi prendre en compte l'*E-value* pour valider l'homologie. Il s'agit d'une espérance mathématique, qui aide dans la prise de décision et ne s'interprète pas seule pour décider si l'alignement est biologiquement significatif. À la différence du score, l'*E-value* tient compte de la taille de la banque.

La définition moléculaire du genre stipule que, la similarité des séquences des ADNr 16 S soit supérieure ou égale à 97 %. Une similarité supérieure ou égale à 99 % traduit l'appartenance à la même espèce (Stackebrandt et Goebel 1994).

## **2. Tests biochimiques**

### **2.1. Coloration de Gram, des spores et le test catalase**

La coloration de Gram qui permet de classer les bactéries selon le type de leur paroi a été réalisée sur un frottis préparé avec une culture pure et jeune (24 h) de l'isolat Cp-LMA-16.

La coloration au vert de malachite sur un frottis de la bactérie étudiée a été utilisée pour visualiser les spores.

---

<sup>†</sup> Nucleotide Basic Local Alignment Search tool,  
[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

Pour le test catalase, une colonie de l'isolat étudié est suspendue dans 1 ml de l'eau physiologique stérile. Ensuite, 2 à 3 gouttes de l'eau oxygénée sont rajoutées. Le test est dit positif dans le cas de dégagement des bulles d'oxygène.

## **2.2. Caractères morphologiques**

La caractérisation morphologique de l'isolat étudié est faite par observation des colonies formées sur la gélose LB et la gélose nutritive supplémentée de  $MnSO_4$  à 0,03 % (Rivardo *et al.* 2009).

## **2.3. Caractères biochimiques**

La détermination de quelques caractères biochimiques de l'isolat Cp-LMA-16 a été réalisée via la galerie API (20 E, bioMérieux) (Logan et Berkeley 1984).

## **2.4. Croissance à différentes conditions de culture**

La croissance de l'isolat étudié à différents pH est testée en inoculant, avec une culture jeune de l'isolat (24 h), des tubes contenant chacun 10 ml du bouillon nutritif ajusté à différentes valeurs de pH (4, 5, 6, 7, 8 et 9) avec des solutions de HCl (1 N) et NaOH (1 N) avant stérilisation par autoclavage.

De la même manière, la tolérance de l'isolat à des fortes concentrations de sel est testée dans des tubes contenant du bouillon nutritif à 0, 5, 7 et 10 % (p/v) de NaCl, qui sont inoculés avec la suspension jeune de l'isolat Cp-LMA-16.

Après incubation à 30 °C pendant 24 et 48 h, les tubes sont examinés et comparés aux témoins négatif et positif de croissance.

La croissance à 50 °C dans le même milieu de culture a été également testée (Schleifer 2009).

# **3. Culture microbienne et choix du milieu de production**

## **3.1. Production dans les milieux liquides**

La production du principe actif vis-à-vis de *Candida* est étudiée en cultivant l'isolat Cp-LMA-16 dans différents milieux de culture liquides : LB, NB, TSB et LMB (*cf.* Annexe 2). Pour ce faire, des erlenmeyers contenant 25 ml de chaque bouillon à pH ajusté à  $7,0 \pm 0,2$  sont inoculés

par une pré-culture de 24 heures de l'isolat à raison de 1 % (v/v), puis incubés à 30 °C pendant 48 heures sans et avec agitation (125 rpm). Après incubation, des aliquotes de 10 ml sont prélevées et centrifugées pendant 15 min à 4500 rpm. L'activité antifongique des surnageants est déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur disques et sur des puits décrites ci-dessous (*cf.* 7. Tests antifongiques ; p : 84).

### **3.2. Production dans les milieux solides**

Les milieux de culture LB, NB, TSB et LMB supplémentés d'agar bactériologique à 2 % (p/v) sont utilisés pour la fermentation solide. Le pH de chaque milieu est également ajusté à  $7\pm 0,2$  avant l'ajout de l'agar. Après stérilisation, les géloses sont coulées et ensuite pré-incubées à 30 °C pendant 24 heures. Les boîtes sont par la suiteensemencées, en réalisant des stries serrées, par une pré-culture de 24 heures de la souche productrice. Après 48 heures d'incubation à 30 °C, l'activité antifongique dans chaque milieu est testée en utilisant la méthode de diffusion sur des plots d'agar.

### **4. Cinétique de croissance et de production antifongique**

La cinétique de croissance de la bactérie productrice est étudiée dans le bouillon LM, inoculé à raison de 0,1 % (v/v) à partir d'un inoculum frais préalablement préparé dans le même milieu de culture et ajusté à une  $DO_{600}$  de 0,7. Le bouillon inoculé est incubé à 30 °C pendant 3 jours sous agitation continue (80 rpm). Pour chaque prélèvement, la densité optique de la culture bactérienne est lue à 600 nm par un spectrophotomètre UV-visible. La cinétique de production antifongique est accomplie par un suivi de l'activité antifongique via la méthode de diffusion sur disques et sur des puits (*cf.* 7. Tests antifongiques ; p : 84).

### **5. Extraction du principe actif**

Afin d'extraire le principe actif produit par l'isolat étudié, une fermentation permettant une production antifongique optimale est réalisée. Brièvement, des boîtes de Pétri (diamètre 9 cm) contenant le milieu de culture gélosé LMA sont utilisées pour cultiver la souche productrice suivant le protocole expérimental décrit précédemment. Après incubation à 30 °C pendant 48 heures, la biomasse est écartée par raclage à la surface de la gélose à l'aide d'un racleur stérile. Après confirmation de l'activité antifongique, le milieu gélosé restant a subi une extraction par macération à température ambiante pendant 2 heures avec des solvants organiques (pureté > 99 %) de polarité



croissante, mais d'une manière séparée : Hexane, chloroforme, dichlorométhane, acétate d'éthyle, acétone, n-butanol et méthanol. Après filtration sur papier Whatman n°1, le solvant est évaporé sous vide à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (BUCHI). Chaque extrait obtenu est testé pour son activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans* par la méthode de diffusion sur disques (cf. 7. Tests antifongiques ; p : 84).

## **6. Spectre d'action antimicrobienne de l'extrait**

Le spectre d'action antimicrobienne de l'extrait obtenu par macération au méthanol de la culture solide de l'isolat Cp-LMA-16 a été étudié sur les différentes souches indicatrices citées dans le Tableau 3. Le protocole adopté consiste à préparer une solution de l'extrait méthanolique dans une solution aqueuse de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 2 % (v/v). Cette solution de l'extrait (60 mg/ml) est filtrée à travers un filtre millipore (0,2 µm) avant d'étudier son pouvoir antimicrobien.

L'étude du spectre d'action a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques (antibiogramme) pour les bactéries, et ce conformément aux normes publiées par l'institution américaine CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI 2012). Ainsi, des boîtes contenant la gélose Mueller Hinton Agar (MHA) (cf. Annexe 2) ont été préparées et pré-incubées pendant 24 h à 30 °C. L'inoculum bactérien est préparé par la méthode de la suspension directe à partir des colonies selon le protocole précédemment décrit (cf. Chapitre I. préparation de l'inoculum microbien ; p : 62). Le protocole adopté consiste à inoculer par la suite les géloses MHA avec les inocula bactériens fraîchement préparés et de déposer à la surface de ces géloses des disques stériles (6 mm de diamètre) et les imbiber par 10 µl de la dilution de l'extrait. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 18-24 h. Les zones d'inhibition sont mesurées en mm et les essais sont réalisés en trois répétitions.

Pour *C. albicans* le test a été réalisé par la méthode de diffusion sur disques selon le protocole décrit ci-dessous.

## **7. Tests antifongiques**

### **7.1. Méthode de diffusion sur plots d'agar**

La production antifongique par la fermentation solide de l'isolat étudié (réalisée dans différents milieux de culture) est testée via la méthode de diffusion sur des plots d'agar détaillée précédemment (*cf.* Chapitre I. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne p : 62).

### **7.2. Méthode de diffusion sur disques**

L'activité antifongique des différentes fermentations liquides et celle des extraits obtenus par macération dans les différents solvants organiques, ainsi que le spectre d'action de l'extrait méthanolique ont été évalués vis-à-vis de *C. albicans* par la méthode de diffusion sur disques selon le protocole décrit par Gajbhiye *et al.* (2009).

En effet, des boîtes de Pétri contenant le milieu YPG sont inoculées par une suspension de *C. albicans* ATCC 10231 préalablement ajustée à la turbidité 0,5 McFarland. Par la suite, des disques stériles (diamètre de 6 mm) sont déposés à la surface des boîtes inoculées et chaque disque est imprégné avec un volume de 10 µl de chaque surnageant ou de l'extrait dilué dans le DMSO à 2 % (v/v) à la concentration de 60 mg/ml. Ensuite, les boîtes sont placées à 4 °C pendant 2 heures avant d'être incubées à 30 °C. Les zones d'inhibition sont mesurées après 48 heures d'incubation. Chaque test est réalisé en triplicata.

### **7.3. Méthode de diffusion sur des puits**

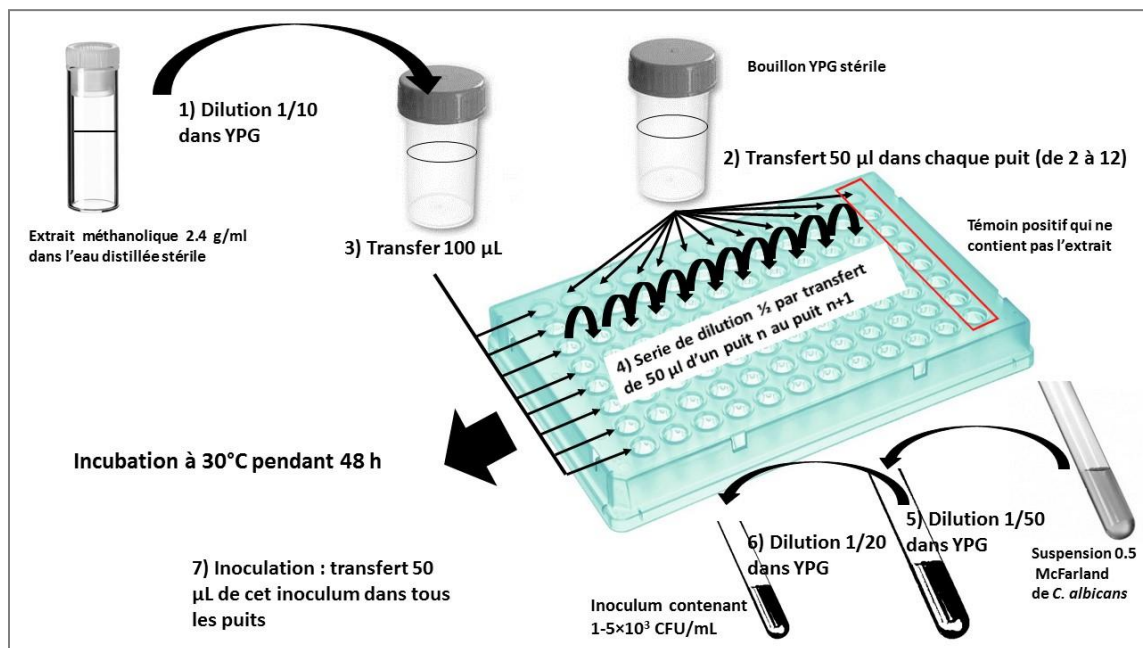
Après l'échec de la révélation de l'activité antifongique résiduelle des aliquotes prélevées au cours de l'étude de la cinétique de production par la méthode de diffusion sur disques, nous avons eu recours à la méthode de diffusion sur des puits.

En effet, le protocole adopté pour cette méthode est celui décrit par Magaldi *et al.* (2004), avec quelques modifications. Comme pour la méthode de diffusion sur disques, des boîtes de Pétri contenant le milieu YPG sont inoculées par un inoculum de *C. albicans* ATCC 10231 préalablement ajusté à 0,5 McFarland. Par la suite, des puits (diamètre de 6 mm) sont creusés dans la gélose inoculée à l'aide d'un emporte-pièce stérile, et chaque puits est rempli avec un volume de 80 µl du surnageant de chaque aliquote. Ensuite, les boîtes sont placées à 4 °C pendant 2 heures

avant d'être incubées à 30 °C. Les zones d'inhibition sont mesurées après 48 heures d'incubation. Chaque test est réalisé en triplicata.

#### **7.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale fongicide (CMF)**

La CMI de l'extrait méthanolique bioactif vis-à-vis de *C. albicans* est déterminée par la méthode de microdilution selon les recommandations de CLSI (2002), avec certaines modifications (Figure 24). En effet, une série de dilutions doubles de l'extrait méthanolique dans le bouillon YPG (allant de 240 à 0,24 mg/ml) est préparée dans une microplaque stérile de 96-puits. Les puits de la colonne (12) ne contiennent que 50 µl du bouillon YPG stérile, ils sont ainsi considérés, après inoculation, comme des témoins positifs de croissance.



**Figure 24 :** Illustration de la méthode de microdilution adoptée pour la détermination de la CMI de l'extrait méthanolique (Balouiri *et al.* 2016)

L'inoculum de la souche test (*C. albicans* ATCC 10231) est préparé par une double dilution de la suspension de cette souche, préalablement préparée dans l'eau physiologique et ajustée à 0,5 McFarland. La première dilution réalisée dans le bouillon YPG est de 1/50, suivie d'une deuxième dilution de 1/20, toujours dans le même bouillon. Il en résulte une suspension de la souche test avec

une concentration de  $1 \times 10^3$  à  $5 \times 10^3$  UFC/ml. Puis, 50  $\mu$ l de cette suspension sont ajoutés à chacun des puits de la microplaque, de sorte à avoir une concentration finale de *C. albicans* de  $0,5 \times 10^3$  à  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml dans chaque puits. Ainsi, les concentrations finales de l'extrait dans la série seraient arrangées de 120 à 0,12 mg/ml.

La microplaque est ensuite incubée à 30 °C pendant 48 heures sans agitation. La croissance fongique est examinée à l'œil nu dans chaque puits et comparée au témoin de croissance. La CMI est lue comme étant la plus faible concentration de l'extrait méthanolique capable d'inhiber la croissance de *C. albicans*.

Ensuite des aliquotes de 4  $\mu$ l ont été prélevées de chaque puits négatif (qui ne montrait pas une croissance fongique), et déposées sur des géloses YPG neuves. Après 24-48 h d'incubation, les boîtes sont examinées, et la concentration minimale fongicide (CMF) est déterminée comme étant la plus faible concentration de l'extrait méthanolique où aucune croissance n'est observée.

## **8. Effet du pH, de la chaleur et de l'action des protéases sur l'activité inhibitrice**

La stabilité de l'activité antifongique en milieu acide ou basique est testée en ajustant le pH des solutions aqueuses de l'extrait actif aux valeurs désirées (pH 2,0 ; pH 7,0 et pH 10,0) avec des solutions de HCl (1 N) et NaOH (1 N). Les tubes sont ensuite incubés pendant 2 heures à 25 °C, puis le pH de chaque tube est mené à  $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ . L'activité antifongique de l'extrait traité contre *C. albicans* est évaluée par la méthode de diffusion sur disques.

La thermostabilité de l'extrait actif est évaluée par traitement thermique, au bain-marie à 100 °C pendant 30 min et par autoclavage (121 °C, 15 min, 1 bar), des tubes contenant des solutions aqueuses de l'extrait actif à une concentration de 60 mg/ml. La méthode de diffusion sur disques est utilisée pour évaluer l'activité antifongique de l'extrait traité contre *C. albicans*.

La sensibilité aux enzymes protéases est également étudiée en utilisant la trypsine et la protéinase K. Ainsi, 0,5 ml de la solution aqueuse de l'extrait actif à 60 mg/ml est additionné séparément de 0,5 ml de la solution de chacune des deux enzymes. Les solutions enzymatiques ont été préalablement préparées à une concentration finale de 1 mg/ml dans le tampon phosphate de sodium (PBS : pH 7,0 : cf. Annexe 2) et stérilisées par filtration (0,45  $\mu$ m). Les tubes sont mélangés et incubés à 37 °C pendant 2 heures.

L'activité antifongique résiduelle des extraits traités et les solutions enzymatiques (contrôles négatifs) est testée par la technique de diffusion sur disques.

## **9. Séparation chromatographique et bioautographie**

### **9.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Dans le but de séparer et de localiser la fraction active de l'extrait étudié, celui-ci a subi une chromatographie sur couche mince (CCM) ascendante. Brièvement, 20 mg de l'extrait ont été mis en suspension dans 500 µl du méthanol analytique. Ensuite, des spots ont été déposés à partir de cette solution sur une plaque CCM (Merck silica gel 60G). Les spots sont séchés à l'aide d'un séchoir et la plaque est déposée verticalement dans une cuve saturée par la phase mobile constituée d'un mélange de solvant : dichlorométhane, méthanol, eau (65:32:3). Les chromatogrammes sont séchés avant d'être visualisés sous UV (254 et 366 nm).

### **9.2. Bioautographie**

Pour localiser la tache active sur le chromatogramme obtenu, nous avons opté pour une bioautographie par la technique d'immersion<sup>‡</sup> (Choma et Grzelak 2011). En effet, le chromatogramme a été stérilisé par exposition aux rayons UV pendant 2 heures, puis il est déposé dans une boîte de Pétri stérile et recouvert par une gélose PDA liquéfiée (0,7 % (p/v) d'agar) préalablement inoculée par *C. albicans* à la concentration finale de 10<sup>6</sup> UFC/ml. La boîte est ensuite déposée à 4 °C pendant 2 heures pour permettre une bonne diffusion des molécules à travers la gélose, avant qu'elle soit incubée à 30 °C pendant 24 heures. La zone d'inhibition et son rapport frontal correspondant (Rf) ont été ainsi déterminés.

### **9.3. Chromatographie préparative sur couche mince (CCM)**

Une chromatographie sur couche mince ascendante préparative a été également effectuée avec les mêmes conditions opératoires décrites ci-dessus. Brièvement, 200 mg de l'extrait méthanolique ont été suspendus dans 1 ml du méthanol analytique. Sur une plaque CCM en verre (Plaque finie CCM SIL G-25 UV<sub>254+366</sub> Macherey-Nagel), l'extrait est minutieusement déposé sous forme d'une ligne à l'aide d'une micropipette. Après séchage, la plaque est déposée dans une cuve contenant 40 ml de la phase mobile (dichlorométhane, méthanol, eau 65:32:3). A la fin de la migration et après avoir séché le chromatogramme, la bande ayant le même Rf que celui déterminé via la bioautographie (0,7), est grattée du chromatogramme à l'aide d'un scalpel et la silice obtenue

---

<sup>‡</sup> Agar-overlay bioassay

est mise en suspension dans 6 ml du méthanol. Après centrifugation pendant 15 min à 5000 rpm, le solvant est aspiré et la silice est resuspendue dans le méthanol. Après trois lavages de la silice, le solvant récupéré est évaporé sous vide, et le résidu restant est récupéré dans 100 µl de DMSO à 2 %. Le mélange est soumis à une sonication à 35 KHz pendant 20 min afin d'assurer une solubilisation optimale. L'activité antifongique du mélange est évaluée par la méthode de diffusion sur disques.

#### **9.4. Fractionnement**

Une chromatographie liquide sur gel de silice a été exécutée pour fractionner l'extrait actif. L'extrait est solubilisé dans le méthanol et mélangé avec 4 g du gel de silice, puis le solvant est évaporé sous vide (Uddin *et al.* 2014). Une colonne de 2 cm de diamètre et 20 cm de longueur est remplie de 40 g du gel de silice (Merck Silica gel 60 G). La phase mobile qui nous a servis pour l'élution est constituée par le système de solvants déjà préétabli (dichlorométhane, méthanol, eau 65:32:3). Après élution, un contrôle par CCM de chaque tube a été fait et les éluats ayant le même profil chromatographique ont été rassemblés. Ensuite, chaque fraction obtenue est testée vis-à-vis de *C. albicans* par la technique de diffusion sur disques.

## Résultats et discussion

### 1. Identification de l'isolat Cp-LMA-16

#### 1.1. Activité antifongique de l'isolat Cp-LMA-16 : critère de choix

L'isolat 16 obtenu à partir de la rhizosphère de *Calotropis procera* Ait. (Cp-LMA-16) a la particularité d'exercer un pouvoir antifongique très puissant vis-à-vis de *Candida albicans*, avec une zone d'inhibition de croissance de  $36,33 \pm 1,15$  mm (Figure 25). Une autre particularité de cet isolat est son isolement à partir du milieu de culture LMA dont la source de carbone et d'énergie est assurée par l'extrait de malt, communément utilisé pour isoler et cultiver les champignons.



**Figure 25 :** Activité antifongique de l'isolat Cp-LMA-16 vis-à-vis de *C. albicans* ATCC 10231 révélée par la méthode de diffusion sur des plats d'agar

#### 1.2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques

L'examen microscopique de l'isolat Cp-LMA-16 après coloration de Gram et coloration au vert de malachite a montré qu'il s'agit d'un bacille à Gram-positif à bouts ronds et à spores subterminales non déformantes. L'observation morphologique des colonies formées sur la gélose LB et sur la gélose nutritive, additionnée de 0,03 % de  $MnSO_4$ , a révélé les mêmes caractéristiques morphologiques. Ainsi, les colonies observées sont plates dont l'aspect est granuleux, à bords irréguliers, opaques, blanches à beiges. Ces caractéristiques sont partiellement en accord avec celles rapportées pour deux espèces appartenant au genre *Bacillus* (*B. licheniformis* et *B. subtilis*) (Rivardo *et al.* 2009).

En outre, l'isolat Cp-LMA-16 est catalase positif, capable d'hydrolyser la gélatine et d'utiliser le citrate. Il est négatif pour la réduction des nitrates et la production de l'H<sub>2</sub>S. La bactérie étudiée est également capable de croître à 50 °C, ainsi que dans un intervalle de pH entre 6 et 8. Elle tolère le sel (NaCl) à une concentration maximale de 5 % (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Caractères biochimiques et caractéristiques de croissance de l'isolat Cp-LMA-16

Test	Résultat	Test	Résultat
β-galactosidase	+	Voges-Proskauer	+
Arginine dihydrolase	-	Production d'indole	-
Lysine décarboxylase	-	Hydrolyse de la gélatine	+
Ornithine décarboxylase	-	Catalase	+
Utilisation de citrate	+	Réduction des nitrates	-
Production de H <sub>2</sub> S	-	Tryptophane désaminase	-
Uréase	-	Croissance à pH	
Croissance à 50° C	+	4	-
Croissance à NaCl % (p/v)		6	+
0	+	5	+
5	+	7	+
7	-	8	+
10	-	9	-

### 1.3. Identification moléculaire

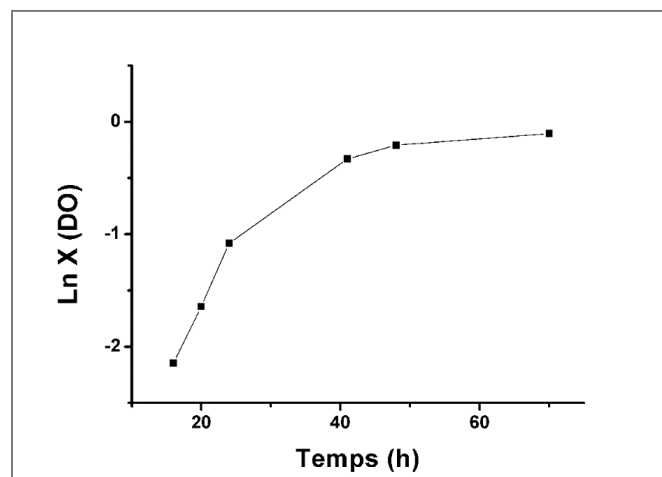
L'identification moléculaire de l'isolat Cp-LMA-16 a permis de l'affilier au genre *Bacillus* avec un degré de similarité, de l'amplifier du gène codant l'ARNr 16 S, de 98 % avec les deux espèces : *Bacillus subtilis* (accession no JF834076.2) et *Bacillus tequilensis* (accession no JN660079.1). Cette dernière est un bacille sporulant qui a été isolé pour la première fois d'une tombe âgée approximativement de 2000 ans à Jalisco (Mexique) (Gatson *et al.* 2006). Pour distinguer entre les deux espèces, ces auteurs ont recommandé l'utilisation d'autres méthodes d'analyse phylogénétique, y compris l'hybridation de l'ADN, l'analyse du profil en acides gras cellulaires et l'électrophorèse de l'ADN digéré par NotI en champ pulsé (Gatson *et al.* 2006). *Bacillus tequilensis* a été isolé par la suite à partir du sol (Dastager *et al.* 2011), et sa capacité à produire des lipopeptides antimicrobiens a été récemment rapportée (Pathak *et al.* 2014).



## 2. Cinétique de croissance et de production antifongique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16

La cinétique de croissance de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16, illustrée dans la Figure 26, et de la production anti-*Candida* sont étudiées dans le bouillon LM à 30 °C sous agitation continue (80 rpm).

En utilisant la méthode de diffusion sur disques, aucune activité inhibitrice résiduelle dans les aliquotes prélevées pour les différentes durées d'incubation n'a été décelée. Toutefois, avec la méthode de diffusion sur des puits, nous avons pu discerner un début de production après 48 heures d'incubation, qui atteint son maximum après 3 jours d'incubation et commence à baisser dès le quatrième et le cinquième jour.



**Figure 26 :** Cinétique de croissance de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 dans le milieu LMB à 30 °C

Compte tenu de la cinétique de croissance (Figure 26), il s'avère que la production du principe actif anti-*Candida* par notre isolat survient à la fin de la phase exponentielle, et se poursuit au cours de la phase stationnaire. Cette production ne semble pas être étroitement liée à la croissance du microorganisme producteur, suggérant ainsi son appartenance au métabolisme secondaire.

## 3. Production, extraction et spectre d'activité de l'extrait actif

### 3.1. Choix du milieu de production du principe antifongique

Dans le but de choisir le milieu de culture permettant une production antifongique acceptable par *Bacillus* sp. Cp-LMA-16, quatre milieux de culture sont testés, y compris le milieu

qui a permis son isolement. Les trois autres milieux de culture sont souvent utilisés pour cultiver les bactéries non exigeantes. Après 48 heures d'incubation, l'activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans* est évaluée par la méthode de diffusion sur des puits pour les bouillons et la méthode de diffusion sur des plots d'agar pour les milieux gélosés. Les résultats qui montrent les diamètres des zones d'inhibition observées sont rassemblés dans le Tableau 10.

D'après ces résultats, une meilleure production antifongique est obtenue dans la gélose LMA (le milieu d'isolement). De plus, une activité inhibitrice modérée est détectée pour la gélose nutritive (NA) et la gélose LB, néanmoins aucune production antifongique n'est observée pour la gélose TSA.

**Tableau 10 :** Activité antifongique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 sur différents milieux de culture solides et liquides

Milieu de culture	Bouillon		Gélose
	Avec agitation	Sans agitation	
LM	15,66 ± 1,52	22,00 ± 3,00 <sup>a</sup>	36,33 ± 1,15 <sup>a</sup>
TS	-	-	-
LB	-	10,66 ± 0,57 <sup>b</sup>	11,33 ± 0,57 <sup>b</sup>
Nutritif (ve)	-	10,00 ± 1,00 <sup>b</sup>	11,66 ± 1,15 <sup>b</sup>

Les résultats sont exprimés en diamètre des zones d'inhibition. Le diamètre du disque ou du plot (6 et 8 mm, respectivement) est inclus.

Les moyennes de la même colonne qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes (P<0,05) (Test de Tukey).

Mis à part le milieu LMB qui a donné une activité inhibitrice moyenne, aucune activité anti-*Candida* n'est observée pour les fermentations liquides effectuées avec agitation dans les bouillons TS, LB et le bouillon nutritif. Cependant, dans les conditions stationnaires, la fermentation dans le bouillon LM a permis une production antifongique avec un diamètre de la zone d'inhibition (22 mm) significativement supérieur à celui de la zone obtenue avec agitation (15,66 mm) (P<0,05). De plus, une faible activité inhibitrice est décelée pour le bouillon nutritif (NB) et le bouillon LB. Quant au bouillon TS, aucune activité inhibitrice n'est discernée dans les deux conditions de l'expérience.

En pratique, nous avons utilisé des milieux de culture empiriques dans le but de choisir celui qui permettrait une production acceptable de la fraction antifongique. Une étude

d'optimisation du milieu de production en utilisant la méthodologie des plans d'expérience est déjà entamée.

Par ailleurs, il est important de signaler que si les *Bacillus* produisent une large gamme de métabolites antimicrobiens dans différents milieux de culture (e.g BHI, NB, TSB, LB et des milieux synthétiques) (Földes *et al.* 2000, Rivardo *et al.* 2009, Gajbhiye *et al.* 2010, Sriram *et al.* 2011, Kumar, Nambisan, *et al.* 2013, El-Naggar *et al.* 2014), la production antifongique par notre souche est importante dans la gélose LMA, par rapport aux autres géloses testées.

La production des métabolites antimicrobiens par les *Bacillus* a été rapportée dans les milieux liquides et solides (Chitarra *et al.* 2003, Intana *et al.* 2008, Khalil *et al.* 2009). En effet, Kumar *et al.* (2009), ont trouvé un maximum de production antifongique par *B. subtilis* dans le milieu TSB, alors qu'aucune production n'a été observée par notre isolat dans ce milieu dans ses deux états, liquide et gélosé. Toutefois, dans la même étude, les auteurs ont observé que la production antifongique par *B. subtilis* était plus importante dans les conditions stationnaires, alors que la croissance du microorganisme était plus importante sous agitation (Kumar *et al.* 2009), ce qui corrobore nos résultats.

La fermentation solide dans la gélose LMA, qui a permis une production antifongique maximale, a été adoptée pour la suite de l'étude. Toutefois, il est important de signaler que la fermentation liquide dans le même milieu de culture et dans les conditions stationnaires a été également envisagée afin d'extraire le principe actif par différentes méthodes, mais sans succès.

### **3.2. Extraction des composés antifongiques**

La gélose LMA récupérée après élimination de la biomasse de la fermentation solide par *Bacillus* sp. Cp-LMA-16, nous a servie comme matrice de premier choix pour une extraction solide-liquide en utilisant différents solvants organiques. Le Tableau 11 montre l'activité antifongique extractible par les solvants utilisés.

Bien que l'extraction ait fait sur la gélose ayant subi à priori une lyophilisation, mais celle-ci n'ait pas abouti à en extraire le principe actif par tous les solvants utilisés (Tableau 11). C'est à partir de la gélose non lyophilisée que celui-ci est extrait via l'acétone et le méthanol, avec des zones d'inhibition relativement proche de 33,66 et 30,00 mm, respectivement.

