



Diversité génétique d'isolats de *Cryptococcus* et *Candida* issus des patients VIH positifs à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes

Thierry Ngouana Kammalac

► To cite this version:

Thierry Ngouana Kammalac. Diversité génétique d'isolats de *Cryptococcus* et *Candida* issus des patients VIH positifs à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes. Parasitologie. Université Montpellier I; Université de Yaoundé I, 2014. Français. NNT : 2014MON13512 . tel-01132146

HAL Id: tel-01132146

<https://theses.hal.science/tel-01132146>

Submitted on 16 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par : UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1 ET UNIVERSITE
DE YAOUNDE 1

Préparée au sein des écoles doctorales

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2), Montpellier

Et Centre de Recherche et de Formation Doctorale en Sciences de la Vie,
Santé et Environnement, Yaoundé

Unité de Recherche UMI233 UM1-IRD-UCAD-UY1 « TransVIHMI »,
Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, Montpellier

Et Unité de Recherche et de Formation Doctorale en Sciences de la Vie
et de la Santé, Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes
Médicinales, Unité des Agents Antimicrobiens, Yaoundé

Spécialité : Biologie santé et Phytobiochimie

Présentée par NGOUANA KAMMALAC Thierry



**Diversité génétique d'isolats de
Cryptococcus et *Candida* issus des
patients VIH positifs à Yaoundé et étude
de leur sensibilité aux antifongiques et
aux extraits de plantes**

Soutenue le 18 décembre 2014 devant le jury composé de

Mme Michèle Mallié, Professeur, Université de Montpellier 1	Directeur
Mr Jacques Reynes, Professeur, Université de Montpellier 1	Examineur
Mr Silvère Ngouela, Professeur, Université de Yaoundé 1	Examineur
Mme Anne-Claire Mitaine-Offer, Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
Mr Sébastien Bertout, Professeur, Université de Montpellier 1	Co-Directeur
Mr Stéphane Ranque, Maître de Conférences, PH, Université de Marseille	Rapporteur
Mr Fabrice Fekam, Maître de Conférences, Université de Yaoundé 1	Directeur
Mme Véronique Penlap, Maître de Conférences, Université de Yaoundé 1	Examineur

Dédicaces

Le présent travail, fruit de longues années d'efforts et de persévérances est dédié

*A mes très chers parents **Samuel et Laurine Kammalac***

Et

*A ma tendre et adorable épouse **Doris Orlane Ngouana***

Remerciements

Ce travail a connu, pour son achèvement, la participation de nombreuses personnes et d'institutions. Je tiens à remercier pour ce fait :

Mes encadrants,

- MC Fabrice Fekam Boyom, qui, comme une mère, a distillé pour moi le lait de la rigueur scientifique depuis le DEA jusqu'à ce jour, veuillez trouver ici, l'expression de mes sincères remerciements,
- Pr Michèle Mallié, qui a accepté de me soutenir dans ce projet et facilité l'obtention de la cotutelle, associé à l'encadrement dument exercé durant ces 3 années de Thèse. Je vous suis sincèrement reconnaissant,
- Pr Sébastien Bertout, qui m'a accompagné de proche en proche sur la pailasse, contrôlant tous les aspects théoriques et pratiques de ce travail. Vous êtes pour moi un grand frère et un modèle à suivre, j'en suis fier,

Les membres du jury,

- Pr Jacques Reynes, c'est un réel plaisir pour moi de vous voir siéger dans ce jury, merci pour les contributions que vous avez apporté pour l'amélioration de ce travail, merci également pour votre disponibilité malgré votre emploi de temps surchargé,
- Pr Anne-Claire Mitaine-Offer, je suis très honoré que vous ayez accepté de juger et d'analyser ce travail. Je vous remercie vivement et soyez assurée à travers ces quelques mots, de ma respectueuse reconnaissance,
- Pr Silvère Ngouela, merci d'avoir accepté de participer à ce jury, trouvez ici, l'expression de ma profonde gratitude,
- MCU-PH Stéphane Ranque, vous avez accepté de juger ce travail avec un immense enthousiasme, depuis le comité de thèse. J'espère qu'il vous aura intéressé. Recevez ici le témoignage de ma sincère gratitude,
- MC Véronique Penlap, merci pour les enseignements que vous m'avez dispensés ces 9 dernières années, merci également pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse et d'évaluer la qualité scientifique de ce travail. Recevez ici, l'expression de ma profonde reconnaissance,

Pr Éric Delaporte, qui m'a chaleureusement accueilli dans son équipe et qui n'a ménagé d'aucun effort pour que cette convention puisse être établie et dont la fourniture logistique et financière a été déterminante dans l'achèvement de ce travail. Je vous dis sincèrement merci,

Dr Charles Kouanfack qui m'a supervisé dans la collecte des échantillons à l'Hôpital Central de Yaoundé. Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance,

Donika Krasteva qui m'a encadré à la paillasse pour l'acquisition des aptitudes techniques en biologie moléculaire,

Dr Vincent Ngouana pour l'accompagnement et les conseils tout au long de cette recherche,

L'équipe du projet Sidaction (Dr Jacqueline Dongtsa, Dr Clément Tonfack) pour leur appui et leur assistance,

Toute l'équipe du Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale de l'UFR Pharmacie de l'Université de Montpellier 1 (Dr Pascal Drakulovski, Jean-Claude Lebecq, Sylvie Jouvert, Dominique Castel, Dominique Peyrin) pour leur encadrement,

Tous les membres du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales de l'Université de Yaoundé 1 (Dr Valère Tsouh, Taffou, Valérie Donkeng, Rufin Toghué, Cédric Jiatsa, Elisabeth Zeuko'o, Ide Kenfack, Via Issakou, Mireille Dongmo, Pierre Eke, Lauve Yamthe, Alvine Ngoutane, Marguerite Simo, Jean-Baptiste Hounda, ...) pour le soutien technique et logistique durant les travaux,

Tout le personnel du Laboratoire Central de Biologie Clinique de l'Hôpital Central de Yaoundé (Dr Ambe Akaba, Mr Augustin Essono, Patrice Mangolo, Mme Bawou, Viviane Bibel,...) pour l'encadrement et le soutien durant ces 4 dernières années dans la collecte des échantillons,

Dr Avelin Aghokeng pour la facilitation de l'envoi des souches à Montpellier,

Dr Laurence Lachaud pour la mise à disposition du MALDI-TOF MS pour l'identification des isolats,

Mme Catherine Crepin qui a facilité mes procédures administratives au sein de l'UFR de Pharmacie,

Mes enseignants du Département de Biochimie, Université de Yaoundé 1 (Pr Oben, Pr Fokou, Pr Moundipa, Pr Mbatcham, Dr Nana, Dr Nguefack...) pour la qualité de la formation à nous transmise,

Les institutions qui ont facilité cette Thèse,

- Le Gouvernement Français à travers la bourse SCAC pour le financement des mobilités
- L'ANRS pour l'appui logistique
- L'Hôpital Central de Yaoundé pour le cadre de travail offert
- L'IRD pour l'appui financier

Mes camarades de promotion (Brice Saha, Aristide Kamda, Sylvain Petchangou, Joseph Galani, Paul Alain Tagnouokam...) pour le soutien et les conseils,

Mes parents (Maurice Tchoffo, Anne Tchoffo, Gilbert Tsatsop, Henri Tiomélé, Daniel Kueté, Robert Tindo, Victor Wati, Elie Ngouana, Ferdinand Tchoffo, ...) pour les conseils,

Mes beaux-parents, Michel et Simone Tchoffo, pour leur encadrement,

Robert et Jeannie Kamdem pour le soutien et l'encadrement à Montpellier,

Mes frères et sœurs (Rossi Tiomela, Stevin Fomena, Duplex Tidan, Jores Taguemfo, Christelle Tchinda, Merveilles Meli, Léonie Mekoue) pour les encouragements,

Mes amis (Archange Nodem, Marcel Fossue, Valentin Tcheuffouo, Stéphane Djami, Gerbot Tchinda, Charly Djeukoua, ...) pour le soutien moral et spirituel,

Mes bien-aimés du Groupe d'Animation Liturgique de la paroisse EEC de Nsam Efoulan (Arielle, Viviane, Eléonore, Céline, Franklin, Majoie, Johanna, Romeo, Michel, Mylène, Rosine, Joël, Martial, Michèle, ...) pour le soutien moral et spirituel,

Mes étudiants (Lorenz Tadjou, Dariooss Tsopgou, Adrien Nana) pour leur aide,

Tous ceux qui de près ou de loin ont participé à l'achèvement de ce travail, trouvez ici l'expression de ma profonde considération.

Résumé

Cryptococcus neoformans et les levures du genre *Candida* sont fréquemment impliqués dans les infections fongiques opportunistes chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH). Les données sur l'épidémiologie moléculaire et la sensibilité de ces levures aux antifongiques sont rares au Cameroun. Les objectifs de ce travail ont été (i) d'obtenir et caractériser génétiquement les isolats de *Cryptococcus* et de *Candida* issus des PVVIH à Yaoundé, (ii) d'étudier leur profil de sensibilité à divers antifongiques, (iii) d'étudier l'activité antifongique des extraits de 3 plantes médicinales (*Terminalia mantaly*, *Terminalia catappa* et *Monodora tenuifolia*). Vingt-cinq souches de *C. neoformans* et 317 isolats *Candida* dont 113 *C. albicans* ont été isolés respectivement de 171 et 402 PVVIH à l'Hôpital Central de Yaoundé. Ces isolats ont été identifiés sur la base de leurs caractères phénotypiques, biochimiques, par spectrométrie de masse et par PCR en temps réel. La diversité génétique de 150 isolats (25 prélèvements initiaux et 125 colonies) de *C. neoformans* a été réalisée par séro-génotypage, PCR-RFLP et polymorphisme de séquences microsatellites. La diversité génétique des 113 isolats de *C. albicans* a été réalisée par génotypage et par analyse du polymorphisme de séquences microsatellites. La recherche des espèces du complexe *C. albicans* s'est effectuée par amplification du gène Hwp1. La sensibilité des isolats de *C. neoformans* aux antifongiques (posaconazole, voriconazole, ketoconazole, itraconazole, fluconazole, amphotéricine B et 5-fluorocytosine) a été évaluée par microdilution en milieu liquide grâce au kit « Sensititre YeastOne® ». Le protocole CLSI M27-A3 a été utilisé pour l'étude de la sensibilité des isolats de *C. albicans* à l'amphotéricine B, au fluconazole, au ketoconazole et à l'itraconazole. L'étude de l'activité antifongique des extraits de plantes s'est déroulée en 3 étapes : (i) screening préliminaire avec détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits bruts, (ii) fractionnement bio-guidé, (iii) étude des interactions synergiques dans les combinaisons de ces subfractions. *C. neoformans* var *grubii* génotype VNI est la seule espèce de cryptocoque isolée des liquides céphalorachidiens. Quinze espèces de *Candida* ont été isolées et *C. albicans* reste l'espèce majoritaire. *C. africana* a été isolée et identifiée pour la première fois au Cameroun. La diversité génétique des isolats de *C. neoformans* a montré 15 types moléculaires, et 24% de patients étaient infectés par deux types moléculaires différents. Le génotype A est majoritaire dans les isolats de *C. albicans* et 65 types moléculaires différents ont été observés. L'analyse du polymorphisme du gène Hwp1 a permis de définir de nouveaux génotypes (H1-H5). Les souches de *C. neoformans* sont sensibles aux antifongiques testés. Une

souche présente une sensibilité réduite à la 5-fluorocytosine et une autre au fluconazole. Des isolats issus du même patient peuvent présenter des sensibilités différentes aux antifongiques testés. Les isolats de *C. albicans* présentent une sensibilité diminuée aux azolés. Il a été montré qu'il existe une relation entre la sensibilité à l'itraconazole et le génotype H chez les isolats de *C. albicans* (p-value <0,05). Les extraits de plantes présentent des activités inhibitrices contre les levures testées. Les fractions obtenues par fractionnement bio-guidé ont permis l'amélioration de l'activité de 7 extraits. La combinaison de ces subfractions a donné une combinaison synergique et fongicide dérivée de *T. mantaly* et de *M. tenuifolia*. En conclusion, ce travail apporte de nouvelles données sur la compréhension de l'épidémiologie moléculaire et de la sensibilité des isolats de *C. neoformans* et de *Candida* aux antifongiques à Yaoundé. L'étude des extraits de plantes semble être une voie prometteuse dans le développement de thérapies antifongiques alternatives.

Mots clés : *Cryptococcus neoformans*, *Candida*, diversité génétique, antifongiques, extraits de plantes, sensibilité, combinaisons.

Abstract

Cryptococcus neoformans and *Candida* species are the main causative agents of yeast opportunistic infections among HIV infected persons. However, information on their molecular epidemiology and antifungal susceptibility are scarce in Cameroon. The main objective of this work was to study the genetic diversity and the antifungal susceptibility against antifungal drugs and plant extracts of *C. neoformans* and *Candida* isolates from Yaoundé HIV patients. *C. neoformans* (25) and *Candida* (317 among which 113 *C. albicans*) isolates were obtained, from 171 and 402 HIV patients at the Yaoundé Central Hospital respectively. They were identified by phenotypic and biochemical characters, by mass spectrometry and real time PCR. The genetic diversity of 150 *C. neoformans* isolates (25 initial isolates and 125 colonies) was carried out by serotyping, microsatellite length polymorphism and PCR-RFLP. The genetic diversity of the 113 *C. albicans* isolates was performed by genotyping and microsatellite length polymorphism. The identification of *C. albicans* complex species was achieved by PCR amplification of the *Hwp1* gene. The antifungal susceptibility testing of *C. neoformans* against posaconazole, voriconazole, ketoconazole, itraconazole, fluconazole, amphotericin B and 5-fluorocytosine was carried out by the broth microdilution test using the « Sensititre YeastOne® » kit. The CLSI M27-A3 protocol was used for the determination of the *C. albicans* isolate's susceptibility against amphotericin B, ketoconazole, fluconazole and itraconazole which are frequently used in Cameroon. The antifungal activity of extracts from *Terminalia mantaly*, *Terminalia catappa* and *Monodora tenuifolia* was performed by a preliminary screening with the determination of minimal inhibitory concentrations (MIC) of crude extracts. Selected extracts were therefore submitted to the bio-guided fractionation. Selected subfractions were submitted to combination assays. *C. neoformans* var *grubii* genotype VNI was the lonely *Cryptococcus* species isolated in cerebrospinal fluids. Fifteen *Candida* species were isolated from mucosae with *C. albicans* remaining the most frequent. *C. africana* has been isolated for the first time in Cameroon. *C. neoformans* and *C. albicans* provided 15 and 65 major molecular types respectively. It was also found that a patient can be infected by 2 different molecular types of *C. neoformans*. *C. albicans* genotype A was the most frequent. The PCR amplification of the *Hwp1* gene allowed the identification of a novel molecular profile among the *C. albicans* complex and named H (H1-H5). *C. neoformans* isolates were susceptible to the tested drugs. However, one isolate exhibited reduced susceptibility to fluconazole and one another to 5-fluorocytosine. *C. albicans* isolates expressed various susceptibility profiles similar to what described in the literature.

Furthermore, there was a relationship between the H-typing and the antifungal susceptibility of *C. albicans* isolates against itraconazole (p-value<0.05). *T. mantaly*, *T. catappa* and *M. tenuifolia* extracts exhibited antifungal activity against tested yeasts. Bioguided fractionation allowed improves of the antifungal activity from crude extracts to subfractions. Synergism was observed, and the most active combination from *T. mantaly* and *M. tenuifolia* was also fungicidal on tested yeasts. Conclusively, the present work brings new tools for the comprehension and the better management of *C. neoformans* and *Candida* infections among Yaoundé HIV positive patients. The antifungal resistance emergence of yeasts isolates could be compensated by the development of a new antifungal medicine from subfractions combinations of *T. mantaly* and *M. tenuifolia*.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, *Candida*, genetic diversity, antifungals, plants extracts, antifungal susceptibility, combination tests.