**Tableau 11** : Activité antifongique des extraits obtenus par extraction solide-liquide vis-à-vis de *C. albicans*

Solvant organique	Activité antifongique extractible	
	Gélose non lyophilisée	Gélose lyophilisée
Hexane	-	-
Chloroforme	-	-
Dichlorométhane	-	-
Acétate d'éthyle	-	-
Acétone	33,66 ± 0,57	-
n-butanol	-	-
Méthanol	30,00 ± 1,73	-

Les résultats sont exprimés en diamètre des zones d'inhibition. Le diamètre du disque (6 mm) est inclus.

Par ailleurs, nous avons essayé d'extraire la fraction active à partir du bouillon LMB en utilisant différentes méthodes : l'extraction solide-liquide par différents solvants organiques après lyophilisation du bouillon, l'extraction liquide-liquide par solvants organiques non miscibles avec l'eau (hexane, acétate d'éthyle, butanol, chloroforme et dichlorométhane), la précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, la précipitation par pH et l'extraction par résine d'Amberlite XAD-16 qui est souvent utilisée pour extraire et purifier les antibiotiques, les stéroïdes solubles dans l'eau, les enzymes et les acides aminés ainsi que les protéines. Or, aucune de ces méthodes n'est parvenue à extraire le principe d'intérêt à partir du bouillon LM fermenté.

L'affinité du principe antifongique étudié à l'acétone et au méthanol suggère que celui-ci est fortement polaire. D'ailleurs, son affinité importante à l'eau, constatée du fait que la gélose lyophilisée n'a pas permis son extraction avec les mêmes solvants, est un argument en faveur de sa polarité très importante. Un autre argument à l'appui de cette suggestion est l'échec de l'extraction liquide-liquide, qui a été faite avec des solvants apolaires (hexane et chloroforme) et moyennement polaires (dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol).

La diversité de la nature chimique des métabolites antimicrobiens produits par les *Bacillus* est reflétée par les différentes méthodes et les solvants organiques qui ont permis l'extraction de

ces molécules à partir de leurs milieux de production dans de nombreuses études antérieures (Ahimou *et al.* 2000, Tamehiro *et al.* 2002, Wu *et al.* 2005, Sansinenea et Ortiz 2011).

Par exemple, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, le n-butanol et le méthanol ont été rapportés (Intana *et al.* 2008, Kumar *et al.* 2009, Rivardo *et al.* 2009, Lee, Cho, *et al.* 2017). De même, la précipitation au sulfate d'ammonium et la résine d'Amberlite XAD-16 ont également permis l'extraction des métabolites antimicrobiens de *Bacillus* sp. (Chen *et al.* 2009, Tan *et al.* 2013).

Dans cette étude, le principe actif doté du pouvoir antifongique est obtenu par une extraction solide-liquide par l'acétone ou le méthanol à partir du milieu gélosé LMA. Comme il a été déjà expliqué, ce résultat implique que sa polarité est très importante. Ainsi, compte tenu des molécules antimicrobiennes produites par les bactéries du genre *Bacillus* sp. rapportées dans la littérature, la nature protéique, peptidique, lipopeptidique ou polycétide (qui sont de nature chimique très hétérogène) de notre principe actif sont suspectées.

### **3.3. Spectre d'activité de l'extrait méthanolique et détermination de la CMI/CMF**

L'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 est testée vis-à-vis de toutes les souches microbiennes indicatrices (Tableau 3), et ce conformément aux normes internationales de l'antibiogramme (CLSI 2012).

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait d'intérêt est dépourvu de toute activité antibactérienne, du moins vis-à-vis de toutes les bactéries indicatrices utilisées dans cette étude. Par ailleurs, l'activité antifongique contre *C. albicans* ATCC 10231 est confirmée par l'apparition d'une zone d'inhibition avec un diamètre de 23,33 mm.

En outre, l'activité de l'extrait étudié est testée vis-à-vis de deux autres souches de *Candida*, à savoir ; *C. tropicalis* isolé et répertorié dans la banque du laboratoire de biotechnologie microbienne (Faculté des Sciences et Techniques-Fès) et une souche clinique pathogène de *C. albicans*, ainsi qu'un champignon filamenteux, *Aspergillus brasiliensis*. Les résultats obtenus ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis de l'isolat clinique *C. albicans* avec un diamètre de 21,33 ± 0,57 mm, mais la croissance de *C. tropicalis* et *A. brasiliensis* n'a pas été affectée. Conséquemment, ces résultats présentent une activité antifongique spécifique à l'espèce *C. albicans*.

L'activité antifongique de l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 vis-à-vis de *C. albicans* ATCC 10231 est caractérisée par une CMI de 60 mg/ml qui est égale à la CMF. Ce ratio CMF/CMI = 1 est à l'appui d'une activité fongicide contre la souche cible.

En examinant les études qui se sont menées sur les molécules anti-*Candida albicans* produites par les bactéries du genre *Bacillus*, un lipopeptide cyclique produit par *B. amyloliquefaciens* doté d'une forte activité anti-*Candida albicans*, a été également actif sur d'autres levures : *Metschnikowia bicuspidata*, *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica* et *Saccharomyces cerevisiae* (Song *et al.* 2013). De même, l'antéiso-C17 mycosubtiline (lipopeptide) produite par *B. subtilis* et purifiée par Fickers *et al.* (2009) est active sur les levures, y compris *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. glabrata*, mais inactive sur les champignons filamenteux.

En outre, il a été démontré que des lipopeptides cycliques de la famille des bacillomycines avaient aussi la capacité d'inhiber différentes espèces de *Candida*, non seulement en mode planctonique mais aussi en biofilms (Ramachandran *et al.* 2017). Ces auteurs ont trouvé des ratios CMF/CMI= 1 exercés sur la majorité des cellules planctoniques testées, qui impliquent l'action fongicide de ces molécules, et qui a été confirmée par l'étude de leurs cinétiques du pouvoir fongicide (*Time-kill curve*) (Ramachandran *et al.* 2017). De même, les ratios CMF/CMI rapportés pour des lipopeptides produits par *B. subtilis* sont égaux à 1 et ne dépassent pas 2 pour toutes les souches de *Candida* testées (Tabbene *et al.* 2011).

Compte tenu de ces études, il s'avère essentiel de confirmer le spectre d'activité antifongique ainsi que le type de l'action inhibitrice (fongicide ou fongistatique/ temps ou concentration dépendante) du principe actif produit par *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 après sa purification en incluant d'autres espèces fongiques de référence.

#### **4. Effet du traitement thermique, du changement de pH et des protéases sur l'activité de l'extrait méthanolique**

Étant donné qu'une grande majorité des substances antimicrobiennes produites par les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont de nature protéique, nous avons étudié l'impact du traitement thermique, des protéases et des changements de pH sur l'activité antifongique de l'extrait méthanolique. Dans le Tableau 12 sont représentés les diamètres des zones d'inhibition de *C. albicans* exhibées par l'extrait méthanolique ayant subi les différents traitements.

**Tableau 12 :** Impact du traitement thermique, du changement de pH et de l'action des protéases sur l'activité antifongique de l'extrait méthanolique vis-à-vis de *C. albicans*

Traitement	Zone d'inhibition (mm)
Témoin positif	23,33 ± 0,57
Traitement thermique	
100 °C pendant 30 min	21,33 ± 0,57**
Autoclavage (121 °C pendant 15 min)	20,66 ± 0,57***
Changement de pH	
2,0 ± 0,2	23,33 ± 0,57
7,0 ± 0,2	23,33 ± 0,57
10,0 ± 0,2	23,33 ± 0,57
Traitement enzymatique	
Trypsine	20,66 ± 0,57***
Protéinase K	21,33 ± 0,57**

Les résultats sont exprimés en diamètre des zones d'inhibition. Le diamètre du disque est inclus (6 mm).  
Test de Dunnett; \*(p<0,05) ; \*\*(p<0,01) ; \*\*\*(p<0,001).

En général, les résultats obtenus ont montré que le pouvoir anti-*Candida* de l'extrait méthanolique subsiste après les différents traitements exécutés. Toutefois, l'analyse statistique des résultats indique une diminution significative des diamètres des zones d'inhibition obtenues après traitement thermique ou enzymatique par les protéases testées, par rapport au témoin positif qui correspond à l'extrait non traité ( $P < 0,05$ ) (Tableau 12). Pourtant, il n'y a pas de différence significative entre les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour ces deux traitements lorsqu'ils sont comparés entre eux ( $P > 0,05$ ).

En effet, l'analyse statistique montre que le traitement thermique et le traitement par les deux protéases diminuent significativement l'activité antifongique de l'extrait étudié comparée à celle du témoin positif ( $P < 0,01$ ). Pourtant, l'extrait traité maintient une bonne activité antifongique, ce qui suggère sa thermostabilité et sa résistance à l'action des deux protéases.

Quant à l'effet du pH, les résultats montrent que les pH fortement acides ou alcalins n'ont aucun impact significatif sur l'activité anti-*Candida* de l'extrait, prouvant ainsi la stabilité du/des principe(s) actif(s) dans des pH acides et alcalins.

Ces résultats infirment éventuellement l'hypothèse de la nature protéique du principe actif étudié. Toutefois, sa nature lipopeptidique, peptidique et polycétide ne peuvent pas être écartées dans la mesure où les tests menés sur trois lipopeptides de la classe des bacillomycines D, produits par *B. subtilis* et ayant une activité anti-*Candida*, ont montré qu'ils ont conservé 100 % de leur activité jusqu'à une température de 90 °C, puis ils ont perdu 30 % de cette activité après autoclavage (121 °C pendant 20 min). De plus, ils sont également stables à des pH allant de 2 à 10 et résistants à l'action des protéases (protéinase K, trypsine et  $\alpha$ -chymotrypsine), mais sensibles à la lipase A (Tabbene *et al.* 2011).

En outre, l'impact du traitement thermique et de la variation du pH sur l'activité d'un extrait biosurfactant de *B. subtilis* SPB1 (dont la nature chimique n'a pas été élucidée) ayant une activité antibactérienne et antifongique (y compris contre *C. albicans*) a été étudié (Ghribi *et al.* 2012). Les auteurs ont démontré une diminution progressive de l'activité avec la température, mais l'extrait conserve 25 % de son activité à une température de 90 °C. L'effet du pH était moins important avec une légère diminution de l'activité dans des pH acides, vu que l'extrait conserve plus de 70 % de son activité dans un pH = 1, alors que l'impact du pH alcalin était négligeable (Ghribi *et al.* 2012).

Dans le même sens, des lipopeptides produits par *Bacillus methylotrophicus* se sont montrés résistants à l'action des protéases (pepsine, trypsine et chymotrypsine), au traitement thermique (jusqu'à 100 °C) et au pH alcalin. Néanmoins le pH acide (3 et 5) a partiellement influencé l'activité antibactérienne de ces molécules (Jemil *et al.* 2017).

D'autre part, la baciamine, une protéine de 50 KDa produite par *B. amyloliquefaciens*, a conservé son activité antifongique vis-à-vis des champignons filamenteux après son traitement par la trypsine, et également après traitement thermique allant jusqu'à 100 °C pendant 20 min. L'activité antifongique de la baciamine est également conservée dans un intervalle de pH de 6 à 11, mais elle est totalement perdue à des pH au-dessous de 5 (Wong *et al.* 2008).

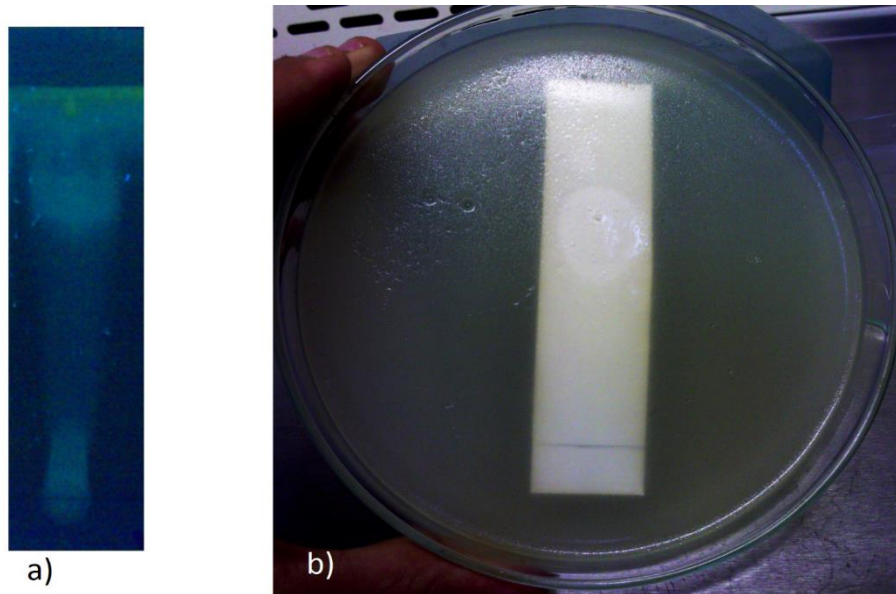
## **5. Isolement de la fraction active**

### **5.1. Chromatographie sur couche mince et bioautographie**

En vue de purifier le principe actif de l'extrait antifongique, nous avons de prime abord opté pour une séparation par chromatographie analytique sur couche mince (CCM). Les chromatogrammes, obtenus par différentes phases mobiles, sont visualisés sous rayons UV, et celui



qui a permis une bonne séparation est gardé pour la suite de l'étude (Figure 27 (a)). Ensuite, la technique de bioautographie est choisie pour localiser d'une manière bioguidée la/les bande(s) antifongique(s) sur le chromatogramme.



**Figure 27 :** Séparation chromatographique et bioautographie de l'extrait acétonique ; a) Chromatogramme sur couche mince visualisé sous rayons UV ; b) Bioautographie du chromatogramme en utilisant *C. albicans* comme souche cible

Sur la base de ce couplage CCM-Bioautographie, une seule bande antifongique caractérisée par un Rf de 0,7 avec la phase mobile constituée de dichlorométhane, méthanol, eau (65:32:3), est localisée (Figure 27(b)).

La bioautographie des chromatogrammes faits avec d'autres phases mobiles a montré l'existence d'une seule zone d'inhibition, suggérant ainsi qu'il s'agit probablement d'une seule molécule qui est responsable de l'activité antifongique.

Par la suite, l'extrait méthanolique est soumis à une chromatographie préparative sur couche mince. Le test de l'activité antifongique de la bande active (repérée à l'aide de son Rf) par la méthode de diffusion sur disques a révélé une activité inhibitrice vis-à-vis de *C. albicans* avec une zone d'inhibition d'un diamètre de 18 mm. D'une part, ceci confirme les résultats obtenus par CCM analytique et bioautographie et rassure, d'autre part, avec les différentes répétitions réalisées, de la

reproductibilité de l'expérience qui est en fait un point indispensable pour procéder au fractionnement par la chromatographie sur colonne.

Il a été rapporté que la fraction bioactive produite par une souche marine de *B. pumilus* (SM H101) a été localisée sur CCM, en utilisant la même phase mobile que nous avons utilisée, avec un Rf de 0,75 (El-Naggar *et al.* 2014). Bien que la nature chimique de ce principe actif (de 875 Da) n'ait pas été déterminée, son Rf relativement proche de celui que nous avons obtenu suggère leur appartenance à la même famille. Toutefois, ces auteurs ont prouvé que ce principe actif est doté d'un spectre d'activité antifongique large (incluant des champignons filamenteux et *C. albicans*) (El-Naggar *et al.* 2014).

## **5.2. Isolement de la fraction active par chromatographie sur colonne**

En utilisant la phase mobile déjà préétablie, l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 est séparé à travers une chromatographie sur colonne de silice, en concomitance avec un suivi par CCM des différents tubes au cours de l'élution. Les neuf fractions obtenues ont été testées par la méthode de diffusion sur disques et la fraction active a été repérée et envoyée pour l'identification par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS).

## **6. Discussion générale**

La souche Cp-LMA-16 isolée à partir de la rhizosphère de *C. procer*a a été phylogénétiquement affiliée au genre *Bacillus*. Les bactéries de ce genre font partie des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes grâce à leur aptitude à produire des molécules antimicrobiennes, des auxines et des sidérophores (Ahmad *et al.* 2008). La plupart des substances antimicrobiennes produites par ces bactéries sont dirigées contre les champignons filamenteux, ce qui leur confère ainsi une place capitale en lutte biologique contre les phytopathogènes (Lee *et al.* 2017, Mardanov *et al.* 2017, Rajaofera *et al.* 2017).

En dehors des phytopathogènes, peu d'études ont rapporté l'activité des *Bacillus* contre les champignons pathogènes pour l'Homme, notamment *C. albicans* (Raaijmakers *et al.* 2010). En examinant les différentes classes des antimicrobiens produites par les *Bacillus*, nous apercevons que les lipopeptides sont les agents anti-*Candida* les plus connus (Fickers *et al.* 2009, Song *et al.*

2013, Rautela *et al.* 2014, Ramachandran *et al.* 2017). Certains lipopeptides sont également actifs contre des bactéries et d'autres espèces fongiques (Jemil *et al.* 2017).

À travers cette étude nous avons démontré de nombreuses propriétés du principe actif étudié, en particulier sa forte affinité pour l'eau, son effet fongicide, sa thermorésistance, sa stabilité dans des pH acides et alcalins, ainsi que sa résistance aux traitements protéolytiques par la trypsine et la protéinase K. Tous ces éléments sont en faveur de sa nature lipopeptidique, qui reste à confirmer, bien que d'autres natures chimiques ne puissent pas être totalement écartées. En outre, cette suspicion des lipopeptides est renforcée avec l'effet de l'extrait méthanolique que nous avons démontré sur les propriétés physicochimiques de la surface cellulaire de *C. albicans* et la surface de deux alliages dentaires (*cf.* Chapitre III. p : 103), étant donné que ces molécules sont très connues par ce genre de pouvoir, par surcroît à leurs effet antiadhésif et antibiofilm (Rivardo *et al.* 2009, Rautela *et al.* 2014). En outre, les souches de *Bacillus* productrices des lipopeptides sont souvent isolées à partir du sol et en association avec les plantes, mais elles peuvent être isolées à partir d'autres niches biologiques (Raaijmakers *et al.* 2010).

Généralement, trois familles de lipopeptides sont produites par les membres de *Bacillus*, les surfactines, les iturines et les fengycines (Figure 17), et dont la biosynthèse est régulée par le *quorum sensing* (Raaijmakers *et al.* 2010). D'ailleurs, Il s'est avéré que l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la surfactine augmente avec la densité cellulaire, et survient notamment au moment de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Raaijmakers *et al.* 2010), et c'est en fait ce que nous avons pu trouver pour le principe actif étudié. Enfin, l'effet fongicide des lipopeptides a été attribué chez *C. albicans* à la perméabilisation membranaire et à la fuite du contenu cellulaire laissant que des cellules fantômes (Rautela *et al.* 2014).

## **Conclusion**

En somme, la souche rhizosphérique Cp-LMA-16 qui a montré une forte activité anti-*Candida* a été sélectionnée dans cette étude. Les résultats obtenus ont montré qu'il s'agit d'une bactérie affiliée au genre *Bacillus*. Une meilleure production du principe actif a été obtenue dans la gélose LMA (son milieu d'isolement). Le principe actif responsable de l'activité anti-*Candida*

est extrait à partir de la gélose LMA fermentée et non lyophilisée par une macération à l'acétone ou au méthanol. L'extrait méthanolique a prouvé sa thermorésistance, sa capacité de tolérer les pH acides et alcalins et de résister à l'action des protéases, mais il a aussi démontré un spectre d'action étroit qui rassure de l'absence de tout impact négatif sur la flore naturelle. Tous ces éléments ne peuvent ainsi qu'appuyer et élargir son champ d'application thérapeutique.

Dans cette optique, nous avons envisagé, dans la suite de ce travail, une éventuelle application du principe actif dans le domaine de la dentisterie. En effet, *C. albicans* est l'agent étiologique majeur des mycoses orales chroniques.

### ***CHAPITRE III***

**EFFET DU TRAITEMENT DE *C. albicans* ET DE DEUX ALLIAGES DENTAIRES PAR L'EXTRAIT METHANOLIQUE SUR LEURS PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DE SURFACE, ET ETUDE DE L'ADHESION FONGIQUE AUX ALLIAGES TRAITES**

## Chapitre III : Effet du traitement de *C. albicans* et de deux alliages dentaires par l'extrait méthanolique sur leurs propriétés physicochimiques de surface, et étude de l'adhésion fongique aux alliages traités

### Introduction

La majorité des antibiotiques conventionnels favorisent l'adhésion et la formation des biofilms par les microorganismes lorsqu'ils sont présents à des concentrations inférieures à leurs CMI. C'est en particulier le cas des  $\beta$ -lactames (ampicilline, oxacilline...), des aminoglycosides (gentamicine, tobramicine...), des macrolides (azithromycine, clarithromycine et érythromycine...) (Kaplan 2011). Ce fait a été associé pour la streptomycine, qui favorise d'une manière indirecte la formation du biofilm par *S. aureus* et *P. aeruginosa* sur le polystyrène, à son action sur les propriétés physicochimiques de surface de ces bactéries (Kumar et Ting 2016). Effectivement, ces constatations ont bouleversé la manière dont nous apercevions ces molécules. C'est pourquoi l'étude de l'impact de toute molécule antimicrobienne, d'une part, sur les paramètres physicochimiques de la surface de ses microorganismes cibles et, d'autre part, sur leur capacité d'adhésion et de formation du biofilm, s'avère impérative dans ce contexte actuel pour assurer le développement de nouveaux agents antimicrobiens efficaces contre les maladies infectieuses. Ainsi, la première partie de ce chapitre s'intéresse à l'étude de l'impact de l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16, appliqué à une concentration subinhibitrice, sur les propriétés physicochimiques de surface de *C. albicans*.

Généralement, la capacité de *C. albicans* de former des biofilms sur les muqueuses et les dispositifs médicaux est un facteur essentiel dans l'installation des candidoses. Dans la cavité orale par exemple, il est estimé que 65 % de la population porteuse des prothèses et des implants dentaires est touchée par des infections prothétiques à *C. albicans*, qui surviennent principalement chez les sujets immunodéprimés (Carolina *et al.* 2015). L'adhésion des cellules fongiques sur la surface de la muqueuse buccale et celle des matériaux insérés est reconnue comme étant l'étape initiale de cette cascade d'évènements qui aboutit à la colonisation et à l'installation des maladies

associées aux biofilms reconnues par leur persistance et leur résistance aux antifongiques (Darouiche 2001, Do Nascimento *et al.* 2013, Taff *et al.* 2013). En l'absence des molécules antiadhésives et antibiofilms efficaces, des échecs d'implantation qui exigent le retrait chirurgical des implants sont très courants (Sbordone et Bortolaia 2003).

L'adhésion est un phénomène très complexe qui dépend d'un ensemble de facteurs. Sur des surfaces abiotiques par exemple, les propriétés physicochimiques de ces dernières ont une importance primordiale (*cf.* Revue bibliographique. III- Facteurs liés à la surface ; p : 32). D'où l'adoption de l'altération des propriétés physicochimiques de la surface des dispositifs médicaux implantables (hydrophobicité, charge de surface, énergie de surface, etc.) comme une approche préventive afin d'endiguer le problème des maladies liées aux biofilms (*cf.* Revue bibliographique : V- Surfaces antiadhésives ; p : 45).

Dans la littérature, les études qui se sont intéressées à l'adhésion de *C. albicans* aux alliages dentaires sont moins nombreuses, en comparaison avec les résines acryliques et d'autres biomatériaux utilisés pour la fabrication des appareils dentaires. Ce qui justifie le cadre de cette partie de notre étude, qui vient appuyer cet axe en s'articulant sur plusieurs volets. Les objectifs fixés consistent en fait à étudier (i) l'effet du préconditionnement de deux alliages dentaires non précieux par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 sur leurs propriétés physicochimiques de surface, (ii) et d'évaluer l'impact de ce préconditionnement sur l'adhésion de *C. albicans* d'un point de vue physicochimique par l'approche XDLVO aussi bien qu'expérimentalement.

Au fond, le but ultime de cette partie vise d'expliquer le mécanisme de l'adhésion de *C. albicans* sur ces alliages dentaires physicochimiquement parlant, et d'étudier le pouvoir antiadhésif de l'extrait antifongique de notre isolat pour une application ultérieure dans des revêtements antiadhésifs sur ces alliages non précieux, qui ont gagné récemment une grande part du marché des matériaux utilisés dans la dentisterie.

## **Matériel et méthodes**

### **1. Conditions de culture, exposition de *C. albicans* à l'extrait méthanolique et préparation du film microbien**

Trois erlenmeyers de 250 ml, contenant chacun 100 ml du bouillon YPG stérile, sont ensemencés par une culture fraîche de *C. albicans* ATCC 10231 de 48 heures. L'incubation est réalisée à 30 °C pendant 48 heures sous agitation orbitale (125 rpm), puis les bouillons sont centrifugés dans des tubes séparés et lavés trois fois par une solution aqueuse stérile de KNO<sub>3</sub> à 0,1 M. Les culots obtenus dans chaque tube sont resuspendus séparément dans 10 ml de KNO<sub>3</sub> à 0,1 M. Ensuite, l'extrait méthanolique de l'isolat Cp-LMA-16 est rajouté dans deux tubes à la concentration subinhibitrice finale de 30 mg/ml. Les tubes sont bien mélangés au vortex puis un tube est incubé à 30 °C pendant une heure et l'autre pendant deux heures. Le troisième tube est considéré comme témoin négatif (non traité).

Pour l'acquisition des angles de contact sur les films de *C. albicans*, le protocole expérimental adopté est celui décrit par Hamadi et Latrache (2008). En effet, la suspension de chaque tube (10 ml) est filtrée à travers un filtre millipore en acétate de cellulose (0,45 µm), préalablement mouillé avec 10 ml de l'eau distillée stérile. Les filtres humides ainsi obtenus sont déposés soigneusement à la surface d'un support de verre (boîte de Pétri) avec des bords opaques et séchés à température ambiante. Des filtres recouverts d'un film ou une pelouse de *C. albicans* sont obtenus et ils ont servi pour les mesures des angles de contact via un goniomètre (GBX, France) (Figure 30).

### **2. Préparation des alliages dentaires et traitement de leur surface par l'extrait méthanolique**

#### **2.1. Prétraitements des alliages dentaires**

Deux matériaux couramment utilisés dans le secteur médical, notamment en dentisterie, ont été sélectionnés pour cette étude. Il s'agit de deux alliages dentaires non précieux, l'un est composé principalement de cobalt et de chrome (Co-Cr) (Mesa, MagnumH60, Italie), et l'autre est composé de nickel et de chrome (Ni-Cr) (Argeloy N.P. (V), Predominantly BASE (PB), EU). Leurs compositions et leurs propriétés physiques sont résumées dans l'Annexe 3.



En premier temps, des échantillons de ces alliages ayant une surface carrée de 100 mm<sup>2</sup> et une épaisseur de 1 mm ont subi une étape de polissage manuel avec un papier abrasif (Imperial Wetordry 2000), pour former des surfaces avec une rugosité fixe. La mesure de ce paramètre physique est faite à l'aide d'un rugosimètre (Mitutoyo Sj 301, Aurora IL, EU). Ainsi, plusieurs mesures sont effectuées par échantillon afin de régler la rugosité de surface moyenne à Ra = 0,04 µm (Figure 28). Tous les échantillons préparés sont ensuite nettoyés par immersion dans une solution d'acétone pure afin d'éliminer tout résidu organique, puis ils sont rincés à l'eau distillée stérile, avant qu'ils soient autoclavés.



**Figure 28 :** Mesure de la rugosité des surfaces des alliages dentaires

## **2.2. Traitement de la surface des alliages dentaires par l'extrait méthanolique**

Les surfaces des alliages dentaires ont été traitées avec l'extrait méthanolique de l'isolat Cp-LMA-16. Le traitement est réalisé par dépôt et étalement d'un volume de 60 µl de la solution de l'extrait (dans le DMSO à 2 %) à la surface de chaque échantillon à une concentration finale de 30 mg/cm<sup>2</sup> pendant des durées d'exposition variables ; 30, 60, 120, 180 et 240 min à température ambiante (25 ± 2 °C). Les échantillons sont ensuite lavés par immersion dans un bain de KNO<sub>3</sub> 0,1 M stérile, et séchés à l'air libre. Le témoin négatif (non traité) n'a subi qu'un rinçage par KNO<sub>3</sub>.

## **3. Détermination des propriétés physicochimiques de surface par la mesure des angles de contact couplée aux calculs par l'équation de Young**

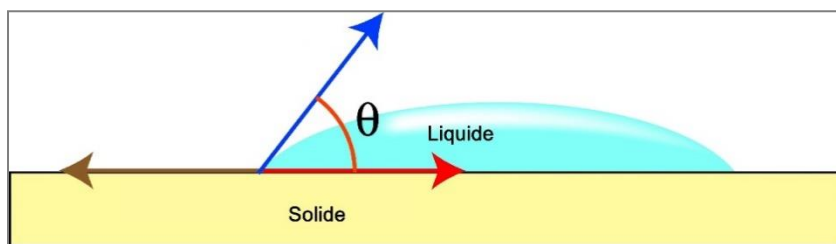
La méthodologie principale sur laquelle se base cette partie consiste à mesurer les angles de contact générés par des gouttelettes liquides déposées sur les surfaces étudiées, à savoir la

surface cellulaire de *C. albicans* et la surface des alliages dentaires. Puis en appliquant l'équation de Young, les composantes de l'énergie de surface sont déterminées.

### **3.1. Principe de la caractérisation physicochimique**

La mesure de l'angle de contact est fondée sur l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte d'un liquide déposée sur le support, avec la surface de celui-ci (Figure 29). La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre de surface. Elle permet en fait la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. Le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface peut être déduit.

D'une manière plus explicite, lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact  $\theta$  (Figure 29).



**Figure 29 :** Représentation de l'angle de contact ( $\theta$ ) d'une goutte déposée sur une surface solide

### **3.2. Détermination des propriétés physicochimiques de surface de *C. albicans* et des alliages dentaires avant et après leur traitement par l'extrait méthanolique**

Les caractéristiques énergétiques ainsi que le degré d'hydrophobicité de la surface cellulaire de *C. albicans* et celles des alliages dentaires ont été obtenus à partir des mesures des angles de contact par la méthode de la goutte posée (sessile) à l'aide d'un goniomètre (GBX, France) (Figure 30).