Table des matières

Dédicaces.....	i
Remerciements	ii
Résumé.....	v
Abstract	vii
Table des matières	ix
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des figures.....	xviii
Liste des abréviations.....	xx
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature	4
I. L'infection à VIH	4
I.1. Epidémiologie de l'infection à VIH	4
I.2. Classification des stades de l'infection à VIH	6
I.3. Infections opportunistes liées à l'infection par le VIH	7
II. <i>Cryptococcus</i> et la cryptococcose neuro-méningée au cours de l'infection par le VIH	8
II.1. Description du complexe <i>Cryptococcus neoformans</i> / <i>Cryptococcus gattii</i>	8
II.2. La cryptococcose neuro-méningée chez l'individu atteint par le VIH.....	10
II.2.1. Les différentes manifestations cliniques de la cryptococcose	10
II.2.2. Physiopathologie de la cryptococcose neuro-méningée au cours de l'infection à VIH	11
II.3. Facteurs favorisants et signes cliniques de la cryptococcose neuro-méningée chez le patient VIH positif.....	11
II.3.1. Facteurs favorisants la cryptococcose neuro-méningée.....	11
II.3.2. Signes cliniques de la cryptococcose neuro-méningée chez le patient VIH positif	12
II.4. Epidémiologie de la cryptococcose neuro-méningée au cours de l'infection à VIH	12
II.5. Cryptococcose et immunodépression au cours de l'infection au VIH : phénomènes immunologiques de l'infection.....	15
II.5.1. Pathogenèse de <i>Cryptococcus neoformans</i>	15
II.5.2. Facteurs de virulence de <i>Cryptococcus neoformans</i>	16
II.5.3. Immunité contre <i>Cryptococcus</i>	18
II.6. Diagnostic biologique de la cryptococcose neuro-méningée	19
III. Le genre <i>Candida</i> et les candidoses muqueuses au cours de l'infection par le VIH	23
III.1. Description du genre <i>Candida</i>	24
III.1.1. Classification et découverte	24

III.1.2. Structure et reproduction de <i>Candida</i>	24
III.1.3. Les principales espèces du genre <i>Candida</i> impliquées en pathologie humaine	26
III.1.3.1. Le complexe <i>Candida albicans</i>	27
III.1.3.1.1. Généralités	27
III.1.3.1.2. <i>Candida albicans</i>	28
III.1.3.1.3. <i>Candida dubliniensis</i>	33
III.1.3.1.4. <i>Candida africana</i>	36
III.1.3.2. <i>Candida glabrata</i>	36
III.1.3.3. <i>Candida krusei</i>	37
III.1.3.4. <i>Candida parapsilosis</i>	38
III.1.3.5. <i>Candida lusitaniae</i>	39
III.1.3.6. <i>Candida tropicalis</i>	40
III.2. Aspects cliniques des candidoses muqueuses	40
III.2.1. Généralités	40
III.2.2. Les candidoses muqueuses	41
III.2.2.1. Les candidoses digestives	41
III.2.2.2. Les candidoses urogénitales	42
III.3. Epidémiologie des candidoses muqueuses au cours de l'infection à VIH	43
III.4. Facteurs de virulence de <i>Candida</i> et immunité anti- <i>Candida</i>	44
III.4.1. Facteurs de virulence	44
III.4.2. Immunité contre <i>Candida</i>	45
III.5. Diagnostic biologique des candidoses muqueuses	46
IV. Epidémiologie moléculaire de <i>Cryptococcus neoformans</i> et de <i>Candida albicans</i>	51
IV.1. Principales méthodes de typage moléculaire de <i>Cryptococcus neoformans</i> et de <i>Candida albicans</i>	51
IV.2. Génome et épidémiologie moléculaire de <i>Cryptococcus neoformans</i>	56
IV.3. Génome et épidémiologie moléculaire du complexe <i>Candida albicans</i>	58
V. Traitement de la candidose muqueuse et de la cryptococcose neuro-méningée	60
V.1. Les principaux antifongiques	60
V.1.1. Les antifongiques de la classe des polyènes	61
V.1.2. Les dérivés azolés	63
V.1.3. Les analogues de bases puriques	66
V.1.4. Les échinocandines	67
V.1.5. Les antifongiques en développement	68

V.2. Traitement de la cryptococcose neuroméningée	69
V.3. Recommandations 2012 de l'ESCMID pour le traitement des infections muqueuses à <i>Candida</i> chez les patients infectés par le VIH.....	70
V.4. Les limites des traitements antifongiques	71
V.4.1. Les résistances aux antifongiques.....	71
V.4.1.1. Définition du concept de résistance	71
V.4.1.2. Résistance de <i>Cryptococcus neoformans</i> aux antifongiques	72
V.4.1.3. Mécanismes de résistances de <i>Candida</i> aux antifongiques.....	73
V.4.2. Incidence des résistances.....	76
VI. Les extraits de plantes médicinales comme alternative thérapeutique aux infections fongiques	78
VI.1. Les familles de plantes douées d'activités antifongiques	78
VI.2. La famille des Annonaceae.....	79
VI.2.1. Le genre <i>Monodora</i> et l'espèce <i>Monodora tenuifolia</i>	79
VI.2.2. La famille des Combretaceae et le genre <i>Terminalia</i>	82
VI.2.2.1. <i>Terminalia Catappa</i> Linné	82
VI.2.2.2. <i>Terminalia Mantaly</i> H. Perrier de la Bâthie	84
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	87
I. Cadre de l'étude	87
I.1. Choix et justification du lieu de l'étude.....	87
I.2. Echantillonnage et considérations éthiques	87
II. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques de <i>C. neoformans</i>	88
II.1. Diagnostic mycologique	88
II.1.1. Le prélèvement : la ponction lombaire	88
II.1.2. L'examen direct.....	88
II.1.3. L'analyse biochimique du LCR.....	89
II.1.4. La recherche de l'antigène cryptocoque par le test d'agglutination sur latex.....	89
II.1.5. La culture.....	90
II.1.6. Identification phénotypique et biochimique de <i>Cryptococcus neoformans</i>	91
II.2. Etude de la diversité génétique de <i>C. neoformans</i>	92
II.2.1. Isolement des clones de <i>C. neoformans</i>	92
II.2.2. Extraction de l'ADN de <i>C. neoformans</i>	92
II.2.3. Principe et généralités de la PCR.....	93
II.2.4. Etude de la diversité génétique de <i>C. neoformans</i>	94
II.2.4.1. Sérotypage par PCR multiplex.....	94

II.2.4.2. Typage moléculaire par PCR-RFLP du gène URA5	96
II.2.4.2.1. Réalisation de la PCR	96
II.2.4.2.2. Digestion des amplicons.....	97
II.2.4.3. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA) ₄ , (GTG) ₅ et minisatellite M13.....	98
II.2.4.4. Electrophorèse des amplicons	100
II.3. Etude de la sensibilité de <i>C. neoformans</i> aux antifongiques par la méthode de dilution en milieu liquide à l'aide du kit Sensititre Yeast One	102
III. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques de <i>C. albicans</i>	104
III.1. Diagnostic mycologique	104
III.1.1. Le prélèvement.....	104
III.1.2. L'examen direct	104
III.1.3. La culture.....	106
III.1.4. Identification phénotypique et biochimique des levures	106
III.1.5. Identification à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF	110
III.1.6. Conservation des levures isolées	112
III.2. Etude de la diversité génétique de <i>C. albicans</i>	113
III.2.1. Extraction de l'ADN de <i>C. albicans</i>	113
III.2.2. Etude de la diversité génétique de <i>C. albicans</i>	113
III.2.2.1. Amplification du gène <i>Hwp1</i>	113
III.2.2.2. Génotypage de <i>C. albicans</i>	114
III.2.2.3. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites HIS3, EF3 et CDC3	115
III.2.2.4. Identification des souches par amplification des séquences ITS par PCR en temps réel.....	117
III.2.2.5. Electrophorèse des amplicons	119
III.3. Etude de la sensibilité des isolats de <i>C. albicans</i> aux antifongiques	120
IV. Etude de la sensibilité des isolats fongiques aux extraits de plantes	123
IV.1. Récolte et traitement du matériel végétal.....	123
IV.2. Obtention des extraits bruts	124
IV.3. Screening initial d'activité antifongique des extraits bruts.....	125
IV.3.1. Sélection primaire par la méthode de dilution en milieu solide.....	125
IV.3.2. Sélection secondaire par la méthode de dilution en milieu liquide	126
IV.4. Fractionnement bio-guidé des extraits bruts sélectionnés après le screening	128
IV.4.1. Chromatographie de partition liquide-liquide eau-chlorure de méthylène et détermination de la CMI des fractions.....	128

IV.4.2. Chromatographie de partition liquide-liquide (hexane-méthanol) des fractions et détermination de la CMI des subfractions	128
IV.5. Obtention des fractions purifiées à partir de la subfraction la plus active et détermination de la CMI des molécules et sub-subfractions obtenues.....	129
IV.6. Etude de l'activité antifongique des combinaisons des subfractions.....	132
IV.6.1. Détermination des combinaisons efficaces par la méthode de l'échiquier.....	132
IV.6.2. Etude pharmacodynamique de la combinaison la plus efficace.....	133
IV.7. Etude phytochimique des extraits sélectionnés	135
IV.7.1. Test de mise en évidence des alcaloïdes	135
IV.7.2. Test de mise en évidence des flavonoïdes.....	135
IV.7.3. Test de mise en évidence des saponines	135
IV.7.4. Test de mise en évidence des tanins.....	135
IV.7.5. Test de mise en évidence des phénols.....	135
IV.7.6. Test de mise en évidence des stéroïdes.....	136
IV.7.7. Test de mise en évidence des triterpènes	136
IV.7.8. Test de mise en évidence des glucosides.....	136
IV.7.9. Test de mise en évidence des anthocyanines.....	136
IV.7.10. Test de mise en évidence des anthraquinones.....	136
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	137
I. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques de <i>C. neoformans</i>	137
I.1. La cryptococcose neuro-méningée	137
I.1.1. Caractéristiques de la population d'étude et fréquence de la cryptococcose neuro-méningée....	137
I.1.2. Variations biochimiques et macroscopiques du LCR dans la population d'étude	138
I.1.4. Discussion.....	139
I.2. Etude de la diversité génétique des isolats de <i>C. neoformans</i>	140
I.2.1. Extraction d'ADN	140
I.2.2. Sérotypage par PCR multiplex.....	142
I.2.3. Typage moléculaire	142
I.2.3.1. Typage moléculaire par PCR-RFLP.....	142
I.2.3.2. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA) ₄ , (GTG) ₅ et minisatellite M13.....	143
I.2.4. Discussion	148
I.3. Sensibilité de <i>C. neoformans</i> aux antifongiques	150
I.4. Discussion	153
I.5. Conclusion partielle 1	154

II. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques de <i>C. albicans</i>	155
II.1. La candidose muqueuse	155
II.1.1. Caractéristiques de la population d'étude.....	155
II.1.2. Répartition et fréquences des colonisations par site de prélèvement.....	156
II.1.3. Répartition des germes isolés	156
II.1.4. Discussion.....	158
II.2. Epidémiologie moléculaire de <i>Candida albicans</i>	162
II.2.1. Extraction d'ADN	162
II.2.2. Recherche des espèces du complexe <i>Candida albicans</i> par amplification du gène <i>Hwp1</i>	163
II.2.3. Génotypage de <i>Candida albicans</i>	164
II.2.4. Typage moléculaire de <i>Candida albicans</i> par amplification des séquences microsatellites HIS3, EF3, CDC3	166
II.2.5. Discussion.....	169
II.3. Sensibilité de <i>Candida albicans</i> aux antifongiques	170
II.3.1. Sensibilité globale.....	170
II.3.2. Discussion.....	175
II.4. Conclusion partielle 2	177
III. Etude de l'activité antifongique des extraits de plantes	179
III.1. Screening préliminaire	179
III.1.1. Rendements d'extractions	179
III.1.2. Sélection des extraits actifs par la méthode de dilution en milieu liquide	180
III.1.3. Détermination de la CMI des extraits sélectionnés	182
III.1.4. Analyse phytochimique des extraits sélectionnés	184
III.1.5. Discussion	186
III.2. Fractionnement bio-guidé.....	188
III.2.1. Partition eau-chlorure de méthylène et concentrations minimales inhibitrices des fractions	188
III.2.2. Partition Hexane - méthanol et concentrations minimales inhibitrices des subfractions	190
III.2.3. Analyse phytochimique des subfractions sélectionnées.....	192
III.2.4. Chromatographie sur colonne et CMI des subfractions et fractions purifiées obtenues	193
III.2.5. Discussion	193
III.3. Etude des combinaisons des subfractions sélectionnées	193
III.3.1. Combinaison par la méthode de l'échiquier	194
III.3.2. Combinaisons par la méthode du time kill kinetic	201
III.3.3. Discussion	203

III.4. Conclusion partielle 3	205
Conclusion générale	206
Références.....	208
Annexes	I
Annexe 1: Résumés des publications	I
Annexe 2 : Considérations éthiques.....	VII

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Définition du statut immunologique selon l'OMS	7
Tableau 2 :	Profil biochimique des espèces <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Cryptococcus gattii</i> .	22
Tableau 3 :	Tailles des fragments amplifiés du gène <i>Hwp1</i> pour chaque espèce du complexe <i>Candida albicans</i>	28
Tableau 4 :	Méthodes phénotypiques de distinction entre <i>Candida dubliniensis</i> et <i>Candida albicans</i> .	35
Tableau 5 :	Caractères morphologiques et physiologiques des principales levures d'intérêt médical	50
Tableau 6 :	Quelques familles de plantes à activité antifongique du Cameroun	79
Tableau 7 :	Les dénominations de <i>Monodora tenuifolia</i>	80
Tableau 8 :	Les dénominations de <i>Terminalia catappa</i>	82
Tableau 9 :	Les dénominations de <i>Terminalia mantaly</i>	84
Tableau 10 :	Mélange réactionnel pour la PCR multiplex du sérotypage de <i>C. neoformans</i> .	95
Tableau 11 :	Mélange réactionnel pour la PCR du gène <i>URA5</i> chez <i>C. neoformans</i> .	97
Tableau 12 :	Mélange réactionnel pour la digestion des amplicons du gène <i>URA5</i> chez <i>C. neoformans</i> .	98
Tableau 13 :	Mélange réactionnel pour les PCR des minisatellites M13 et microsatellites (GTG) ₅ et (GACA) ₄ chez <i>C. neoformans</i>	99
Tableau 14 :	Antifongiques utilisés et dilutions des plaques Sensititre Yeast One	103
Tableau 15 :	Mélange réactionnel pour la PCR du gène <i>Hwp1</i> chez <i>C. albicans</i>	113
Tableau 16 :	Mélange réactionnel pour la PCR du gène de la région 25s de l'ARNr de <i>C. albicans</i>	114
Tableau 17 :	Séquences microsatellites et séquences d'amorces utilisées pour le typage moléculaire de <i>C. albicans</i>	116
Tableau 18 :	Mélange réactionnel pour la PCR des microsatellites EF3, CDC3, et HIS3 chez <i>C. albicans</i>	116
Tableau 19 :	Mélange réactionnel pour la PCR en temps réel	118
Tableau 20 :	Préparation des dilutions d'antifongiques (amphotéricine B, itraconazole et ketoconazole) de concentration intermédiaire 100X dans le DMSO	121
Tableau 21 :	Préparation des dilutions de fluconazole de concentration intermédiaire 10X dans le RPMI	122
Tableau 22 :	Critères d'interprétation de la CMI (µg/ml) pour <i>Candida</i> sp. Après 48 heures d'incubation (CLSI M27-A3, 2008)	123
Tableau 23 :	Récapitulatif des organes de plantes utilisés	124
Tableau 24 :	Constantes biochimiques du LCR chez les patients atteints ou non de cryptococcose neuro-méningée	138
Tableau 25 :	Evaluation de l'aspect macroscopique des LCR	138
Tableau 26 :	Rendement d'extraction d'ADN et de la pureté de l'ADN de <i>C. neoformans</i>	140
Tableau 27 :	Concentrations minimales inhibitrices des antifongiques testés sur les souches de <i>C. neoformans</i> .	151
Tableau 28 :	Répartition de la présence des <i>Candida</i> en fonction des taux de CD4 d'après la	156

	classification OMS de 2006	
Tableau 29 :	Répartition des prélèvements muqueux par sites prélevés pour la recherche de <i>Candida</i> dans la population d'étude	156
Tableau 30 :	Rendements d'extraction d'ADN et pureté de l'ADN extrait des isolats du complexe <i>C. albicans</i>	162
Tableau 31 :	Répartition des géotypes de <i>Candida albicans</i> par site de prélèvement.	165
Tableau 32 :	Concentrations minimales inhibitrices pour 113 isolats de <i>C. albicans</i> testés	172
Tableau 33 :	Sensibilité globale des isolats de <i>C. albicans</i> pour les antifongiques testés.	175
Tableau 34 :	Sensibilité des isolats de <i>C. albicans</i> en fonction des sites de prélèvement	175
Tableau 35 :	Pourcentages d'inhibition des extraits bruts de plantes testés sur les quatre isolats de levures <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> et <i>C. neoformans</i>	181
Tableau 36 :	Concentrations minimales inhibitrices des extraits bruts d'intérêts sur les isolats de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> et <i>C. neoformans</i> et la souche <i>C. albicans</i> ATCC P37037	183
Tableau 37 :	Résultats de l'analyse phytochimique des extraits bruts sélectionnés à l'issue de la méthode de dilution en milieu solide	185
Tableau 38 :	Concentrations minimales inhibitrices des fractions obtenues sur les isolats de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> et <i>C. neoformans</i> et la souche <i>C. albicans</i> ATCC P37037	189
Tableau 39 :	Concentrations minimales inhibitrices des subfractions obtenues sur les isolats de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> et <i>C. neoformans</i> et la souche <i>C. albicans</i> ATCC P37037	191
Tableau 40 :	Visualisation globale de l'évolution des CMI avec le fractionnement	192
Tableau 41 :	Profil phytochimique des 7 subfractions sélectionnées	192
Tableau 42 :	Codes d'identification des différentes subfractions pour la réalisation des tests de combinaison	194
Tableau 43 :	CMI et interprétations des combinaisons sur <i>Candida albicans</i> ATCC P37037	196
Tableau 44 :	CMI et interprétations des combinaisons sur l'isolat de <i>Candida albicans</i>	197
Tableau 48 :	CMI et interprétations des combinaisons sur l'isolat de <i>Candida glabrata</i>	198
Tableau 46 :	CMI et interprétations des combinaisons sur l'isolat de <i>Candida parapsilosis</i>	199
Tableau 47 :	CMI et interprétations des combinaisons sur <i>Cryptococcus neoformans</i>	200
Tableau 48 :	Récapitulatif des interactions obtenues par la méthode de l'échiquier	201
Tableau 49 :	Résumé et type d'interaction après le time kill kinetic test.	203

Liste des figures

Figure 1 :	Evolution du nombre de PVVIH dans le monde et du nombre de patients ayant accès aux antirétroviraux de 2001 à 2012	5
Figure 2 :	Répartition de la fréquence de l'infection à VIH par région du monde	5
Figure 3 :	Distribution des pathologies infectieuses en Afrique subsaharienne hors VIH	14
Figure 4 :	Ultrastructure de la cellule fongique	25
Figure 5 :	Structure générale d'une paroi fongique	25
Figure 6 :	Différentes présentations morphologiques de <i>Candida albicans</i>	30
Figure 7 :	Exemples de phénotypes de colonies de <i>C. albicans</i> .	32
Figure 8 :	Organisation des candidoses chez l'homme	41
Figure 9 :	Colonies du genre <i>Candida</i> sur gélose de Sabouraud	48
Figure 10 :	Distribution globale des 8 types moléculaires majeurs du complexe <i>C. neoformans/C. gattii</i>	58
Figure 11 :	Interaction entre l'amphotéricine B et l'ergostérol dans une bicouche lipidique	62
Figure 12 :	Structure chimique de l'amphotéricine B	62
Figure 13 :	Structure chimique de composés imidazolés (clotrimazole, miconazole, econazole et ketoconazole) et triazolés (fluconazole, itraconazole, voriconazole et posaconazole)	64
Figure 14 :	Structure chimique de la 5-fluorocytosine	67
Figure 15 :	Structure chimique des échinocandines	67
Figure 16 :	Mécanismes de résistance développés par les cellules fongiques	74
Figure 17 :	<i>Monodora tenuifolia</i> , graines, fleurs et feuilles	80
Figure 18 :	Illustration de quelques parties de <i>Terminalia catappa</i> Linné	83
Figure 19 :	Quelques images de <i>Terminalia mantaly</i>	85
Figure 20 :	Images d'interprétation du test d'agglutination sur latex de négatif à 4+	90
Figure 21 :	Schéma général de la PCR	94
Figure 22 :	Image des levures après coloration de Gram (100×)	105
Figure 23 :	Aspects des tubes germinatifs produits par les espèces du complexe <i>Candida albicans</i> lors du test de blastèse	107
Figure 24 :	Aspect des chlamydospores de <i>Candida albicans</i> (40× sur PCB)	109
Figure 25 :	Principe d'ionisation par la technique MALDI.	111
Figure 26 :	Exemple de lame DS (à gauche) et porte lame contenant 4 lames (à droite) utilisés dans la technique MALDI-TOF	111
Figure 27 :	Prep station en capture d'écran lors de la mise en place de la technique MALDI-TOF MS	112
Figure 28 :	Exemple de résultats obtenus en PCR en temps réel	118
Figure 29 :	Protocole général de partition Liquide-Liquide des extraits bruts de plante utilisés	129
Figure 30 :	Schéma général de la chromatographie sur colonne utilisée pour la purification de la subfraction d'intérêt	131
Figure 31 :	Quelques images de blastospores et aspect en culture de <i>C. neoformans</i>	137
Figure 32 :	Exemple de profils électrophorétiques du sérotypage des isolats de <i>C. neoformans</i>	142
Figure 33 :	Exemples de profils électrophorétiques obtenus après digestion des amplicons du gène URA5 des isolats de <i>C. neoformans</i>	143
Figure 34 :	Quelques profils de migration sur gel haute résolution après amplification des	144

	séquences microsatellites (GACA) ₄ des isolats de <i>C. neoformans</i>	
Figure 35 :	Quelques profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GTG) ₅ des isolats de <i>C. neoformans</i>	145
Figure 36 :	Quelques profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences minisatellite M13 des isolats de <i>C. neoformans</i>	146
Figure 37 :	Dendrogramme de la diversité génétique de <i>C. neoformans</i> obtenu par analyse des séquences mini et microsatellites	147
Figure 38 :	Pourcentage de isolats de <i>C. neoformans</i> sensibles à chaque CMI et pour chaque antifongique testé	152
Figure 39 :	Quelques images des tubes germinatifs obtenus lors du test de blastèse, chlamydospores sur milieu PCB et couleur des isolats du complexe <i>Candida albicans</i> sur milieu chromogénique Can2	157
Figure 40 :	Répartition générale des levures isolées des prélèvements muqueux	158
Figure 41 :	Répartition des espèces obtenues par site de prélèvement muqueux	158
Figure 42 :	Exemples de profils obtenus après électrophorèse des amplicons du gène <i>Hwp1</i> des isolats du complexe <i>C. albicans</i>	164
Figure 43 :	Profils de migration PCR obtenus pour le génotypage de <i>C. albicans</i>	165
Figure 44 :	Profils de migration des amplicons des microsatellites CDC3, HIS3 et EF3 de <i>C. albicans</i>	167
Figure 45 :	Dendrogramme de l'analyse des séquences microsatellites de <i>C. albicans</i>	168
Figure 46 :	Rendements d'extraction des 34 échantillons des plantes utilisés	179
Figure 47 :	Courbes de cinétique de mort à l'issu du time kill test sur les isolats de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> et <i>C. neoformans</i> et la souche <i>C. albicans</i> ATCC P37037	202

Liste des abréviations

ABC :	ATP-Binding Cassette
AES :	Accident d'Exposition au Sang
AFLP :	Amplified Fragment-Length Polymorphism
BET :	Bromure d'Ethidium
BHE :	Barrière Hémato-Encéphalique
BSL-2 :	Biosafety Level 2
CAP64 :	Capsule Associated Gene 64
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CD4 :	Cluster of Differentiation 4
CD8 :	Cluster of Differentiation 8
CGB :	Canavanine-Glycine-Bromothymol bleu
CHCA :	Acide Hydroxycinnamique
CHEF :	Contour-Clamped Homogenous Electric Fields
CLSI :	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMF :	Concentration Minimale Fongicide
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CXCL8 :	Interleukine 8
dATP :	Deoxy Adénosine Triphosphate
dCTP :	Deoxy Cytidine Triphosphate
DEPC :	Diethyl Pyrocarbonate
dGTP :	Deoxy Guanosine Triphosphate
DHB :	Acide 2,5 Dihydroxybenzoïque
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
dNTPs :	Désoxyribonucléosides Triphosphates
DPPC :	Di-Palmitoyl-Phosphatidylcholine
dTTP :	Deoxy Thymidine Triphosphate
EDTA :	Ethylène Diamine Tetra Acetate
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESCMID :	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ESGEM :	European Study Group on Epidemiological Markers
FIC :	Concentrations Inhibitrices Fractionnelles
FICI :	Index de Concentrations Inhibitrices Fractionnelles
GalXM :	Galactoxylomannanes
GlcNAc :	N -Acétylglucosamine
gp120 :	Gap Protein 120
gp41 :	Gap Protein 41
GXM :	Glucuronoxylomannanes
HAART :	High Active Antiretroviral Therapy

HES :	Hématoxyline-Eosine-Safran
Hwp1 :	Hyphal wall protein 1
IgM :	Immunoglobuline M
IL-10 :	Interleukine 10
IL-17 :	Interleukine 17
IMC :	Indice de Masse Corporelle
ITS2 :	Internal Transcribed Spacer 2
l'ADN :	Acide Desoxyribonucléique
l'ARN :	Acide Ribonucléique
LAC1 :	Laccase 1
LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
L-DOPA :	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LPG :	Lymphadénopathie Persistante Généralisé
MALDI-TOF:	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
MFS :	Major Facilitator Superfamily
MGG :	May-Grunwald-Giemsa
MIP-1 β :	Macrophage Inflammatory Protein 1 beta
MLEE :	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLMT :	Multilocus Microsatellite Typing
MLP :	Microsatellite Length Polymorphism
MLST :	Multilocus Sequence Typing
MOPS :	Acide 3-(N-morpholino) Propane Sulfonique
MTL :	Mating Type-Like
NCCLS :	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NK :	Natural Killer
NO :	Monoxyde d'azote
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PAS :	Periodic acid-Schiff
PCB :	Pomme de terre-Carotte-Bile
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PFGE :	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PG :	Phosphatidylglycerol
PLB :	Phospholipase B
PVVIH :	Personnes Vivant avec le VIH
RAPD :	Random Amplified Polymorphic DNA
RAT :	Riz Agar Tween
REA :	Restriction Enzyme Analysis
rep-PCR :	Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS :	Reactive Oxygen Species
RPML :	Roswell Park Memorial Institute

- SDS : Sulfate Dodecyl Sodium (laurylsulfate)
SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Humaine
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SSR : Simple Sequence repeats
STR : Short Tandem Repeats
TAE : Tris Acetate EDTA
TBE : Tris Borate EDTA
TME : Transmission Mère Enfant
TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha
UFR : Unité de Formation et de Recherche
UGPMA : Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean
UMI : Unité Mixte Internationale
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS : Virus de l'Immunodéficience Simien
VNTR : Variable Number of Tandem Repeat

Introduction

Depuis l'avènement de l'infection à VIH dans les années 1980, l'humanité fait face à l'une des crises sanitaires les plus importantes de toute son histoire. L'infection à VIH est aujourd'hui considérée comme étant la 6^{ème} cause de mortalité dans le monde et la 2^{ème} en Afrique subsaharienne. La progression de l'épidémie du VIH/SIDA dans cette région, en a fait la zone la plus durement touchée avec 25 millions de personnes vivant avec le VIH (PVVIH), soit 70,82% de la population VIH positive (**ONUSIDA, 2013**). Même si la prévalence mondiale est passée de 5,8% en 2001 à 0,8% en 2012 (**ONUSIDA, 2013**), le nombre de PVVIH n'a cessé d'augmenter depuis lors. Il est passé de 30 millions de PVVIH en 2001 à 35,3 millions en 2012. Depuis le début de la pandémie, environ 75 millions de personnes ont été infectées par le VIH (**ONUSIDA, 2013**). Malgré les efforts fournis dans la prise en charge des PVVIH au travers des antirétroviraux, le suivi des infections opportunistes reste encore peu considéré, ce qui favorise leur évolution et compromet le pronostic vital des patients (**Lahuerta et al., 2013 ; Homa, 2007 ; Ouattara, 2005**). L'avènement de l'infection à VIH a entraîné une recrudescence des infections fongiques avec au premier rang les infections dues aux levures du genre *Cryptococcus* et *Candida* (**Bouchara et al., 2010**).

La cryptococcose neuro-méningée est la deuxième infection opportuniste la plus fréquente et la mycose systémique la plus dangereuse au cours de l'infection à VIH (**Homa, 2007 ; Millogo et al., 2003**). Elle est causée par une levure capsulée, *Cryptococcus neoformans* qui se développe chez le sujet fortement immunodéprimé et reste fatale lorsque diagnostiquée tardivement, même en cas de traitement antifongique (**Antinori, 2013 ; Mbuagbaw et al., 2002 ; Njamnshi et al., 1999**). Alors que l'incidence de la maladie a diminué dans les pays occidentaux avec l'ère de la trithérapie, la cryptococcose neuro-méningée reste une cause majeure de méningite en Afrique subsaharienne (**Luma et al., 2013 ; Homa, 2007**). Les candidoses sont rencontrées dans toutes les régions du monde (**Sylvie, 2003 ; Sanglard et Odds, 2002**). Soixante à 80% de malades VIH positifs développent une candidose avec un taux de mortalité de 10 à 20% (**Shivaswamy and Neelambike, 2014 ; David, 2007**).

L'augmentation du nombre de PVVIH a modifié l'épidémiologie des maladies opportunistes, en augmentant notamment l'incidence des candidoses et des cryptococcoses au Cameroun. Cependant, les données sur la surveillance épidémiologique des candidoses et de la

cryptococcose chez les PVVIH sont rares. Quelques études épidémiologiques ont néanmoins été menées et ont montré que la prévalence des levures chez ces patients reste élevée au Cameroun (Luma *et al.*, 2013 ; Yongabi *et al.*, 2009 ; Mbu *et al.*, 2007 ; Lohoué *et al.*, 2005 ; Mbuagbaw *et al.*, 2002 ; Njamnshi *et al.*, 1999).

Le traitement des levures au Cameroun utilise essentiellement le fluconazole, le kétoconazole, l'amphotéricine B ou la nystatine, le plus souvent administrés en monothérapie. Ceci est potentiellement source de développement des résistances (Sar *et al.*, 2004). De plus, des espèces de *Candida* présentant des résistances naturelles à certains antifongiques ont été mises en évidence et des mécanismes d'acquisition de la résistance de nombre d'espèces de *Candida* ont été démontrés (Lortholary *et al.*, 2010 ; Sanglard et Odds, 2002 ; Ghannoum et Rice, 1999). *C. neoformans* est sensible à l'amphotéricine B, utilisé en association avec la 5-fluorocytosine. Cependant, la toxicité et le coût élevés de l'amphotéricine B limitent son utilisation au Cameroun. Le fluconazole est de ce fait le traitement de première intention. Les informations sur la résistance de *C. neoformans* au fluconazole sont controversées, néanmoins, de nombreux échecs thérapeutiques ont été observés, avec des cas de rechute dans une période de moins de 6 mois après l'initiation du traitement (Sar *et al.*, 2004). Les données sur la sensibilité des isolats camerounais aux antifongiques restent rares.

La diversité génétique des levures au Cameroun est peu documentée. Pourtant, ce type d'étude est important pour la compréhension de l'épidémiologie d'un champignon pathogène (Viviani *et al.*, 2006). L'espèce *C. albicans* existe sous plusieurs génotypes : A, B, C (Bii *et al.*, 2009 ; Karkowska-Kulet *et al.*, 2009 ; Nesseir, 2007). Chez *C. neoformans*, plusieurs sérotypes ont été décrits (A, D et AD) et le sérotype A (var. *grubii*) domine chez les PVVIH (Adou-Bryn *et al.*, 2006).

La candidose et la cryptococcose neuro-méningée sont des infections opportunistes fréquentes au cours du SIDA compromettant la prise en charge des PVVIH. Leur recrudescence impose aujourd'hui de mettre en place un programme de surveillance épidémiologique de ces infections, tout en déterminant les variabilités génétiques des souches isolées et leur profil de sensibilité aux antifongiques disponibles ; ceci dans le but de mieux comprendre leur évolution et développer des stratégies de lutttes efficaces.

Par ailleurs, le coût élevé des antifongiques associé à la durée du traitement rendent difficile le contrôle des infections fongiques. De plus, la pauvreté des patients et leurs croyances empiriques les incitent de plus en plus à se référer à la médecine à base de plantes qui exploite les connaissances ancestrales des peuples du Cameroun et d'ailleurs. Les plantes médicinales sont une source de composés bioactifs pouvant servir au développement de nouveaux médicaments (**Van Vuuren et al., 2011**) et de nombreuses populations dans le monde utilisent en première intention la médecine traditionnelle pour leurs besoins de santé (**OMS, 2000**). L'exploration des plantes pourrait constituer une voie prometteuse de développement de nouvelles sources médicamenteuses antifongiques efficaces et à moindre coût.

L'objectif de ce travail a été d'obtenir et de caractériser génétiquement des isolats de *Cryptococcus* et *Candida* issus des PVVIH à Yaoundé, d'étudier leur profil de sensibilité aux antifongiques donnés en thérapeutique courante au Cameroun et à divers extraits de plantes potentiellement actifs sur ces isolats.

Ce travail se divise en 3 parties :

- 1. L'étude de l'épidémiologie descriptive et moléculaire et de la sensibilité aux antifongiques d'isolats de *C. neoformans* issus des patients VIH positifs.**
- 2. L'étude de l'épidémiologie descriptive et moléculaire et de la sensibilité aux antifongiques d'isolats de *C. albicans* issus des patients VIH positifs.**
- 3. L'étude de la sensibilité d'isolats de *C. neoformans* et de *Candida* aux extraits de 3 plantes médicinales Camerounaises, *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* et *Monodora tenuifolia*.**

Les deux premiers points ont été réalisés à l'Hôpital Central de Yaoundé et au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale de l'UFR de Pharmacie de Montpellier, équipe « Infections parasitaires et fongiques » de l'UMI 233 du Pr Éric Delaporte.

Le dernier point a été réalisé grâce à l'expertise acquise dans ce domaine par le Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales, Unité des Agents Antimicrobiens, de l'Université de Yaoundé I, dirigé par le MC Fabrice Fekam Boyom.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

I. L'infection à VIH

I.1. Épidémiologie de l'infection à VIH (ONUSIDA, 2013)

Depuis la découverte de la pandémie du Syndrome de l'Immunodéficience Acquisée (SIDA) dans les années 1980, le nombre d'infections, l'incidence et le nombre de morts associés à cette maladie fait d'elle l'une des plus meurtrières de l'histoire de l'humanité. En effet, d'après le rapport de l'ONUSIDA 2013, même si la prévalence mondiale est passée de 5,8% en 2001 à 0,8% en 2012, le nombre de PVVIH n'a cessé d'augmenter (figure 1). Ainsi, le nombre de PVVIH est passé de 30 millions en 2001 à 35,3 millions en 2012. Depuis le début de la pandémie, environ 75 millions de personnes ont été infectées par le VIH. Le nombre de cas a diminué de 33% depuis 2001.

Dans le monde, 2,3 millions [1,9 million–2,7 millions] de personnes ont été nouvellement infectées par le virus en 2012, contre 3,4 millions [3,1 millions–3,7 millions] en 2001. Les nouvelles infections à VIH chez les adultes et les adolescents ont diminué d'au moins 50% dans 26 pays entre 2001 et 2012. Dans le monde, 260 000 [230 000–320 000] enfants ont été nouvellement infectés par le virus en 2012, contre 550 000 [500 000–620 000] en 2001.