Les angles de contact ont été mesurés en utilisant trois liquides purs ayant des caractéristiques énergétiques connues (Tableau 13) ; eau distillée, formamide et diiodométhane. Les composantes de l'énergie de surface : Lifshitz Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ),

accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ), et le degré d'hydrophobicité estimé par l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ), ont été déterminés à partir de l'équation de Young (Van Oss *et al.* 1988).



**Figure 30 :** Goniomètre (GBX, France) utilisé pour mesurer les angles de contact

$$\gamma_L(\cos \theta + 1) = 2(\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW})^{1/2} + 2(\gamma_S^+\gamma_L^-)^{1/2} + 2(\gamma_S^-\gamma_L^+)^{1/2} \text{ (Equation 1)}$$

$$\cos \theta = -1 + 2 \frac{(\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW})^{1/2}}{\gamma_L} + 2 \frac{(\gamma_S^+\gamma_L^-)^{1/2}}{\gamma_L} + 2 \frac{(\gamma_S^-\gamma_L^+)^{1/2}}{\gamma_L}$$

Avec

$\gamma_S^{LW}$  : Composante de Lifshitz-Van der Waals de la surface

$\gamma_L^{LW}$  : Composante de Lifshitz-Van der Waals du liquide

$\gamma_S^+$  : Composante accepteur d'électrons de la surface

$\gamma_L^+$  : Composante accepteur d'électrons du liquide

$\gamma_S^-$  : Composante donneur d'électrons de la surface

$\gamma_L^-$  : Composante donneur d'électrons du liquide.

Où  $\gamma_S^{AB} = 2(\gamma_S^-\gamma_S^+)^{1/2}$  (Equation 2)

Et

$$\Delta G_{iwi} = -2 \gamma_{iw} = -2 \left[ \left( (\gamma_i^{LW})^{1/2} - (\gamma_w^{LW})^{1/2} \right)^2 + 2 \left( (\gamma_i^+\gamma_i^-)^{1/2} + (\gamma_w^+\gamma_w^-)^{1/2} - (\gamma_i^+\gamma_w^-)^{1/2} - (\gamma_w^+\gamma_i^-)^{1/2} \right) \right] \text{ (Equation 3)}$$

**Tableau 13 :** Composantes énergétiques des liquides purs utilisés pour les mesures des angles de contact (Van Oss *et al.* 1988)

Liquide	$\gamma^{LW}(\text{mJ}/\text{m}^2)$	$\gamma^+(\text{mJ}/\text{m}^2)$	$\gamma^- (\text{mJ}/\text{m}^2)$
Eau	21,8	25,5	25,5
Formamide	39,0	2,3	39,6
Diiodomethane	50,5	0	0

$\gamma^{LW}$  : Composante de Lifshitz-Van der Waals ;  $\gamma^+$  : Composante accepteur d'électrons ;  $\gamma^-$  : Composante donneur d'électrons.

Étant donné les énergies de surface des trois liquides utilisés, les composantes ( $\gamma^{LW}$ ), ( $\gamma^-$ ) et ( $\gamma^+$ ) des surfaces étudiées ont pu être calculées par la résolution d'un système de trois équations à trois inconnues.

L'hydrophobicité est déterminée qualitativement par l'angle de contact vis-à-vis de l'eau. En effet, selon Vogler (1998) une surface est hydrophobe si son angle de contact vis-à-vis de l'eau dépasse 60 °, et inversement la surface est hydrophile lorsque l'angle contact vis-à-vis de l'eau est inférieur ou égal à cette limite. Or, selon l'approche de Van Oss le degré d'hydrophobicité peut être évalué quantitativement avec l'énergie libre d'interaction  $\Delta G_{iwi}$  (Equation 3). En effet, si  $\Delta G_{iwi}$  est négative la surface est hydrophobe, alors qu'elle est hydrophile dans le cas contraire.

#### **4. Influence du préconditionnement de la surface des alliages dentaires sur l'adhésion théorique de *C. albicans* évaluée par l'approche XDLVO**

Selon le modèle XDLVO (Extended Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek), l'interaction dans une solution aqueuse (L) entre la surface d'un microorganisme (M) et celle d'un support solide (S) est décrite par l'énergie libre totale d'interaction ( $\Delta G_{MLS}^{Tot}$ ). C'est en fait la somme des interactions Van der Waals (LW), électrostatiques (EL) et Lewis acide-base (AB) (Van Oss 1994). Eq (4)

$$\Delta G_{MLS}^{Tot} = \Delta G_{MLS}^{LW} + \Delta G_{MLS}^{AB} + \Delta G_{MLS}^{EL} \quad (\text{Equation 4})$$

L'utilisation de  $\text{KNO}_3$  0,1 M exerçant une remarquable force ionique pour le rinçage a permis de négliger les interactions électrostatiques (Hamadi *et al.* 2009). Nous avons donc :

$$\Delta G_{MLS}^{Tot} = \Delta G_{MLS}^{LW} + \Delta G_{MLS}^{AB} \quad (\text{Equation 5})$$

Avec

$$\Delta G_{MLS}^{LW} = \left( (\gamma_M^{LW})^{1/2} - (\gamma_S^{LW})^{1/2} \right)^2 - \left( (\gamma_M^{LW})^{1/2} - (\gamma_L^{LW})^{1/2} \right)^2 - \left( (\gamma_S^{LW})^{1/2} - (\gamma_L^{LW})^{1/2} \right)^2$$

(Equation 6)

Et

$$\Delta G_{MLS}^{AB} = 2[(\gamma_L^+)^{1/2}[(\gamma_M^-)^{1/2} + (\gamma_S^-)^{1/2} - (\gamma_L^-)^{1/2}] + (\gamma_L^-)^{1/2} \times [(\gamma_M^+)^{1/2} + (\gamma_S^+)^{1/2} - (\gamma_L^+)^{1/2}] - (\gamma_L^- \gamma_S^+)^{1/2} - (\gamma_L^+ \gamma_S^-)^{1/2}]$$

(Equation 7)

Généralement, des valeurs négatives de ( $\Delta G_{MLS}^{Tot}$ ) entrevoient théoriquement une adhésion favorable, et inversement, les valeurs positives entrevoient des conditions défavorables d'adhésion entre le microorganisme (M) et le support (S) étudié.

## **5. Évaluation de l'adhésion expérimentale de *C. albicans* sur la surface des alliages dentaires préconditionnés**

### **5.1. Prétraitement des alliages dentaires**

Des morceaux des alliages dentaires étudiés (Co-Cr et Ni-Cr), de mêmes dimensions que ceux utilisés pour la caractérisation des paramètres physicochimiques, ont subi également les mêmes prétraitements précédemment décrits, et sont stérilisés par autoclavage (121 °C, 1 bar, 15 min). Ces échantillons sont utilisés pour étudier l'adhésion expérimentale de *C. albicans* sur leurs surfaces avant et après traitement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16.

Ensuite, deux échantillons de chaque alliage ont subi un traitement par l'extrait antifongique par dépôt et étalement d'un volume de 60 µl à la surface de chaque échantillon à une concentration finale de 30 mg/cm<sup>2</sup> pendant 240 min à température ambiante (25 ± 2 °C). Les échantillons ont été ensuite lavés par immersion dans un bain de KNO<sub>3</sub> (0,1 M) stérile. Les alliages non traités (témoins) n'ont subi que cette dernière étape de lavage par KNO<sub>3</sub> avant de passer au test de l'adhésion.

### **5.2. Préparation de la suspension fongique**

La souche test *C. albicans* ATCC 10231 est revivifiée à partir du stock sur la gélose YPG à 30 °C pendant 24 h. Ensuite, par la méthode de la suspension directe à partir des colonies, une suspension fongique est préparée dans le tampon phosphate salin stérile (pH = 7,2) (cf. Annexe 2)

avec une turbidité ajustée par spectrophotomètre à celle de 0,5 McFarland ( $DO_{625\text{ nm}} = 0,08$ ), qui est équivalent à  $10^6$  UFC/ml.

### **5.3. Test de l'adhésion**

L'adhésion expérimentale de *C. albicans* sur les alliages dentaires Co-Cr et Ni-Cr est réalisée dans des boîtes de Pétri stériles, où les échantillons des deux alliages dentaires respectifs traités et non traités par l'extrait antifongique sont déposés et immergés dans 10 ml de la suspension fongique préparée. Les témoins négatifs sont immergés dans 10 ml du PBS stérile. Après incubation des boîtes à 30 °C pendant 90 min sans agitation, les morceaux sont soigneusement lavés trois fois dans des bains du tampon PBS stérile afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Ensuite, les cellules sont fixées en traitant la surface des alliages par une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v). Après 12 h de traitement à température ambiante, les morceaux sont trempés pendant 10 min dans des bains d'éthanol de concentration croissante ; 30 %, 50 %, 70 % et 100 %, respectivement (Wang *et al.* 2015).

### **5.4. Observation par microscopie électronique à balayage**

Les échantillons des alliages dentaires sont analysés par microscope électronique à balayage environnemental (Quanta 200 FEG, FEI Company, Hillsboro, OR, EU). Les clichés microscopiques obtenus sont traités par le logiciel Image J® afin de quantifier l'adhésion fongique sur les différentes surfaces analysées.

## **6. Analyses statistiques**

Les tests de comparaison par le test T de Student ou par ANOVA (analyse de la variance) suivie des tests Tukey et/ou Dunnett ainsi que les courbes et les coefficients de corrélation (Pearson) et de régression linéaire ont été établis par différents logiciels : IBM SPSS Statistics ® v 22 et Statistica® v 8.0. Le seuil de signification est fixé à 5 %.

## Résultats et discussion

### I. Effet de l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 sur les propriétés physicochimiques de surface de *C. albicans*

#### 1. Propriétés physicochimiques de surface de *C. albicans*

Les propriétés physicochimiques de la surface de *C. albicans* ATCC 10231 sont évaluées via la méthode de la mesure des angles de contact en utilisant trois liquides : l'eau, le formamide et le diiodométhane. Les mesures ainsi obtenues sont rassemblées dans le Tableau 14. Les tensions et l'énergie libre d'interaction de la surface cellulaire de *C. albicans* avant et après traitement par l'extrait antifongique ont été déterminées en utilisant l'équation de Young (Tableau 15).

La valeur de l'angle de contact permet de déterminer de façon qualitative le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. En effet, la limite supérieure de  $\theta_w$  (angle de contact vis-à-vis de l'eau) fixée par Vogler (1998) pour désigner une surface hydrophile est de  $65^\circ$ . Les résultats obtenus montrent ainsi le caractère hydrophile de la surface cellulaire de *C. albicans* puisque la valeur de  $\theta_w$  ( $= 20,33^\circ$ ) est inférieure à  $65^\circ$ .

Quant aux tensions de surface, *C. albicans* présente un caractère Lifshitz–Van der Waals de  $24,63 \text{ mJ/m}^2$ , un caractère donneur d'électrons plus fort que son caractère accepteur d'électrons ( $\gamma^- = 48,72 \text{ mJ/m}^2$  ;  $\gamma^+ = 5,98 \text{ mJ/m}^2$ ) (Tableau 15). Le caractère donneur d'électrons est supérieur à la limite inférieure caractéristique, qui est de  $27,9 \text{ mJ/m}^2$ , au-delà de laquelle la surface est hydrophile (Van Oss et Giese 1995). De plus, la valeur nettement positive de l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi} = 19,94 \text{ mJ/m}^2$ ) confirme quantitativement le caractère hydrophile de la surface cellulaire de *C. albicans*.

Le caractère hydrophile de la surface de *C. albicans* affirmé dans cette étude est en accord avec ce qui a été rapporté par Henriques *et al.* (2002). Ces auteurs ont déterminé les propriétés physicochimiques de *C. albicans* par la méthode de la mesure des angles de contact en utilisant les mêmes solvants polaires que nous avons utilisés (l'eau et le formamide) et un autre solvant apolaire, le 1-bromonaphthalène. L'angle de contact vis-à-vis de l'eau rapporté par ces auteurs est de  $37^\circ \pm 2$  et  $41^\circ \pm 4$  pour *C. albicans* lavé par l'eau et l'éthanol, respectivement. En effet, ces valeurs de

$\theta_w$  sont supérieures à la valeur que nous avons trouvée ( $20,33^\circ$ ), bien qu'elles indiquent toujours le caractère hydrophile de la surface cellulaire de cette levure. De plus, Henriques *et al.* (2002) ont prouvé que la surface de *C. albicans* manifeste un caractère donneur d'électrons plus qu'accepteur d'électrons avec des valeurs de 7 et  $51,9 \text{ mJ/m}^2$  pour  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$ , respectivement, ce qui corrobore les résultats que nous avons trouvés.

L'énergie libre d'interaction de la surface de *C. albicans* rapportée par Henriques *et al.* (2002) est de  $15,3 \text{ mJ/m}^2$ . Elle est relativement proche de celle retrouvée dans notre étude ( $19,94 \text{ mJ/m}^2$ ), ce qui corrobore notre résultat et confirme aussi le caractère hydrophile de la surface de cette levure.

Par ailleurs, dans une autre étude menée par Blanco *et al.* (2008), les auteurs ont démontré via la méthode de l'adhésion microbienne aux solvants (MATH) que *C. albicans* cultivé dans différentes conditions de culture expose toujours une surface cellulaire hydrophile, contrairement à *C. dubliniensis* qui exprime un degré d'hydrophilicité plus faible. Ces auteurs ont suggéré cette différence comme un critère de différenciation entre ces deux espèces (Blanco *et al.* 2008).

D'une manière générale, plusieurs chercheurs ont montré que les surfaces des cellules microbiennes sont donneuses d'électrons, mais des microorganismes avec un caractère accepteur d'électrons élevé peuvent être occasionnellement discernés (Van der Mei *et al.* 1998). Comme le souligne le travail de Maataoui *et al.* (2014), la surface des souches d'actinomycètes exhibe également un caractère donneur d'électrons dominant par rapport à un faible caractère accepteur d'électrons. Cette association d'un caractère donneur d'électrons élevé et un caractère accepteur d'électrons faible est une propriété typique des microorganismes avec une surface hydrophile, tandis que les surfaces hydrophobes sont souvent caractérisées par des caractères donneur d'électrons et accepteur d'électrons faibles (Van der Mei *et al.* 1998, Feng *et al.* 2013).

En effet, une corrélation positive a été rapportée entre le caractère donneur d'électrons de la surface cellulaire d'une multitude de bactéries et leur énergie libre d'interaction (degré de l'hydrophobicité) ( $R = 0,8$ ) (Hamadi et Latrache 2008). Selon Hamadi *et al.* (2008), les propriétés physicochimiques des microorganismes sont dictées par les groupements chimiques fonctionnels exposés à leur surface cellulaire. D'ailleurs, chez *E. coli* ces auteurs ont associé la mobilité électrophorétique aux groupements ( $\text{C}=\text{O}$ ), alors que l'hydrophilicité a été associée aux



groupements (C-(O,N)) et (OH- (C-O-C)), tandis que l'hydrophobicité a été associée aux groupements (C-(C,H)) (Hamadi *et al.* 2008).

Toutefois, Alsteens *et al.* (2013) ont observé que le degré d'hydrophobicité de la surface cellulaire de *C. albicans* varie avec sa morphologie (hyphes, tubes germinatifs et blastospores), et ils ont prouvé la contribution des protéines de surface de type ALS, qui sont beaucoup plus exprimées dans les tubes germinatifs, à cette l'hydrophobicité de surface.

## **2. Impact du traitement par l'extrait antifongique sur les propriétés physicochimiques de *C. albicans***

Après traitement des cellules fongiques par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 à une concentration subinhibitrice (30 mg/ml) pendant 1 h et 2 h, l'angle de contact vis-à-vis de l'eau a subi une diminution significative. En effet, à partir d'une valeur initiale de 20,33° pour le témoin non traité, des valeurs de 19,13° et 16,60° (soit une diminution par 1,2° et 3,73°) ont été enregistrées pour une durée de traitement de 1 h et 2 h, respectivement (P<0,01) (Tableau 14). Ceci suggère une augmentation de l'hydrophilicité de la surface cellulaire après traitement. De plus, l'effet de la durée du traitement (1 h et 2 h) sur cette diminution est significatif (P<0,001).

**Tableau 14 :** Angles de contact de la surface cellulaire de *C. albicans* avant et après traitement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16

<b>Echantillon</b>	<b><math>\theta_w</math>(°)</b>	<b><math>\theta_F</math>(°)</b>	<b><math>\theta_D</math>(°)</b>
Témoin	20,33 ± 0,11	17,00 ± 0,10	66,80 ± 0,00
Traité (1 h)	19,13 ± 0,30 **	22,30 ± 0,26 ***	59,66 ± 0,92 ***
Traité (2 h)	16,60 ± 0,36 ***	18,83 ± 0,49 **	58,66 ± 0,66 ***

$\theta_w$  : angle de contact vis-à-vis de l'eau  $\theta_F$  : angle de contact vis-à-vis du formamide  $\theta_D$  : angle de contact vis-à-vis du diiodométhane.

Test de Dunnett; \*(p<0,05) ; \*\*(p<0,01) ; \*\*\*(p<0,001).

Quant à l'angle de contact vis-à-vis du formamide, une augmentation significative a été observée après une heure de traitement. Tandis qu'une diminution de la valeur de cet angle de contact a été notée quand le temps de traitement est prolongé à 2 h ( $\theta_F=18,83^\circ$ ). Pour l'angle de contact vis-à-vis du diiodométhane, une diminution significative est notée après une heure de

traitement par l'extrait, bien que la prolongation de la durée du traitement à 2 h n'ait pas eu un effet significatif sur ce paramètre ( $P=0,231$ ).

Concernant les tensions de la surface fongique traitée et son énergie libre d'interaction, il est clair d'après les résultats que le traitement par l'extrait méthanolique a eu un impact significatif sur tous les paramètres étudiés ( $p<0,001$ ) (Tableau 15). En effet, une augmentation significative de la composante Lifshitz–Van der Waals est observée, sans effet significatif de la prolongation de la durée du traitement à 2 h ( $P=0,231$ ). Par ailleurs, une légère diminution à 3,39 et 3,55  $\text{mJ/m}^2$  pour une durée de traitement de 1 h et 2 h, respectivement est notée pour le caractère accepteur d'électrons, hors que la durée du traitement est sans effet significatif sur cette modification ( $P=0,419$ ). Cependant, l'effet inverse est exercé sur le caractère donneur d'électrons, avec une augmentation importante de celui-ci à 52,87 et 52,94  $\text{mJ/m}^2$  pour des durées de traitement de 1 h et 2 h, respectivement. Donc, le caractère donneur d'électrons de la surface fongique a été renforcé par le traitement envisagé (Figure 31).

Pour l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ), les valeurs obtenues après traitements sont supérieures à celle de la surface de *C. albicans* non traitée, reflétant ainsi une augmentation significative du degré de son hydrophilicité. Comme pour les autres tensions de surface, la prolongation de la durée de traitement est sans effet significatif sur l'énergie libre d'interaction de *C. albicans* ( $P = 0,527$ ).

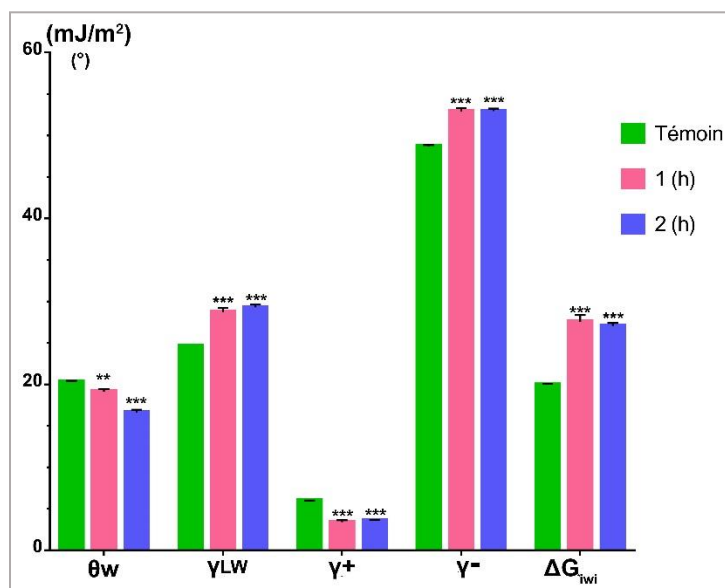
**Tableau 15 :** Composantes Lifshitz–Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ), donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ) de la surface de *C. albicans* avant et après traitement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16

	$\gamma^{LW}$ ( $\text{mJ/m}^2$ )	$\gamma^+$ ( $\text{mJ/m}^2$ )	$\gamma^-$ ( $\text{mJ/m}^2$ )	$\Delta G_{iwi}$ ( $\text{mJ/m}^2$ )
Témoin	24,63 ± 0,00	5,98 ± 0,02	48,72 ± 0,13	19,94 ± 0,13
Traité (1 h)	28,71 ± 0,53 ***	3,39 ± 0,23 ***	52,87 ± 0,45 ***	27,54 ± 0,82 ***
Traité (2 h)	29,28 ± 0,38 ***	3,55 ± 0,09 ***	52,94 ± 0,31 ***	27,05 ± 0,36 ***

Test de Dunnett; \*( $p<0,05$ ) ; \*\*( $p<0,01$ ) ; \*\*\*( $p<0,001$ ).

En somme, le traitement de la surface cellulaire de *C. albicans* par l'extrait antifongique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 a exercé un effet remarquable sur ses propriétés physicochimiques, manifesté par l'augmentation du caractère donneur d'électrons (Figure 31). Ce qui a abouti en

grande partie à l'augmentation de l'énergie libre d'interaction, c'est-à-dire de l'hydrophilicité de la surface fongique.



**Figure 31 :** Propriétés physicochimiques de la surface de *C. albicans* avant et après traitement par l'extrait antifongique

Test de Dunnett; \*(p<0,05) ; \*\*(p<0,01) ; \*\*\*(p<0,001).

Des études antérieures ont rapporté des résultats similaires avec des molécules de synthèse, des substances d'origine microbienne ou des phytomolécules. Ainsi, une diminution de l'hydrophobicité de la surface de *C. albicans* et *C. tropicalis* a été obtenue, suite à leur traitement par une bactériocine (la sanguicine) produite par *Streptococcus sanguinis* (Ma *et al.* 2015). De plus, la chlorhexidine utilisée par ces auteurs comme témoin positif a exercé le même effet que la sanguicine sur l'hydrophobicité de la surface de ces deux espèces. Cet effet de la chlorhexidine gluconate sur l'hydrophobicité de surface de plusieurs souches de *C. albicans*, isolées de la cavité orale des patients atteints du SIDA, a été démontré auparavant (Anil *et al.* 2001).

Par ailleurs, le traitement par l'extrait aqueux (1 mg/ml) d'une plante (*Psidium guajava*) a provoqué une diminution de l'hydrophobicité de surface de *Streptococcus sanguinis*, *S. mitis* et *Actinomyces* sp. par 54,1 %, 49,9 % et 40,6 %, respectivement (Razak *et al.* 2006).

Dans une autre étude, il s'est avéré que l'effet de deux surfactants (rhamnolipide et tergitol) sur les paramètres physicochimiques de surface de deux bactéries (*Pseudomonas putida* 852 et *Rhodococcus erythropolis* 3586 de la collection de la Nouvelle-Zélande des cultures types) dépend

non seulement du type et de la concentration de chaque surfactant, mais également des caractéristiques de surface de la bactérie traitée (Feng *et al.* 2013).

Dans une autre étude intéressante, Biniarz *et al.* (2015) ont évalué l'impact de deux lipopeptides (la pseudosurfactine II et la surfactine) sur l'hydrophobicité de surface de différentes souches de *C. albicans* ainsi que son adhésion sur le polystyrène, sauf que les souches qu'ils ont testées présentent des pourcentages d'hydrophobicité variés (déterminés par la technique MATH). Ces auteurs ont observé une diminution irréversible de l'hydrophobicité de 20-60 % (selon la souche et le bio-tensioactif), et que l'adhésion est diminuée de 80-90 % (Biniarz *et al.* 2015). Ces lipopeptides provoquent l'extraction des protéines de la paroi cellulaire ayant un poids moléculaire entre 10-40 kDa. Ce fait a été ainsi suggéré par les auteurs comme un mécanisme d'action de ces molécules (Biniarz *et al.* 2015).

Par ailleurs, en vue d'étudier l'effet de l'adsorption d'un biosurfactant (dirhamnolipide) sur la surface de *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *Candida lyopolitica*, Zhong *et al.* (2007) ont constaté que cette adsorption a modifié significativement leur hydrophobicité de surface, et cet effet varie en fonction de chaque microorganisme et de ses conditions physiologiques. Le modèle proposé par ces auteurs comme mécanisme d'action consiste en une interaction qui se produit entre une moitié du rhamnolipide avec certains groupements chimiques de la surface cellulaire tout en laissant l'autre moitié (de polarité opposée) libre dans l'environnement (Zhong *et al.* 2007).

Dans tous les cas, les paramètres physicochimiques de surface cellulaire résultent des structures et des groupements chimiques qu'elle expose (protéine, acide lipotéichoïque, capsule, fimbriae, etc.) (Krasowska et Sigler 2014), et tout changement de ces paramètres n'est réellement qu'une modification biochimique de la paroi cellulaire.

### **3. Contribution des propriétés physicochimiques de *C. albicans* au pouvoir pathogène et à l'adhésion**

Le fait que la streptomycine agit sur les propriétés physicochimiques de surface de *S. aureus* et *P. aeruginosa*, a permis par cet intermédiaire d'améliorer leur capacité de former du biofilm sur le polystyrène (Kumar et Ting 2016). En détail, ces chercheurs ont montré que l'exposition des cellules bactériennes à cet antibiotique est responsable d'une augmentation de l'hydrophobicité de surface de ces deux bactéries (évaluée par l'angle de contact vis-à-vis de l'eau et l'énergie libre

d'interaction), avec une diminution de leurs caractères donneur et accepteur d'électrons ainsi que leurs charges de surface (Kumar et Ting 2016).

Conformément à nos résultats, le traitement des cellules végétatives de *C. albicans* par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 à une concentration sub-létale (1/2 CMF) a augmenté significativement son caractère hydrophile ainsi que son caractère donneur d'électrons. C'est tout à fait l'effet inverse que celui de la streptomycine sur la surface bactérienne de *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Kumar et Ting 2016). Donc, cette confrontation des résultats suggère à priori que l'extrait étudié peut atténuer l'adhésion de *C. albicans* en diminuant son hydrophobicité de surface.

En effet, de la même façon que pour la majorité des microorganismes, plusieurs études ont montré que l'hydrophobicité de la surface cellulaire de *C. albicans* est positivement corrélée avec sa capacité d'adhésion. Ce fait a été démontré par l'étude de Ellepola et Samaranayake (1998) qui s'est intéressée à l'adhésion de *C. albicans* sur les cellules épithéliales buccales. Ces auteurs ont également observé que l'exposition à des concentrations sub-létales de certains antifongiques conventionnels, notamment le fluconazole, le kétoconazole et la flucytosine, pendant une heure permet de réduire l'hydrophobicité de la surface de *C. albicans* et cette réduction est associée à une réduction de l'adhésion. Cependant, la nystatine était incapable de produire cet effet (Ellepola et Samaranayake 1998).

En outre, Alsteens *et al.* (2013) ont démontré que l'hydrophobicité de la surface de *C. albicans* est également impliquée dans l'adhésion cellule-cellule. Leur étude a dévoilé également que cette adhésion, en particulier entre un hyphes et un blastospore implique essentiellement de fortes interactions à courte portée et de faibles interactions à longue portée (Alsteens *et al.* 2013). Ces auteurs ont prouvé ainsi que la protéine de surface (ALS3) contribue à ces interactions à courte portée et aussi à l'hydrophobicité de surface chez *C. albicans* (Alsteens *et al.* 2013).

L'hydrophobicité de la surface de *C. albicans* est impliquée non seulement dans son potentiel d'adhésion, mais encore dans l'expression de plusieurs facteurs de virulence. D'ailleurs, il a été prouvé que les souches hydrophobes de *C. albicans* produisent les tubes germinatifs plus rapidement que les souches hydrophiles (Antley et Hazen 1988). Ces auteurs ont suggéré également que les souches hydrophobes sont facilement phagocytées par les polynucléaires neutrophiles, mais ces derniers ont beaucoup plus du mal à les tuer. Ce qui leur laisse du temps pour la production des

tubes germinatifs et d'autres matériaux extracellulaires qui les protègent contre les phagocytes et facilitent la colonisation et la dissémination.

Par ailleurs, Rautela *et al.* (2014) ont démontré que le mélange de deux lipopeptides cycliques (fengycines et iturines) produits par *Bacillus amyloliquefaciens* exerce un effet fongicide concentration-dépendant vis-à-vis de *C. albicans*. Ce mélange permet, à une concentration subinhibitrice, de diminuer l'hydrophobicité de la surface cellulaire de ce champignon, de réduire sa capacité de former des tubes germinatifs et de réprimer l'expression de certains gènes impliqués dans la formation des hyphes (Hwp1 et ALS3), sans affecter significativement sa croissance.

## **II. Effet de l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 sur les propriétés physicochimiques de surface des alliages dentaires**

### **1. Propriétés physicochimiques de surface des alliages dentaires**

Par la même approche, les caractéristiques physicochimiques des alliages dentaires sont évaluées et les résultats sont représentés dans le Tableau 16.

#### **1.1. Alliage dentaire Co-Cr**

Pour cet alliage, l'angle de contact vis-à-vis de l'eau ( $84,16^\circ$ ) est largement supérieur à  $65^\circ$ , ce qui montre le caractère hydrophobe de sa surface (selon Vogler 1998). Le degré d'hydrophobicité, évalué quantitativement par l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi} = -64,91 \text{ mJ/m}^2$ ), a confirmé le caractère hydrophobe de cet alliage. En outre, un caractère accepteur d'électrons très faible ( $0,35 \text{ mJ/m}^2$ ), un caractère donneur d'électrons modéré ( $4,21 \text{ mJ/m}^2$ ) et une composante de Lifshitz-van der Waals de  $49,88 \text{ mJ/m}^2$  sont obtenus pour cet alliage.

#### **1.2. Alliage dentaire Ni-Cr**

À l'égard de l'alliage dentaire Ni-Cr, sa surface est hydrophobe avec un angle de contact vis-à-vis de l'eau de  $84,43^\circ$  et une énergie libre d'interaction de  $-33,84 \text{ mJ/m}^2$ . La surface de cet alliage est caractérisée par une composante de Lifshitz-van der Waals de  $45,81 \text{ mJ/m}^2$ , légèrement inférieure à celle obtenue pour l'alliage Co-Cr. Néanmoins, il s'est avéré que l'alliage Ni-Cr expose une surface ayant des caractères accepteur d'électrons et donneur d'électrons ( $2,46$  et  $10,64 \text{ mJ/m}^2$ ,

respectivement) plus importants que ceux de l'alliage Co-Cr (Tableau 16). Le caractère donneur d'électrons est plus important que le caractère accepteur d'électrons pour les deux alliages.

**Tableau 16 :** Angles de contact, composantes de l'énergie de surface et énergie libre d'interaction des alliages dentaires non traités

Paramètre	Co-Cr	Ni-Cr
$\theta_w$ (°)	84,16 ± 0,23	84,43 ± 0,57
$\theta_F$ (°)	60,53 ± 0,35 ***	73,70 ± 0,70 ***
$\theta_D$ (°)	10,26 ± 0,30 ***	25,66 ± 0,20 ***
$\gamma^{LW}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	49,88 ± 0,04 ***	45,81 ± 0,07 ***
$\gamma^+$ (mJ/m <sup>2</sup> )	0,35 ± 0,02 ***	2,46 ± 0,29 ***
$\gamma^-$ (mJ/m <sup>2</sup> )	4,21 ± 0,08 ***	10,64 ± 0,97 ***
$\Delta G_{iwi}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	-64,91 ± 0,53 ***	-33,84 ± 2,68 ***

$\theta_w$  : angle de contact vis-à-vis de l'eau  $\theta_F$  : angle de contact vis-à-vis du formamide  $\theta_D$  : angle de contact vis-à-vis du diiodométhane.

$\gamma^{LW}$  : composante de Lifshitz–Van der Waals ;  $\gamma^+$  : composante accepteur d'électrons ;  $\gamma^-$  : composante donneur d'électrons ;  $\Delta G_{iwi}$  : énergie libre d'interaction

Test T; \*(p<0,05) ; \*\*(p<0,01) ; \*\*\*(p<0,001).

### 1.3. Comparaison et discussion des propriétés physicochimiques de surface des deux alliages dentaires

En comparant les propriétés physicochimiques de surface des deux alliages, nous avons constaté que leurs surfaces exhibent relativement le même angle de contact vis-à-vis de l'eau, et elles présentent toutes les deux un faible caractère accepteur d'électrons. Or, la surface de l'alliage Ni-Cr possède un caractère donneur d'électrons de 10,64 mJ/m<sup>2</sup>, qui est deux-fois supérieur à celui de la surface de l'alliage Co-Cr (4,21 mJ/m<sup>2</sup>), mais qui n'arrive pas à dépasser le seuil caractéristique des surfaces hydrophiles (27,9 mJ/m<sup>2</sup>) (Van Oss et Giese 1995).

En définitive, les deux alliages étudiés exposent des surfaces qui par surcroît à leur caractère qualitativement hydrophobe avec des angles de contact supérieurs à 65°, elles sont également quantitativement hydrophobe avec des énergies libres d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ) négatives. Ces dernières montrent que la surface de l'alliage Co-Cr est plus hydrophobe ( $\Delta G_{iwi} = -64,91$  mJ/m<sup>2</sup>) que celle de l'alliage Ni-Cr ( $\Delta G_{iwi} = -33,84$  mJ/m<sup>2</sup>). À notre connaissance, ce fait n'a jamais été rapporté dans la littérature.

L'analyse de plusieurs travaux antérieurs qui se sont intéressés aux caractéristiques physicochimiques de surface des biomatériaux (alliages, résines, polystyrène, silicone, etc.) a révélé que des différences (légères à extrêmes) peuvent être rencontrées pour le même type de biomatériau. En fait, ces différences sont dues, d'une part, à des différences au niveau de leurs compositions élémentaires et, d'autre part, aux méthodes utilisées pour leur préparation, prétraitement, finition et polissage, qui façonnent leur topographie, leur rugosité ainsi que leur énergie de surface (Mekayarajjanonth et Winkler 1999).

Contrairement aux résines acryliques, les études antérieures menées sur la caractérisation de la surface des alliages dentaires, notamment à base de Co-Cr et Ni-Cr, qui se sont focalisées sur leur mouillabilité et leurs énergies de surface sont très rares.

Parmi ces études, Urushibara *et al.* (2014), ont trouvé que l'alliage Co-Cr (Co 63,1 % ; Cr 28,0 % ; Mo 6,0 %) ayant une  $R_a = 0,044 \mu\text{m}$ , a exhibé un angle de contact vis-à-vis de l'eau de  $93,6^\circ \pm 2,5$ . Cette valeur est relativement plus élevée que celle trouvée dans notre travail. De plus, les alliages dentaires examinés dans la même étude étaient tous hydrophobes avec des angles de contact très proches.

Sipahi *et al.* (2001) ont déterminé les paramètres de l'énergie de surface de l'alliage Co-Cr (Modelguß Legierung) en utilisant le formamide, l'éthylène glycol et le diiodométhane et ils ont trouvé les valeurs suivantes :  $\gamma^{\text{LW}} = 43,23 \text{ mJ/m}^2$  ;  $\gamma^+ = 2,88 \text{ mJ/m}^2$  et  $\gamma^- = 0,10 \text{ mJ/m}^2$ . Bien que la rugosité de surface de cet alliage n'ait pas été mentionnée, les valeurs de  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$  relativement faibles témoignent son caractère hydrophobe, car ce sont les caractères acide-base de Lewis qui dictent le caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface (Van Oss 1995).

Par ailleurs, Grivet *et al.* (2000) ont rapporté un angle de contact vis-à-vis de l'eau de  $64,0^\circ$  pour l'alliage dentaire Ni-Cr (Rexilium<sup>TM</sup> - Ni 76,0 % ; Cr 13,0 % ;  $R_a = 0,02 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ). D'après cette étude, l'angle de contact vis-à-vis de l'eau observé pour cet alliage est le plus faible par rapport aux autres alliages étudiés (Grivet *et al.* 2000). Il faut noter que cet alliage contient plus du nickel (4 %) et moins du chrome (-2 %) que celui avec lequel nous avons travaillé (*cf.* Annexe 3). Dans une autre étude, la comparaison des énergies libres totales d'interaction de trois biomatériaux, a dévoilé que la surface du nickel métallique (>99 % du Ni) est hydrophile, alors que celles de l'acier inoxydable (304) et du polyméthyl méthacrylate sont hydrophobes, avec des valeurs de  $\Delta G_{\text{rwi}}$  de 6,33 ; -47,45 et -36,29  $\text{mJ/m}^2$ , respectivement (Lopes *et al.* 2005). En effet, les propriétés



physicochimiques du nickel métallique ( $\theta_w = 59,10^\circ \pm 2,38$  ;  $\gamma^{LW} = 44,16 \text{ mJ/m}^2$  ;  $\gamma^+ = 0,0 \text{ mJ/m}^2$  et  $\gamma^- = 33,06 \text{ mJ/m}^2$ ) reflètent son caractère hydrophile et monopolaire avec un caractère donneur d'électrons relativement élevé (Lopes *et al.* 2005). Quant à l'acier inoxydable (304), ses propriétés physicochimiques ( $\theta_w = 74,93^\circ \pm 5,01$ ;  $\gamma^{LW} = 36,70 \text{ mJ/m}^2$  ;  $\gamma^+ = 2,28 \text{ mJ/m}^2$  et  $\gamma^- = 3,89 \text{ mJ/m}^2$ ) sont en faveur de son caractère hydrophobe (Lopes *et al.* 2005). Le degré d'hydrophobicité élevé de l'acier inoxydable (304) (composé majoritairement du Cr 17 % et Ni 8,1 %, ainsi que des éléments traces : C 0,05 % ; Mn 1,34 % ; Si 0,36 % ; Cu 0,19 % ; Mo 0,18 % et Co 0,13 %) en comparaison avec le nickel métallique résulte probablement de sa teneur élevée en chrome et de sa faible teneur en nickel.

Nous sommes donc, probablement, devant cette hypothèse qui peut être à l'origine de la différence observée au niveau du degré d'hydrophobicité entre les deux alliages étudiés dans notre étude, vu que celui à base de Co-Cr contient deux-fois de plus du chrome que l'alliage Ni-Cr (29 % et 15 %) (*cf.* Annexe 3).

## **2. Impact du préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus sp.* Cp-LMA-16 sur les propriétés physicochimiques de surface des alliages dentaires**

### **2.1. Alliage dentaire Co- Cr**

Pour rendre inappropriée la surface des alliages étudiés à l'adhésion, nous avons évalué l'effet du préconditionnement de leur surface par l'extrait antifongique de *Bacillus sp.* Cp-LMA-16 sur leurs propriétés physicochimiques et sur l'adhésion de *C. albicans*. Ainsi, différentes durées d'exposition à l'extrait ont été programmées (30 min ; 60 min ; 120 min ; 180 min et 240 min). Les Tableaux 17, 18, 19 et 20 résument les angles de contact, mesurés à l'aide du goniomètre, et les paramètres de l'énergie de surface des alliages dentaires préconditionnés.

La surface de l'alliage Co-Cr traitée pendant 30 min a exhibé un angle de contact vis-à-vis de l'eau comparable à celui de la surface non traitée (témoin). Or, un effet significatif est observé sur les angles de contact vis-à-vis du formamide et du diiodométhane ( $P < 0,001$ ). En prolongeant les durées d'exposition à l'extrait à 60 min ; 120 min ; 180 min et 240 min, l'angle de contact vis-à-vis de l'eau a diminué significativement ( $P < 0,001$ ). Une valeur de  $\theta_w$  inférieure à  $65^\circ$  est atteinte pour une durée du préconditionnement de 240 min. Toutefois, les angles de contact vis-à-vis du

formamide et du diiodométhane ont augmenté significativement par rapport au témoin (Tableau 17) ( $P < 0,001$ ).

**Tableau 17 :** Angles de contact de l'alliage dentaire Co-Cr après préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus sp.* Cp-LMA-16

Echantillon	$\theta_w$ (°)	$\theta_F$ (°)	$\theta_D$ (°)
Témoin	84,16 ± 0,23	60,53 ± 0,35	10,26 ± 0,30
30 min	83,33 ± 0,40	63,63 ± 0,11 ***	34,90 ± 0,55 ***
60 min	81,50 ± 0,26 ***	65,86 ± 0,45 ***	35,83 ± 0,15 ***
120 min	75,96 ± 0,56 ***	68,63 ± 0,05 ***	39,10 ± 0,10 ***
180 min	73,43 ± 0,05 ***	72,33 ± 0,11 ***	41,93 ± 0,23 ***
240 min	57,20 ± 0,36 ***	72,66 ± 0,40 ***	42,06 ± 0,25 ***

$\theta_w$  : angle de contact vis-à-vis de l'eau  $\theta_F$  : angle de contact vis-à-vis du formamide  $\theta_D$  : angle de contact vis-à-vis du diiodométhane.

Test de Dunnett; \*( $p < 0,05$ ) ; \*\*( $p < 0,01$ ) ; \*\*\*( $p < 0,001$ ).

De même, les composantes de l'énergie de surface de l'alliage Co-Cr sont significativement affectées par le traitement ( $P < 0,05$ ) (Tableau 18). La composante de Lifshitz-van der Waals a subi une diminution significative par rapport au témoin, qui s'est stabilisée à partir de 180 min du préconditionnement.

**Tableau 18 :** Energie libre d'interaction et tensions de surface de l'alliage dentaire Co-Cr après préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus sp.* Cp-LMA-16

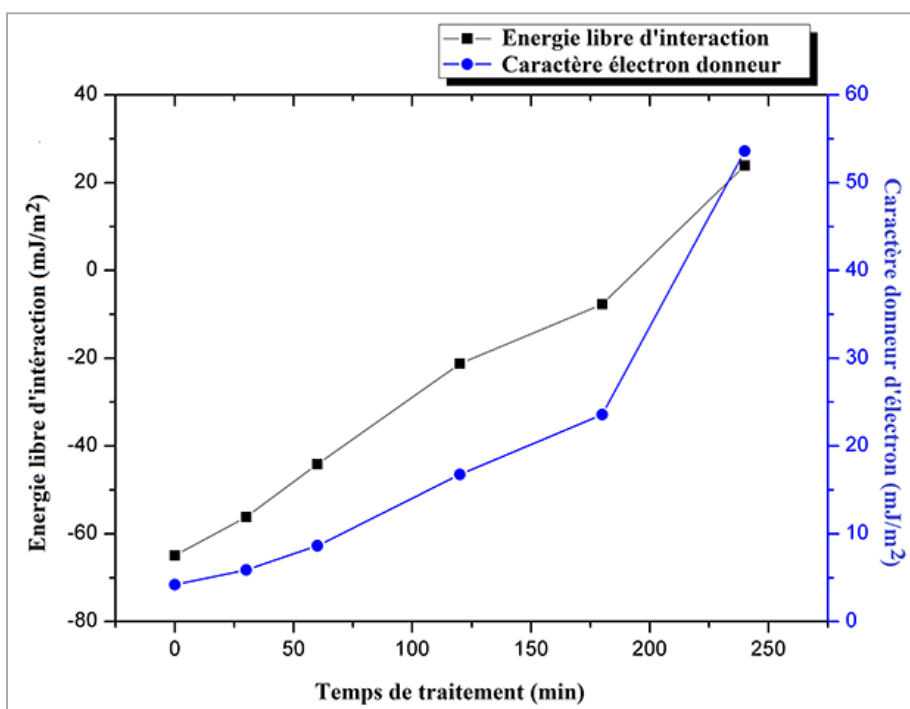
Echantillon	$\gamma^{LW}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma^+$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma^-$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G_{iwi}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
Témoin	49,88 ± 0,04	0,35 ± 0,02	4,21 ± 0,08	-64,91 ± 0,53
30 min	41,98 ± 0,25 ***	0,10 ± 0,02 **	5,89 ± 0,37 **	-56,14 ± 1,73 ***
60 min	41,55 ± 0,07 ***	0,33 ± 0,05	8,63 ± 0,47 ***	-44,14 ± 1,90 ***
120 min	39,97 ± 0,04 ***	0,88 ± 0,05 ***	16,76 ± 0,78 ***	-21,25 ± 1,66 ***
180 min	38,54 ± 0,11 ***	1,66 ± 0,03 ***	23,57 ± 0,10 ***	-7,71 ± 0,15 ***
240 min	38,47 ± 0,12 ***	3,59 ± 0,17 ***	53,60 ± 0,84 ***	23,88 ± 0,35 ***

$\gamma^{LW}$  : composante de Lifshitz–Van der Waals ;  $\gamma^+$  : composante accepteur d'électrons ;  $\gamma^-$  : composante donneur d'électrons ;  $\Delta G_{iwi}$  : énergie libre d'interaction

Test de Dunnett; \*( $p < 0,05$ ) ; \*\*( $p < 0,01$ ) ; \*\*\*( $p < 0,001$ ).

De plus, une légère modification du caractère accepteur d'électrons  $\gamma^+$  est constatée. Elle consiste en une faible réduction de  $\gamma^+$  durant les premières 30 min du traitement, mais qui est suivie d'une augmentation significative avec les autres durées d'exposition pour atteindre un maximum de  $3,59 \text{ mJ/m}^2$  avec un traitement de 240 min ( $P < 0,001$ ).

Contrairement à ces deux paramètres ( $\gamma^{\text{LW}}$  et  $\gamma^+$ ), une augmentation étonnante du caractère donneur d'électrons et de l'énergie libre d'interaction est remarquée. Ceci montre que le préconditionnement de la surface de l'alliage Co-Cr a produit une réduction de son degré d'hydrophobicité. Subséquemment, des régressions linéaires ont permis de décrire l'augmentation de  $\gamma^-$  et  $\Delta G_{\text{iwi}}$  en fonction de la durée du préconditionnement ( $R^2=0,87$  et  $P = 0,007$  ;  $R^2=0,99$  et  $P < 0,001$  pour  $\gamma^-$  et  $\Delta G_{\text{iwi}}$ , respectivement) (Figure 32).



**Figure 32 :** Evolution de l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{\text{iwi}}$ ) et du caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) de la surface de l'alliage Co-Cr en fonction de la durée du préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16

En conclusion, le préconditionnement par l'extrait antifongique étudié a altéré les caractéristiques physicochimiques de surface de l'alliage dentaire Co-Cr. Celle-ci est devenue de plus en plus donneuse d'électrons, avec une valeur maximale de  $\gamma^- = 53,60 \text{ mJ/m}^2$  obtenue pour

une durée de traitement de 240 min. En même temps, la surface de cet alliage est devenue hydrophile pour la même durée de traitement ( $\theta_w=57,20^\circ < 65^\circ$  et  $\Delta G_{IWI}=23,88 > 0$ ).

## 2.2. Alliage dentaire Ni-Cr

Une augmentation significative de l'angle de contact vis-à-vis de l'eau est notée pour toutes les durées d'exposition de l'alliage Ni-Cr à l'extrait. L'analyse statistique a montré que  $\theta_w$  atteint son maximum à partir de 120 min du préconditionnement. Au-delà de cette durée, toute modification de ce paramètre n'est plus significative ( $P > 0,05$ ).

Parallèlement, une augmentation significative des angles de contact vis-à-vis du formamide et du diiodométhane par rapport au témoin est également observée ( $P < 0,001$ ) (Tableau 19).

Les tensions et l'énergie libre d'interaction de la surface de l'alliage dentaire Ni-Cr sont affectées par le préconditionnement, mais d'une manière différente, voire opposée, en comparaison avec l'alliage Co-Cr (Tableau 20). En effet, la composante Lifshitz-van der Waals de l'alliage Ni-Cr a subi une réduction pour toutes les durées d'exposition testées ( $P < 0,001$ ). Le paramètre accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) a subi également une légère réduction, qui n'est pas corrélée avec la durée d'exposition à l'extrait.

**Tableau 19 :** Angles de contact de l'alliage dentaire Ni-Cr après préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16

Echantillon	$\theta_w$ (°)	$\theta_F$ (°)	$\theta_D$ (°)
Témoin	84,43 ± 0,57	73,70 ± 0,70	25,66 ± 0,20
30 min	89,16 ± 0,46 ***	74,80 ± 0,70 *	34,30 ± 0,51 ***
60 min	92,76 ± 0,23 ***	78,36 ± 0,15 ***	36,36 ± 0,05 ***
120 min	94,26 ± 0,11 ***	79,73 ± 0,05 ***	35,86 ± 0,11 ***
180 min	94,13 ± 0,23 ***	79,90 ± 0,36 ***	36,90 ± 0,00 ***
240 min	94,23 ± 0,23 ***	80,30 ± 0,30 ***	40,70 ± 0,43 ***

$\theta_w$  : angle de contact vis-à-vis de l'eau  $\theta_F$  : angle de contact vis-à-vis du formamide  $\theta_D$  : angle de contact vis-à-vis du diiodométhane.

Test de Dunnett; \*( $p < 0,05$ ) ; \*\*( $p < 0,01$ ) ; \*\*\*( $p < 0,001$ ).

En même temps, une réduction significative du caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ), qui était relativement élevé pour la surface non traitée, est survenue ( $P < 0,001$ ). Comme pour les autres

paramètres, cette réduction est indépendante de la durée du préconditionnement, étant donné que les valeurs de  $\gamma$  obtenues pour les durées de 60 min, 120 min, 180 min et 240 min ne diffèrent pas significativement ( $P > 0,05$ ).

**Tableau 20 :** Energie libre d'interaction et composantes de l'énergie de surface de l'alliage dentaire Ni-Cr après préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16

Echantillon	$\gamma^{LW}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma^+$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma^-$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G_{iwi}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
Témoin	45,81 ± 0,07	2,46 ± 0,29	10,64 ± 0,97	-33,84 ± 2,68
30 min	42,26 ± 0,23 ***	1,49 ± 0,08 ***	6,58 ± 0,06 ***	-44,78 ± 0,44 ***
60 min	41,30 ± 0,02 ***	1,88 ± 0,04 **	5,43 ± 0,20 ***	-46,24 ± 0,82 ***
120 min	41,53 ± 0,05 ***	2,16 ± 0,03	4,95 ± 0,10 ***	-46,76 ± 0,44 ***
180 min	41,04 ± 0,00 ***	2,12 ± 0,13 *	5,12 ± 0,33 ***	-46,16 ± 1,59 ***
240 min	39,17 ± 0,22 ***	1,81 ± 0,08 ***	5,17 ± 0,21 ***	-46,24 ± 0,96 ***

$\gamma^{LW}$  : composante de Lifshitz–Van der Waals ;  $\gamma^+$  : composante accepteur d'électrons ;  $\gamma^-$  : composante donneur d'électrons ;  $\Delta G_{iwi}$  : énergie libre d'interaction  
Test de Dunnett; \*( $p < 0,05$ ) ; \*\*( $p < 0,01$ ) ; \*\*\*( $p < 0,001$ ).

L'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ) a subi également une réduction significative ( $P < 0,001$ ), qui est aussi indépendante de la durée du préconditionnement par l'extrait.

De ce fait, le degré d'hydrophobicité de surface de l'alliage Ni-Cr est intensifié par le préconditionnement, avec une réduction de ses paramètres donneur d'électrons et accepteur d'électrons.

### 2.3. Comparaison de l'impact du préconditionnement sur les propriétés physicochimiques de surface des deux alliages

Le préconditionnement de la surface des alliages dentaires par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 a altéré les propriétés physicochimiques natives des deux alliages, d'une manière spécifique à chacun d'entre eux. D'un côté, une altération marquée par une augmentation très importante du caractère donneur d'électrons, et par conséquent de l'énergie libre d'interaction avec un effet significatif de la durée d'exposition à l'extrait, est manifestée sur la surface de l'alliage Co-Cr. De l'autre côté, l'altération survenue sur la surface de l'alliage Ni-Cr s'est

exprimée par une réduction du caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons, et donc de l'énergie libre d'interaction sans effet significatif de la durée d'exposition à l'extrait.

De toutes les molécules produites par les microorganismes, en particulier les bactéries du genre *Bacillus*, ce sont les lipopeptides qui sont connus par leur effet sur les propriétés physicochimiques des surfaces abiotiques. D'ailleurs, des effets similaires à ceux observés dans notre étude sur l'alliage dentaire Co-Cr ont été rapportés pour la surfactine qui, après préconditionnement, a diminué le paramètre Lifshitz-Van Der Waals (de 40,0 à 34,8 mJ/m<sup>2</sup>) et a augmenté le paramètre donneur d'électrons (de 17,8 à 59,2 mJ/m<sup>2</sup>) de l'acier inoxydable (Nitschke *et al.* 2009). Il est aussi intéressant de souligner qu'à l'image de ce que nous avons montré, l'effet de la surfactine était aussi dépendant de la surface à traiter. En effet, la surfactine n'a pas exercé le même effet sur le polypropylène, puisqu'elle a diminué son caractère donneur d'électrons de surface (Nitschke *et al.* 2009). En outre, les mêmes auteurs ont constaté qu'un rhamnolipide a exercé l'effet inverse de celui de la surfactine sur l'acier inoxydable (augmentation de  $\gamma^+$  et diminution de  $\gamma^-$ ). Ils ont aussi conclu que l'altération des propriétés physicochimiques de surface dépend de la nature chimique du tensioactif utilisé pour le préconditionnement (Nitschke *et al.* 2009). C'est ce qui a été également confirmé par Shakerifard *et al.* (2009) à travers leur étude sur trois familles de lipopeptides produits par *Bacillus* sp. D'ailleurs, en plus du type du lipopeptide et de la nature du matériau, ces auteurs ont souligné l'influence de la concentration du lipopeptide utilisé pour le préconditionnement sur l'angle de contact vis-à-vis de l'eau de la surface traitée. Ils ont aussi remarqué que l'iturine A a diminué considérablement  $\theta_w$  du téflon (qui était au départ hydrophobe qualitativement) alors que la surfactine a augmenté  $\theta_w$  de l'acier inoxydable (qui était au départ hydrophile qualitativement). Ces modifications ont affecté significativement l'adhésion des spores de *B. cereus* sur ces matériaux préconditionnés (Shakerifard *et al.* 2009).

Après une analyse rigoureuse des résultats obtenus dans notre étude, nous avons constaté que même si le préconditionnement a réduit significativement la composante Lifshitz-van der Waals des deux alliages, cette réduction n'est pas la cause principale des changements observés au niveau de leur degré d'hydrophobicité. Car l'évolution de l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ) est corrélée avec les paramètres accepteur et donneur d'électrons, alors qu'elle n'est pas corrélée significativement avec la composante de Lifshitz van der Waals ( $P > 0,05$ ). Ainsi, pour l'alliage Co-Cr, une corrélation positive est établie entre, d'une part, l'énergie libre d'interaction et le caractère

accepteur d'électrons ( $R=0,943$  ;  $P<0,01$ ), et entre, d'autre part, l'énergie libre d'interaction et le caractère donneur d'électrons ( $R=0,955$  ;  $P<0,01$ ). Quant à l'alliage Ni-Cr, bien que le caractère donneur d'électrons soit fortement corrélé avec l'énergie libre d'interaction ( $R=0,99$  ;  $P<0,001$ ), aucune corrélation significative n'a été retrouvée pour le caractère accepteur d'électrons pour cet alliage ( $P>0,05$ ). En conséquence, ces corrélations corroborent le fait que ce sont les caractères donneur et accepteur d'électrons ou acide-base de Lewis qui dictent le caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface (Van Oss *et al.* 1988).

À la lumière de nos résultats, le préconditionnement des alliages dentaires par l'extrait antifongique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 a altéré leurs propriétés physicochimiques de surface, et cette altération est éventuellement due à l'adsorption des molécules présentes dans l'extrait sur leurs surfaces. Toutefois, l'altération des caractéristiques physicochimiques de surface des alliages étudiés s'est avérée spécifique à chaque surface. Cette différence de comportement de chaque alliage suite au traitement par l'extrait testé est probablement due à la différence de leurs propriétés physicochimiques initiales (avant traitement), notamment au niveau de leurs caractères accepteur et donneur d'électrons. Dans ce cas, ces différences affecteraient le type, le taux et l'orientation des molécules adsorbées sur chacune des surfaces. C'est d'ailleurs le même effet rapporté pour la surfactine sur la surface de l'acier inoxydable et le polystyrène (Araujo *et al.* 2016).

D'autre part, les alliages Co-Cr appartiennent aux alliages dits à une seule phase (*single-phase alloys*) qui sont reconnus par une homogénéité à travers leurs structures. Au contraire, l'alliage Ni-Cr est dit à phases multiples (*multiple-phase alloys*). Il est caractérisé par différentes microstructures, dans lesquelles certaines régions diffèrent des autres en terme de composition et de structure, reflétant ainsi une hétérogénéité à travers la structure globale de cet alliage (Wataha 2002, Elshahawy et Watanabe 2014). Ces microstructures de l'alliage Ni-Cr sont nettement identifiables dans la Figure 36 (B).

Par conséquent, ceci aurait éventuellement un effet sur l'adsorption des molécules de l'extrait méthanolique sur la surface des deux alliages et serait probablement à l'origine de la différence de la réponse de chaque alliage au traitement envisagé. Il reste ainsi à savoir si cette divergence observée se serait reflétée sur le comportement de chaque alliage vis-à-vis de l'adhésion par *C. albicans*.

### III. Adhésion théorique et expérimentale de *C. albicans* : effet du préconditionnement de surface des alliages dentaires

#### 1. Adhésion théorique de *C. albicans* sur les alliages dentaires : approche XDLVO

L'adhésion microbienne a été étudiée, d'un point de vue physicochimique, par plusieurs auteurs en utilisant différents modèles (cf. Revue bibliographique. Modèle prédictif de l'adhésion ; p : 20). Dans cette étude, nous avons opté pour l'approche XDLVO, développée par Van Oss (2003), afin d'évaluer l'adhésion théorique de *C. albicans* sur la surface des deux alliages dentaires natifs et préconditionnés par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16.

Conformément à cette approche, l'énergie libre totale d'interaction ( $\Delta G^{\text{Tot}}$ ) entre la surface cellulaire de *C. albicans* et la surface des alliages dans un milieu aqueux est calculée. Thermodynamiquement, des valeurs négatives de  $\Delta G^{\text{Tot}}$  prédisent une attraction entre les deux surfaces, tandis que des valeurs positives de cette énergie prédisent une adhésion défavorable ou une répulsion.

Dans le Tableau 21 sont empilées les énergies libres d'interaction de Lifshitz–Van der Waals ( $\Delta G^{\text{LW}}$ ), acide–base de Lewis ( $\Delta G^{\text{AB}}$ ) et l'énergie libre totale de l'adhésion ( $\Delta G^{\text{Tot}}$ ), décrivant les interactions physicochimiques entre la surface de *C. albicans* et la surface des deux alliages dentaires obtenues pour les différentes durées du préconditionnement envisagées.

##### 1.1. Alliage dentaire Co-Cr

D'après les résultats, la valeur négative de  $\Delta G^{\text{Tot}}$  qui est obtenue pour l'alliage dentaire Co-Cr (-3,57 mJ/m<sup>2</sup>) indique une adhésion favorable sur la surface de cet alliage. Après traitement, nous avons observé une augmentation importante de l'énergie libre totale de l'adhésion ( $\Delta G^{\text{Tot}}$ ) (P<0,001) et de l'énergie libre acide-base de Lewis ( $\Delta G^{\text{AB}}$ ) (P<0,001). Pour l'énergie libre d'interaction de Lifshitz–Van der Waals ( $\Delta G^{\text{LW}}$ ), une légère augmentation est constatée (P<0,001). Par ailleurs, il est important d'évoquer que l'augmentation de  $\Delta G^{\text{Tot}}$  est proportionnelle à la durée d'exposition à l'extrait. D'ailleurs, une corrélation positive (R=0,977 ; P=0,001) et une régression linéaire significative (P<0,01) sont établies entre  $\Delta G^{\text{Tot}}$  et la durée du préconditionnement (Figure 33).



Ces résultats montrent que le traitement de la surface de l'alliage Co-Cr par l'extrait méthanolique défavorise l'adhésion de *C. albicans* d'une manière durée d'exposition-dépendante.