En 2012, 1,6 million [1,4 million–1,9 million] de personnes sont décédées de causes liées au SIDA dans le monde. Depuis le début de l'épidémie, on estime que 36 millions [30 millions – 42 millions] de personnes sont décédées de pathologies associées au SIDA.

En 2012, environ 9,7 millions de PVVIH ont eu accès au traitement antirétroviral dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Cela représente 61% des personnes éligibles au traitement selon les directives de l'OMS de 2010 et 34% des personnes éligibles selon les directives de l'OMS de 2013.

L'Afrique subsaharienne reste la région du monde la plus durement touchée par l'infection à VIH, avec 25 millions de PVVIH, soit 70,82% de la population VIH positive (figure 2). Au Cameroun, la prévalence de l'infection à VIH est de 4,3%.

Ces données épidémiologiques font de l'infection par le VIH la 6^{ème} cause de mortalité dans le monde et la 2^{ème} en Afrique subsaharienne.

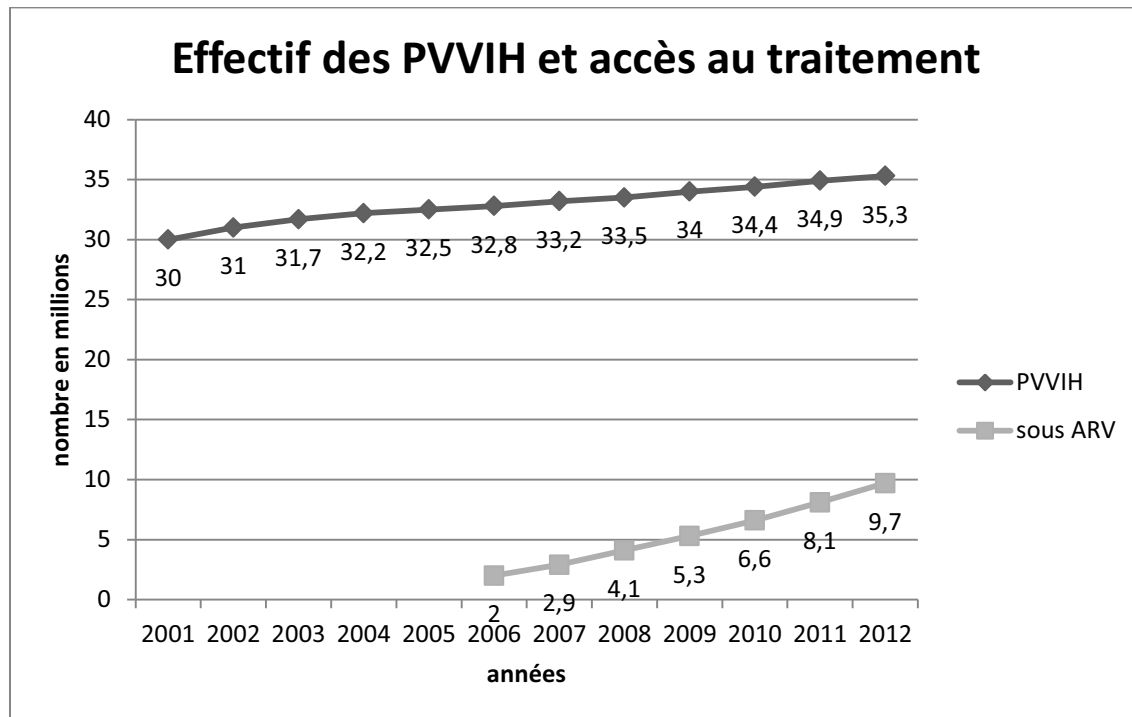


Figure 1 : Evolution du nombre de PVVIH dans le monde et du nombre de personnes ayant accès aux antirétroviraux de 2001 à 2012 d'après **ONUSIDA (2013)**.

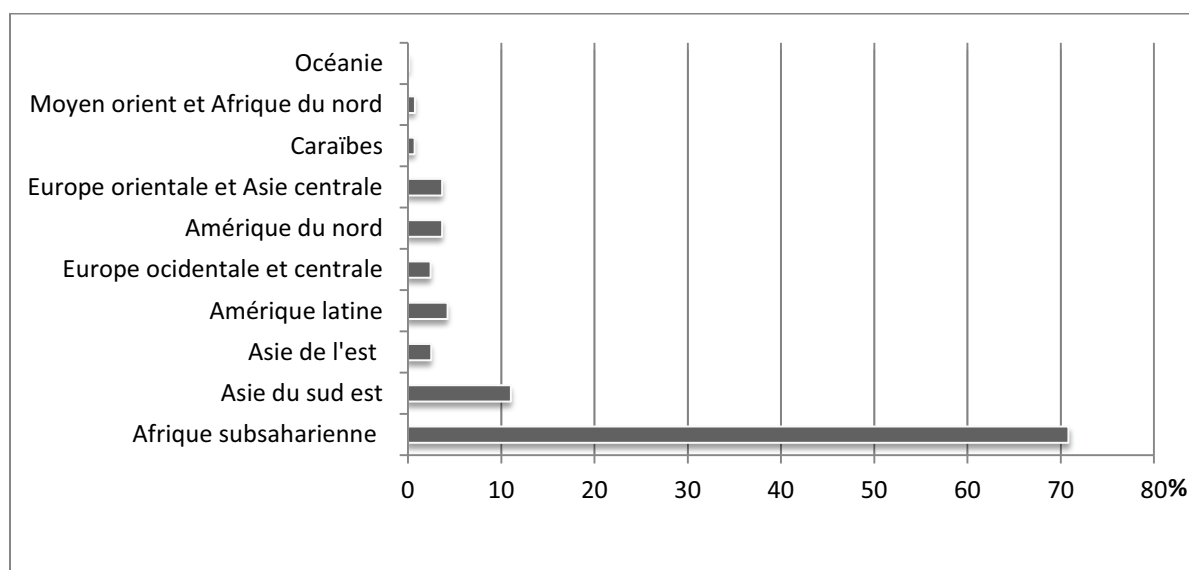


Figure 2: Répartition de la fréquence de l'infection à VIH par région du monde (**ONUSIDA, 2013**).

I.2. Classification des stades de l'infection à VIH

Chez l'adulte, l'infection à VIH peut être classée suivant deux aspects :

➤ Aspect clinique

Selon l'OMS, il existe des stades d'évolution de l'infection à VIH en fonction des signes cliniques

- ✓ Stade clinique OMS 1: asymptomatique
 - Pas de perte de poids. Pas de symptômes ou seulement lymphadénopathie généralisée persistante
 - Echelle de performance 1: asymptomatique, activité normale
- ✓ Stade clinique OMS 2: maladie de faible gravité
 - Perte de poids 5-10%. Manifestations cutanéomuqueuses mineures, zona dans les cinq dernières années, infections urinaires à répétition, sinusite ou otite bactériennes
 - Echelle de performance 2: symptomatique, activité normale
- ✓ Stade clinique OMS 3: maladie de gravité modérée
 - Perte de poids >10%
 - Diarrhée chronique inexpliquée ou fièvre prolongée inexpliquée >1mois, candidose buccale (muguet), tuberculose pulmonaire, infections bactériennes graves (exemple : pneumonie)
 - Echelle de performance 3: alité <50% de la journée durant le dernier mois
- ✓ Stade clinique OMS 4: maladie grave (SIDA)
 - Syndrome cachectique dû au VIH
 - Pneumopathie à *Pneumocystis carinii*, toxoplasmose cérébrale, cryptosporidiose avec diarrhée >1mois, cryptococcose extrapulmonaire, candidose de l'œsophage, de la trachée, des bronches, mycobactériose atypique à *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose extrapulmonaire, lymphome, sarcome de Kaposi, encéphalopathie à VIH
 - Echelle de performance 4: alité > 50% de la journée durant le dernier mois
(Forsman and Weiss, 2008).

➤ **Aspect immunologique**

Selon l'OMS, le nombre de lymphocytes T CD4 et de lymphocytes T CD8 permet la classification de l'infection à VIH en quatre stades (**OMS, 2006**).

Tableau 1: Définition du statut immunologique selon l'OMS (**OMS, 2006**).

Nombre de lymphocytes T CD4 et T CD8 par rapport au stade de la maladie		
Pas d'immunosuppression significative	CD4 $\geq$ 500/mm ³	NA
Immunosuppression modérée	CD4 350-499/mm ³	NA
Immunosuppression avancée	CD4 200-349/mm ³	CD8 < 1800/mm ³
Immunosuppression sévère	CD4 < 200/mm ³	CD8 < 1500/mm ³

NA : non attribué

I.3. Infections opportunistes liées à l'infection par le VIH

Les infections opportunistes au cours de l'infection à VIH sont dues à des micro-organismes divers : bactéries, parasites, virus et champignons. Les infections les plus courantes sont :

- Les infections bactériennes : la tuberculose, les pyodermites (forme banale, cellulites infectieuses, adénocellulites infectieuses), la syphilis, les angiomatoses bacillaires, la folliculite bactérienne.
- Les infections virales causées par: les Herpès simplex virus, le complexe zona-varicelle, le cytomégalovirus, le papillomavirus ;
- Les infections parasitaires : la cryptosporidiose, la toxoplasmose cérébrale
- Les infections fongiques : les dermatophyties (onyxis dermatophytiques, les dermatophyties cutanées, les teignes), les candidoses, la cryptococcose neuro-méningée (**Kong et al., 2007**).

II. *Cryptococcus* et la cryptococcose neuro-méningée au cours de l'infection par le VIH

La cryptococcose neuro-méningée est la mycose systémique la plus mortelle au cours de l'infection à VIH (**Luma et al., 2013 ; Homa, 2007 ; Millogo et al., 2003**). Elle est causée par une levure capsulée du genre *Cryptococcus* qui se développe chez le sujet fortement immunodéprimé et qui reste fatale lorsque diagnostiquée tardivement, même en cas de traitement antifongique (**Mbuagbaw et al., 2002**). Alors que l'incidence de la maladie a diminué dans les pays occidentaux avec l'ère de la trithérapie antirétrovirale, la cryptococcose neuro-méningée reste une cause majeure de méningite en Afrique subsaharienne (**Homa, 2007**). La porte d'entrée est respiratoire, aboutissant à une primo-infection pulmonaire souvent asymptomatique, puis la levure persiste dans l'organisme sous une forme latente (**Garcia-Hermoso et al., 2001**). À la faveur d'une immunosuppression, la levure est «réactivée» et, au cours d'un épisode de fongémie, pénètre dans le compartiment cérébral à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (**Garcia-Hermoso et al., 2001**).

II.1. Description du complexe *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*

➤ Généralités

En 1894, Otto Busse isole un pathogène sur une lésion du tibia d'un patient ayant des ressemblances avec le genre *Saccharomyces* (**Barnett, 2010**). Durant la même année, Francesco Sanfelice isole une levure similaire à celle de Busse d'un jus de pêche qu'il nomme *Saccharomyces neoformans*. En 1901, Jean-Paul Vuillemin renomme cette dernière *Cryptococcus neoformans* puisqu'elle ne produit pas d'ascospores. Ce sont les premières descriptions du genre *Cryptococcus* (**Barnett, 2010**). *Cryptococcus* appartient au règne des *Fungi*, Phylum des *Basidimycota*, Subphylum des *Tremellomycetes*, ordre des *Tremellales*, famille des *Tremellaceae*, genre *Cryptococcus* (**Barnett, 2010**). On dénombre 37 espèces dont seules *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. laurentii* et *C. albidus* sont capables de causer une infection chez l'homme (**Li and Mody, 2010**). Ce n'est que depuis quelques années que *Cryptococcus gattii* est considéré comme une espèce à part entière. En effet, des différences physiques, biochimiques, phénotypiques, leur habitat naturel, l'épidémiologie, les manifestations cliniques et les réponses aux thérapies antifongiques ont permis la séparation de *Cryptococcus gattii* en une espèce distincte de *Cryptococcus neoformans* (**Li and Mody, 2010 ; Kwon-Chung and Varma, 2006**).

C. neoformans est une levure sphérique ou globuleuse mesurant de 2 à 12µm de diamètre. *C. gattii* se distingue par une taille inférieure et une forme plus ovoïde, voire allongée. La majorité des souches possède une capsule polysaccharidique d'épaisseur variable conférant un aspect muqueux aux colonies, et un pigment caroténoïde les colorant du beige à l'ocre. La capsule est composée à 10% de galactoxylomannanes (GalXM) et à 88% de glucuronoxylomannanes (GXM), un polymère de α -1,3-mannose avec des branchements d'acide glucuronique, de xylose, et d'O-acetyl. La quantité et la disposition des résidus d'O-acetyl et de xylose déterminent la séro-spécificité des souches (Lin, 2009).

Le complexe *C. neoformans/C. gattii* comprend 5 sérotypes basés sur les réactions d'agglutination de composants capsulaires: A, B, C, D et AD. *C. neoformans* est séparé en deux variétés soit *C. neoformans* var. *neoformans* (D) et *C. neoformans* var. *grubii* (A) ; *C. gattii* comprend les sérotypes B et C (Li and Mody, 2010).

Habituellement, Le complexe *C. neoformans/C. gattii* est un saprophyte. On le retrouve dans plusieurs environnements tels les excréments de pigeons, le sol, les légumes en état de putréfaction, le bois, les produits laitiers et les plantes (*Eucalyptus camaldulensis* et *Terminalia catappa*) (Kwon-Chung et al., 2014 ; Nielsen et al., 2007 ; Sorrell and Ellis, 1997).

➤ Reproduction

Cryptococcus sp. se présente généralement sous forme de levures, autant dans l'environnement que chez un sujet infecté. Ces levures se reproduisent par bourgeonnement (Lin, 2009 ; Idnurm et al., 2005). Cependant des cas de formation de pseudohyphes ont été décrits dans la littérature pendant la reproduction sexuée et dans un environnement pauvre en ressources azotées (Lin, 2009).

La reproduction sexuée chez *Cryptococcus* n'a jamais été observée dans la nature ou chez un patient infecté (Idnurm et al., 2005). Grâce à ses expériences en laboratoire en 1975 et 1976, c'est à Kwon-Chung que nous devons la découverte des formes parfaites de *C. neoformans* et *C. gattii*, soit *Filobasidiella neoformans* et *Filobasidiella bacillispora* respectivement (Kwon-Chung, 1976). Les basidiospores de *Cryptococcus* ne sont pas contenues dans des basides comme chez les autres basidiomycètes ; ainsi, les spores sont libres et facilement détachées et transportées dans l'air avant d'être inhalées par les individus (Hull and Heitman, 2002).

II.2. La cryptococcose neuro-méningée chez l'individu atteint par le VIH

II.2.1. Les différentes manifestations cliniques de la cryptococcose

Le tableau clinique diffère selon l'immunité du malade. En cas d'immunodépression, l'atteinte est le plus souvent disséminée et les lésions inaugurales concernent volontiers les méninges ou les poumons. La méningo-encéphalite cryptococcique concourt à la découverte du statut sérologique du patient et constitue un fréquent mode de révélation du SIDA et un facteur important de mortalité malgré le traitement (**Maslin et al., 2002**).

L'atteinte pulmonaire est souvent asymptomatique et polymorphe. Elle se traduit habituellement par une toux ou une dyspnée fébrile ; la pneumopathie interstitielle bilatérale (pouvant faire évoquer une pneumocystose, d'ailleurs parfois associée) est la plus typique. On décrit aussi des formes nodulaires ou abcédées et des pleurésies (**Maslin et al., 2002**).

L'atteinte cutanée révèle parfois l'infection: les lésions sont typiquement papuleuses ou nodulaires, d'évolution ombiliquée, parfois ulcérées et sont volontiers distribuées aux zones découvertes (**Lin et al., 2009**).

On observe plus exceptionnellement des cellulites ou des abcès à cryptocoque. Les atteintes oculaires (choriorétinite, endophtalmie), sinusiennes, médullaires, ganglionnaires ou spléniques, digestives, uro-génitales et, plus rarement, osseuses ou cardiaques peuvent s'associer dans la forme disséminée (**Lin et al., 2009**).

Chez le sujet immunocompétent, on peut observer des atteintes isolées cutanées ou viscérales (surtout cérébrales et pulmonaires) mais elles se traduisent alors plus volontiers par une maladie granulomateuse localisée (cryptococcomes) (**Lin et al., 2009**).

Il y a plusieurs différences cliniques entre la cryptococcose chez l'individu immunocompétent et l'individu immunodéprimé. La durée des signes et symptômes avant le diagnostic de la méningite à cryptocoque est souvent courte chez les patients au stade SIDA (**Lin et al., 2009 ; Mitchell and Perfect, 1995**). On retrouve chez les patients au stade SIDA une plus grande charge fongique et une quasi absence de réponse inflammatoire dans les tissus infectés par *Cryptococcus* (**Severo et al., 2009a**).

L'infection du système nerveux central par *Cryptococcus* est plus fréquente chez les patients atteints du SIDA, tandis que l'infection limitée aux poumons est plus courante chez les patients sans immunodéficience (Davis *et al.*, 2009 ; Jongwutiwes *et al.*, 2008). Les rechutes sont aussi plus courantes chez les patients atteints par le VIH, mais le taux de mortalité ne diffère pas beaucoup et est assez élevé chez les deux types de patients (Davis *et al.*, 2009).