**Tableau 21 :** Energies libres d'interaction de Lifshitz–Van der Waals ( $\Delta G^{LW}$ ), acide–base de Lewis ( $\Delta G^{AB}$ ) et l'énergie libre totale de l'adhésion ( $\Delta G^{Tot}$ ) de *C. albicans* sur les alliages dentaires traités et non traités par l'extrait méthanolique

Alliage	Echantillon	$\Delta G^{LW}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G^{AB}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G^{Tot}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
Co-Cr	Témoin	-1,38 ± 0,00	-2,18 ± 0,16	-3,57 ± 0,16
	30 min	-1,04 ± 0,01 ***	1,55 ± 0,44 ***	0,50 ± 0,44 ***
	60 min	-1,03 ± 0,00 ***	4,07 ± 0,36 ***	3,04 ± 0,36 ***
	120 min	-0,95 ± 0,00 ***	10,65 ± 0,54 ***	9,69 ± 0,54 ***
	180 min	-0,89 ± 0,00 ***	14,51 ± 0,02 ***	13,62 ± 0,02 ***
	240 min	-0,88 ± 0,00 ***	29,20 ± 0,25 ***	28,31 ± 0,25 ***
Ni-Cr	Témoin	-1,21 ± 0,00	2,16 ± 0,68	0,95 ± 0,68
	30 min	-1,06 ± 0,01 ***	-1,23 ± 0,19 ***	-2,29 ± 0,18 ***
	60 min	-1,01 ± 0,00 ***	-3,51 ± 0,24 ***	-4,53 ± 0,24 ***
	120 min	-1,02 ± 0,00 ***	-4,67 ± 0,10 ***	-5,70 ± 0,10 ***
	180 min	-1,00 ± 0,00 ***	-4,35 ± 0,32 ***	-5,36 ± 0,32 ***
	240 min	-0,92 ± 0,01 ***	-3,79 ± 0,30 ***	-4,72 ± 0,31 ***

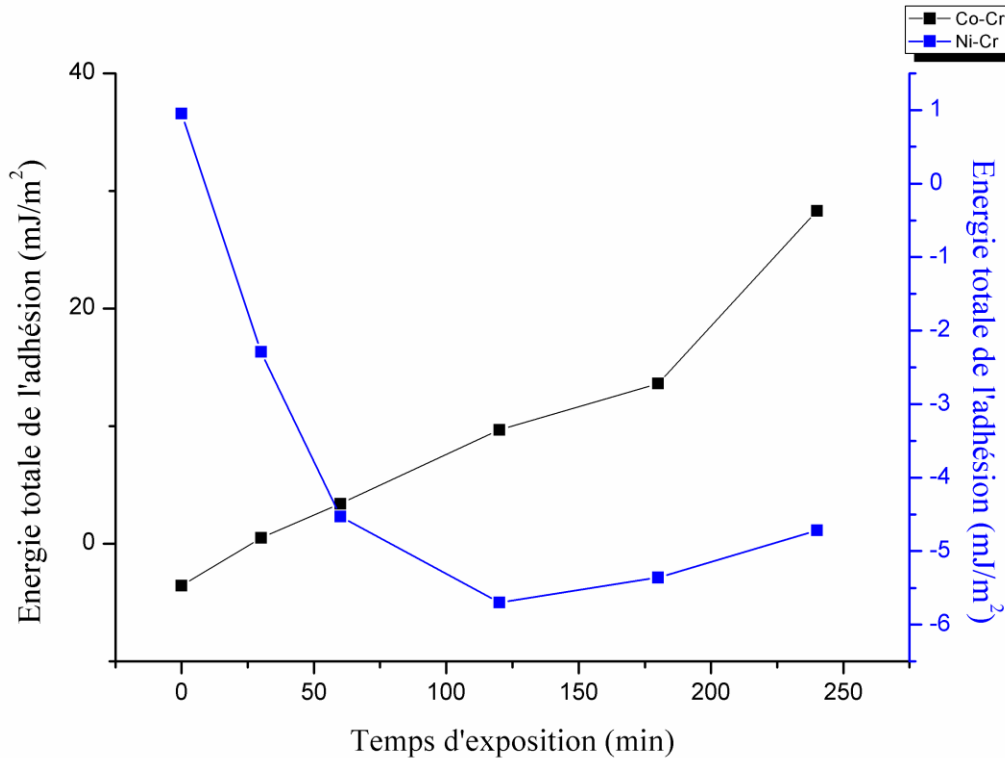
Test de Dunnett; \*(p<0,05) ; \*\*(p<0,01) ; \*\*\*(p<0,001).

## 1.2. Alliage dentaire Ni-Cr

Si la valeur de l'énergie totale de l'adhésion ( $\Delta G^{Tot}$ ) obtenue pour la surface de l'alliage Ni-Cr non préconditionnée est positive, elle est néanmoins quasi-nulle (0,95 ± 0,68 mJ/m<sup>2</sup>). D'un point de vue physicochimique, ce résultat reflète une faible adhésion de *C. albicans* sur cet alliage, voire une absence de l'adhésion.

Toutefois, après traitement nous avons constaté une modification de l'énergie libre totale de l'adhésion qui diverge totalement de celle qui a été infligée à l'alliage Co-Cr. Cette modification s'est exprimée par une réduction significative de  $\Delta G^{Tot}$ , qui a pris des valeurs négatives pour toutes les durées d'exposition envisagées (P<0,001). Ainsi,  $\Delta G^{Tot}$  a pris une valeur minimale (-5,70 mJ/m<sup>2</sup>) pour une durée du préconditionnement de 120 min. En outre, une augmentation de  $\Delta G^{LW}$  et

une diminution de  $\Delta G^{AB}$  qui sont significatives ont été observées ( $P < 0,001$ ) (Tableau 21). Théoriquement, la diminution de  $\Delta G^{Tot}$  implique une adhésion favorable du champignon sur la surface préconditionnée de l'alliage Ni-Cr.

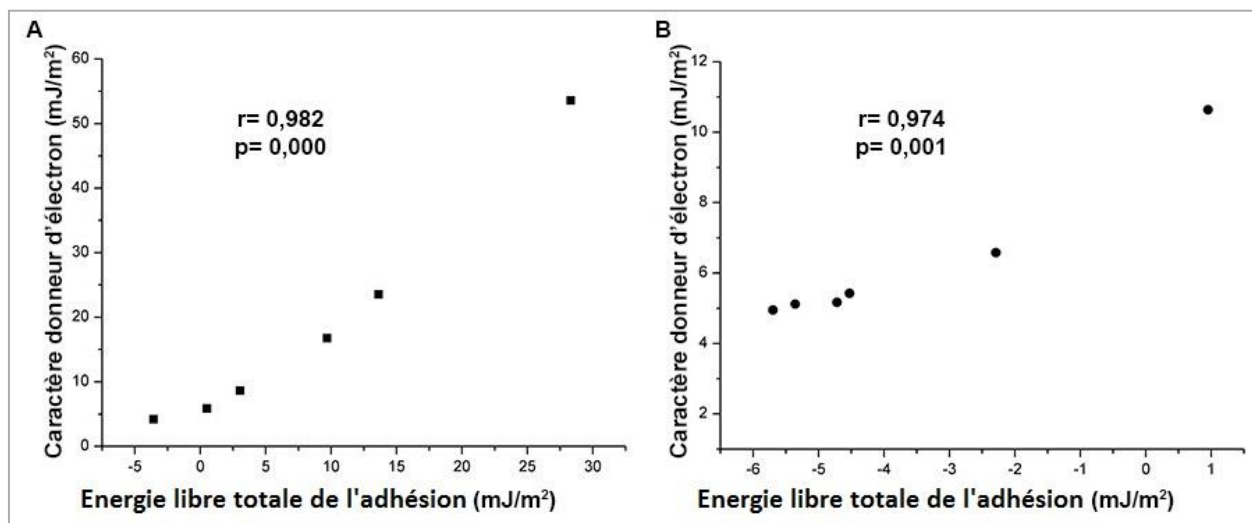


**Figure 33 :** Evolution de l'énergie totale de l'adhésion de *C. albicans* sur les deux alliages dentaires en fonction de la durée de leur préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16

### 1.3. Effet du préconditionnement des alliages sur l'adhésion théorique de *C. albicans* : discussion et comparaison entre les deux alliages

Les valeurs positives de  $\Delta G^{AB}$  observées pour les surfaces traitées de l'alliage Co-Cr, en comparaison avec les valeurs négatives et relativement constantes de  $\Delta G^{LW}$ , présument que l'adhésion théorique de *C. albicans* sur la surface préconditionnée de cet alliage est influencée essentiellement par les interactions à courte portée (e.g interactions acide-base de Lewis). Ce fait est également mis en évidence pour l'alliage Ni-Cr, car nous avons constaté que les valeurs négatives de  $\Delta G^{Tot}$  obtenues pour les surfaces traitées sont accentuées par les valeurs négatives de  $\Delta G^{AB}$ . Cet effet capital des interactions acide-base de Lewis sur l'adhésion de *C. albicans* sur les

deux alliages dentaires est également confirmé par la corrélation positive établie entre  $\Delta G^{Tot}$  et le caractère donneur d'électrons des alliages dentaires (Figure 34).

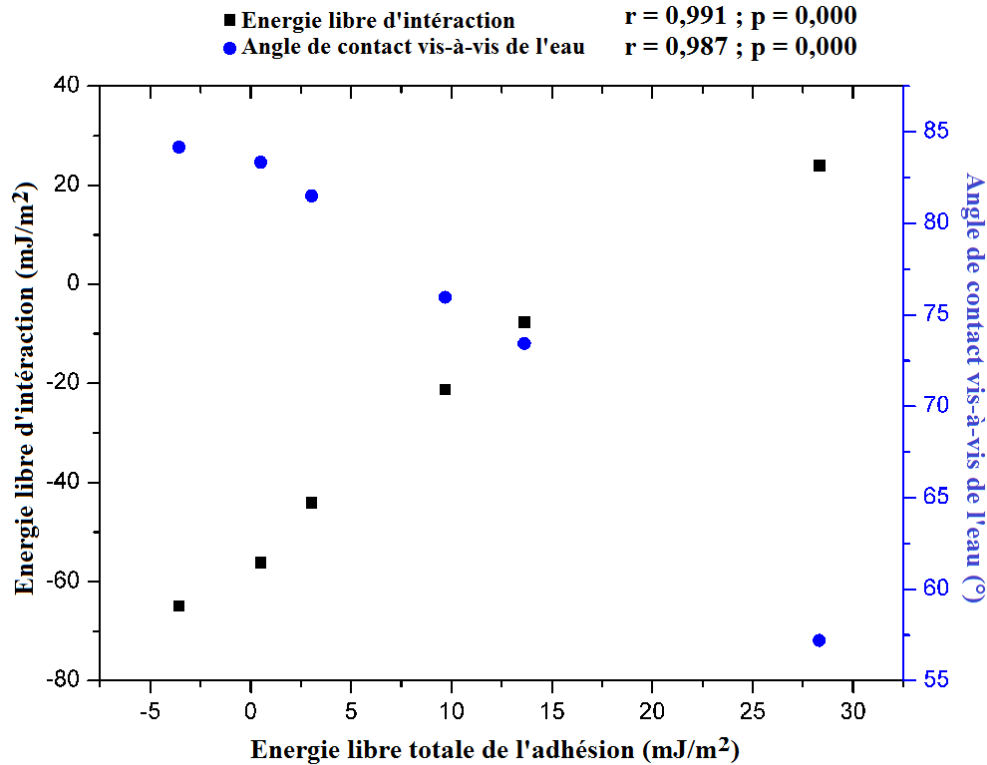


**Figure 34 :** Corrélation positive entre le caractère donneur d'électrons de surface et l'énergie libre totale de l'adhésion de *C. albicans* sur les deux alliages dentaires ; A) alliage Co-Cr ; B) alliage Ni-Cr

Dans le même sens, l'augmentation de l'énergie libre de l'adhésion (pour l'alliage Co-Cr) d'une manière proportionnelle à la durée d'exposition à l'extrait résulte, du moins en partie, de l'augmentation du degré d'hydrophilicité de cet alliage, qui est aussi proportionnelle à la durée d'exposition (Figure 32). C'est ce que nous avons confirmé par des corrélations hautement significatives que nous avons établies entre l'angle de contact vis-à-vis de l'eau  $\theta_w$  (estimation qualitative de l'hydrophobicité) ainsi que l'énergie libre d'interaction  $\Delta G_{iwi}$  (estimation quantitative de l'hydrophobicité) de la surface de l'alliage Co-Cr avec l'énergie libre totale de l'adhésion ( $\Delta G^{Tot}$ ) de *C. albicans* sur la surface de cet alliage (Figure 35). Ce résultat reflète aussi l'impact de l'angle de contact vis-à-vis de l'eau et des propriétés acide et base de Lewis de la surface du matériau sur l'adhésion théorique de *C. albicans*.

Par ailleurs, il est important de signaler que les valeurs négatives de  $\Delta G^{LW}$  (Tableau 21) indiquent que les interactions de van der Waals ( $\Delta G^{LW}$ ) entre la surface de *C. albicans* et la surface des alliages dentaires peuvent contribuer à son adhésion (évidemment car nous avons déjà évoqué que les interactions de van der Waals sont généralement attractives). Toutefois, l'augmentation

significative de  $\Delta G^{LW}$  par le préconditionnement des deux alliages montre que celui-ci a réduit cet effet attractif exercé par les interactions de van der Waals entre la surface cellulaire et la surface de chaque alliage.



**Figure 35 :** Corrélation positive entre l'hydrophobicité (exprimée par l'énergie libre d'interaction  $\Delta G_{iwi}$  et par l'angle de contact vis-à-vis de l'eau  $\theta_w$ ) et l'énergie libre totale de l'adhésion  $\Delta G^{Tot}$  de *C. albicans* sur l'alliage dentaire Co-Cr

Plusieurs études ont prouvé le rôle capital des interactions acide-base de Lewis entre la surface de *C. albicans* et la surface du matériau dans l'adhésion ou la répulsion, notamment à faible distance de séparation entre les deux surfaces. C'est en fait ce que nous avons pu mettre en évidence dans notre étude, non seulement par les corrélations positives entre le caractère donneur d'électrons des alliages dentaires et leur énergie libre totale de l'adhésion, mais aussi par la corrélation positive entre l'hydrophobicité de l'alliage Co-Cr et son énergie libre totale de l'adhésion. À l'image de nos résultats, Henriques *et al.* (2004) ont précédemment prouvé que l'adhésion de *C. albicans* et *C. dubliniensis* sur la résine acrylique et l'hydroxyapatite est régie par les interactions acide-base de Lewis. De même, Sardin *et al.* (2004) ont démontré que l'adhésion bactérienne sur des alliages dentaires dépend à la fois des caractéristiques physicochimiques de surface des bactéries et des

alliages, et donc elle est influencée essentiellement par la balance entre les interactions acide-base de Lewis et les interactions de van der Waals entre les deux surfaces.

D'après nos résultats et ceux de plusieurs travaux antérieurs, l'adhésion et la formation du biofilm par *C. albicans* sont favorisées sur des surfaces abiotiques hydrophobes. D'ailleurs, une étude comparative de l'adhésion de *C. albicans* sur plusieurs biomatériaux a confirmé ce fait (Singh, Agrawal, *et al.* 2011). Dans ce sens, une corrélation positive entre l'angle de contact vis-à-vis de l'eau du polyéther-uréthane et la formation de biofilm par *C. albicans* a été démontrée (Chandra *et al.* 2005). Ceci explique pourquoi, selon une étude antérieure, le revêtement des résines acryliques par des matériaux hydrophiles a diminué l'adhésion des blastospores et des hyphes de plusieurs espèces de *Candida*, y compris *C. albicans* (Yoshijima *et al.* 2010). Par ailleurs, Bowen *et al.* (2001) ont évalué la force d'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* sur une surface hydrophobe du mica au méthylsilane par microscopie à force atomique à  $46,6 + 20,8$  nN, alors que sur une surface hydrophile une faible force d'adhésion est obtenue  $10,2 + 9,0$  nN.

## **2. Quantification de l'adhésion expérimentale de *C. albicans* aux alliages dentaires**

L'adhésion expérimentale de *C. albicans* sur la surface des deux alliages dentaires est étudiée tout en évaluant l'impact du préconditionnement de la surface des alliages par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16. L'activité antiadhésive est évaluée par l'observation des surfaces via la microscopie électronique à balayage, et par la quantification des cellules adhérentes visualisées sur les clichés microscopiques en utilisant le logiciel Image J® (Figure 36).

### **2.1. Critères de choix des conditions expérimentales**

Comme nous l'avons déjà évoqué, la rugosité de la surface affecte considérablement l'adhésion microbienne (*cf.* Revue bibliographique. Facteurs liés à la surface. p : 32). Or, il a été prouvé, qu'au-dessous d'un seuil estimé à  $Ra=0,2$   $\mu\text{m}$ , l'influence de ce paramètre sur l'adhésion microbienne n'est plus significative (Bollen *et al.* 1996). De ce fait, nous avons choisi dans cette étude une rugosité moyenne 50 fois plus faible ( $Ra=0,04$   $\mu\text{m}$ ) pour minimiser au maximum son effet.

Étant donné leur milieu d'insertion, la surface des dispositifs dentaires serait toujours imbibée par la salive ou par le fluide gingival. Toutefois, il s'est avéré, à travers des études

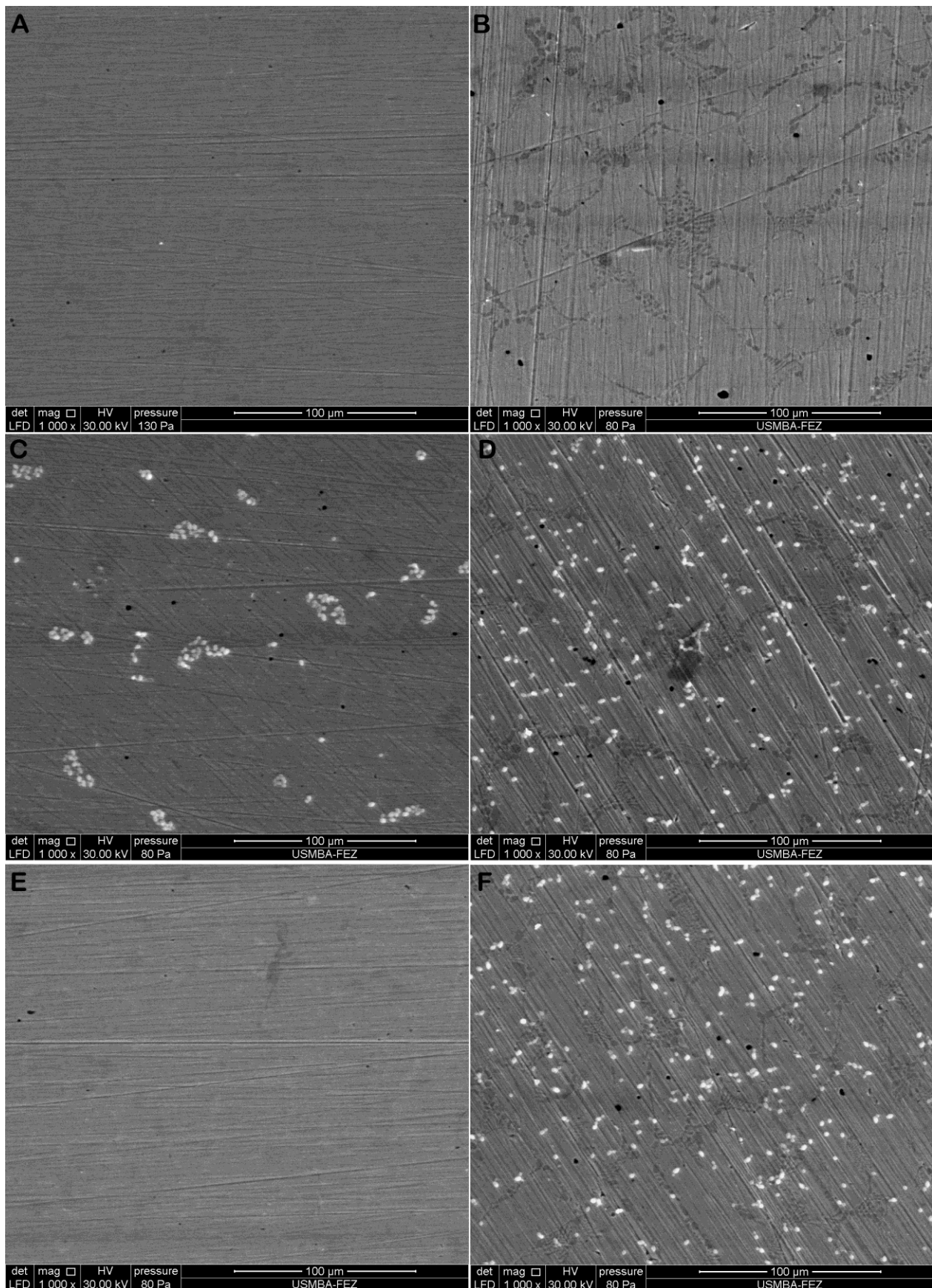
antérieures, que le degré d'hydrophobicité des alliages dentaires diminue après leur préconditionnement par la salive (Sipahi *et al.* 2001, Urushibara *et al.* 2014). De plus, il a été prouvé que l'adhésion et la formation de biofilm sur l'alliage Co-Cr et d'autres biomatériaux diminuent après leur préconditionnement par la salive (Li *et al.* 2012). C'est pourquoi, comme pour la plupart des études (Trindade *et al.* 2015, Aguayo *et al.* 2017), l'effet de la salive n'a pas été pris en compte dans notre étude.

D'un autre côté, il a été démontré que dans les meilleures circonstances pour *C. albicans*, les interactions électrostatiques n'ont qu'une contribution mineure dans son adhésion (Klotz 1994). De plus, Jones et O'shea (1994) ont discerné une adhésion importante de *C. albicans* sur le verre (sachant que les deux surfaces sont électronégatives) même quand les interactions coulombiennes entre les deux surface étaient répulsives à leur maximum. Par ailleurs, le potentiel zêta de surface de *C. albicans* (-20 à -25 mV à faible force ionique), qui reflète son électronégativité, tend vers l'annulation avec l'augmentation de la force ionique du milieu (Sharp et Dickinson 2005). Pour ces raisons, nous avons négligé dans cette étude la contribution de ces interactions en travaillant dans un milieu à force ionique très élevée.

## **2.2. Résultats de la quantification de l'adhésion expérimentale de *C. albicans* aux alliages dentaires**

Les clichés microscopiques de l'adhésion de *C. albicans* sur les surfaces des alliages dentaires traités et non traités par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 sont rassemblés dans la figure 36.

Contrairement aux échantillons utilisés comme témoins négatifs (qui n'ont pas été traités par l'extrait et qui ont été incubés dans le PBS stérile) et qui ont montré des surfaces exemptes de toute cellule fongique (Figure 36 A et B), des cellules de fongiques blanchâtres qui se sont adhérees sur la surface des deux alliages dentaires non traitée par l'extrait méthanolique (Témoins positifs de l'adhésion) sont observées (Figure 36 (C) (D)). Rappelons que nous avons fixé le temps de l'adhésion à 2 h. Le traitement d'image et le dénombrement des cellules par Image J® ont dévoilé un nombre de cellules adhérees de 211 (soit 3914,21 cellule/mm<sup>2</sup>) et 396 (soit 7346,10 cellule/mm<sup>2</sup>) pour l'alliage Co-Cr et l'alliage Ni-Cr, respectivement.



**Figure 36 :** Clichés microscopiques de l'adhésion de *C. albicans* sur les surfaces des alliages dentaires traités et non traités par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 ; A) témoin négatif de l'alliage Co-Cr ; B) témoin négatif de l'alliage Ni-Cr; C) alliage Co-Cr non traité ; D) alliage Ni-Cr non traité ; E) alliage Co-Cr traité ; F) alliage Ni-Cr traité

Quant aux échantillons dont les surfaces sont traitées par l'extrait méthanolique pendant 240 min, les résultats obtenus sont divergents. En effet, pour l'alliage Co-Cr, aucune cellule fongique n'a pas été visualisée sur sa surface préconditionnée, ce qui montre une inhibition totale (100 %) de l'adhésion (Figure 36, E).

Toutefois, un nombre de cellules adhérees de 425 (soit 7884,07 cellule/mm<sup>2</sup>) est obtenu pour l'alliage Ni-Cr, et qui est supérieur que celui du témoin positif (Figure 36, F). De ce fait, une augmentation de l'adhésion estimée à 7,32 % est survenue après préconditionnement de la surface de cet alliage.

### **3. Comparaison entre les prédictions théoriques et les résultats expérimentaux**

À la lumière de ces résultats expérimentaux, il s'avère que les prédictions théoriques de l'adhésion obtenues par l'approche XDLVO se sont reflétées partiellement.

D'une part, l'adhésion expérimentale de *C. albicans* était favorable sur la surface des deux alliages dentaires non préconditionnés, et c'est en fait ce qui a été prédit surtout par l'énergie libre totale de l'adhésion  $\Delta G^{\text{Tot}}$  de  $-3,57 \pm 0,16$  mJ/m<sup>2</sup> pour l'alliage Co-Cr (Tableau 21). Toutefois, pour l'alliage Ni-Cr une légère discordance est notée, étant donné que  $\Delta G^{\text{Tot}} = 0,95 \pm 0,68$  mJ/m<sup>2</sup> pour cet alliage.

Certes, le nombre de cellules adhérees sur l'alliage Ni-Cr (7346,10 cellule/mm<sup>2</sup>) est plus important que sur celui à base de Co-Cr (3914,21 cellule/mm<sup>2</sup>). Or, comme nous l'avons constaté dans la Figure 36 (C), les cellules adhérees sur l'alliage Co-Cr se sont agrégées et la formation des microcolonies a déjà eu lieu, tandis que sur la surface de l'alliage Ni-Cr les cellules qui se sont adhérees sont toujours dispersées (Figure 36 (D)). C'est-à-dire qu'au cours des 2 heures du test, les cellules fongiques ont mis moins du temps pour s'adhérer à la surface de l'alliage Co-Cr, et ceci revient aussi à dire qu'elles préfèrent la surface cet alliage.

Logiquement, ce résultat est d'une importance majeure et implique que l'adhésion microbienne ne puisse pas être évaluée seulement par le nombre de cellules adhérees sans prendre en compte le temps qui a été mis pour s'adhérer à la surface. En fait, ce facteur est souvent omis dans la plupart des études qui se sont intéressées à l'étude de l'adhésion, et peut ainsi expliquer les contradictions qui ont été rapportées entre les prédictions théoriques de l'adhésion et les résultats expérimentaux. Rappelons aussi que l'adhésion est perçue par les approches physicochimiques DLVO et XDLVO comme étant une cinétique (*cf.* Revue bibliographique. Modèle prédictif de



l'adhésion ; p : 20). Elabed *et al.* (2013) ont essayé de mettre en évidence l'impact du temps de l'adhésion pour expliquer ces écarts. En comparant les pourcentages de l'adhésion et les énergies libres totales de l'adhésion (calculées conformément à l'approche XDLVO) des spores de quatre espèces de *Penicillium* sur le bois de cèdre à 3 h et 24 h d'adhésion, les auteurs ont établi une relation linéaire entre les prédictions théoriques et les résultats expérimentaux pour un temps d'adhésion de 3 h. Toutefois, pour les tests effectués à 24 h, des contradictions sont notées. En réalité, ce n'est pas surprenant de trouver ces contradictions, parce que la théorie XDLVO est une approche physicochimique qui ne peut s'appliquer que pour la première phase de l'adhésion (généralement les premiers 3 h (Gerin *et al.* 1995)). De plus, Bayouhd *et al.* (2006) ont démontré que la théorie XDLVO est limitée à l'étude de la première phase de l'adhésion (attachement) et ne tient pas compte des interactions biologiques spécifiques mises en jeu au cours de la deuxième phase.

La discordance notée entre l'énergie libre totale de l'adhésion obtenue pour la surface non préconditionnée de l'alliage Ni-Cr ( $\Delta G^{\text{Tot}} = 0,95 \pm 0,68 \text{ mJ/m}^2$ ), impliquant une faible adhésion, voire son absence totale, et le résultat obtenu expérimentalement a été rapportée auparavant (Lopes *et al.* 2005). D'ailleurs, ces auteurs ont observé que le pourcentage de l'adhésion de *Desulfovibrio desulfuricans* était très important sur un alliage à base du nickel pur, ce qui divergeait avec l'énergie libre totale de l'adhésion calculée conformément à l'approche XDLVO (Lopes *et al.* 2005). Pourtant, les prédictions faites dans la même étude et qui présagent une forte adhésion de cette bactérie à l'acier inoxydable, par rapport au polyméthyl méthacrylate, corroborent les pourcentages de l'adhésion expérimentale. Ces auteurs ont ainsi montré que le nickel à des concentrations entre 0,85 et 85,20  $\mu\text{M}$  affecte positivement la croissance du microorganisme utilisé (Lopes *et al.* 2005).

D'autre part, les prédictions théoriques de l'adhésion de *C. albicans* aux alliages après préconditionnement de leurs surfaces corroborent les résultats expérimentaux. En effet, ce préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 pendant 240 min a affecté l'adhésion expérimentale de *C. albicans* avec une inhibition totale sur la surface de l'alliage Co-Cr. Pour l'alliage Ni-Cr, une augmentation légère du nombre de cellules qui y sont adhérentes par 7,32 % est obtenue, et qui a été prédite par une diminution également légère de l'énergie libre totale de l'adhésion ( $\Delta G^{\text{Tot}}$ ) de 0,95 à -4,72  $\text{mJ/m}^2$  (Tableau 21). Ces résultats confirment en fait que la modification des paramètres physicochimiques de surface des alliages suite à leur

préconditionnement par l'extrait s'est répercutée sur l'adhésion par *C. albicans*. En effet, la diminution de degré d'hydrophobicité de la surface de l'alliage Co-Cr et l'augmentation de son caractère donneur d'électrons étaient à l'origine de l'inhibition de l'adhésion que nous avons observée pour cet alliage.

De même, Chen *et al.* (2012) ont démontré que le revêtement de l'alliage Co-Cr par un film de carbone amorphe tétraédrique, qui a diminué son angle de contact vis-à-vis de l'eau et a augmenté son caractère donneur d'électrons, a permis par conséquent de diminuer significativement le taux de l'adhésion de deux bactéries (*Streptococcus mutans* et *Actinomyces viscosus*) et de *C. albicans*. À titre de comparaison, l'effet de ce revêtement était moins remarquable que le préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 dans notre étude, que ce soit sur les propriétés physicochimiques de l'alliage Co-Cr ou sur l'adhésion de *C. albicans*. Cette comparaison suggère également que l'effet du préconditionnement que nous avons envisagé aurait fort probablement un effet antiadhésif sur les bactéries pour l'alliage Co-Cr.