II.2.2. Physiopathologie de la cryptococcose neuro-méningée au cours de l'infection à VIH

Le VIH-1 et *Cryptococcus* peuvent mutuellement augmenter leur virulence (Lortholary *et al.*, 2005). *C. neoformans* augmente la réplication du VIH-1 dans les monocytes (Lortholary *et al.*, 2005). En effet, *C. neoformans* induit la production de TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) par les monocytes, et cette cytokine augmente la production de VIH-1 (Harrison *et al.*, 1997). La sécrétion de MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein 1 beta) par les cellules microgliales inhibe le rétrovirus (Goldman *et al.*, 2001). Par contre, *C. neoformans* inhibe la production de MIP-1 β par ces cellules (Goldman *et al.*, 2001). Le défaut d'expression de CD88 (cluster of differentiation 88) chez les neutrophiles de PVVIH, qui entraîne une inhibition de production de CXCL8 (interleukine 8), provoque une réduction de l'activation du système complément et la migration des neutrophiles vers le site infecté par *C. neoformans* (Lortholary *et al.*, 2005). La gp120 du VIH-1 aide aussi *C. neoformans* à provoquer une réponse Th2 en augmentant la capacité de la levure à induire la production d'IL-10 (interleukine 10) par les monocytes et en inhibant la translocation du CD40 à la surface des cellules (Lortholary *et al.*, 2005 ; Pietrella *et al.*, 2001). La réponse Th1 protectrice est donc inhibée. La gp41 exerce son activité directement sur les cellules épithéliales en augmentant l'adhésion de *C. neoformans* (Jong *et al.*, 2007).

II.3. Facteurs favorisants et signes cliniques de la cryptococcose neuro-méningée chez le patient VIH positif

II.3.1. Facteurs favorisants la cryptococcose neuro-méningée

La majorité des hommes est exposée à *Cryptococcus* (Bovers *et al.*, 2008). Ce dernier peut coloniser un individu pendant des mois ou des années et, en général, ne progresse jamais à l'état d'infection (Kronstad *et al.*, 2011). Les PVVIH, sont incapables d'empêcher la prolifération de *Cryptococcus* du fait de leur immunodépression et il y a alors établissement de l'infection (Li and Mody, 2010; Pfaller and Diekema, 2010 ; Shirley and Baddley, 2009). Il est très rare d'observer une infection par *Cryptococcus* chez les patients cancéreux ou chez ceux qui ont

reçu une transplantation de moelle osseuse (**Pukkila-Worley and Mylonakis, 2008**). Puisque la transmission d'animal à humain ou interhumaine de *Cryptococcus* n'a pas vraiment été documentée, la réactivation d'une infection latente est l'hypothèse la plus acceptée pour expliquer le déclenchement de l'infection chez l'homme (**Lin and Heitman, 2006**). L'âge semble être un facteur déterminant dans l'apparition de la cryptococcose (**Galanis and Macdougall, 2010**). Les enfants VIH négatifs sont très peu affectés et l'incidence chez les enfants vivant avec le VIH est seulement d'environ 1% (**Pfaller and Diekema, 2010 ; Severo et al., 2009b; Subramanian and Mathai, 2005**). Chez les patients VIH négatifs atteints de cryptococcose, la moyenne d'âge est ≥ 45 ans (**Pfaller and Diekema, 2010**). Le sexe est aussi un facteur favorisant, puisque les hommes semblent être en moyenne 3 fois plus affectés que les femmes par la cryptococcose (**Li and Mody, 2010 ; Leal et al., 2008; Subramanian and Mathai, 2005; Lortholary et al., 2002; Chen et al., 2000**).

II.3.2. Signes cliniques de la cryptococcose neuro-méningée chez le patient VIH positif

Les signes et symptômes de la cryptococcose neuro-méningée sont très nombreux et ne se manifestent pas tous nécessairement chez un même patient: toux, céphalée, fièvre, nausées, vomissements, douleur à la poitrine, perte de poids (souvent un indice de dissémination), troubles visuels et d'ouïe, état mental altéré, et coma. Les manifestations cérébrales de la méningo-encéphalite les plus courantes sont les céphalées, la fièvre, les sueurs nocturnes, l'hypertension inter-crânienne et la raideur de la nuque (**Kronstad et al., 2011 ; Li and Mody, 2010; Shirley and Baddley, 2009; Baddley et al., 2008; Leal et al., 2008**).

II.4. Épidémiologie de la cryptococcose neuro-méningée au cours de l'infection à VIH

La description des infections à *Cryptococcus* n'est pas récente. Des cas de cryptococcose ont été rapportés avant les années 1950 en Europe et en Afrique (**Molez, 1998**). Avant la pandémie du SIDA, les cas de cryptococcose en Amérique du Nord se chiffraient à environ 0,2 – 0,8 par 100 000 habitants par année (**Pfaller and Diekema, 2010**). Depuis le début de la pandémie du SIDA, l'incidence de la cryptococcose a considérablement augmenté et on estime qu'il y a présentement environ 1 million de cas par année à l'échelle mondiale dont 625 000 décès survenant dans les trois premiers mois après l'infection (**Kronstad et al., 2011**).

En différentes régions du monde, l'incidence des méningites à *Cryptococcus* chez les patients atteints du VIH-1 varie de 0,04% à 12% (**Park et al., 2009**). Le plus grand bassin d'infection se

trouve en Afrique subsaharienne (environ 720 000 nouveaux cas/année), alors que les infections en Europe de l'Ouest et centrale, ainsi qu'en Océanie sont beaucoup plus rares (**Park et al., 2009**).

Aux USA, on estime que près de 78,4% des cryptococcoses sont liées à l'infection par le VIH (**Pyrgos et al., 2013**). En Afrique du sud, la cryptococcose est responsable de 44% de décès chez les personnes infectées par le VIH (**Nelesh, 2007**). Une étude menée par **Soumaré et al. (2005)** à Dakar (Sénégal) a montré que la prévalence de la cryptococcose dans cette ville était de 2,9% en 2001 et 7,9% en 2003. La mortalité inhérente était de 71,1%, atteignant 78,9% en cas de cytorachie inférieure à 20 éléments/mm³. De même, **Millogo et al. (2003)** ont mené une étude similaire au Burkina Faso et ont conclu que la cryptococcose neuro-méningée est associée à une mortalité hospitalière élevée.

Au Cameroun, les études sur la cryptococcose neuro-méningée sont variables. Dans une étude portant sur les atteintes neuro-méningées à l'Hôpital Central de Yaoundé, **Njamnshi et al. (1999)** ont trouvé une prévalence de 100% chez les sujets VIH positifs atteints de méningite. Une autre étude menée au Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé (CHUY) a montré que 97% de patients en stade SIDA développent une cryptococcose avec 42,2% de décès dans un délai de 21 jours, bien que sous traitement antifongique au fluconazole (**Mbuagbaw et al., 2002**). **Luma et al., (2013)** ont récemment obtenu une fréquence de 11,2% de la cryptococcose chez les PVVIH après examen des liquides céphalo-rachidiens (LCR) à l'encre de Chine à Douala.

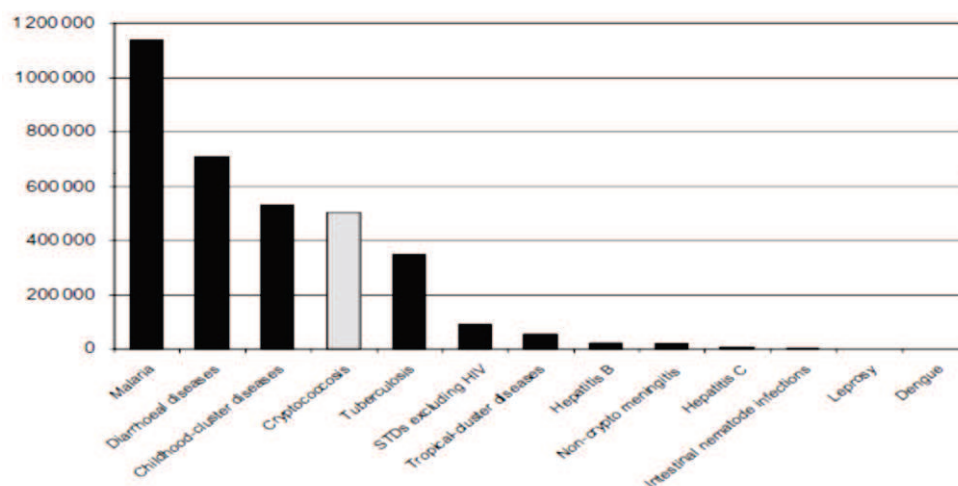


Figure 3: Distribution des pathologies infectieuses en Afrique subsaharienne hors VIH (**Park et al., 2009**).

C. neoformans var. *grubii* (sérotypage A) cause la majorité (95%) des infections chez les PVVIH (**Lin, 2009 ; Idnurm et al., 2005; Sorrell, 2001**). En Europe, le sérotypage A est responsable d'environ 51% des cas d'infections chez les patients atteints du VIH-1 (**Bovers et al., 2008**). Le sérotypage D est lui aussi ubiquitaire, mais sa prévalence est plus faible que celle du sérotypage A. De plus, il semble moins virulent que ce dernier (**Pukkila-Worley and Mylonakis, 2008 ; Litvintseva et al., 2005**). Le sérotypage hybride AD est, quant à lui rarement isolé (**Litvintseva et al., 2005**). A ce jour, au Cameroun, seul le sérotypage A a été mis en évidence (**Bertout et al., 2012**).

La distribution mondiale cosmopolite de *C. neoformans* est probablement due aux pigeons (**Lin, 2009 ; Nielsen et al., 2007; Haag-Wackernagel and Moch, 2004**). L'isolement de *C. neoformans* chez les pigeons, au niveau du bec et du cloaque, ainsi que dans leurs excréments séchés démontre que les pigeons sont les réservoirs de ce champignon (**Rosario et al., 2005**). La migration des oiseaux et la domestication des pigeons ont eu pour conséquence une présence constante des pigeons dans les milieux urbains et donc une augmentation du risque d'infection (**Nielsen et al., 2007**). La pandémie du SIDA a aussi contribué à une augmentation fulgurante des cas de cryptococcose par *C. neoformans* (**Kronstad et al., 2011 ; Chakrabarti, 2007**).

II.5. Cryptococcose et immunodépression au cours de l'infection au VIH : phénomènes immunologiques de l'infection

II.5.1. Pathogenèse de *Cryptococcus neoformans*

L'agent responsable de l'infection initiale serait la spore ou la levure déshydratée (**Botts and Hull, 2010**). Les deux sont très petites (environ 1-5µm) et peuvent facilement se loger dans les alvéoles pulmonaires. Par contre, puisque la levure déshydratée n'est pas très résistante à l'action du système immunitaire, la spore serait un meilleur candidat pour survivre à l'entrée initiale dans le poumon (**Botts and Hull, 2010 ; Botts et al., 2009; Giles et al., 2009; Velagapudi et al., 2009**). Les spores de *Cryptococcus* sont caractérisées par une paroi très épaisse, morphologiquement différente de la surface de la levure sous sa forme végétative, et qui la protège contre le stress de l'environnement (**Botts et al., 2009**). La majorité des spores est rapidement éliminée par les macrophages alvéolaires. Elles doivent germer le plus rapidement possible pour devenir infectieuses (**Giles et al., 2009**).

Après avoir été phagocyté par les macrophages alvéolaires de l'hôte, *Cryptococcus* doit survivre dans ces derniers (**Giles et al., 2009**). Dans l'environnement, les amibes sont capables de phagocyter *Cryptococcus*, et selon les chercheurs, les tactiques d'évasion que *Cryptococcus* a dû, au cours de l'évolution, développer pour survivre dans les amibes sont aussi utilisées dans les macrophages (**Greub and Raoult, 2004**). *Cryptococcus* est capable de survivre et de bourgeonner dans l'environnement acide induit par les compartiments de lysosomes des macrophages (**Levitz et al., 1999**). La levure produit aussi des vésicules qui contiennent des éléments nécessaires à sa virulence et à sa survie (les enzymes laccase, phospholipase B et uréase) et les exporte dans le cytoplasme des macrophages (**Kronstad et al., 2011 ; Rodrigues et al., 2008**).

Cryptococcus, pathogène intracellulaire facultatif, est aussi capable d'éviter la phagocytose via l'échappement à l'opsonisation, et au camouflage qui empêche aux macrophages de le reconnaître (**Seider et al., 2010 ; Stano et al., 2009**). *C. neoformans* peut aussi éviter la phagocytose par l'épaississement de sa capsule (**Chrisman et al., 2011**).

Il existe plusieurs phénotypes de *Cryptococcus* *in vitro* et *in vivo* (**Jain and Fries, 2008 ; Goldman et al., 1998**). Les trois phénotypes recensés, différenciés par la structure de la paroi et la composition biochimique de la capsule, sont caractérisés par leur aspect sur gélose : le

phénotype lisse, le phénotype mucoïde, et le phénotype ridé (**Guerrero et al., 2006 ; Fries et al., 1999**). La forme mucoïde est beaucoup plus virulente, autant chez l'homme que chez les modèles animaux, et elle induit une plus grande résistance à la phagocytose ainsi qu'un degré plus élevé d'inflammation (**Guerrero et al., 2010 ; Guerrero and Fries, 2008 ; Pietrella et al., 2003**). De plus, en réponse à la forme mucoïde, les macrophages sont activés de façon alternative ce qui provoque une persistance de l'infection (**Guerrero et al., 2010**).

La dissémination cérébrale de *Cryptococcus* à partir de la porte d'entrée pulmonaire est rendue possible par la mise en place de plusieurs mécanismes. Le premier est de demeurer dans les phagocytes et de les utiliser comme véhicule de transport à la manière d'un Cheval de Troie. Les phagocytes qui ont internalisé les levures permettent à *Cryptococcus* d'entrer dans le cerveau lorsque ces derniers traversent la barrière hémato-encéphalique (**Casadevall, 2010 ; Charlier et al., 2009**). Le second est de traverser la barrière hémato-encéphalique par transcytose. Ce processus permet la transmigration directe de levures viables à travers l'endothélium des capillaires corticaux (**Casadevall, 2010 ; Charlier et al., 2009**). Ce passage semble dépendre de l'expression d'uréase, et d'acide hyaluronique qui altèrent les jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales facilitant la migration trans-cellulaire des levures (**Casadevall, 2010; Shi et al., 2010 ; Chang et al., 2004 ; Chen et al., 2003**).

II.5.2. Facteurs de virulence de *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus possède trois facteurs de virulence principaux : une capacité de croissance à 37°C, la synthèse de mélanine et la formation d'une capsule.

➤ Croissance à 37°C

C. neoformans et *C. gattii* sont les seules *Tremellalles* capables de pousser de façon optimale à une température supérieure à 30°C (**Perfect, 2006**). Ceci leur confère donc un avantage au niveau de l'établissement d'une infection, puisque la température corporelle de l'homme est de 37°C. Plus de 20 gènes ont été démontrés comme nécessaires à la croissance à 37°C (**Perfect, 2006**). On peut citer entre autres, les protéines Ras, une protéine G, le facteur d'échange de guanine Cdc24, la calcineurine, la phosphatase calcique (**Nichols et al., 2007 ; Vallim et al., 2005**).

➤ Synthèse de la mélanine

La mélanine est une substance brun-foncé à noire qui se loge dans la membrane cellulaire et protège *C. neoformans* contre la phagocytose, les enzymes hydrolytiques, les rayons UV dans l'environnement et le stress oxydatif (**Eisenman et al., 2009 ; Frases et al., 2007; Langfelder et al., 2003; Rosas and Casadevall, 2001**). Elle est synthétisée par la laccase à partir des composés phénoliques tels que la L-DOPA, l'épinéphrine et la norépinéphrine (**Frases et al., 2007 ; Langfelder et al., 2003**). Le cerveau contient ces composés phénoliques, ce qui pourrait expliquer en partie le neurotropisme de *Cryptococcus* (**Liu and Nizet, 2009 ; Nosanchuk et al., 2000**).

➤ La capsule

Chez *C. neoformans* et *C. gattii*, la capsule procure une barrière physique en empêchant la phagocytose, inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, réduit la production d'anticorps, empêche la reconnaissance par le complément, aide à la résistance aux ROS (espèces réactives de l'oxygène) et au NO (monoxyde d'azote) et réduit la migration des leucocytes. Elle prévient l'activation et la maturation des cellules dendritiques (**Cordero et al., 2011 ; Lupo et al., 2008; Bose et al., 2003; Vecchiarelli et al., 2003; Almeida et al., 2001**). Dans le cerveau, la capsule inhibe grandement la réponse aux cytokines et chimiokines induites par les cellules microgliales (**Goldman et al., 2001**).

➤ Autres facteurs de virulence importants

La sécrétion d'enzymes extracellulaires (laccase, phospholipase et uréase) est aussi un facteur de virulence important chez *C. neoformans* et *C. gattii*. Seules ces deux espèces de *Cryptococcus* produisent la laccase (**Chan and Tay, 2010**). La laccase est retrouvée dans le cytoplasme, la membrane cellulaire et la capsule (**Garcia-Rivera et al., 2005**). Elle contribue à la virulence par la synthèse de mélanine en utilisant des composés phénoliques et des flavonoïdes des plantes dans l'environnement (**Fowler et al., 2011 ; Eisenman et al., 2007**).

La phospholipase B (PLB) qui joue un rôle dans la biogenèse et le remodelage de la membrane de la levure peut se lier au DPPC (di-palmitoyl-phosphatidylcholine) et au PG (phosphatidylglycérol) des cellules épithéliales du poumon et hydrolyser les phospholipides à la

surface de celles-ci, augmentant ainsi la pénétration des levures et la dissémination (**Djordjevic, 2010 ; Ganendren et al., 2006; Santangelo et al., 2004; Santangelo et al., 1999**).

L'uréase est un facteur important de virulence de *Cryptococcus*, surtout dans l'infection système nerveux central (**Cox et al., 2000**). La transmigration vers le cerveau est uréase-dépendante (**Shi et al., 2010 ; Osterholzer et al., 2009**). L'uréase entraîne la séquestration de *Cryptococcus* dans les micro-capillaires à la barrière hémato-encéphalique (probablement par la synthèse d'ammonium qui est très dommageable pour l'endothélium), facilitant donc l'invasion du cerveau (**Shi et al., 2010 ; Olszewski et al., 2004**).

Le type sexuel de *Cryptococcus* joue aussi un rôle dans sa virulence. En effet, la majorité des souches cliniques est de type α (**Nielsen et al., 2005**). Il y a corrélation entre la virulence et le type α , puisque les souches du type α sont peu ou pas virulentes (**Barchiesi et al., 2005**). Les souches α ont une plus grande prédilection à infecter le système nerveux central (**Nielsen et al., 2005**).

Les superoxydes dismutases convertissent les radicaux libres, toxiques pour *Cryptococcus*, en peroxyde d'hydrogène et oxygène moins toxiques pour la levure (**Cox et al., 2003**).

L'inositol est un précurseur des phosphatidylinositols, un élément essentiel pour maintenir l'intégrité de la membrane de *Cryptococcus*. Le système nerveux central est riche en inositol et c'est probablement à cet endroit que *Cryptococcus* se l'approprie, expliquant en partie le neurotropisme de cette levure (**Reynolds, 2009**).

II.5.3. Immunité contre *Cryptococcus*

Avant de rejoindre les poumons, *Cryptococcus* doit d'abord traverser les voies nasales parsemées de poils, échapper à l'action ciliaire de l'arbre bronchique, et résister à la toux et aux éternuements qui chassent les corps étrangers et les pathogènes, entourés de mucus, hors des voies respiratoires (**Kindt et al., 2007**). Chez l'homme, des histatines présentes dans la salive ont une activité fongicide contre les levures (**Tsai and Bobek, 1998**). De plus, seules les plus petites levures ou spores vont pouvoir se rendre aux alvéoles et capillaires pulmonaires pour s'y loger. Les pneumocytes de type II qui tapissent les alvéoles reconnaissent *Cryptococcus* et sécrètent des cytokines qui augmentent le recrutement et l'activité des neutrophiles (**Guillot et al., 2008 ; Barbosa et al., 2007**).

Les premières cellules immunitaires rencontrées par *Cryptococcus* après son entrée dans les poumons sont les macrophages alvéolaires (**Chang et al., 2006**).

Les cellules dendritiques et les éosinophiles ont la capacité de reconnaître *C. neoformans* opsonisé par des anticorps ou des molécules du complément, de phagocyter et de tuer les levures, et de présenter des antigènes (**Garro et al., 2011 ; Wozniak and Levitz, 2008 ; Kelly et al., 2005**).

Les cellules NK (natural killer) humaines et murines peuvent tuer *Cryptococcus* et ce, sans exposition préalable (**Petkovic et al., 2010 ; Marr et al., 2009 ; Marr et al., 2006 ; Hidore et al., 1991**).

Les polynucléaires neutrophiles (PMNs) jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre *Cryptococcus*. Au cours de l'infection par des souches virulentes de *C. neoformans*, il y a une infiltration massive de PMNs dans les poumons et augmentation de leur activité phagocytaire (**Hardison et al., 2010 ; Mednick et al., 2003**).

Chez l'homme, les lymphocytes T cytotoxiques tuent *Cryptococcus* grâce à la sécrétion de granulysine qui interagit avec les lipides de la membrane cellulaire de la levure en activant les enzymes responsables de la dégradation lipidique (**Kindt et al., 2007 ; Ma et al., 2002**).

Le rôle protecteur des lymphocytes B contre *Cryptococcus* est généralement moindre que celui des lymphocytes T (**Rodrigues et al., 2005**). La capsule active de façon alternative le système du complément. La mélanine peut activer la voie alternative du système complément (**Rosas et al., 2002**).

II.6. Diagnostic biologique de la cryptococcose neuro-méningée

➤ Prélèvements

Le diagnostic repose sur un bilan d'extension complet basé sur l'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR), de l'hémoculture et d'une culture des urines ainsi que la recherche de l'antigène capsulaire polysidique dans le sérum et le LCR avec détermination du titre antigénique (**Dromer et Lortholary, 2004**).

➤ **Examen microscopique**

• **Examen Direct**

C. neoformans et *C. gattii* sont des levures sphériques à ovoïdes encapsulées de taille variable (moyenne de 3-10µm). La capsule est facilement observable en microscopie optique après contre coloration à l'encre de Chine. En effet, les particules de l'encre sont repoussées par la capsule entraînant l'apparition d'un halo clair autour de la cellule. La mise en évidence de levures capsulées à l'examen direct d'échantillons biologiques est un élément majeur du diagnostic. Leur présence dans un LCR signe le diagnostic de méningo-encéphalite cryptococcique d'après les critères internationaux de diagnostic des mycoses invasives (**De Pauw et al., 2008**). Le culot de centrifugation du LCR ou de tout autre liquide biologique est examiné entre lame et lamelle après contre coloration à l'encre de Chine diluée au 1/3. L'examen direct du LCR est positif au cours de la cryptococcose neuro-méningée chez 90% des patients infectés par le VIH et 50% des patients séronégatifs au VIH (**Dromer et al., 2007**). Des colorations de type Gram ou plus spécifiques des champignons (Calcofluor) peuvent aussi être utilisées.

• **Histologie**

En histopathologie, après coloration non spécifique (hématoxyline-éosine-safran (HES)) ou spécifiques des champignons (imprégnation argentique de Gomori-Grocott qui colore la paroi des champignons en brun-noir), les levures de 5-20µm sont facilement détectables grâce à leur capsule importante. Certains réactifs colorent spécifiquement la capsule (le mucicarmin colore les mucopolysaccharides en noir, le PAS (periodic acid-Schiff) colore les polysaccharides en rose fushia, le bleu Alcian colore la capsule en bleu). La coloration de Fontana-Masson qui colore la mélanine en brun-noir semble être assez spécifique pour distinguer *C. neoformans* et *C. gattii* des autres champignons lévuriformes dans les tissus (**Kwon-Chung et al., 1981**).

➤ **Culture**

• **Ensemencement**

C. neoformans et *C. gattii* sont classés parmi les agents pathogènes de classe 2 d'après la législation française (Décret 94-352 du 4 mai 1994, arrêté du 30 juin 1998, Code du Travail Art. R.231-61-1). Une classification réalisée par des mycologues internationaux recommande de

manipuler les deux espèces au niveau 2 de sécurité (BSL-2) quand elles sont sous la forme levure, mais au niveau 3 (BSL-3) quand elles sont sous forme de basidiospores (**de Hoog, 1996**). La mise en culture des échantillons (culot de centrifugation du LCR, des urines, hémoculture, pus, biopsies) est indispensable pour permettre l'identification de l'espèce. Le rendement des cultures est très dépendant des volumesensemencés même si la charge fongique dans le LCR est censée dépasser dans certains cas 10^5 cellules/ml (**Bicanic et al., 2009**). La croissance est optimale entre 30°C et 35°C. En cas de traitement antifongique antérieur, les échantillons peuvent êtreensemencés en milieu liquide pour favoriser la dilution de l'antifongique résiduel.

Les colonies sur milieu Sabouraud gélosé ont un aspect muqueux voire gluant, de couleur beige à marron, après quelques jours de culture. Ce sont des levures qui peuvent pousser jusqu'à 40°C, avec une température de croissance optimale à 30°C. Les souches poussent sur la plupart des milieux de culture, excepté ceux contenant de la cycloheximide (actidione). A partir d'un prélèvement, les colonies apparaissent après environ 48 heures de culture mais les délais peuvent être allongés en cas de traitement antifongique antérieur ou de charge fongique faible, ce qui justifie de conserver les cultures au moins 4 semaines (**Perfect, 2006 ; Bose et al., 2003**).

- **Milieux sélectifs**

La capacité de synthèse de mélanine par *C. neoformans* et *C. gattii* grâce à la phénol-oxydase a été utilisée pour développer des milieux sélectifs tels que le milieu L-DOPA (**Paliwal et Randhawa, 1978b**), le milieu norépinephrine (**Shaw et Kapica, 1972**) ainsi que le milieu aux graines de Niger (*Guizotia abyssinica*) (**Paliwal et Randhawa, 1978a ; Staib, 1963**). Sur ces milieux les colonies deviennent rapidement marron, ce qui permet de les distinguer des autres espèces, dont les colonies restent blanches/beiges. C'est le cas de *Cryptococcus laurentii* parfois décrite au cours d'infections en association avec *C. neoformans* (**Manfredi et al., 2006 ; Ikeda et Maeda, 2004**) et des levures de type *Candida* parfois majoritaires dans des prélèvements de type expectoration.

Pour différencier phénotypiquement *C. neoformans* et *C. gattii*, il existe deux milieux :

- Le milieu CGB (Canavanine-Glycine-Bromothymol bleu). Le milieu gélosé est de couleur verte. Les souches de *C. gattii* sont résistantes à la canavanine et hydrolysent la glycine ce qui augmente le pH et ainsi le bromothymol vire au bleu alors que la plupart des souches de *C. neoformans* n'hydrolysent pas la glycine et les quelques

souches qui en sont capables sont sensibles à la canavanine, le milieu restant donc de couleur verte (**Min et Kwon-Chung, 1986 ; Kreger-van Rij, 1984**).

- Le milieu YCB + D-Proline (**Dufait et al., 1987**) : *C. gattii* est capable d'utiliser la D-Proline comme source azotée contrairement à *C. neoformans*.

➤ Identification biochimique

C. neoformans est capable d'utiliser la plupart des acides aminés, sucres, lipides et vitamines comme source d'énergie. Les levures sont aérobies et sont capables de croître en milieu solide et liquide. En revanche, elles ne sont pas capables de fermenter les sucres et ne peuvent utiliser ni le nitrate ni le nitrite comme sources azotées (**Kreger-van Rij, 1984 ; Barnett et al., 1983**). Elles tolèrent des pH allant de 4 à 7,5. Quelques données physiologiques caractéristiques sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Profil biochimique des espèces *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus gattii* (**Fricker-Hidalgo et al., 1995**).

Source carbonée	galactose	sucrose	maltose	tréhalose	mannitol	melezitose	2ketogluconate	inositol	rhamnose	lactose
croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-

Comme toutes les levures basidiomycètes, elles sont capables d'hydrolyser l'urée en ammoniacque (**Kreger-van Rij, 1984**) et sont positives pour la réaction de coloration du Diazonium Blue B (**Kreger-van Rij, 1984**). L'activité uréase peut être déterminée en quelques heures grâce à des kits commercialisés comme par exemple le milieu urée indole (bio Mérieux®, Marcy-L'étoile, France).

➤ Détection de l'antigène capsulaire

La recherche de l'antigène capsulaire polysidique est un outil de diagnostic très important. En effet, les trousse commercialisées ont une excellente spécificité et sensibilité (> 95 % pour les trousse utilisant la pronase pour le prétraitement des échantillons). La détection se fait par agglutination de billes de latex sensibilisées avec des anticorps anti-polyoside capsulaire ou par

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). La positivité de la détection dans le LCR est synonyme de méningo-encéphalite cryptococcique (**De Pauw, et al., 2008**), mais sa négativité n'élimine pas le diagnostic. De même, la positivité de la détection dans le sérum est en faveur d'une infection disséminée. La détermination des titres antigéniques est un élément important de l'appréciation de la sévérité de l'infection puisque des titres antigéniques élevés dans le sérum et/ou le LCR au moment du diagnostic sont corrélés à un moins bon pronostic (échec mycologique à 15 jours et à 10 semaines de traitement avec rechute), hypertension intracrânienne, et lésions spécifiques à l'imagerie cérébrale. Il est totalement inutile de déterminer les titres dans les urines ou d'autres liquides biologiques (**Charlier et al., 2008 ; Dromer, et al., 2007**).

III. Le genre *Candida* et les candidoses muqueuses au cours de l'infection par le VIH

Les champignons du genre *Candida* peuvent provoquer des infections superficielles touchant les muqueuses et la peau, ainsi que des infections viscérales. Plus de 200 espèces de *Candida* sont connues, et parmi elles, seule une vingtaine est responsable d'infections humaines. Les principaux facteurs favorisant les candidoses sont les facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Les facteurs dits intrinsèques sont liés à l'hôte. On y retrouve, les facteurs:

- Physiologiques: âge, grossesse,
- Locaux : transpiration, macération, humidité, traumatismes,
- Liés au terrain du patient : diabète, pneumopathie, neutropénie, cancer, baisse de l'état général, immunodépression.

Les facteurs extrinsèques sont d'origine iatrogène: antibiotiques, corticoïdes, immunosuppresseurs, anticancéreux, hormones contraceptives, antiseptiques, radiothérapie, héroïnomanie intraveineuse, chirurgie (digestive et cardiaque), transplantation d'organes, cathéters intraveineux, prothèses dentaires (**Bouchara et al., 2010 ; Rispaïl, 2005**).

Toutefois, c'est avec l'avènement de l'infection à VIH qu'il y a eu une recrudescence des infections fongiques avec au premier rang les infections dues aux levures du genre *Candida* (**Bouchara et al., 2010**).

III.1. Description du genre *Candida*

III.1.1. Classification et découverte

Le genre *Candida* se caractérise par des levures de morphologie variée qui se reproduisent toutes par bourgeonnement. Ces levures sont non capsulées, non pigmentées et certaines produisent du pseudomycélium ou du mycélium vrai (Calderone, 2002 ; Odds, 1997). Les levures du genre *Candida* se retrouvent dans toutes les régions du monde et dans tous les milieux (Calderone, 2002 ; Odds, 1997).

C'est en Allemagne en 1923 que B. Lagenbeck démontre pour la première fois la présence d'un champignon levuriforme dans le muguet buccal. Dans le genre *Candida*, l'espèce *C. albicans* fut décrite par Christine Marie Berkhout en 1923 (Calderone, 2002). Parmi la vingtaine d'espèces de *Candida* ayant une activité pathogène clairement démontrée chez l'Homme (Eggiman, 2003), six seulement sont plus fréquemment rencontrées. Il s'agit de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* et *Candida lusitaniae* (Bruder-Nascimento et al., 2010 ; Appleton, 2000 ; Samaranayake and Samaranayake, 1994).

III.1.2. Structure et reproduction de *Candida*

➤ Structure de *Candida*

Candida, comme tout champignon, possède une membrane, un noyau bien différencié, ainsi que les organelles nécessaires à son fonctionnement. Cette levure possède de surcroît une paroi épaisse qui lui permet de résister aux attaques (figure 4).

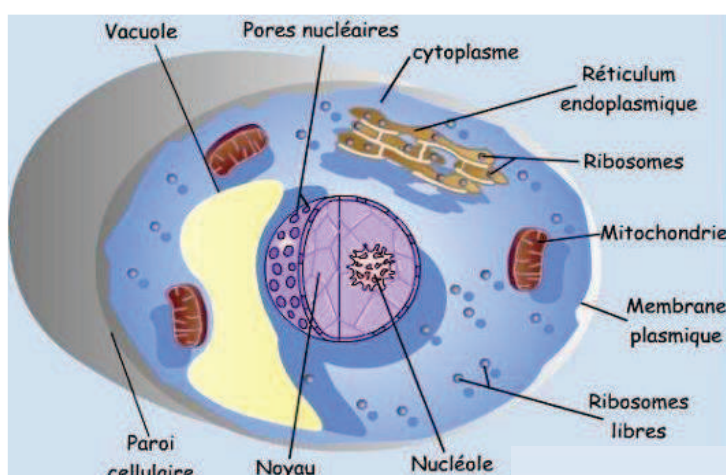


Figure 4 : Ultrastructure de la cellule fongique (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006)

La paroi lui procure sa rigidité, offrant une structure maintenue de la cellule (Lee *et al.*, 2012). La connaissance de la paroi est essentielle et elle a pu permettre le développement de thérapies ciblées efficaces (Castillo *et al.*, 2008). La chitine, les β -glucanes et les mannoprotéines sont les composants essentiels de cette paroi, les deux derniers représentent 80% de la masse de la paroi. Trois à huit couches différentes peuvent exister dans cette paroi. La couche la plus externe est un réseau dense, à l'aspect fibreux ou flocculent, constituée de mannanes, mannoprotéines, de β -(1,6)-glucanes et de protéines. La plus interne quant à elle, est étroitement ancrée dans la membrane, elle est continue au plasmalemme. Elle est principalement formée de β -(1,3)-glucane, de chitine et de quelques mannoprotéines (Figure 5) (Lee *et al.*, 2012 ; Castillo *et al.*, 2008 ; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

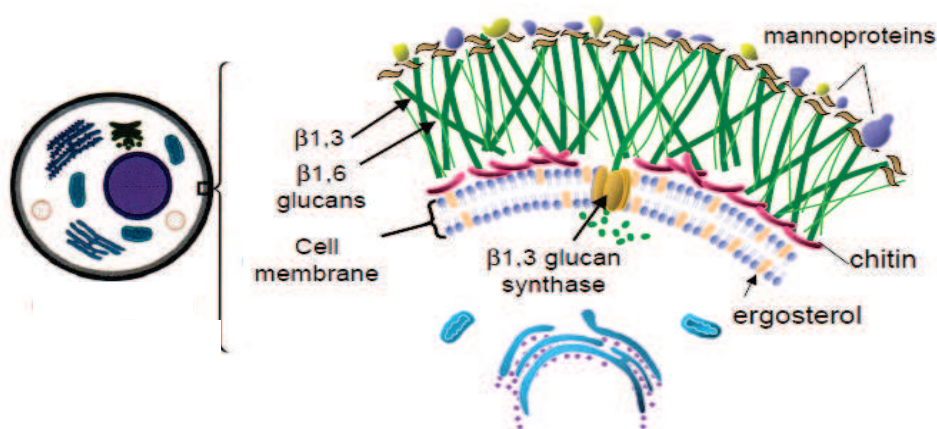


Figure 5 : Structure générale d'une paroi fongique (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006)

➤ **Mécanisme de reproduction**

Les levures désignent des champignons possédant un thalle unicellulaire. Cependant, *Candida* peut adopter trois morphologies différentes : levures (blastopore) ; chlamydospore ; mycélium (**Bouchara et al., 2010 ; Mosca et al., 2003**).