À notre connaissance, le préconditionnement de la surface des alliages dentaires par des molécules ou des extraits microbiens n'a pas été rapporté dans la littérature. Par contre, l'adhésion microbienne a été étudiée sur les surfaces du polystyrène, acier inoxydable, téflon et autres matériaux avant et après leur préconditionnement par des métabolites produits par *Bacillus* sp., notamment les lipopeptides. L'activité antiadhésive de ces molécules a été prouvée à travers une multitude de travaux. Ainsi, la surface du polystyrène traitée par la surfactine ou la pseudosurfactine II a montré une réduction considérable de l'adhésion de différentes souches de *C. albicans* (Biniarz *et al.* 2015). Une corrélation positive a été également rapportée entre l'hydrophobicité de surface de l'acier inoxydable et du téflon et l'adhésion des spores de *Bacillus* après leur traitement par des lipopeptides produits par *Bacillus* (Shakerifard *et al.* 2009). En outre, un effet significatif (à faible dose) sur l'adhésion microbienne et sur le biofilm préformé a été observé sur la surface du polystyrène traitée par un extrait de lipopeptides sécrétés par *Bacillus methylotrophicus*. D'ailleurs, une inhibition de l'adhésion de *C. albicans* qui dépasse 80 % (à une concentration de 0,016 mg/ml) et plus de 80 % de détachement de biofilm préformé (à partir d'une dose de 1 mg/ml) ont été observés (Jemil *et al.* 2017).

Pareillement, Rautela *et al.* (2014) ont constaté la capacité d'un mélange de lipopeptides produits par *B. amyloliquefaciens* d'inhiber l'adhésion de *C. albicans* sur le polystyrène de 46 à 100 %, en fonction de la concentration et de la souche. De surcroît, ils ont prouvé également sa capacité de réduire le biofilm préformé sur le même matériau de 25–100 %.

Ces effets antiadhésifs et antibiofilms des biosurfactants ont été associés à leur effet sur les propriétés physicochimiques des surfaces mises en jeu. Ce qui a été démontré plus explicitement dans une étude récente qui s'est intéressée à l'altération des propriétés physicochimiques de la surface de l'acier inoxydable et du polystyrène après leur traitement par un rhamnolipide et par la surfactine (Araujo *et al.* 2016). Bien qu'elle soit différente d'une surface à l'autre, cette altération s'est manifestée généralement par une réduction de leur hydrophobicité, qui a entraîné une réduction de l'adhésion et de la formation de biofilm par deux bactéries ; *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas fluorescens* (Araujo *et al.* 2016). Dans la même étude, les auteurs ont observé qu'avec la surfactine il y a eu une réduction importante du degré de l'hydrophobicité de l'acier inoxydable, alors que son effet sur le polystyrène était négligeable. Par contre, le rhamnolipide a diminué légèrement le degré d'hydrophobicité des deux matériaux. Il est important de noter ici que l'acier inoxydable 304 a exposé une surface plus hydrophobe que le polystyrène (Araujo *et al.* 2016). Ces mêmes résultats ont été rapportés pour ces deux matériaux par Nitschke *et al.* (2009), qui ont prouvé une réduction de l'adhésion bactérienne de trois bactéries ; *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* et *Salmonella enteritidis*, après leur traitement par les mêmes biosurfactants.

## **Conclusion**

En somme, nos résultats montrent d'abord que le degré d'hydrophobicité de surface de *C. albicans* est réduit après son traitement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16, alors que son caractère donneur d'électrons est augmenté. Nous jugeons, à travers ce qui a été discuté précédemment, que ce résultat est d'importance capitale, car les molécules antifongiques capables de réduire le degré d'hydrophobicité de la surface cellulaire de *C. albicans*, par surcroît à leur activité antifongique, seraient capables d'atténuer simultanément l'adhésion, la virulence et la pathogénicité du champignon.

En ce qui concerne le préconditionnement de la surface des alliages dentaires, son impact sur leurs propriétés physicochimiques s'est montré spécifique à chaque alliage. Sur l'alliage Co-Cr, une altération marquée par une augmentation très importante du caractère donneur d'électrons, et par conséquent, de l'énergie libre d'interaction, avec un effet significatif de la durée d'exposition à l'extrait, est manifestée. Alors que sur la surface de l'alliage Ni-Cr, il y a eu une réduction des caractères donneur d'électrons et accepteur d'électrons et donc de l'énergie libre d'interaction, sans effet significatif de la durée d'exposition à l'extrait. Cette différence, en matière du comportement de chaque alliage vis-à-vis du préconditionnement par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16, est expliquée par leurs paramètres physicochimiques initiaux ainsi que leurs compositions élémentaires et leurs structures globales qui auraient éventuellement une influence sur le taux, le type et l'orientation des molécules qui se sont adsorbées sur leurs surfaces.

Quant à l'adhésion, l'extrait méthanolique étudié a théoriquement et expérimentalement prouvé son activité antiadhésive très puissante vis-à-vis de *C. albicans* sur l'alliage dentaire Co-Cr. Cet effet résulte de la modification des propriétés physicochimiques de surface de cet alliage, et ce d'une manière indépendante de son effet antifongique, tenant compte de la concentration utilisée (inférieure à la CMI) et l'adhésion qui est observée pour l'alliage Ni-Cr préconditionné.

Par ailleurs, nous avons prouvé par des corrélations significatives que l'effet antiadhésif observé sur l'alliage Co-Cr est lié à l'influence des paramètres physicochimiques de sa surface, notamment son degré d'hydrophobicité et son caractère donneur d'électrons. Ces altérations ont généré en grande partie des interactions acide-base de Lewis qui sont répulsives entre la surface de *C. albicans* et celle de l'alliage Co-Cr, créant ainsi une barrière d'énergie très forte et impénétrable par les cellules fongiques.

Cette activité antiadhésive additionnée à la thermorésistance de l'extrait antifongique étudié, sont en faveur de son exploitation et son application pour élaborer des revêtements stables sur l'alliage Co-Cr en vue de confectionner des appareils dentaires antiadhésifs.

À travers nos résultats, nous avons également démontré l'efficacité de l'approche physicochimique (XDLVO) dans la prédiction de l'adhésion microbienne, tout en montrant l'influence des interactions acide-base de Lewis entre la surface du champignon et celle de la

surface des alliages sur l'adhésion. Néanmoins, les résultats obtenus pour l'alliage Ni-Cr ont affirmé qu'il est difficile de généraliser les conclusions obtenues par cette approche sur les différents biomatériaux. Ce qui implique que chaque cas doit être interprété à part, et témoignant ainsi de la complexité de l'adhésion et son caractère multifactoriel qui résulte de l'interaction des déterminants physicochimiques, biologiques, hydrodynamiques, etc.

## CONCLUSION GENERALE

Le travail que nous avons entrepris a porté sur la rhizosphère de trois plantes marocaines, à nos connaissances, non explorées auparavant dans le but d'isoler et identifier des souches microbiennes originales douées d'une activité antimicrobienne puissante, et par la suite, mettre en évidence de nouvelles substances antimicrobiennes.

Le criblage antimicrobien de 112 isolats rhizosphériques de *Calotropis procera* Ait., *Myrtus communis* L. et *Pistacia lentiscus* L. a montré que 65 isolats exercent une activité antimicrobienne, soit un pourcentage de 58 %.

Les résultats obtenus montrent que :

- La moitié des isolats rhizosphériques actifs sont des champignons (33/65) soit  $\approx 51$  %.
- La plupart des actinomycètes sont doués d'une activité antimicrobienne puissante vis-à-vis de plusieurs souches indicatrices par rapport aux bactéries non filamenteuses et aux champignons.
- Plusieurs isolats actifs sont classés comme étant des microorganismes d'intérêt majeur par leur activité antimicrobienne vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Candida albicans* et qui peuvent constituer une source de nouveaux agents antimicrobiens.
- Un isolat (16 Cp-LMA-16) se distingue du lot par son activité antifongique très puissante vis-à-vis de *C. albicans*.

Cet isolat a fait l'objet de notre étude par la suite, et son identification a permis d'attribuer son affiliation au genre *Bacillus* avec 98 % de similarité de son ADN<sub>r</sub> 16 S avec les deux espèces *Bacillus subtilis* et *Bacillus tequilensis*. Son activité antifongique, produite dans le milieu LMA et extraite par l'acétone ou le méthanol, a fait preuve d'une grande stabilité à des pH acides et basiques et aux traitements protéolytiques ainsi qu'une grande thermostabilité. Le ratio CMI/CMF = 1 de l'extrait méthanolique suggère un mode d'action fongicide, avec un spectre d'activité qui est étroit et dirigé vis-à-vis de *C. albicans*. Ces caractéristiques constituent un outil très important, d'un point de vue biotechnologique pour son application en tant qu'agent anti-*Candida*.

Ces résultats nouveaux et encourageants nous ont poussés à explorer davantage l'effet de l'extrait antifongique sur les paramètres physicochimiques de la surface de *C. albicans* ATCC

10231. La technique de la mesure des angles de contact a montré que cette levure a une surface hydrophile avec un angle de contact vis-à-vis de l'eau de  $20,33^\circ$ , et une énergie libre d'interaction de  $19,94 \text{ mJ/m}^2$ . La surface de *C. albicans* a exposé également un caractère donneur d'électrons de  $48,72 \text{ mJ/m}^2$ , et qui est largement supérieur du caractère accepteur d'électrons  $5,98 \text{ mJ/m}^2$  pris comme référence.

Le traitement de *C. albicans* avec l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 a permis de rendre sa surface plus hydrophile par la diminution de son angle de contact vis-à-vis de l'eau et par l'augmentation de son énergie libre d'interaction. En même temps, le caractère donneur d'électrons a subi une augmentation, alors que le caractère accepteur d'électrons a subi une diminution. Cette altération suggère, d'après la littérature, qu'elle a un effet réducteur de l'adhésion de ce champignon. De surcroît, une réduction de la virulence a été aussi suggérée.

Nos derniers efforts ont donc porté sur l'application de l'extrait étudié pour empêcher l'adhésion de *C. albicans* sur des alliages dentaires. Dans un premier temps, nous avons examiné les propriétés physicochimiques de surface des deux alliages dentaires Co-Cr et Ni-Cr et nous avons constaté que ces derniers exposent des surfaces avec une mouillabilité similaire, qui indique leur caractère hydrophobe, du moins qualitativement parlant. Les caractères accepteur et donneur d'électrons de ces alliages ont été faibles, malgré qu'ils étaient deux fois plus importants pour l'alliage Ni-Cr que pour l'alliage Co-Cr. L'énergie libre d'interaction des deux alliages a confirmé qu'ils sont quantitativement hydrophobes. De plus, l'alliage Co-Cr s'est montré deux fois plus hydrophobe ( $\Delta G_{iwi} = -64,91 \text{ mJ/m}^2$ ) que l'alliage Ni-Cr ( $\Delta G_{iwi} = -33,84 \text{ mJ/m}^2$ ). Ce fait a été pour la première fois démontré dans cette étude.

Ensuite nous avons préconditionné les surfaces des deux alliages dentaires étudiés par l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16 et nous avons constaté que leurs propriétés physicochimiques ont été affectées significativement, mais d'une manière différente pour chaque alliage. En effet, après préconditionnement de la surface de l'alliage Co-Cr, celle-ci est devenue de plus en plus donneuse d'électrons, avec une valeur maximale de  $\gamma = 53,60 \text{ mJ/m}^2$  obtenue pour une durée de traitement de 240 min. En même temps, la surface de cet alliage est devenue qualitativement et quantitativement hydrophile pour la même durée de traitement ( $\theta_w = 57,20^\circ < 65^\circ$  et  $\Delta G_{iwi} = 23,88 > 0$ ). De plus, ces modifications ont été dépendantes de la durée d'exposition à l'extrait méthanolique. De l'autre côté, les caractéristiques physicochimiques de la surface de

l'alliage Ni-Cr ont été altérées autrement par une réduction du caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons. Par conséquent, il en résulte une diminution de l'énergie libre d'interaction. Ainsi, la surface de cet alliage est devenue plus hydrophobe, mais sans effet significatif de la durée d'exposition à l'extrait.

Enfin, l'étude de l'adhésion théorique par l'approche XDLVO a montré que l'adhésion de *C. albicans* sur les surfaces des alliages préconditionnés a été affectée, mais aussi d'une manière différente pour chaque alliage. Ainsi :

- D'une part, sur la surface de l'alliage Co-Cr, l'adhésion théorique de *C. albicans* est de plus en plus défavorisée après préconditionnement, et ce d'une manière proportionnelle avec la durée d'exposition à l'extrait méthanolique.
- D'autre part, sur la surface de l'alliage Ni-Cr, une diminution de l'énergie totale de l'adhésion impliquant une adhésion favorable du champignon sur la surface préconditionnée de cet alliage a été trouvée, sans effet significatif de la durée d'exposition à l'extrait méthanolique.

D'après les prédictions théoriques de l'adhésion de *C. albicans* sur la surface des alliages dentaires avant et après leur préconditionnement par l'extrait méthanolique étudié, le rôle capital joué par l'hydrophobicité et les caractères donneur et accepteur d'électrons de la surface de chaque alliage dans ce phénomène a été prouvé. Ceci implique également le rôle majeur des interactions acide-base de Lewis dans l'adhésion microbienne.

L'adhésion expérimentale a prouvé que les prédictions théoriques par l'approche XDLVO sont bien vérifiées, étant donné que l'adhésion a été inhibée totalement sur la surface de l'alliage Co-Cr préconditionnée avec l'extrait méthanolique pendant 240 min. Cet effet antiadhésif résulte de la modification des propriétés physicochimiques de surface de l'alliage Co-Cr et n'est pas dû à son effet antifongique. Alors que sur l'alliage Ni-Cr, une augmentation de l'adhésion a été obtenue après le préconditionnement pendant la même durée d'exposition. Par contre, ce résultat montre qu'il est difficile de généraliser les conclusions obtenues par l'approche physicochimique sur les différents biomatériaux



## PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans ce mémoire prouvent d'une part, la richesse des rhizosphères explorées en matière de microorganismes producteurs de substances antimicrobiennes, avec certains isolats distingués par leur effet prometteur.

D'autre part, nos résultats prouvent l'activité antifongique et antiadhésive redoutable de l'isolat sélectionné, faisant d'elles une alternative encourageante pour le traitement des candidoses et pour la conception des appareils dentaires antiadhésifs. Or, d'autres tests, aussi bien sur le plan fondamental que sur le plan appliqué, s'avèrent indispensables pour compléter cette piste de recherche et l'acheminer vers une application médicale prometteuse.

Sur le plan fondamental, il serait souhaitable de procéder à une :

1. Purification et identification du principe actif responsable de l'activité antifongique ;
2. Étude du spectre d'action du principe actif purifié, sa CMI, sa CMF, et le temps minimal nécessaire pour tuer sa cible, ainsi que son mécanisme d'action fongicide ;
3. Étude de l'activité antiadhésive du principe actif purifié pour confirmer si cette activité provient de celui-ci, et étendre cette étude sur d'autres biomatériaux ;
4. Étude de son effet sur le biofilm de *C. albicans* préformé ;
5. Vérifier si le potentiel antiadhésif peut être étendu à d'autres souches cibles impliquées dans les infections prothétiques dues aux biofilms, en considérant également le biofilm multi-espèces ;
6. Étude de l'effet du prétraitement de *C. albicans* par le principe actif purifié (à concentration subinhibitrice) sur la composition chimique de sa paroi cellulaire, sa capacité de formation des tubes germinatifs et de filamentation ainsi que sa capacité de former des biofilms.

Sur le plan appliqué, il serait intéressant de procéder à une étude d'optimisation pour confectionner des revêtements stables antiadhésifs et anti-*Candida* sur la surface de l'alliage Co-Cr, et d'étudier la possibilité de les étendre sur d'autres biomatériaux.

# **Références bibliographiques**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, A., Rutter, P.R., et Berkeley, R.C.W., 1983. The influence of ionic strength, pH and a protein layer on the interaction between *Streptococcus mutans* and glass surfaces. *Journal of general microbiology*, 129, 439–445.
- Absolom, D.R., Lamberti, F. V, Policova, Z., Zingg, W., Van Oss, C.J., et Neumann, A.W., 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and environmental microbiology*, 46 (1), 90–97.
- Abu-lail, N.I. et Camesano, T.A., 2003. Role of Ionic Strength on the Relationship of Biopolymer Conformation , DLVO Contributions , and Steric Interactions to Bioadhesion of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules*, 4 (4), 1000–1012.
- Agarwal, V., Lal, P., et Pruthi, V., 2008. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*, 165 (1), 13–19.
- Aguayo, S., Marshall, H., Pratten, J., Bradshaw, D., Brown, J.S., Porter, S.R., Spratt, D., et Bozec, L., 2017. Early Adhesion of *Candida albicans* onto Dental Acrylic Surfaces. *Journal of Dental Research*, 96 (8), 917–923.
- Ahariz, M., Loeb, I., et Courtois, P., 2010. Candidoses orales et prothèses dentaires. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*, 111, 74–78.
- Ahimou, F., Jacques, P., et Deleu, M., 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and microbial technology*, 27 (10), 749–754.
- Ahire, J.J., Robertson, D.D., Reenen, A.J. Van, et Dicks, L.M.T., 2017. Surfactin-loaded polyvinyl alcohol (PVA) nanofibers alters adhesion of *Listeria monocytogenes* to polystyrene. *Materials Science & Engineering C*, 1 (77), 27–33.
- Ahmad, F., Ahmad, I., et Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163 (2), 173–181.
- Al-Askari, S.K., Ariffin, Z., Husein, A., et Reza, F., 2014. Comparison of Microbial Adherence to Silicone Elastomers for Maxillo-Facial Prostheses. *World Journal of Medical Sciences*, 11 (2), 161–165.
- Al-fattani, M.A. et Douglas, L.J., 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* : chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55, 999–1008.
- Alphei, J., Bonkowski, M., et Scheu, S., 1996. Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the rhizosphere of *Hordelymus europeus* (Poaceae): faunal interactions, response of microorganisms and effects on plant growth. *Oecologia*, 106, 111–126.
- Alshami, I. et Alharbi, A.E., 2014. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of *Candida albicans* isolated from recurrent urinary tract infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (2), 104–108.
- Alsteens, D., Van Dijck, P., Lipke, P.N., et Dufreïne, Y.F., 2013. Quantifying the forces driving cell-cell adhesion in a fungal pathogen. *Langmuir*, 29 (44), 13473–13480.
- An, C., Huang, G., Yao, Y., et Zhao, S., 2017. Emerging usage of electrocoagulation technology for oil removal from wastewater: A review. *Science of the Total Environment*, 579, 537–556.
- An, Y.H., Dickinson, R.B., et Doyle, R.J., 2000. Mechanisms of Bacterial Adhesion and Pathogenesis of Implant and Tissue Infections. In: Y.H. An and R.J. Friedman, eds. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*. New Jersey: Humana Press Inc, 1–28.
- An, Y.H. et Friedman, R.J., 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial

- surfaces. *Journal of biomedical materials research*, 43 (3), 338–348.
- Anil, S., Ellepola, A.N.B., et Samaranayake, L.P., 2001. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Diseases*, 7 (2), 119–122.
- Antley, P.P. et Hazen, K.C., 1988. Role of Yeast Cell Growth Temperature Virulence in Mice on *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 56 (11), 2884–2890.
- Aouiche, A., Sabaou, N., Meklat, A., Zitouni, A., Mathieu, F., et Lebrihi, A., 2012. Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 22 (1), 42–51.
- Araujo, L.V., Guimaraes, C.R., da Silva Marquita, R.L., Santiago, V.M., de Sousa, M. paula, Nitschke, M., et Freire, D.M.G., 2016. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. *Food Control*, 63, 171–178.
- Arendrup, M.C., Dzajic, E., Jensen, R.H., Johansen, H.K., Kjaeldgaard, P., Knudsen, J.D., Kristensen, L., Leitz, C., Lemming, L.E., Nielsen, L., Olesen, B., Rosenvinge, F.S., Røder, B.L., et Schønheyder, H.C., 2013. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clinical microbiology and infection*, 19 (8), E343-53.
- Armellini, D., Reynolds, M.A., Harro, J.M., et Molly, L., 2009. Biofilm Formation on Natural Teeth and Dental Implants: What is the Difference? In: M. Shirtliff and jeff G. Leid, eds. *The role of biofilms in Device-related infections*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 109–122.
- Ashley, E.A., Recht, J., Chua, A., Dance, D., Dhorda, M., Thomas, N. V, Ranganathan, N., Turner, P., Guerin, P.J., White, N.J., et Day, N.P., 2018. An inventory of supranational antimicrobial resistance surveillance networks involving low- and middle-income countries since 2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (March), 1–13.
- Atay, A., Piskin, B., Akin, H., Sipahi, C., Karakas, A., et Saracli, M.A., 2013. Evaluation of *Candida albicans* adherence on the surface of various maxillofacial silicone materials. *Journal de mycologie médicale*, 23 (1), 27–32.
- Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J., et White, R.P., 1985. Numerical Classification of *Actinomyces* and *Nocardia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35 (1), 86–98.
- Baciu, E.-R., Chicet, D., Mares, M., Munteanu, C., Baciu, C., et Forna, N.-C., 2015. Influence of finishing techniques of non-noble alloys used in prosthetic restoration on *Candida albicans* biofilm development. *Environmental Engineering and management Journal*, 11 (5), 1015–1022.
- Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., et Sabaou, N., 2005. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal of Medical Mycology*, 15 (4), 211–219.
- Baillif, S., Hartmann, D., Freny, J., et Kodjikian, L., 2010. Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 33 (3), 210–221.
- Baldo, A., Mathy, A., Vermout, S., Tabart, J., Losson, B., et Mignon, B., 2007. Les mécanismes d'adhérence des champignons responsables de mycoses superficielles. *Annales de Médecine Veterinaire*, 151 (3), 192–199.
- Balouiri, M., Sadiki, M., et Ibsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79.
- Bandyopadhyay, P., Bhuyan, S.K., Yadava, P.K., Varma, A., et Tuteja, N., 2016. Emergence of plant and

- rhizospheric microbiota as stable interactomes. *Protoplasma*, 254 (2), 617–626.
- Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K., et Beaulieu, C., 2002. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 (1), 49–54.
- Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R., et Chamberlain, A.H.L., 1999. Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10), 4543–4548.
- Basilio, A., González, I., Vicente, M.F., Gorrochategui, J., Cabello, A., González, A., et Genilloud, O., 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (4), 814–823.
- Bayoudh, S., Othmane, A., Bettaieb, F., Bakhrouf, A., Ouada, H. Ben., Ponsonnet, L., (2006). Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering C*, 26 (2-3), 300-305.
- Becherelli, M., Tao, J., et Ryder, N.S., 2013. Involvement of heat shock proteins in *Candida albicans* biofilm formation. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 23 (6), 396–400.
- Benedict, R.G., 1953. Antibiotics produced by actinomycetes. *Review Literature And Arts Of The Americas*, XIX (5), 229–320.
- de Bentzmann, S. et Plésiat, P., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: Une virulence complexe. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011 (435), 73–81.
- Berdy, J., 2005. bioactive microbial metabolites. *The journal of antibiotics*, 58 (1), 1–26.
- Bettayeb, K., 2017. La guerre contre les champignons est déclarée. *Sciences & Vie N°1199*, 98.
- Bhunia, A.K., 2008. *Foodborne Microbial Pathogens : Mechanisms and Pathogenesis*. New York: Springer Science+Business Media, LLC. p 289.
- Biniarz, P., Baranowska, G., Feder-Kubis, J., et Krasowska, A., 2015. The lipopeptides pseudofactin II and surfactin effectively decrease *Candida albicans* adhesion and hydrophobicity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108 (2), 343–353.
- Blanco, M., Sacristán, B., Beteta, A., Hurtado, C., et Pérez-giraldo, C., 2008. Cellular surface hydrophobicity as an additional phenotypic criterion applied to differentiate strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60, 129–131.
- Bliss, J.M., Bigelow, C.E., Foster, T.H., et Haidaris, C.G., 2004. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (6), 2000–2006.
- Bohinc, K., Dra, G., Jev, M., Jer, B., Nipi, D., Kurin, M., et Raspor, P., 2016. Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 68, 39–46.
- Bollen, C.M., Papaioanno, W., Van Eldere, J., Schepers, E., Quirynen, M., et van Steenberghe, D., 1996. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical oral implants research*, 7 (3), 201–211.
- Bonaventura, G. Di, Piccolomini, R., Paludi, D., Orio, V.D., Vergara, A., et Conter, M., 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces : relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of applied biological sciences*, 104, 1552–1561.
- Bonet, R., Simon-pujol, M.D., et Congregado, F., 1993. Effects of Nutrients on Exopolysaccharide Production and Surface Properties of *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (8), 2437–2441.
- Bos, R., Mei, H.C. Van Der, et Busscher, H.J., 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 179–230.

- Bowen, W.R., Lovitt, R.W., et Wright, C.J., 2001. Atomic force microscopy study of the adhesion of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 237 (1), 54–61.
- Briandet, R., Fechner, L., Naïtali, M., et Dreanno, C., 2012. *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Quae éditions. p 175.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., et Bellon-Fontaine, M.N., 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and environmental microbiology*, 65 (12), 5328–5333.
- Brown, A.J.P., Budge, S., Kaloriti, D., Tillmann, A., Jacobsen, M.D., Yin, Z., Ene, I. V., Bohovych, I., Sandai, D., Kastora, S., Potrykus, J., Ballou, E.R., Childers, D.S., Shahana, S., et Leach, M.D., 2014. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *The Journal of Experimental Biology*, 217, 144–155.
- Brown, A.J.P., Haynes, K., Gow, N.A.R., et Quinn, J., 2012. Stress Responses in *Candida*. In: R. Calderone et C. Clancy, eds. *Candida and Candidiasis*. Washington D.C: ASM Press, 225–242.
- Buée, M., de Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., et Jurkevitch, E., 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil*, 321 (1–2), 189–212.
- Bujdáková, H., 2016. Management of *Candida* biofilms – state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future microbiology*, 11 (2), 235–251.
- Busscher, H.J., Rinastiti, M., Siswomihardjo, W., et van der Mei, H.C., 2010. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of dental research*, 89 (7), 657–665.
- Camposcia, D., Montanaro, L., et Arciola, C.R., 2013. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 34 (34), 8533–8554.
- de Campos Rasteiro, V.M., da Costa, A.C.B.P., Araújo, C.F., de Barros, P.P., Rossoni, R.D., Anbinder, A.L., Jorge, A.O.C., et Junqueira, J.C., 2014. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. *BMC complementary and alternative medicine*, 14 (489), 1–10.
- Carlet, J., 2011. Stop bacterial resistance: save antibiotics. *Médecine et maladies infectieuses*, 41 (7), 351–2.
- Carolina, A., Ignácio, J., Giro, G., Mendoza-marin, D.O., Gustavo, A., et Antonio, M., 2013. Surface properties and color stability of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer. *Revista de Odontologia da Unesp*, 42 (4), 237–242.
- Carolina, A., Pereira, B., Pereira, C.A., Nuernberg, G., et Brito, B., 2015. *Candida albicans* biofilms : characteristics , clinical relevance , and drug susceptibility-Mini-review. In: A. Méndez-Vilas, ed. *The battle against microbial pathogens: Basic science, Technological advances and educational programs*. Formatex Research Center, 413–421.
- Caumes, E., 1998. *Atlas de dermatologie tropicale*. 4ème éd. Janssen-Cilag, division Afrique. p 88.
- Cavalcanti, I.M.G., Del Bel Cury, A.A., Jenkinson, H.F., et Nobbs, A.H., 2016. Interactions between *Streptococcus oralis*, *Actinomyces oris*, and *Candida albicans* in the development of multispecies oral microbial biofilms on salivary pellicle. *Molecular Oral Microbiology*, 32 (1), 60–73.
- Cazenave, B., Lanternier, F., et Lortholary, O., 2010. Nouveaux antifongiques systémiques. *La lettre de l'infectiologue*, Tome XXV (5), 178–184.
- CEDEF, 2012. Item 87 — Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques : *Candida albicans*. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 139, A40–A46.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A., Mahmoud, A., Cormick, T.M.C., et Ghannoum, M.A., 2001. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida*

- albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of bacteriology*, 183 (18), 5385–5394.
- Chandra, J., Patel, J.D., Li, J., Zhou, G., Mukherjee, P.K., McCormick, T.S., James, M., Ghannoum, M.A., et Anderson, J.M., 2005. Modification of Surface Properties of Biomaterials Influences the Ability of *Candida albicans* To Form Biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 71 (12), 8795–8801.
- Chapman, J., 2015a. Microstructures of Biofilm. In: H. Kanematsu and D.M. Barry, eds. *Biofilm and Materials Science*. London: Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht, 35–44.
- Chapman, J., 2015b. Detachment of Bacteria. In: H. Kanematsu et D.M. Barry, eds. *Biofilm and Materials Science*. London: Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht, 45–52.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., et Joner, E.J., 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental science and pollution research international*, 12 (1), 34–48.
- Chen, G., Wang, Z., Wang, H., Zhao, X., Hu, J., Wang, S., et Zhang, S., 2012. Effects of tetrahedral amorphous carbon film deposited on dental cobalt-chromium alloys on bacterial adhesion. *Surface and Coatings Technology*, 206 (15), 3386–3392.
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., et Borriss, R., 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 140 (1–2), 38–44.
- Chen, Y.L., Brand, A., Morrison, E.L., Silao, F.G.S., Bigol, U.G., Malbas, F.F., Nett, J.E., Andes, D.R., Solis, N. V., Filler, S.G., Averette, A., et Heitman, J., 2011. Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*. *Eukaryotic Cell*, 10 (6), 803–819.
- Chitarra, G.S., Breeuwer, P., Nout, M.J.R., van Aelst, A.C., Rombouts, F.M., et Abee, T., 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of applied microbiology*, 94 (2), 159–66.
- Choma, I.M. et Grzelak, E.M., 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1218 (19), 2684–91.
- Clancy, C.J. et Nguyen, M.H., 2012. Systemic candidiasis: Candidemia and deep-organ infections. In: R.A. Calderone and C.J. Clancy, eds. *Candida and Candidiasis*. Washington D.C: ASM Press, 429–441.
- CLSI, 2002. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard — Second Edition Serving the World ' s Medical Science Community Through Voluntary Consensus*. The National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- CLSI, 2007. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI.
- CLSI, 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard — Eleventh Edition*. CLSI.
- Coad, B.R., Griesser, H.J., Peleg, A.Y., et Traven, A., 2016. Anti-infective Surface Coatings : Design and Therapeutic Promise against Device- Associated Infections. *PLoS Pathogens*, 12 (6), e1005598.
- Cochis, A., Fracchia, L., Martinotti, M.G., et Rimondini, L., 2012. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 113 (6), 755–761.
- Cooper, J.E. et Rao, J.R., 2006. *Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis*. Crop Science. London: CAB International. p 307.
- Corinaldesi, C., Barone, G., Marcellini, F., Anno, A.D., et Danovaro, R., 2017. Marine Microbial-Derived Molecules and Their Potential Use in Cosmeceutical and Cosmetic Products. *Marine drugs*, 15 (118),

- 1–21.
- Costerton, J.W., Lewandowski, D.R., Caldwell, D.E., Korber, D.R., et Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–745.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., et Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318–1322.
- Cowell, B.A., Willcox, M.D.P., Herbert, B., et Schneider, R.P., 1999. Effect of nutrient limitation on adhesion characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology*, 86, 944–954.
- Cuellar-Cruz, M., Gutierrez-Sanchez, G., Lopez-Romero, E., Ruiz-Baca, E., Villagomez-Castro, J.C., et Rodriguez-Sifuentes, L., 2013. Identification of *Candida albicans* heat shock proteins and *Candida glabrata* and *Candida krusei* enolases involved in the response to oxidative stress. *Central European Journal of Biology*, 8 (4), 337–345.
- Dannaoui, É., 2013. Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *RFL Revue francophone des laboratoires*, 2013 (450), 71–77.
- Dantas, A. da S., Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B., et Quinn, J., 2015. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*, 5 (1), 142–65.
- Darouiche, R.O., 2001. Device-Associated Infections : A Macroproblem that Starts with Microadherence. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 1567–1572.
- Dastager, S.G., Deepa, C.K., et Pandey, A., 2011. Growth enhancement of black pepper (*Piper nigrum*) by a newly isolated *Bacillus tequilensis* NII-0943. *Biologia*, 66 (5), 801–806.
- Decuzzi, P. et Ferrari, M., 2010. Modulating cellular adhesion through nanotopography. *Biomaterials*, 31 (1), 173–179.
- Demain, A.L., 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41 (2), 185–201.
- Denieul, A. et Faure, S., 2009. Les traitements antifongiques. *Actualités Pharmaceutiques*, 48 (484), 14–18.
- Desrousseaux, C., Sautou, V., Descamps, S., et Traore, O., 2013. Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *Journal of hospital infection*, 85, 87–93.
- Dickson, J.S. et Koohmaraie, M., 1989. Cell Surface Charge Characteristics and Their Relationship to Bacterial Attachment to Meat Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (4), 832–836.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Ca, L., Sosio, M., et Maria, A., 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of biotechnology*, 99, 187–198.
- Dovigo, L.N., Pavarina, A.C., Carmello, J.C., Machado, A.L., Brunetti, I.L., et Bagnato, V.S., 2011. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43, 927–934.
- Drancourt, M., 1998. Outils moléculaires d'identification en bactériologie. *Médecine et maladies infectieuses*, 28 (Spécial), 380–2.
- Duffy, G. et Sheridan, J.J., 1997. The effect of temperature, pH and medium in a surface adhesion immunofluorescent technique for detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, 83, 95–101.
- Edwards, K.A. et Clancy, H.A., 2006. *Bacillus anthracis* : toxicology , epidemiology and current rapid-detection methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 73–84.
- Elabed, S., Ibsouda, S., Houari, A., Latrache, H., (2013). Experimental and theoretical investigations of the adhesion time of *Penicillium* spores to cedar wood surface. *Materials Science & Engineering C*,



- 33 (3), 1276–1281.
- El-Naggar, M.M., Hassan, A.H.I., Mohamed, G.B., Fagr, K.A.A.-G., et Mohamed, S.I., 2014. Antifungal agent production from a new marine *Bacillus pumilus* SMH101. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (3), 286–296.
- Elbendary, A.A., Hessain, A.M., El-Hariri, M.D., Seida, A.A., Moussa, I.M., Mubarak, A.S., Kabli, S.A., Hemeg, H.A., et El Jakee, J.K., 2017. Isolation of antimicrobial producing *Actinobacteria* from soil samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25 (1), 44–46.
- Ellepola, A.N.B. et Samaranayake, L.P., 1998. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. *Archives of oral biology*, 43 (11), 879–87.
- Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli, L., Karray-Rebai, I., Fourati-Ben Fguira, L., Shaaban, K. A, et Laatsch, H., 2010. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162 (2), 579–93.
- Elshahawy, W. et Watanabe, I., 2014. Biocompatibility of dental alloys used in dental fixed prosthodontics. *Tanta Dental Journal*, 11 (2), 150–159.
- Espinasse, F., Page, B., et Cottard-Boulle, B., 2010. Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *RFL Revue francophone des laboratoires*, 426, 51-63.
- Feldner, J., Bredt, W., et Kahane, I., 1983. Influence of cell shape and surface charge on attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to glass surfaces. *Journal of bacteriology*, 153 (1), 1–5.
- Feng, W., Swift, S., et Singhal, N., 2013. Effects of surfactants on cell surface tension parameters and hydrophobicity of *Pseudomonas putida* 852 and *Rhodococcus erythropolis* 3586. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 105, 43–50.
- Fickers, P., Guez, J.S., Damblon, C., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., et Joris, B., 2009. High-level biosynthesis of the anteiso-C17 isoform of the antibiotic mycosubtilin in *Bacillus subtilis* and characterization of its candidacidal activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (13), 4636–4640.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., et Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (9), 563–575.
- Fletcher, M., 1976. The Effects of Proteins on Bacterial Attachment to Polystyrene. *Journal of general microbiology*, 94, 400–404.
- Fletcher, M. et Loeb, G.I., 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 37 (1), 67–72.
- de Foggi, C.C., Machado, A.L., Zamperini, C.A., Fernandes, D., Wady, A.F., et Vergani, C.E., 2014. Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 5, 1–8.
- Földes, T., Bánhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., et Szigeti, J., 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 89 (5), 840–846.
- Fukazawa, Y. et Kagaya, K., 1997. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 35 (1997), 87–99.
- Gajbhiye, A., Rai, A.R., Meshram, S.U., et Dongre, A.B., 2010. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (7), 1187–1194.
- Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., et Rai, M., 2009. Fungus-mediated synthesis of silver

- nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 5 (4), 382–6.
- Gandhi, A. et Shah, N.P., 2016. Effect of salt stress on morphology and membrane composition of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium bifidum*, and their adhesion to human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. *Journal of Dairy Science*, 99, 1–12.
- Gatson, J.W., Benz, B.F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., et Hart, M.E., 2006. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56 (Pt 7), 1475–84.
- Gerin, P., Bellon-fontaine, M N., Asther, M., Rouxhet P G., 1995. Immobilization of Fungal Spores by Adhesion. *Biochemical Engineering*, 47, 677–687.
- Ghribi, D., Abdelkefi-mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I., Maktouf, S., et Chaabouni-ellouze, S., 2012. Investigation of Antimicrobial Activity and Statistical Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production in Solid-State Fermentation. *Journal of Biomedecine and Biotechnology*, 2012 (ID 373682), 1–12.
- Gilbert, P., Evans, D., Evans, E., Duguid, I.G., et Brown, M.R., 1991. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of applied bacteriology*, 71, 72–77.
- Girardot, M. et Imbert, C., 2016. Novel strategies against *Candida* biofilms : interest of synthetic compounds. *Future microbiology*, 11 (1), 69–79.
- Glick, B.R., 2015. *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. London: Springer International Publishing Switzerland. p 251.
- Goemaere, B., Becker, P., Van Wijngaerden, E Maertens, J., Spriet, I., Hendrickx, M., et Lagrou, K., 2018. Increasing candidemia incidence from 2004 to 2015 with a shift in epidemiology in patients pre-exposed to antifungals. *Mycoses*, 61 (2), 127–133.
- Gonçalves, S.S., Souza, A.C.R., Chowdhary, A., Meis, J.F., et Colombo, A.L., 2016. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*, 59, 198–219.
- Gottenbos, B., Van Der Mei, H.C., et Busscher, H.J., 1999. [38] Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in Enzymology*, 310, 523–534.
- Gow, N.A.R., Brown, A.J.P., et Odds, F.C., 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (4), 366–371.
- Grivet, M., Morrier, J.J., Benay, G., et Barsotti, O., 2000. Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11 (10), 637–642.
- Gulati, M. et Nobile, C.J., 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18 (5), 310–321.
- Gunatilaka, A.A.L., 2006. Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *Journal of natural products*, 69, 509–526.
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P.G., Chen, X., Donose, B.C., Keller, J., Gooding, J.J., et Rabaey, K., 2013. Effects of Surface Charge and Hydrophobicity on Anodic Biofilm Formation, Community Composition, and Current Generation in Bioelectrochemical Systems. *Environmental science & technology*, 47, 7563–7570.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J., et Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 2, 95–108.
- Hamadi, F., Asserne, F., Elabed, S., Bensouda, S., Mabrouki, M., et Latrache, H., 2014. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control*, 38 (1), 104–108.

- Hamadi, F. et Latrache, H., 2008. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 65 (1), 134–9.
- Hamadi, F., Latrache, H., Zahir, H., Elghmari, A., et Timinouni, M., 2008. The relation between *Escherichia coli* surface functional groups' composition and their physicochemical properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 10–15.
- Hamadi, F., Latrache, H., Zekraoui, M., Ellouali, M., et Bengourram, J., 2009. Effect of pH on surface energy of glass and Teflon and theoretical prediction of *Staphylococcus aureus* adhesion. *Materials Science and Engineering C*, 29 (4), 1302–1305.
- Han, A., Tsoi, J.K.H., Pires, F., Leprince, J.G., et Palin, W.M., 2016. Bacterial adhesion mechanisms on dental implant surfaces and the influencing factors. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 69, 58–71.
- Han, N., Mizan, M., Jahid, I., et Ha, S., 2016. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. *Food Control*, 70, 161–166.
- Harriott, M.M. et Noverr, M.C., 2009. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53 (9), 3914–22.
- Harvey, A.L., 2008. Natural products in drug discovery. *Drug discovery Today*, 13 (19/20), 894–901.
- Hazen, K., Plotkin, B., et Klimas, D., 1986. Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infection and immunity*, 54 (1), 269–271.
- Head, D., Devine, D.A., et Marsh, P.D., 2017. In silico modelling to differentiate the contribution of sugar frequency versus total amount in driving biofilm dysbiosis in dental caries. *Scientific Reports*, 7 (1), 1–10.
- Hennequin, C., Gauzit, R., Wolff, M., et Cordonnier, C., 2010. Recommandations de stratégies thérapeutiques pour le traitement des candidoses et aspergilloses invasives chez l'adulte. *Antibiotiques*, 12 (3), 165–170.
- Henriques, M., Azeredo, J., et Oliveira, R., 2004. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33 (3–4), 235–241.
- Henriques, M., Gasparetto, K., et Azeredo, J., 2002. Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Biotechnology letters*, 24, 1111–1115.
- Hermansson, M., 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14 (1–4), 105–119.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., et Peterson, S.B., 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (1), 15–25.
- Höfs, S., Mogavero, S., et Hube, B., 2016. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54 (3), 149–169.
- Holban, M.A., Gestal, C.M., et Grumezescu, M.A., 2016. Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 510 (2), 409–418.
- Hollins, C., 2015. *Basic Guide to Dental Procedures*. Seconde Ed. Journal of Chemical Information and Modeling. John Wiley & Sons Ltd. p 177.
- Hori, K., 2015. Adhesion of Bacteria. In: H. Kanematsu et D.M. Barry, eds. *Biofilm and Materials Science*. London: Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht, 23–34.
- Hori, K. et Matsumoto, S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48 (3), 424–434.

- Hromatka, B.S., Noble, S.M., et Johnson, A.D., 2005. Transcriptional Response of *Candida albicans* to Nitric Oxide and the Role of the YHB1 Gene in Nitrosative Stress and Virulence. *Molecular Biology of the Cell*, 16 (October), 4814–4826.
- Hu, J., Xia, Y., Xiong, Y., Li, X., et Su, X., 2011. Inhibition of biofilm formation by the antisense peptide nucleic acids targeted at the motA gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (9), 1981–1987.
- Hube, B. et Naglik, J., 2001. *Candida albicans* proteinases: Resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, 147 (8), 1997–2005.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., et Schäfer, W., 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of microbiology*, 174, 362–374.
- Hwang, C.S., Rhie, G.E., Oh, J.H., Huh, W.K., Yim, H.S., et Kang, S.O., 2002. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*, 148 (11), 3705–3713.
- Ibrahim, D., Lee, C.C., et Sheh-Hong, L., 2014. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Swietenia macrophylla* leaves. *Natural product communications*, 9 (2), 247–50.
- Intana, W., Yenjit, P., Suwanno, T., Sattasakulchai, S., Suwanno, M., et Chamswarng, C., 2008. Efficacy of Antifungal Metabolites of *Bacillus* spp. for Controlling Tomato Damping-off Caused by *Pythium aphanidermatum*. *Walaikak J Sci and Tech*, 5 (1), 29–38.
- Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y., et Panbangred, W., 2011. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *BMC research notes*, 4, 98.
- Ishijima, S.A., Hayama, K., Burton, J.P., Reid, G., Okada, M., Matsushita, Y., et Abe, S., 2012. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the In vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (7), 2190–2199.
- Isola, M., Isola, R., Lantini, M.S., et Riva, A., 2009. The three-dimensional morphology of *Candida albicans* as seen by high-resolution scanning electron microscopy. *Journal of Microbiology*, 47 (3), 260–264.
- Jabbari, Y.S. Al, 2014. Physico-mechanical properties and prosthodontic applications of Co-Cr dental alloys : a review of the literature. *Journal of advanced prosthodontics*, 6 (2), 138–145.
- Jacobsen, I.D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J.R., et Hube, B., 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Talking Democracy*, 10 (1), 85–93.
- Jemil, N., Ben Ayed, H., Manresa, A., Nasri, M., et Hmidet, N., 2017. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. *BMC Microbiology*, 17 (1), 1–11.
- Jensen, R.H., Astvad, K.M.T., Silva, L.V., Sanglard, D., Jørgensen, R., Nielsen, K.F., Mathiasen, E.G., Doroudian, G., Perlin, D.S., Arendrup, M.C., Hare Jensen, R., Marie, K., Astvad, T., Silva, L.V., Sanglard, D., Jørgensen, R., Fog Nielsen, K., Glintborg Mathiasen, E., Doroudian, G., Perlin, D.S., et Arendrup, M.C., 2015. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70 (9), 2551–2555.
- Jiménez-Esquilín, A.E. et Roane, T.M., 2005. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 32 (8), 378–81.

- Jjemba, P.K. et Alexander, M., 1999. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 31 (4), 623–632.
- Jones, L. et O'shea, P., 1994. The electrostatic nature of the cell surface of *Candida albicans* : A role in Adhesion. *Experimental Mycology*, 18, 111–120.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., Davis, R.W., et Scherer, S., 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (19), 7329–7334.
- Kanematsu, H. et Barry, D.M., 2015. Movement of Bacteria Towards Material Surfaces. In: H. Kanematsu and D.M. Barry, eds. *Biofilm and Materials Science*. London: Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht, 17–22.
- Kaplan, J.B., 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research*, 89 (3), 205–218.
- Kaplan, J.B., 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. *International Journal of Artificial Organs*, 34 (9), 737–751.
- Katsikogianni, M. et Missirlis, Y.F., 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials*, 8, 37–57.
- Kennedy, A.C. et de Luna, L.Z., 2004. Rhizosphere. *Encyclopedia of soils in the environment*. p 399.
- Kennedy, M.J., Calderone, R.A., Cutler, J.E., Kanabe, T., Riesselman, M.H., Robert, R., Senet, J.M., Annaix, V., Bouali, A., et Mahaza, C., 1992. Molecular basis of *Candida albicans* adhesion. *Journal of medical and veterinary mycology*, 30 Suppl 1, 95–122.
- Kennedy, M.J. et Sandin, R., 1988. Influence of growth conditions on *Candida albicans* adhesion, hydrophobicity and cell wall ultrastructure. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 26, 79–92.
- Kennedy, R.K., Naik, P.R., Veena, V., Lakshmi, B.S., Lakshmi, P., Krishna, R., et Sakthivel, N., 2015. 5-Methyl phenazine-1-carboxylic acid: A novel bioactive metabolite by a rhizosphere soil bacterium that exhibits potent antimicrobial and anticancer activities. *Chemico-Biological Interactions*, 231, 71–82.
- Khalil, Djadouni, Elbahloul, et Omar, 2009. The influence of cultural and physical conditions on the antimicrobial activity of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 22 strain. *African J Food Sci*, 3, 11–22.
- Kjelleberg, S. et Hermansson, M., 1984. Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (3), 497–503.
- Klis, F.M., De Groot, P., et Hellingwerf, K., 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 39 (Supplement 1), 1–8.
- Klotz, S.A., 1994. The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates. *FEMS microbiology letters*, 120 (3), 257–62.
- Klotz, S.A., Drutz, D.J., et Zajic, J.E., 1985. Factors Governing Adherence of *Candida* Species to Plastic Surfaces. *Infection and Immunity*, 50 (1), 97–101.
- Kojic, E.M. et Darouiche, R.O., 2004. *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical microbiology reviews*, 17 (2), 255–267.
- Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P., et Hall-Stoodley, L., 2017. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 740-755.
- Krasowska, A. et Sigler, K., 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4 (August), 1–7.

- Krekeler, C., Ziehr, H., et Klein, J., 1989. Physical methods for characterization of microbial cell surfaces. *Experientia*, 45 (11–12), 1047–1055.
- Kruppa, M., 2009. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*, 52 (1), 1–10.
- Kumamoto, C.A., 2002. *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (6), 608–611.
- Kumar, A., Saini, P., et Shrivastava, J.N., 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian journal of experimental biology*, 47 (1), 57–62.
- Kumar, A. et Ting, Y.P., 2016. Streptomycin favors biofilm formation by altering cell surface properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (20), 8843–8853.
- Kumar, D., Shivay, Y.S., Dhar, S., Kumar, C., et Prasad, R., 2013. Rhizospheric flora and the influence of agronomic practices on them: A review. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 83 (1), 1–14.
- Kumar, G.C., Mongolla, P., Joseph, J., Nageswar, Y.V.D., et Kamal, A., 2010. Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 20 (4), 283–289.
- Kumar, S.N., Nambisan, B., Sundaresan, A., Mohandas, C., et Anto, R.J., 2013. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Annals of Microbiology*, 64 (1), 209–218.
- Kuphasuk, C., Oshida, Y., Andres, C.J., Hovijitra, S.T., Barco, M.T., et Brown, D.T., 2001. Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85 (2), 195–202.
- Kurtböke, D.I., 2012. Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 93 (5), 1843–52.
- Lafleur, M.D., Kumamoto, C.A., et Lewis, K., 2006. *Candida albicans* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (11), 3839–3846.
- Lagane, C., 2007. Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR- $\gamma$  dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de PPAR- $\gamma$ . Université Toulouse III- Paul Sabatier.
- Lagha, R., Bellon-Fontaine, M.N., Renault, M., Briandet, R., Herry, J.M., Mrabet, B., Bakhrouf, A., et Chehimi, M.M., 2014. Impact of long-term starvation on adhesion to and biofilm formation on stainless steel 316 L and gold surfaces of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Annals of Microbiology*, 65 (1), 399–409.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., et Goodfellow, M., eds. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, NY, 115-175.
- Lanneau, D., 2010. Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. Université de Bourgogne.
- Łaskawiec, E., 2015. Biofilm – an instrument for wastewater treatment technology. *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa*, 1, 20–26.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., et Marinelli, F., 2001. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79 (3–4), 399–405.
- Lebeaux, D. et Ghigo, J., 2012. Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *Médecine/Sciences*, 28, 727–739.
- Lee, T., Park, D., Kim, K., Lim, S.M., Yu, N.H., Kim, S., Kim, H.Y., Jung, K.S., Jang, J.Y., Park, J.C., Ham, H., Lee, S., Hong, S.K., et Kim, J.C., 2017. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic fusarium species. *Plant Pathology Journal*, 33 (5), 499–507.

- Lee, Y.S., Cho, J.Y., Moon, J.H., et Kim, K.Y., 2017. Isolation and identification of N-butyl-tetrahydro-5-oxofuran-2-carboxamide produced by *Bacillus* sp. L60 and its antifungal activity. *Journal of Basic Microbiology*, 57 (3), 283–288.
- Lepinay, C., 2013. Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Université de Bourgogne.
- Lewis, K., 2010. Persister cells. *Annual review of microbiology*, 64, 357–372.
- Li, B., Jiang, B., Boyce, B.M., et Lindsey, B.A., 2009. Multilayer polypeptide nanoscale coatings incorporating IL-12 for the prevention of biomedical device-associated infections. *Biomaterials*, 30 (13), 2552–2558.
- Li, B., Jiang, B., Dietz, M.J., Smith, E.S., Clovis, N.B., et Murali Krishna Rao, K., 2010. Evaluation of local MCP-1 and IL-12 nanocoatings for infection prevention in open fractures. *Journal of Orthopaedic Research*, 28 (1), 48–54.
- Li, J., Hirota, K., Goto, T., Yumoto, H., Miyake, Y., et Ichikawa, T., 2012. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *Journal of Dentistry*, 40, 686–692.
- Liang, H., Xing, Y., Chen, J., Zhang, D., Guo, S., et Wang, C., 2012. Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BMC complementary and alternative medicine*, 12 (1), 238.
- Liao, K.S., Lehman, S.M., Tweardy, D.J., Donlan, R.M., et Trautner, B.W., 2012. Bacteriophages are synergistic with bacterial interference for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. *Journal of Applied Microbiology*, 113 (6), 1530–1539.
- Lievens, K.H., Rijsbergen, R. Van, Leyns, F.R., Lambert, B.J., Tenning, P., Swings, J., et Joos, H.J., 1989. Dominant Rhizosphere Bacteria as a Source for Antifungal Agents. *Journal of Pesticide Science*, 27, 141–154.
- Logan, N.A. et Berkeley, R.C., 1984. Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. *Journal of general microbiology*, 130 (7), 1871–82.
- Van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., et Zehnder, A.J., 1987a. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (8), 1893–1897.
- Van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., et Zehnder, A.J., 1987b. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (8), 1898–1901.
- Lopes, F.A., Morin, P., Oliveira, R., et Melo, L.F., 2005. The influence of nickel on the adhesion ability of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46 (2), 127–133.
- Ma, S., Zhao, Y., Xia, X., Dong, X., Ge, W., et Li, H., 2015. Effects of *Streptococcus sanguinis* Bacteriocin on Cell Surface Hydrophobicity , Membrane Permeability , and Ultrastructure of *Candida Thallus*. *BioMed Research International*, 2015 (Article ID 514152).
- Maataoui, H., Barkai, H., Sadiki, M., Haggoud, A., Ibsouda Koraichi, S., et Elabed, S., 2014. Physicochemical characterization of actinomycetes isolated from decayed cedar wood: contact angle measurement. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 28 (20), 2046–2053.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M.T., Olairola, C., et Ontiveros, Y., 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45
- Manaranche, C. et Hornberger, H., 2007. A proposal for the classification of dental alloys according to their resistance to corrosion. *Dental Materials*, 23 (11), 1428–1437.

- Mardanova, A.M., Fanisovna Hadieva, G., Tafkilevich Lutfullin, M., Valer'evna Khilyas, I., Farvazovna Minnullina, L., Gadelevna Gilyazeva, A., Mikhailovna Bogomolnaya, L., and Rashidovna Sharipova, M., 2017. *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. *Agricultural Sciences*, 8 (1), 1–20.
- Marshall, K.C., 1985. Mechanisms of Bacterial Adhesion at Solid-Water Interfaces. In: D.C. Savage and M. Fletcher, eds. *Bacterial adhesion: Mechanisms and physiological significance*. New York: Plenum Press, 133–161.
- Martins, M., Henriques, M., Lopez-Ribot, J.L., et Oliveira, R., 2012. Addition of DNase Improves the in vitro Activity of Antifungal Drugs against *Candida albicans* Biofilms. *Mycoses*, 55 (1), 80–85.
- Mayer, F.L., Wilson, D., et Hube, B., 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2), 119–128.
- Mayers, D.L., Sobel, J.D., Ouellette, M., Kaye, K.S., et Marchaim, D., 2017. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*. Second. Switzerland: Springer International Publishing. p 759.
- McCullough, M.J., Ross, B.C., et Reade, P.C., 1996. *Candida albicans* : a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25, 136–144.
- Mceldowney, S. et Fletcher, M., 1986. Effect of Growth Conditions and Surface Characteristics of Aquatic Bacteria on Their Attachment to Solid Surfaces. *Journal of general microbiology*, 132, 513–523.
- Mceldowney, S. et Fletchert, M., 1986. Variability of the Influence of Physicochemical Factors Affecting Bacterial Adhesion to Polystyrene Substrata. *Applied and environmental microbiology*, 52 (3), 460–465.
- McNear, D.H., 2013. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between Meeting the Global Challenge of Sustainable Food, Fuel and Fiber Production. *Nature Education Knowledge*, 4 (3), 1–15.
- Van der Mei, H.C., Bos, R., et Busscher, H.J., 1998. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 11, 213–221.
- Mekayarajjanononth, T. et Winkler, S., 1999. Contact angle measurement on dental implant biomaterials. *Journal of Oral Implantology*, XXV (4), 230–236.
- Mérens, A., Delacour, H., Plésiat, P., Cavallo, J.-D., et Jeannot, K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011 (435), 49–62.
- Millsop, J.W. et Fazel, N., 2016. Oral candidosis. *Clinics in Dermatology*, 34 (4), 487–494.
- Monciardini, P., Iorio, M., Maffioli, S., Sosio, M., et Donadio, S., 2014. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. *Microbial Biotechnology*, 7 (3), 209–220.
- Moran, G., Coleman, D., et Sullivan, D., 2012. An introduction to the medically important *Candida* species. In: R.A. Calderone and C.J. Clancy, eds. *Candida and Candidiasis*. Washington, DC: ASM Press, 11–26.
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D., et White, P.J., 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56 (417), 1729–1739.
- Morra, M. et Cassinelli, C., 1997. Bacterial adhesion to polymer surfaces: a critical review of surface thermodynamic approaches. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 9 (1), 55–74.
- Mosaid, A. Al, Sullivan, D.J., Salkin, I.F., Shanley, D., et Coleman, D.C., 2001. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar. *Journal of clinical microbiology*, 39 (1), 323–327.
- Mostakim, M., El abed, S., Iraqi, M., Benbrahim, K.F., Houari, A., Gounni, A.S., et Ibsouda, S.K., 2011.



- Biocontrol potential of a *Bacillus subtilis* strain against *Bactrocera oleae*. *Annals of Microbiology*, 62 (1), 211–216.
- Murciano, C., Moyes, D.L., Runglall, M., Tobouti, P., Islam, A., Hoyer, L.L., et Naglik, J.R., 2012. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PLoS ONE*, 7 (3), 1–9.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J., et Hube, B., 2003. *Candida albicans* secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67 (3), 400–428.
- Naglik, J.R., Moyes, D.L., Wächtler, B., et Hube, B., 2011. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 13 (12–13), 963–76.
- Do Nascimento, C., Pita, M.S., Pedrazzi, V., De Albuquerque Junior, R.F., et Ribeiro, R.F., 2013. In vivo evaluation of *Candida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. *Archives of Oral Biology*, 58 (7), 853–861.
- Nath Mishra, N., Ali, S., et Shukla, P.K., 2014. Arachidonic acid affects biofilm formation and PGE2 level in *Candida albicans* and non-albicans species in presence of subinhibitory concentration of fluconazole and terbinafine. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18 (83), 287–293.
- Nguyen, V., Karunakaran, E., Collins, G., et Biggs, C.A., 2016. Biointerfaces Physicochemical analysis of initial adhesion and biofilm formation of *Methanosarcina barkeri* on polymer support material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 518–525.
- Nitschke, M., Araújo, L. V, Costa, S.G.V.A.O., Pires, R.C., Zeraik, A.E., Fernandes, A.C.L.B., Freire, D.M.G., et Contiero, J., 2009. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 49 (2), 241–247.
- Nobile, C.J., Fox, E.P., Nett, J.E., Sorrells, T.R., Mitrovich, Q.M., Hernday, A.D., Tuch, B.B., Andes, D.R., et Johnson, A.D., 2012. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, 148 (1–2), 126–138.
- Nobile, C.J. et Johnson, A.D., 2015. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69 (1), 71–92.
- O'Donnell, L.E., Robertson, D., et Ramage, G., 2015. *Candida* virulence factors. In: E.A. Rosa, ed. *Oral Candidosis: Physiopathology, Decision Making, and Therapeutics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 7–19.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., et Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*, 54, 49–79.
- Øilo, M. et Bakken, V., 2015. Biofilm and Dental Biomaterials. *Materials*, 8 (6), 2887–2900.
- Oliveira, R., Azeredo, J., Teixeira, P., et Fonseca, A.P., 2001. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. In: J.W. P. Gilbert, D. Allison, M. Brading, J. Verran, ed. *Biofilm Community Interactions: Chance or Necessity?* Cardiff, UK: Bionline, 11–22.
- Oluyombo, O., Diggle, S.P., et Penfold, C.N., 2018. Competition in biofilms between *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates is driven by R-pyocins. *bioRxiv*, 17 (2–3), 27–44.
- OMS, 2015. Résistance aux antimicrobiens. *Aide-mémoire N°194*. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/fr/>.
- OMS, 2016. *Promouvoir la santé bucco-dentaire en Afrique*. Disponible sur : <http://apps.who.int/iris/handle/10665/205894>
- Van Oss, C.J., 1991. The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles — Their determination and relative roles. *Biofouling*, 4 (1–3), 25–35.
- Van Oss, C.J., 1994. *Interfacial Forces in Aqueous Media*. Taylor & Francis. p 177.