Candida se reproduit essentiellement par bourgeonnement, donnant ainsi naissance à de nouvelles levures, également appelées blastopores ou blastoconidies. La production de tubes germinatifs conduit au passage à la phase de croissance filamenteuse ou hyphe, aussi appelée forme mycélienne. Mais *Candida* a aussi la possibilité de se reproduire de manière sexuée avec formation d'hyphes (**Bennett, 2010**).

Lorsque les conditions de vie leur sont défavorables, *C. albicans* et *C. dubliniensis* peuvent former des chlamydospores (**Mosca et al., 2003**).

III.1.3. Les principales espèces du genre *Candida* impliquées en pathologie humaine

Parmi les levures du genre *Candida* impliquées en pathologie humaine, on retrouve :

- *Candida albicans*, la principale levure impliquée en pathologie chez l'homme. C'est une levure commensale du tube digestif et des cavités naturelles de l'homme.
- *Candida glabrata*, commensal des voies génito-urinaires et de l'intestin est retrouvé dans 10% des isolats et responsable de 7% des septicémies,
- *Candida tropicalis*, saprophyte de la nature (sol, eau, céréales) est retrouvé dans le tube digestif et les voies urinaires de l'homme, représente 4% des isolats de *Candida* et est responsable de plus de 7% des septicémies,
- Les levures commensales de la peau : *Candida parapsilosis* (20% des septicémies), *C. guilliermondii*, *C. famata*,
- les espèces d'origine alimentaire : *C. kefyr* (produits laitiers fermentés), *C. krusei* (jus de raisin),
- *Candida dubliniensis* : espèce isolée chez les PVVIH, longtemps confondue avec *C. albicans*.
- Et plus récemment *Candida africana* nouvelle espèce isolée des prélèvements vaginaux, et très proche de *C. albicans*.

III.1.3.1. Le complexe *Candida albicans*

III.1.3.1.1. Généralités

C. albicans a pendant longtemps été la seule espèce de *Candida* capable de produire un tube germinatif dans du sérum et cette caractéristique était utilisée pour l'identification de l'espèce. Cependant, Jones et Martins ont identifié des souches atypiques de *C. albicans* qui n'assimilent pas le sucrose et produisent faiblement des chlamydospores. Ces souches ont par la suite été identifiées et nommées *C. stellatoidea*. Grâce à la technique d'électrocaryotypage, **Kwon-Chung et al. (1988)** ont montré que *C. stellatoidea* peut être subdivisée en 2 espèces différentes, *C. stellatoidea* type I considérée comme une espèce isolée, et *C. stellatoidea* type II considérée comme un mutant sucrose négatif de *C. albicans*. Ensuite, **Sullivan et al. (1995)** ont identifié une autre souche atypique de *C. albicans* qui n'assimile pas le α -méthyl-D-glucoside, le lactate et le xylose, bien qu'étant blastèse et chlamydospore positive. Elle a été nommée *C. dubliniensis*. **Tietz et al. (2002)** ont enfin identifié *C. africana* qui donne un test de blastèse positif et est cependant incapable de produire des chlamydospores et n'assimile pas la N-acétylglucosamine et la glucosamine. Ces espèces qui sont capables de produire un tube germinatif dans du sérum sont aujourd'hui regroupées sous le terme d'espèces du complexe *C. albicans* et on y retrouve : *C. albicans*, *C. stellatoidea* type I, *C. dubliniensis* et *C. africana*. Les méthodes phénotypiques et biochimiques conventionnelles ne sont pas capables de les identifier formellement.

Toutefois, l'évolution dans les techniques de biologie moléculaire a permis à **Romeo et Criseo (2008)** de mettre sur pied une technique qui permet de séparer ces 4 espèces sans ambiguïté. L'amplification du gène *Hwp1* commun à ces 4 espèces avec une paire d'amorces spécifiques (CR-f 5'-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3'/CR-r 5' GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3') donne des profils différents pour chacune de ces espèces tel que représenté dans le tableau 3.

Tableau 3: Tailles des fragments amplifiés du gène *Hwp1* pour chaque espèce du complexe *Candida albicans* (Romeo et Criseo, 2009).

Espèce	Taille de la bande obtenue (pb)
<i>C. albicans</i>	941pb
<i>C. dubiniensis</i>	569pb
<i>C. stellatoidea</i> type I	800pb
<i>C. africana</i>	700pb

III.1.3.1.2. *Candida albicans*

Candida albicans, levure opportuniste, est le pathogène fongique le plus commun chez l'homme. Elle est responsable entre autres, de diverses candidoses orales et de vaginites, deux infections très répandues (Segal, 2005).

C. albicans fait partie de la microflore indigène vaginale et oro-gastro-intestinale de l'être humain et de nombreuses espèces animales. Elle est détectée chez au moins 70% de la population humaine saine (Ruhnke & Maschmeyer, 2002). Normalement, un équilibre existe entre l'hôte et la microflore endogène, favorisant l'état commensal de *C. albicans*. Par contre, certains facteurs contribuent à dévoiler son caractère pathogène opportuniste, notamment dans des conditions d'affaiblissement du système immunitaire ou de modification de la flore bactérienne (Perlroth et al., 2007).

C. albicans, levure d'abord considérée asexuée, fut classée dans le phylum des deutéromycètes (*Fungi imperfecti*), ensuite, la découverte du cycle sexué potentiel a permis de la classer dans la division des ascomycètes (Nebavi et al., 2006 ; Hull et al., 2000; Magee and Magee, 2000).

La classification actuelle de *C. albicans* est la suivante :

Empire : Eucaryote (*Eukaryota*)

Rang/Règne : Champignon (*Fungi*)

Embranchement/Division/Phylum : Ascomycètes (*Ascomycota*)

Sous-embranchement/Sous-division/Sous-phylum : Saccharomycotina

Classe : Saccharomycetes

Ordre : Saccharomycetales

Famille : Saccharomycetaceae

Genre : *Candida*

Espèce : *albicans* (Jones *et al.*, 2004)

➤ **Croissance de *C. albicans***

C. albicans croît sur des milieux de culture définis, riches ou pauvres, contenant des sources de sel, de carbone, d'azote et de phosphate, et nécessite la présence de biotine. La levure se développe dans des conditions de pH variant entre 2 et 8 et dans un intervalle de température de 20 à 45°C, sa température optimale de croissance étant de 37°C. Son temps de génération maximal est de 0,3 à 0,4.heures⁻¹, dans un milieu de culture synthétique, elle est anaérobie facultative (Bahn and Muhlschlegel, 2006 ; Dumitru *et al.*, 2004).

➤ **Formes morphologiques de *C. albicans***

Une caractéristique importante de cette levure est sa capacité à croître sous plusieurs formes morphologiques : levure (blastospore), hyphe, pseudohyphe, projection sexuelle (*shmoo*), chlamydospore et bourgeon hyperpolarisé (Whiteway and Bachewich, 2007) (Figure 6). Cette diversité morphologique est considérée comme étant une stratégie de survie, permettant sa croissance et sa dissémination dans l'hôte (Berman and Sudbery, 2002). Les blastospores, les hyphes et les pseudohyphes sont les formes les plus fréquemment rencontrées. Elles coexistent souvent dans les cultures végétatives et dans les sites infectés (Sudbery *et al.*, 2004). Pourtant, des conditions de culture permettant le développement de *C. albicans* majoritairement sous une seule forme morphologique ont été définies en laboratoire. Il est à noter que ce pathogène est capable de passer, et de manière réversible entre la forme blastospore, hyphe et pseudohyphe (Whiteway and Bachewich, 2007).

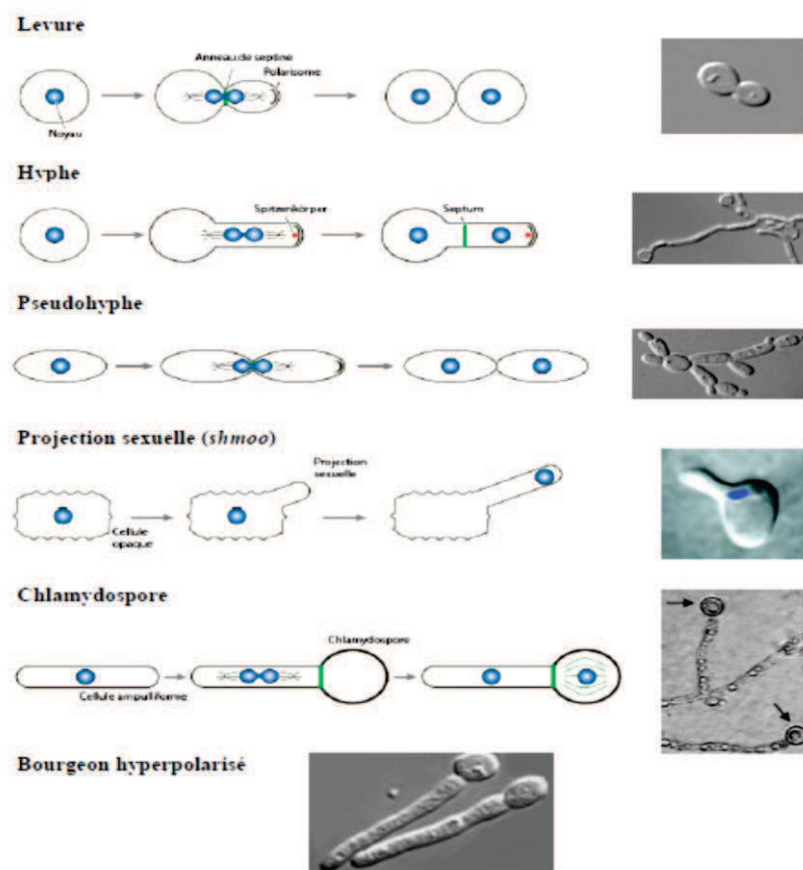


Figure 6 : Différentes présentations morphologiques de *Candida albicans* (Whiteway and Bachewich, 2007).

- **Les blastospores** sont des cellules ovoïdes d'environ 3 à 5µm qui se reproduisent par bourgeonnement asexué multipolaire (asymétrique). La cellule mère produit un bourgeon (blastoconidie), qui va se séparer après formation d'une cloison (anneau de septine) et donner naissance à une cellule fille. Les cellules se séparent après la cytokinèse, lorsque la cellule fille n'a pas encore atteint la taille de la cellule mère. Le noyau se divise dans la jonction formée entre la cellule mère et le bourgeon (Whiteway and Bachewich, 2007 ; Berman, 2006).
- **Les hyphes** sont des tubes microscopiques, longs et minces (environ 2µm de diamètre), qui contiennent plusieurs unités cellulaires, divisées par des septa (Figure 6). Les hyphes possèdent des parois parallèles, sans constriction visible au site de séparation. Elles naissent d'une blastospore ou d'un hyphe déjà existant. Leur formation est initiée par le développement des tubes de germination et des invaginations cylindriques précédant l'apparition du premier septum. Les hyphes contiennent aux moins trois fois plus de chitine que les blastospores (Chaffin et al., 1998). Les hyphes peuvent donner naissance

soit aux blastospores qui vont bourgeonner latéralement, soit aux nouvelles branches hyphales.

- **Les pseudohyphes** étaient vues auparavant comme une forme intermédiaire entre les blastospores et les hyphes, mais certaines études les considèrent comme une forme totalement distincte (**Sudbery et al., 2004**). Les pseudohyphes ressemblent aux blastospores au niveau du cycle cellulaire, les seules différences étant la forme cellulaire plus allongée ($\geq 2,8\mu\text{m}$ de diamètre), le bourgeonnement unipolaire et l'attachement des cellules après la cytokinèse (Figure 6). Ceci conduit à la formation des chaînes embranchées, constituées des bourgeons allongés. Cette structure facilite la recherche de nutriments loin de la cellule parentale (**Whiteway and Bachewich, 2007 ; Berman, 2006**). Les pseudohyphes bourgeonnent à partir d'une blastospore ou d'un hyphe. Les bourgeons peuvent être tellement allongés qu'ils ressemblent morphologiquement aux hyphes, mais ils se distinguent de ceux-ci par la présence des constriction à l'endroit du septum entre les bourgeons. À cause de cette forte ressemblance, les pseudohyphes et les hyphes sont souvent retrouvées sous le nom des formes filamenteuses de *C. albicans* (**Sudbery et al., 2004**).
- **Les projections sexuelles (shmoos)** sont des élongations des cellules en phase opaque, en réponse aux phéromones sexuelles (Figure 6). Les cellules opaques sont des cellules allongées, avec une paroi cellulaire ondulée, qui forment des colonies de phénotype opaque. Les *shmoos* sont des formes caractéristiques des cellules compétentes pour le cycle sexuel (*mating-competent cells*). Ils ont été observés uniquement dans des mélanges cellulaires contenant les deux types sexuels opposés (a/a et α/α) (**Whiteway and Bachewich, 2007**).
- **Les chlamydospores** sont de grosses cellules sphériques de 8 à 12 μm , avec une paroi cellulaire épaisse (Figure 6). Elles apparaissent *in vitro* dans des conditions de culture défavorables, de longue durée, et sont observées très rarement *in vivo* (**Cole et al., 1991 ; Chabasse et al., 1988**). Les chlamydospores se forment par bourgeonnement sur des hyphes ou des pseudohyphes, à l'extrémité des cellules ampulliformes (*suspensor cells*—structures allongées sous forme d'amphore qui sont un embranchement des formes filamenteuses) (**Staib and Morschhauser, 2007; Whiteway and Bachewich, 2007 ; Martin et al., 2005**). Les chlamydospores sont produites uniquement par *C. albicans* et *C. dubliniensis* (**Staib and Morschhauser, 2007**).

- **Les bourgeons hyperpolarisés** sont des structures similaires aux hyphes, les seules différences étant la présence d'une constriction entre la blastospore et le bourgeon allongé et l'absence de la réplication de l'ADN dans le bourgeon germé (Figure 6). De ce fait, les bourgeons hyperpolarisés meurent éventuellement car ils sont incapables de continuer le cycle cellulaire (**Whiteway and Bachewich, 2007**).

- **Morphologie des colonies et commutation phénotypique**

On peut rencontrer en culture, pour *C. albicans* des colonies lisses, chevelues, plissées, étoilées, en anneau, pointillées, crêpelées, en chapeau, etc. Quelques exemples sont montrés dans la Figure 7. Trois cent quatre-vingt-quatre morphologies différentes ont été décrites (**Rustchenko-Bulgac et al., 1990**), et seulement 5 à 8 phénotypes sont le plus souvent rencontrés (**Radford et al., 1994**).

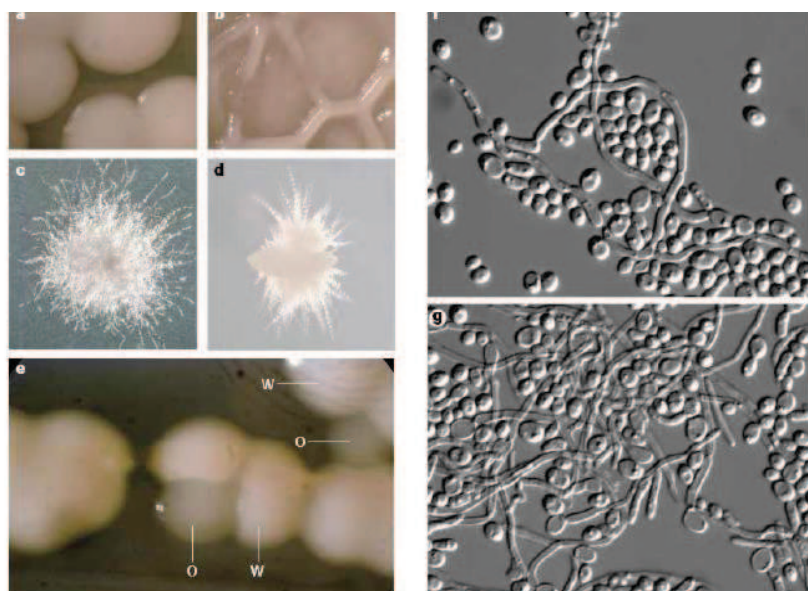


Figure 7 : Exemples de phénotypes de colonies de *C. albicans*.