- Van Oss, C.J., 1995. Hydrophobicity of biosurfaces — Origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5 (3–4), 91–110.
- Van Oss, C.J., 2003. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *Journal of Molecular Recognition*, 16 (4), 177–190.
- Van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., et Good, R.J., 1988. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*, 88 (6), 927–941.
- Van Oss, C.J. et Giese, R.F., 1995. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays and Clay Minerals*, 43 (4), 474–477.
- Otto, M., 2014. Biofilms in disease. In: K.P. Rumbaugh et I. Ahmad, eds. *Antibiofilm agents From diagnosis to treatment and prevention*. London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3–13.
- Owens, J.N., Skelley, J.W., et Kyle, J.A., 2010. The Fungus Among Us: An Antifungal Review. *US Pharmacist*, 35 (8), 44–56.
- Owotade, F., Gulube, Z., et Ramla, S., 2016. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolated from the oral cavities of patients with HIV infection and cancer. *South African Dental Journal*, 71 (1), 8–11.
- Pagès, J.-M., Monlezun, L., Broutin, I., et Davin-Regli, A., 2011. Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011 (435), 63–72.
- Palanisamy, S.K.A., Ramirez, M.A., Lorenz, M., et Lee, S.A., 2010. *Candida albicans* PEP12 is required for biofilm integrity and in Vivo virulence. *Eukaryotic Cell*, 9 (2), 266–277.
- Panagoda, G.J., Ellepola, A.N.B., et Samaranyake, L.P., 2001. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*, 44 (1–2), 29–35.
- Passari, A.K., Mishra, V.K., Saikia, R., Gupta, V.K., et Singh, B.P., 2015. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology*, 6 (April), 1–13.
- Pathak, K. V, Bose, A., et Keharia, H., 2014. Characterization of Novel Lipopeptides Produced by *Bacillus tequilensis* P15 Using Liquid Chromatography Coupled Electron Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC – ESI – MS/MS). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20 (2), 133–143.
- Percival, S.L., Suleman, L., et Donelli, G., 2015. Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology*, 64 (4), 323–334.
- Pereira-Cenci, T., Cury, A., Cenci, M., et Rodrigues-Garcia, R., 2007. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *The International journal of prosthodontics*, 20 (3), 308–310.
- Pereira, A.C., Domingues, N., Isabel, M.D.S., Araujo, A., Junqueira, J.C., Back-brito, G.N., et Olavo, A.C.J., 2016. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85 (1), 66–72.
- Perić, M., Živković, R., Lemić, A.M., Radunović, M., Miličić, B., et Arsenijević, V.A., 2018. The severity of denture stomatitis as related to risk factors and different *Candida* spp. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. (Sous Presse). <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.003>
- Pfaller, M.A. et Diekema, D.J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (1), 133–163.
- Pfaller, M. a et Diekema, D.J., 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology*, 36 (1), 1–53.
- Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Ibrahim, A.S., Edwards,

- J.E., et Filler, S.G., 2007. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biology*, 5 (3), 0543–0557.
- Del Pozo, J.L., 2018. Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 16 (1), 51–65.
- Prashith, K.T., Onkarappa, R., et Raghavendra, H., 2013. Pharmacological Activities of *Streptomyces* Species PO-178 Isolated from Rhizosphere Soil of Agumbe, Karnataka, India. *Science, Technology and Arts Research journal*, 2 (2), 83–91.
- Puchter, L., Chaberny, I.F., Schwab, F., Vonberg, R.-P., Bange, F.-C., et Ebadi, E., 2018. Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial resistance and infection control*, 7 (1), 1–7.
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O., et Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34 (6), 1037–1062.
- Radha, T.K., Rao, D.L.N., et Ramulu, K.R.S., 2017. Media Comparison for Enumeration of *Actinobacteria* and their Catabolic Diversity in the Crop Rhizosphere of Arid, Semi-Arid and Humid Regions (AER 3 and AER 6) of India. *International Journal of current microbiology and applied sciences*, 6 (10), 955–962.
- Rajaofera, M.J.N., Jin, P.F., Fan, Y.M., Sun, Q.Q., Huang, W.K., Wang, W.B., Shen, H.Y., Zhang, S., Lin, C.H., Liu, W.B., Zheng, F.C., et Miao, W.G., 2017. Antifungal activity of the bioactive substance from *Bacillus atrophaeus* strain HAB-5 and its toxicity assessment on *Danio rerio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. (Sous Presse). <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.006>
- Ramachandran, R., Shrivastava, M., Narayanan, N.N., Thakur, R.L., Chakrabarti, A., et Roy, U., 2017. Evaluation of Antifungal Efficacy of Three New Cyclic Lipopeptides of the Class Bacillomycin from *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62 (1), e01457-17.
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., et Lopez-Ribot, J., 2009. Our current understanding of fungal biofilms. *Critical reviews in microbiology*, 35 (4), 340–55.
- Ramage, G., Saville, S.P., et Thomas, D.P., 2005. Biofilms: an Update†. *Eukaryotic Cell*, 4 (4), 633–638.
- Ramage, G., Tomsett, K., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, J.L., et Redding, S.W., 2004. Denture stomatitis : A role for *Candida* biofilms. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 98 (1), 53–59.
- Rastogi, S., Singh, A.K., Pant, G., Mitra, K., Sashidhara, K. V., et Krishnan, M.Y., 2017. Down-regulation of PE11, a cell wall associated esterase, enhances the biofilm growth of *Mycobacterium tuberculosis* and reduces cell wall virulence lipid levels. *Microbiology (United Kingdom)*, 163 (1), 52–61.
- Rautela, R., Singh, A.K., Shukla, A., et Cameotra, S.S., 2014. Lipopeptides from *Bacillus* strain AR2 inhibits biofilm formation by *Candida albicans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105 (5), 809–821.
- Razak, F.A., Othman, R.Y., et Rahim, Z.H.A., 2006. The effect of Piper betle and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *Journal of oral science*, 48 (2), 71–5.
- Ribeiro, S.M., Felicio, M.R., Boas, E.V., Gonçalves, S., Costa, F., Samy, R.P., Santos, N.C., et Franco, O.L., 2016. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology and Therapeutics*, 160, 133–144.
- Rieckmann, K., Müller, K., Moter, A., Baums, C.G., et Seydel, A., 2017. *Streptococcus suis* serotype 9 endocarditis and subsequent severe meningitis in a growing pig despite specific bactericidal humoral immunity. *JMM case reports*, 4 (5), e005093.
- Rinastiti, M., 2016. Biomaterials in Dentistry. In: F. Mahyudin and H. Hermawan, eds. *Biomaterials and*

- Medical Devices, Advanced Structured Materials*. Springer International Publishing Switzerland, 183–205.
- Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., et Martinotti, M.G., 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 83, 541–553.
- Roach, M., 2007. Base Metal Alloys Used for Dental Restorations and Implants. *Dental Clinics of North America*, 51 (3), 603–627.
- Roger, T., Bhakoo, M., et Zhang, Z., 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in natural science*, 18, 1049–1056.
- Rojo, L., Barcenilla, J.M., Vázquez, B., González, R., et San Román, J., 2008. Intrinsically antibacterial materials based on polymeric derivatives of eugenol for biomedical applications. *Biomacromolecules*, 9 (9), 2530–2535.
- Rybtke, M.T., Jensen, P.Ø., Høiby, N., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., et Bjarnsholt, T., 2011. The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. *Inflammation & allergy drug targets*, 10, 141–157.
- Saadoun, I., Hameed, K.M., et Moussauui, A., 1999. Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. *Microbios*, 99 (394), 173–9.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M.F.R., et Ha, S.D., 2015. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (4), 491–509.
- Sadiki, M., Elabed, S., Barkai, H., et Laachari, F., 2015. The impact of *Thymus vulgaris* extractives on cedar wood surface energy : Theoretical and experimental of *Penicillium* spores adhesion. *Industrial Crops & Products*, 77, 1020–1027.
- Saeki, D., Nagashima, Y., Sawada, I., et Matsuyama, H., 2016. Physicochemical and engineering aspects effect of hydrophobicity of polymer materials used for water purification membranes on biofilm formation dynamics. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 506, 622–628.
- Salerno, C., Pascale, M., Contaldo, M., Esposito, V., et Busciolano, M., 2011. Candida-associated denture stomatitis. *Oral medicine and pathology*, 16 (2), 139–143.
- Sanchis, V. et Bourguet, D., 2008. *Bacillus thuringiensis* : applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 11–20.
- Sandin, R.L., 1987. The attachment to human buccal epithelial cells by *Candida albicans* : An in vitro kinetic study using concanavalin A. *Mycopathologia*, 98, 179–184.
- Sanin, S.L., Sanin, F.D., et Bryers, J.D., 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry*, 38, 909–914.
- Sansinenea, E. et Ortiz, A., 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, 33 (8), 1523–1538.
- Santos, A.L.S., Carvalho, I.S., Prata, J.M., Martins, M.B., Souza, L.O.P., Galdino, A.C.M., Braga-silva, L.A., et Marta, H., 2016. *Candida Albicans* Involvement in Denture-Related Stomatitis : A Serious and Real Clinical Concern. *Journal of infections diseases and diagnosis*, 1 (1), 13–15.
- Santos, M.S., Orlandelli, R.C., Polonio, J.C., Alessandro, M., Sarragiotto, M.H., Azevedo, J.L., et Pamphile, J.A., 2017. Endophytes isolated from passion fruit plants : molecular identification , chemical characterization and antibacterial activity of secondary metabolites. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7 (4), 38–43.
- Sarazin, A., 2010. Les glycannes pariétaux de levures et leur implication dans l'induction et la régulation

- de la réponse immunitaire de l'hôte. Université du Droit et de la Santé - Lille II.
- Sardin, S., Morrier, J.-J., Benay, G., et Barsotti, O., 2004. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. *Journal of oral rehabilitation*, 31 (2), 140–148.
- Sbordone, L. et Bortolaia, C., 2003. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical oral investigations*, 7 (4), 181–188.
- Schippers, B., Bakker, A.W., et Bakker, P.A.H.M., 1987. Interactions of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Microorganisms and the Effect of Cropping Practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25 (1), 339–358.
- Schleifer, K.-H., 2009. Phylum XIII.Firmicutes Gibbons and Murray. In: P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N. Krieg, W. Ludwig, F. Rainey, K.-H. Schleifer, and W. Whitman, eds. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology SE - 3*. Springer New York, 19–1317.
- Schrey, S.D., Hartmann, A., et Hampp, R., 2015. Rhizosphere Interactions. In: G.-J. Krauss and D.H. Nies., eds. *Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions*. Wiley-Blackwell, 292–311.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Ro, A., et Krohn, K., 2002. Endophytic fungi : a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycology research*, 106 (9), 996–1004.
- Serrano-Granger, C., Cerero-Lapiedra, R., Campo-Trapero, J., et Del Río-Highsmith, J., 2005. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *The International journal of prosthodontics*, 18 (5), 392–398.
- Shah, S.R., Tataru, A.M., D'Souza, R.N., Mikos, A.G., et Kasper, F.K., 2013. Evolving strategies for preventing biofilm on implantable materials. *Materials Today*, 16 (5), 177–182.
- Shakerifard, P., Gancel, F., Jacques, P., et Faille, C., 2009. Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling*, 25 (6), 533–541.
- Shannon, J.L., 1981. Scanning and Transmission Electron Microscopy of *Candida albicans* Chlamydospores. *Journal of general microbiology*, 125, 199–203.
- Sharp, J.M. et Dickinson, R.B., 2005. Direct evaluation of DLVO theory for predicting long-range forces between a yeast cell and a surface. *Langmuir*, 21 (18), 8198–8203.
- Shinde, R.B., Chauhan, N.M., Raut, J.S., et Karuppaiyil, S.M., 2012. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 11 (1), 27–37.
- Shirliff, M. et Leid, jeff G., 2009. *The role of biofilms in Device-related infections*. Springer S. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p 276.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., et Azeredo, J., 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2), 288–305.
- Singh, A.V., Vyas, V., Patil, R., Sharma, V., Scopelliti, P.E., Bongiorno, G., Podestà, A., Lenardi, C., Gade, W.N., et Milani, P., 2011. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PloS one*, 6 (9), e25029.
- Singh, N., Agrawal, V., Permmaraju, S.C., Panwar, R., et Pruthi, V., 2011. Impact of infectious *Candida albicans* biofilm on biomaterials. *Indian Journal of Biotechnology*, 10, 417–422.
- Singh, R., Paul, D., et Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*,

- 14 (9), 389–397.
- Singh, V.K., Kavita, K., Prabhakaran, R., et Jha, B., 2013. Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling: The journal of Bioadhesion and Biofilm research*, 29 (7), 855–867.
- Sipahi, C., Anil, N., et Bayramli, E., 2001. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *Journal of Dentistry*, 29, 197–204.
- Sitterlé, E., Coste, A., Maufrais, C., Sertour, N., Sanglard, D., D'enfert, C., et Bougnoux, M.-E., 2017. Analyse du polymorphisme des gènes de *Candida albicans* impliqués dans la résistance aux azolés et aux échinocandines et description de potentielles nouvelles mutations de résistance aux azolés chez des isolats cliniques. *Journal de Mycologie Médicale*, 27 (3), e14–e15.
- Skvarla, J., 1993. A Physico-chemical Model of Microbial Adhesion. *Journal of Chemical Society*, 89 (15), 2913–2921.
- Slepecky, R.A. et Hemphill, H.E., 2006. The Genus *Bacillus* — Nonmedical. *Prokaryotes*, 4, 530–562.
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., et Rajnisz, A., 2012. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology*, 7 (3), 373–390.
- Soll, D.R. et Daniels, K.J., 2016. Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80 (3), 565–595.
- Song, B., Rong, Y.J., Zhao, M.X., et Chi, Z.M., 2013. Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (16), 7141–7150.
- Song, F., Koo, H., et Ren, D., 2015. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of dental research*, 94 (8), 1027–1034.
- Srey, S., Jahid, I.K., et Ha, S. Do, 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31 (2), 572–585.
- Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosept, R., Srisakthi, K., et Gurunathan, S., 2011. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85, 174–181.
- Srivastava, S. et Bhargava, A., 2016. Biofilms and human health. *Biotechnology Letters*, 38 (1), 1–22.
- Stackebrandt, E. et Goebel, B.M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 (4), 846–849.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., et Klapper, I., 2002. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 29 (6), 361–367.
- Strobel, G.A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection*, 5 (6), 535–44.
- Sudbery, P., Gow, N., et Berman, J., 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12 (7), 317–324.
- Sun, J.N., Solis, N. V., Phan, Q.T., Bajwa, J.S., Kashleva, H., Thompson, A., Liu, Y., Dongari-Bagtzoglou, A., Edgerton, M., et Filler, S.G., 2010. Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathogens*, 6 (11), e1001181.
- Sundstrom, P., Balish, E., et Allen, C.M., 2002. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *The Journal of infectious diseases*, 185 (4), 521–530.
- Tabbene, O., Kalai, L., Slimene, I. Ben, Karkouch, I., Elkahoui, S., Gharbi, A., Cosette, P., Mangoni, M.,

- Jouenne, T., et Limam, F., 2011. Anti-*Candida* effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38. *FEMS Microbiology Letters*, 316, 108–114.
- Taechowisan, T., Peberdy, J.F., et Lummyong, S., 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 381–385.
- Taff, H.T., Mitchell, K.F., Edward, J.A., et Et es, D.R., 2013. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future microbiology*, 8 (10), 1–19.
- Tamada, Y. et Ikada, Y., 1993. Effect of preadsorbed proteins on cell adhesion to polymer surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 155, 334–339.
- Tamehiro, N., Okamoto-hosoya, Y., Ubukata, M., Hamada, M., Okamoto, S., Naganawa, H., et Ochi, K., 2002. Bacilysocin, a Novel Phospholipid Antibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (2), 315–320.
- Tamilarasi, S., Nanthakumar, K., Karthikeyan, K., et Lakshmanaperumalsamy, P., 2008. Diversity of root associated microorganisms of selected medicinal plants and influence of rhizomicroorganisms on the antimicrobial property of *Coriandrum sativum*. *Journal of Environmental Biology*, 29 (1), 127–134.
- Tan, Z., Lin, B., et Zhang, R., 2013. A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. *SpringerPlus*, 2, 543.
- Tang, H., Cao, T., Liang, X., Wang, A., Salley, S.O., Ii, J.M., et Ng, K.Y.S., 2008. Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of biomedical materials research Part A*, 88 (2), 454–463.
- Tardieux, P. et Pochon, J., 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Éditions de la Tourelle Issoudun, impr. Gagnault. p 112.
- Tokunaga, M., Kusamichi, M., et Koike, H., 1986. Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique. *Microscopy*, 35 (3), 237–246.
- Tremblay, Y.D., Hathroubi, S., et Jacques, M., 2014. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 78, 110–116.
- Trindade, L.A., Oliveira, J.A., Dias De Castro, R., et Lima, O.E., 2015. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clinical oral investigations*, 19 (9), 2223–2231.
- Tronchin, A.G., Bouchara, J.P., Annaix, V., Robert, R., et Senet, J.M., 1991. Fungal Cell Adhesion Molecules in *Candida albicans*. *European journal of epidemiology*, 7 (1), 23–33.
- Tsang, P.W.K., Bandara, H.M.H.N., et Fong, W.P., 2012. Purpurin Suppresses *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Development. *PLoS ONE*, 7 (11), e50866.
- Tumbarello, M., Repetto, E., Treçarichi, E.M., Bernardini, C., De Pascale, G., Parisini, A., Rossi, M., Molinari, M.P., Spanu, T., Viscoli, C., Cauda, R., et Bassetti, M., 2011. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and mortality. *Epidemiology and infection*, 139 (11), 1740–9.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., et Palmer, J.D., 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 327–338.
- Uddin, G., Rauf, A., Siddiqui, B.S., Muhammad, N., Khan, A., Uzair, S., et Shah, A., 2014. Antinociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L. *Phytomedicine*, 21 (7), 954–959.
- Urushibara, Y., Ohshima, T., Sato, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Maeda, N., et Ohkubo, C., 2014. An analysis of the biofilms adhered to framework alloys using in vitro denture plaque models. *Dental*

- Materials Journal*, 33 (3), 402–414.
- Uwamahoro, N., Verma-gaur, J., Shen, H., Qu, Y., Lewis, R., Lu, J., Bambery, K., Masters, S.L., Vince, J.E., Naderer, T., et Traven, A., 2014. The Pathogen *Candida albicans* Hijacks Pyroptosis for Escape from Macrophages. *mBio*, 5 (2), 1–11.
- Vieira, F.C.S. et Nahas, E.Ã., 2005. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiological Research*, 160, 197–202.
- Vogler, E.A., 1998. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 74, 69–117.
- Vroman, L., Adams, A.L., Klings, M., et Fischer, G., 1975. Fibrinogen, Globulins, Albumin and Plasma at Interfaces. In: *Applied Chemistry at Protein Interfaces*. American Chemical Society, 255–289.
- Wächtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., et Hube, B., 2011. From attachment to damage: Defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS ONE*, 6 (2), e17046.
- Wahid, N., 2013. Perspectives de la valorisation de l'usage et de la culture du *Myrtus communis* L. au Maroc. *Phytothérapie*, 11 (4), 237–243.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., et Vivanco, J.M., 2014. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant physiology*, 132 (May), 44–51.
- Wanderley, Y., Wilson, M., Lewis, M., Williams, D., Mendes, P., Del-bel-cury, A.A., et José, W., 2016. Salivary pellicles equalise surfaces' charges and modulate the virulence of *Candida albicans* biofilm. *Archives of Oral Biology*, 66, 129–140.
- Wang, T., Shi, G., Shao, J., Wu, D., Yan, Y., Zhang, M., Cui, Y., et Changzhong, W., 2015. In vitro antifungal activity of baicalin against *Candida albicans* biofilms via apoptotic induction. *Microbial Pathogenesis*, 87, 21–29.
- Wataha, J.C., 2002. Alloys for prosthodontic restorations. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 87 (4), 351–363.
- Watts, H.J., Véry, A.A., Perera, T.H.S., Davies, J.M., et Gow, N.A.R., 1998. Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology*, 144, 689–695.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., et Bhole, B.D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176 (5), 386–390.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., et Lane, D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of bacteriology*, 173 (2), 697–703.
- Weiser, J., Henke, H.A., Hector, N., Both, A., Christner, M., Büttner, H., Kaplan, J.B., et Rohde, H., 2016. Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and immune evasion. *International Journal of Medical Microbiology*, 306 (6), 471–8.
- Westhoff, S., van Wezel, G.P., et Rozen, D.E., 2017. Distance-dependent danger responses in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 95–101.
- Whitehead, K.A. et Verran, J., 2006. The effet of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*, 84 (4), 253–259.
- Whithman, B.W., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume three (the Firmicutes)*. 2nd ed. New York: Springer Dordrecht Heidelberg. p 1450.
- Wieland, K., Chhatwal, P., et Vonberg, R.-P., 2018. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. *American Journal of Infection Control*. (Sous presse). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.12.014>.
- Williams, C. et Ramage, G., 2015. Fungal biofilms in human disease. In: G. Donelli, ed. *Biofilm-based*



- healthcare-associated infections*. London: Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht, 11–27.
- Williams, J.F. et Worley, S.D., 2000. Infection-resistant nonleachable materials for urologic devices. *Journal of Endourology*, 14 (5), 395–400.
- Wilson, W.W., Wade, M.M., Holman, S.C., et Champlin, F.R., 2001. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 43 (3), 153–164.
- Wong, J.H., Hao, J., Cao, Z., Qiao, M., Xu, H., Bai, Y., et Ng, T.B., 2008. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1888–1898.
- Wu, S., Jia, S., Sun, D., Chen, M., Chen, X., Zhong, J., et Huan, L., 2005. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Current microbiology*, 51, 292–296.
- Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., et Qin, W., 2015. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, 3 (4), 316–323.
- Yarbrough, G.G., Taylor, D.P., Rowlands, R.T., Crawford, M.S., et Lasure, L.L., 1992. Screening microbial metabolites for new drugs-Theoretical and practical issues. *The journal of antibiotics*, 46 (4), 535–544.
- Yeater, K.M., Chandra, J., Cheng, G., Mukherjee, P.K., Zhao, X., Rodriguez-Zas, S.L., Kwast, K.E., Gannoum, M.A., et Hoyer, L.L., 2007. Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology*, 153 (8), 2373–2385.
- York, A., 2017. Biofilms: The architect of the biofilm. *Nature Reviews Microbiology*, 15 (11), 642–643.
- Yoshijima, Y., Murakami, K., Kayama, S., Liu, D., Hirota, K., Ichikawa, T., et Miyake, Y., 2010. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses*, 53 (3), 221–226.
- Zhang, X., Wang, L., et Levanen, E., 2013. Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion. *RSC Advances*, 3 (30), 12003–12020.
- Zheng, L., Han, X., Chen, H., Lin, W., et Yan, X., 2005. Marine bacteria associated with marine macroorganisms : the potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology*, 55 (2), 119–124.
- Zhong, H., Zeng, G.M., Yuan, X.Z., Fu, H.Y., Huang, G.H., et Ren, F.Y., 2007. Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 (2), 447–455.

# **Annexes**

## ANNEXES

**Annexe 1 : Principaux antifongiques utilisés dans le traitement des infections fongiques invasives (Robert-gangneux *et al.* 2010) avec modifications**

DCI* (nom commercial)	Voie d'administration	Toxicité	Classe thérapeutique et mécanisme d'action	Spectre d'activité
Amphotéricine B désoxycholate (Fungizone®)	Intraveineuse	Rénale +++ Hypokaliémie Hématologique +	Polyènes : complexe avec l'ergostérol et altération de perméabilité membranaire – (Fongicide)	<i>Candida</i> sp., cryptocoque, moisissures, dimorphiques
Amphotéricine B liposomale (Ambisome®)	Intraveineuse	Rénale +	Polyènes : Formulation liposomale d'amphotéricine B (Fongicide)	<i>Candida</i> sp., cryptocoque, <i>Aspergillus</i> ±, Mucorales, dimorphiques
Amphotéricine B complexe lipidique (Abelcet®)	Intraveineuse	Rénale ++	Polyènes : Complexe phospholipidique d'amphotéricine B	<i>Candida</i> sp., cryptocoque, <i>Aspergillus</i> ±, Mucorales, dimorphiques
5-fluorocytosine (Ancotil®)	Orale ou Intraveineuse	Hématologique++ et hépatique +	Analogue pyrimidique : Perturbation de la synthèse d'ADN et de la synthèse protéique (Fongistatique)	<i>Candida</i> sp., <i>Fonsecaea</i> sp., cryptocoque
Itraconazole (Sporanox®)	Orale	Hépatique ±	Azolé : Blocage du cyt P450 et de la C14 lanostérol déméthylase, inhibant la synthèse de l'ergostérol membranaire (Fongistatique)	<i>Candida</i> sp., dimorphiques, <i>Aspergillus</i> , <i>Malassezia</i>
Kétoconazole (Nizoral®)	Orale	Hépatique +	Azolé	<i>Candida</i> sp., <i>Malassezia</i> Dimorphiques ±
Fluconazole (Triflucan®)	Orale ou Intraveineuse	Hépatique ±	Azolé	<i>Candida</i> sp, cryptocoque
Voriconazole (V-Fend®)	Orale (pendant le repas) ou Intraveineuse	Hépatique +	Azolé : Fongicide sur <i>Aspergillus</i> Fongistatique sur <i>Candida</i>	<i>Candida</i> sp., cryptocoque, <i>Trichosporon</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> <i>apiospermum</i> , dimorphiques
Posaconazole (Noxafil®)	Orale Pendant le repas	Hépatique +	Azolé	<i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , Mucorales, certains dimorphiques
Caspofungine (Cancidas®)	Intraveineuse	Hépatique ±	Échinocandine : Inhibition de la synthèse du $\beta$ (1,3)-D-glucane de la paroi. Fongicide sur <i>Candida</i> sp.	<i>Candida</i> sp, <i>Aspergillus</i> , certains dimorphiques
Anidulafungine (Ecalta®)	Intraveineuse	Hépatique ±	Échinocandine	<i>Candida</i> sp.
Micafungine (Mycamine®)	Intraveineuse	Hépatique ±	Échinocandine	<i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i>

---

\* DCI : Dénomination commune internationale

## Annexe 2 : Solutions tampons et milieux de culture

### 1- Tampons et solutions employés

- **Tampon Tris-Acétate EDTA (TAE) :**

Tris	40 mM
Acide acétique glacial	2,5 mM
EDTA	0,5 M
pH final 8,2 ± 0,2	

- **Solution de charge**

Glycérol	30 %
Bleu de bromophénol	2,5 mg
Eau distillée	1 ml

- **Tampon phosphate salin (PBS)**

Phosphate dipotassique d'hydrogène	1,1 g
Dihydrophosphate de potassium	0,32 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	1 L
pH 7,2 ± 0,2	

### 2- Milieux de culture

- **Gélose glucosée à l'extrait de levure (GYEA)**

Ce milieu est préconisé par (Athalye *et al.* 1985) pour cultiver les actinomycètes. Il a été utilisé pour l'isolement des actinomycètes producteurs des substances antifongiques à partir du sol (Badji *et al.* 2005).

Glucose	10,0 g/l
Extrait de levure	10,0 g/l
Agar	15,0 g/l
pH final 7,2 ± 0,2	

- **Bouillon à l'extrait de levure et à l'extrait de malt (LMB)**

Le milieu à l'extrait de levure et l'extrait de malt est utilisé pour cultiver et dénombrer les moisissures et les levures. Additionné de 2 % d'agar, ce milieu est utilisé comme milieu solide (LMA).

Extrait de levure	1 g/l
Extrait de malt	20 g/l
pH final 7,0 ± 0,2	

- **Gélose dextrosée à la pomme de terre (Potato dextrose Agar) (PDA)**

Ce milieu de culture est largement utilisé pour cultiver des mycètes et des bactéries (actinomycètes en particulier) qui attaquent les plantes vivantes ou la matière organique végétale en décomposition. La préparation commerciale, déshydratée (Difco), est dissoute en raison de 39 g/l d'eau distillée.

Infusion de pomme de terre	4,0 g/l
Dextrose	20,0 g/l
Agar	15,0 g/l
pH final 5,6 ± 0,2	

- **Bouillon lysogène (ou milieu Luria-Bertani) LB**

Il s'agit d'un milieu nutritif communément utilisé pour cultiver les bactéries. Additionné de 2 % d'agar, ce milieu est utilisé comme milieu solide.

Peptone	10,0 g/l
Extrait de levure	5,0 g/l
Chlorure de sodium	10,0 g/l
pH final 7,0 ± 0,2	

- **Bouillon nutritif (NB)**

Le bouillon nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes non exigeants. La gélose nutritive est préparée par ajout de 1,5 % d'agar.

Extrait de viande	1,0 g/l
Extrait de levure	2,5 g/l
Peptone	5,0 g/l
Chlorure de sodium	5,0 g/l
pH final 7,0 ± 0,2	

- **Bouillon Tryptone-Soja**

Le bouillon TSB est souvent employé pour la croissance des bactéries. La préparation commerciale, déshydratée (Scharlau), est dissoute en raison de 30 g/l d'eau distillée. Additionné de 1,5 % d'agar, ce milieu est utilisé comme milieu solide (TSA).

Peptone de caséine	17,0 g/l
Peptone de Soja	3,0 g/l
Chlorure de sodium	5,0 g/l
Phosphate di-potassique	2,5 g/l
Dextrose	2,5 g/l
pH final 7,3 ± 0,2	

- **Gélose de Mueller-Hinton (MHA)**

La gélose MHA est le milieu recommandé pour la réalisation de l'antibiogramme selon la norme de (CLSI 2007). Nous l'avons employée pour étudier le spectre d'action antibactérien de l'extrait méthanolique de *Bacillus* sp. Cp-LMA-16.

Amidon	1,5 g/l
Extrait de viande	2,0 g/l
Hydrolysate de caséine	17,5 g/l
Agar	17 g/l
pH final 7,0± 0,2	

- **Milieu extrait de levure-peptone-glucose (YPG)**

Le milieu YPG ou YPD est communément utilisé pour cultiver les levures. Additionné de 1,5 % d'agar, ce milieu est utilisé comme milieu solide.

Extrait de levure	30,0 g/l
Peptone	10,0 g/l
Glucose	20,0 g/l
pH final 7,0 ± 0,2	

### Annexe 3 : Composition et propriétés physiques des alliages dentaires

#### 1- Alliage base-metal cobalt-chrome (Co-Cr)

##### Magnum H60, cobalt based dental alloy for prostheses, type 5\*, Mesa® (ITALIA)

- **Composition**

Métal	Pourcentage %
Co	63
Cr	29
Mo	6,5
C, Si, Fe, Mn	1,5

- **Propriétés mécaniques et thermiques**

Température de solidus-liquidus	1321÷1407°C
Température de fusion	1445°C
Densité	8,3 g/cm <sup>3</sup>
Dureté Vickers	394 HV10
Allongement	5,8 %
Limite élastique	546 MPa
Module d'élasticité	209 GPa

#### 2- Alliage base métal nickel-chrome (Ni-Cr)

##### Nickel based dental alloy (N.P (V)), Predominantly Base BP®

- **Composition**

Métal	Pourcentage %
Ni	72.0
Cr	15.0
Mo	9.0
Al	2.0
Be	1.8
Fe	<1
Si	<1
C	<1

- **Propriétés mécaniques et thermiques**

Couleur	Blanc
Type	PFM, 4
PGM	0 %
C.E.T. (25-500°C)	13,6 µm/m-°C
C.E.T. (25-600°C)	14 µm/m-°C
Dureté Vickers	af=200
Limite d'élasticité MPa	af=550
Module d'élasticité GPa	192
Allongement	af=9%
af = after firing	
Intervalle de fusion	1205-1260°C
Température de coulée	1370°C
Densité	7.8 g/cm <sup>3</sup>