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

C'est le nombre et la proportion de blastospores, d'hyphes et de pseudohyphes qui déterminent le phénotype d'une colonie (Figure 7f et 7g). Une colonie formée uniquement des blastospores a un aspect lisse, tandis que la présence des formes filamenteuses lui donne une

apparence plus ou moins chevelue (**Vargas et al., 2004 ; Berman and Sudbery, 2002 ; Radford et al., 1994**). La morphologie des colonies semble jouer un rôle important dans l'adaptabilité et la survie de *C. albicans* dans différentes conditions environnementales.

Le fait que *C. albicans* soit capable de réaliser une transition morphologique de la forme levure aux formes filamenteuses conduit à une autre caractéristique importante de ce pathogène : la commutation phénotypique (*phenotypic switching*).

Le système de commutation phénotypique le mieux étudié chez *C. albicans* est le système *white-opaque*. Dans ce système, la levure peut générer deux phénotypes de colonies : le phénotype *white* (colonies standards, blanches et lisses) et le phénotype *opaque* (colonies larges, grises et aplaties) (Figure 7e). Les colonies de phénotype *white* sont formées des levures sous forme blastospore tandis que les cellules en phase opaque ont une forme allongée d'haricot et sont trois fois plus grandes que les cellules en phase blanche (**Slutsky et al., 1987**). La commutation *white-opaque* est intimement liée au cycle sexuel de *C. albicans*. Seules les cellules homozygotes pour le locus des gènes *MTL* (*Mating Type-Like*) du cycle sexuel sont capables de changer de phénotypes (**Miller & Johnson, 2002**). La majorité des cellules de *C. albicans* (97% des souches) est hétérozygote pour ce locus (*MTLa/MTLα*) et ces cellules sont donc incapables de modifier leur phénotype (**Lockhart et al., 2002**).

III.1.3.1.3. *Candida dubliniensis*

➤ Historique

C. dubliniensis est une espèce appartenant au genre *Candida*, identifiée en 1995 par une équipe irlandaise de Dublin (**Sullivan et al., 1995**) d'où son nom. En effet, Sullivan et al. ont remarqué la présence d'isolats de *Candida* atypiques isolés dans la bouche de 60 patients VIH positifs et 3 patients VIH négatifs (deux héroïnomanes et un sujet immunocompétent). Ces isolats avaient un test de filamentation positif et un test de chlamydosporulation positif avec des chlamydospores abondantes arrangées en triplets ou en paires contiguës et avaient un profil atypique d'assimilation des sucres. L'étude génomique par la méthode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et l'analyse caryotypique a montré que ces isolats avaient un génome significativement différent de celui des autres espèces de *Candida* mais proche de celui de *C. albicans*. Ainsi, l'ensemble des caractéristiques génotypiques, phénotypiques et

biologiques a abouti à l'individualisation de cette nouvelle espèce, *Candida dubliniensis* (Sullivan *et al.*, 1995).

➤ Épidémiologie

Les isolats de *C. dubliniensis* sont majoritairement isolés dans la cavité orale des sujets infectés par le VIH, en particulier ceux qui souffrent d'épisodes récurrents de candidose oro-pharyngée. Cette espèce a été isolée au niveau d'autres sites anatomiques tels que le vagin, les urines, les poumons et le sang, non seulement chez des sujets VIH positifs mais aussi chez des sujets VIH négatifs aussi bien immunodéprimés (cancéreux, transplantés...) qu'immunocompétents (Anane et Khalfallah, 2006 ; Fotedar et Al Hedaithy, 2003 ; Sullivan and Coleman, 1998).

Depuis le premier cas découvert à Dublin, *C. dubliniensis* a été isolé et identifié dans de très nombreuses régions du monde : Irlande, Argentine, Australie, Belgique, Canada, France, Finlande, Grèce, États-Unis, Venezuela, Allemagne, Espagne, Kuwait, Arabie Saoudite et Israël (Brito *et al.*, 2006a ; Ellepola *et al.*, 2003 ; Fotedar et Al Hedaithy, 2003 ; Sullivan and Coleman, 1998).

➤ Méthodes d'identification de *Candida dubliniensis*

Cette espèce partage plusieurs caractères phénotypiques avec *C. albicans* incluant la production des colonies blanches crémeuses sur Sabouraud, la capacité de formation des tubes germinatifs sur sérum et la formation des chlamydospores terminales sur des milieux pauvres (riz agar tween, pomme de terre-carotte-bile). Ces similitudes phénotypiques causent des problèmes significatifs pour l'identification de *C. dubliniensis* par les méthodes de routine (Anane *et al.*, 2007 ; Fotedar et Al Hedaithy, 2003 ; Sullivan et Coleman, 1998). Diverses méthodes phénotypiques (tableau 4), immunologiques et moléculaires appropriées à l'identification de *Candida dubliniensis* ont été évaluées.

Sur le milieu CHROMagar les colonies de *C. albicans* apparaissent vertes claires alors que celles de *Candida dubliniensis* sont vertes foncées. Cependant, ce critère n'est pas exhaustif car seulement 56,6 % à 94 % des isolats de *Candida dubliniensis* présentent une couleur verte foncée en primoculture. Ce caractère peut être absent au cours de repiquage ou de conservation (Borst *et al.*, 2003 ; Ellepola *et al.*, 2003 ; Fotedar et Al Hedaithy, 2003).

Tableau 4 : Méthodes phénotypiques de distinction entre *Candida dubliniensis* et *Candida albicans* (Anane et al., 2007).

Caractère phénotypique	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
Couleur des colonies sur CHROMagar	Vert clair	Vert foncé
Couleur des colonies sur Candida ID 2	Bleu cobalt	Bleu turquoise
Croissance à 45 °C	Positive	Négative
Production des chlamydospores sur Casein agar	Absence de chlamydospores	Chlamydospores abondantes
Aspect des colonies et production des chlamydospores sur Staib agar	Colonies lisses, Absence des chlamydospores	Colonies rugueuses, Chlamydospores abondantes
Aspect des colonies et production des chlamydospores sur Sunflower agar	Colonies lisses, Absence des chlamydospores	Colonies rugueuses, Chlamydospores abondantes
Production des chlamydospores sur Tomato Juice agar	Absence des chlamydospores	Chlamydospores abondantes
Croissance sur Sabouraud hypertonique	Positive	Négative
Assimilation de D-xylose	Positive	Négative
Assimilation de α -méthyl-D-glucoside	Positive	Négative

Dans la majorité des tests d'assimilation effectués, *C. dubliniensis* n'assimile pas le D-xylose et le α -méthyl-D-glucoside alors que *C. albicans* les assimile dans la plupart des cas. Les galeries API 20 C Aux et ID 32 C incluent désormais le profil d'assimilation des sucres de *C. dubliniensis* dans leur bases de données (Tintelnot et al., 2000 ; Pincus et al., 1999). L'étude d'Ellepola et al. utilisant la galerie API 20C Aux a montré que l'assimilation de D-xylose et de α -méthyl-D-glucoside est négative pour des isolats de *C. dubliniensis* et positive pour des isolats de *C. albicans* (Ellepola et al., 2003).

Le test d'agglutination au latex de Bichro-Dubli (Fumouze diagnostics) a été développé. Sa capacité à identifier les colonies de *C. dublinensis* développées sur différents milieux (Sabouraud dextrose agar, CHROMagar...) a été évaluée. La sensibilité de ce test varie entre

97,1 % et 100 % et sa spécificité est de 100 % (**Marot-Leblond et al., 2006 ; Sahand et al., 2006**).

Plusieurs méthodes moléculaires sont utilisées pour la distinction entre les deux espèces à savoir l'amplification spécifique et /ou le séquençage de la région ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2); la PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Lors de la réalisation de cette méthode, la région ITS de *C. dubliniensis* est digérée par l'enzyme de restriction B1nI alors que celle de *C. albicans* reste intacte (**Neppelenbroek et al., 2006 ; Al-Sweih et al., 2005 ; Mahnss et al., 2005 ; Mirhendi et al., 2005**).

III.1.3.1.4. *Candida africana*

Candida africana est une espèce récemment identifiée comme responsable des vaginites. Elle possède certaines caractéristiques morphologique et physiologique semblables à *C. albicans*. Les caractéristiques culturelles de *C. africana* sont semblables à celles de *C. albicans*. Cependant, elle donne un test de filamentation positif comme *C. albicans*, mais ne produit pas de chlamydospores (**Nnaemeka et al., 2012**). Les méthodes d'identification conventionnelles ne la distinguent pas véritablement de *C. albicans*, bien que les souches jusqu'ici isolées n'assimilent pas la glucosamine et la N-acetylglucosamine. *C. africana* a été jusqu'ici isolée uniquement des prélèvements vaginaux des femmes non immunodéprimées, et le milieu vaginal semble être la niche écologique principale de cette nouvelle espèce (**Orazio et al., 2008**). Depuis la découverte du gène *Hwp1* comme principal outil d'identification de *C. africana*, la levure a été isolée dans plusieurs pays et semble avoir une distribution mondiale (**Romeo and criseo, 2009**). Cette espèce a déjà été isolée chez les patients au Nigéria (**Nnaemeka et al., 2012**), à Madagascar, en Angola, en Allemagne (**Andeme et al., 2014 ; Tietz et al., 2002**), en Italie (**Andeme et al., 2014 ; Orazio et al., 2008**).

III.1.3.2. *Candida glabrata*

Candida glabrata est une levure haploïde, connue auparavant sous le nom de *Torulopsis glabrata*. Cette espèce ne présente pas de dimorphisme et aucune activité de *mating* n'a été encore observée. *C. glabrata* appartient au règne des champignons, au phylum des ascomycètes, à la classe des hémiascomycètes, à l'ordre des saccharomycétales, à la famille des

Saccharomycetaceae, et au genre *Candida* (Correia *et al.*, 2006 ; Alcoba-Florez *et al.*, 2005; Kurtzman, 2003 ; Mannarelli *et al.*, 1998).

C. glabrata est une petite levure (2-4µm) qui se présente uniquement sous la forme de blastoconidies aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Elle se reproduit par bourgeonnements successifs et, à ce jour aucune reproduction sexuée n'a été mise en évidence pour cette espèce. Elle pousse à 37°C et les colonies sont blanches, crémeuses, plates et brillantes. Les levures sont rondes ou ovalaires de petite taille et ne donnent pas de pseudomycélium. Cette levure ne pousse pas sur milieu à l'actidione, ne fermente et n'assimile que 2 sucres, le glucose et le tréhalose (Correia *et al.*, 2006 ; Alcoba-Florez *et al.*, 2005).

Peu d'études référencées ont rapporté la présence de *C. glabrata* dans l'environnement ou chez les animaux. Sa présence dans des zones proches de l'habitat humain peut être interprétée comme une « contamination » de l'environnement par l'Homme (Ferreira *et al.*, 2010 ; Brinkman *et al.*, 2003).

C. glabrata est un pathogène opportuniste du tractus urogénital et peut causer une candidémie (Bolotin-Fukuhara and Fairhead, 2014 ; Mannarelli *et al.*, 1998). Elle est isolée lors de candidoses vaginales et digestives (Brockert *et al.*, 2003 ; Jacobson, 2000). La prévalence de l'isolement de *C. glabrata* au niveau du tube digestif est très variable allant de 0% à 51% (Hedderwick *et al.*, 2000 ; Vazquez *et al.*, 1998). L'isolement de *C. glabrata* au niveau vulvo-vaginal est rapporté depuis les années 1970 avec une prévalence variant de 0,8% à 8% selon le pays et la population étudiée (Gross *et al.*, 2007 ; Dan *et al.*, 2006 ; Pirodda *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2001 ; Lachke *et al.*, 2000). Pour ce qui est de la pathogénicité, *C. glabrata* possède des gènes codant pour des phospholipases (Butler *et al.*, 2009 ; Kantarcioglu *et al.*, 2002 ; Lachke *et al.*, 2002).

III.1.3.3. *Candida krusei*

C. krusei est un Hémiascomycète de l'ordre des Endomycétales, famille des Saccharomycetaceae. La forme parfaite est *Issatchenkia orientalis*. Son implication en pathologie humaine a été découverte par Castellani (Samaranayake and Samaranayake, 1994). Ce microorganisme est reconnu comme commensal des muqueuses avec une faible pathogénicité. Cependant, l'isolement et l'implication de *C. krusei* en pathologie humaine ces

dernières années, associé à la résistance de cette levure aux azolés a imposé un regain d'intérêt dans l'étude et la compréhension de cette levure (**Patted et al., 2009**).

C. krusei est une levure de forme variable, allongée, ovale à cylindrique, de 5 à 10µm de long sur 3 à 6µm de large, qui se reproduit par bourgeonnement multipolaire. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. L'on note parfois une présence de vrai mycélium. Les levures sont non pigmentées. *C. krusei* croît sur milieu Sabouraud en donnant des colonies étendues, plates et mates, avec une température optimale de croissance de 43-45°C. Elle ne nécessite pas la présence de vitamines pour sa croissance. La fermentation des sucres est plus ou moins présente, seul le glucose est assimilé ou fermenté ; la levure ne sécrète pas d'uréase et n'assimile pas l'inositol (**Samaranayake and Samaranayake, 1994**).

C. krusei n'est pas retrouvé dans l'environnement. Cette levure a été isolée de divers aliments (produits laitiers, bière). On le retrouve chez les mammifères, les oiseaux et chez l'homme (sur la peau et dans le tube digestif). Le mode de contamination est une auto-contamination à partir des levures du tube digestif ou de la peau (**Patted et al., 2009 ; Samaranayake and Samaranayake, 1994**). Une contamination est aussi possible par des aliments où la levure est présente. La levure est impliquée en pathologie dans des diarrhées, des infections cutanéomuqueuses et unguéales et des septicémies chez l'immunodéprimé. Elle est également responsable des candidoses cardiaques (**Patted et al., 2009**). Cette levure n'est pas sensible au fluconazole, ce qui explique son émergence lors des traitements ou de la prophylaxie des candidoses chez le patient VIH positif (**Pfaller et al., 2008**).

III.1.3.4. *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis est un blastomycète de l'ordre des Cryptococcales, de la famille des Cryptococcaceae. La forme parfaite n'est pas connue. Elle a été isolée pour la première fois par Langeron et Talice en 1932. Les levures sont de forme variable rondes à allongées. La reproduction se fait par bourgeonnement multipolaire. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. Parfois, il y a présence de vrai mycélium. Les levures sont non pigmentées, font une fermentation approximative et n'assimilent pas l'inositol, la créatinine et ne produisent pas d'uréase. Par contre, elles fermentent le glucose et assimilent de nombreux sucres (glucose, galactose, saccharose, maltose, tréhalose) mais pas le cellobiose et le mélézitose. Les colonies poussent rapidement, elles sont blanches, crémeuses, lisses, ou

finement plissées. Elles poussent à 37°C. Il y a absence de pousse sur milieu de Sabouraud-actidione. Les levures sont polymorphes : rondes et ovales parfois cylindriques, mesurant 4 à 8µm sur 3 à 4µm. Il y a une association fréquente de pseudomycélium abondant et ramifié mais court. Le pseudomycélium sur RAT ou PCB apparaît rapidement, est abondant, court, très ramifié, avec peu de blastospores (**Brito et al., 2006b**).

La levure est fréquente chez l'homme : c'est un saprophyte de la peau qui peut provoquer des infections cutanées et unguéales. Elle provoque chez l'immunodéprimé des septicémies et des infections viscérales et génitales. La contamination se fait par la peau (pose de cathéter, injections intraveineuses, chirurgie) (**Almirante et al., 2006 ; Barchiesi et al., 2006; Almirante et al., 2005**).

III.1.3.5. *Candida lusitaniae*

C. lusitaniae est un Hémiascomycète, de l'ordre des Endomycétales, de la famille des Dipodascaceae. Sa forme parfaite est *Clavispora lusitaniae*. C'est une espèce isolée pour la première fois par Van Uden et Do Carmo-Sousa en 1959 (**Smith et al., 2005**). Les levures sont de forme variable, rondes à allongées. La reproduction se fait par bourgeonnement multipolaire. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. Parfois, il y a présence de vrai mycélium. Les levures sont non pigmentées, avec une fermentation des sucres plus ou moins présente. *C. lusitaniae* n'assimile pas la créatinine et l'inositol. La levure pousse rapidement sur milieu Sabouraud et donne des colonies blanches, crémeuses, lisses, d'aspect brillant. Elle est sensible à l'actidione. Les levures sont ovoïdes de 4 à 10µm sur 3 à 6µm, parfois associées à un fin pseudomycélium. Sur RAT ou PCB, il y a apparition rapide d'un pseudomycélium fin, peu ramifié qui part de l'intérieur de la colonie de levures. Elle assimile de nombreux sucres (L-rabose, L-rhamnose, 2-Kéto D Gluconate, nitrate, saccharose, maltose, cellobiose, tréhalose) (**Smith et al., 2005 ; Ellis et al., 2002 ; Viudes et al., 2002**).

C. lusitaniae est un saprophyte du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (mammifères, oiseaux). Les infections chez l'homme résultent le plus souvent d'une auto-contamination par le foyer digestif. De plus en plus fréquemment impliquée en pathologie humaine chez l'immunodéprimé et en néonatalogie, elle est à l'origine de septicémies, d'infections viscérales profondes mais également de lésions des muqueuses digestives et pulmonaires (**Smith et al., 2005 ; Ellis et al., 2002**).

III.1.3.6. *Candida tropicalis*

C. tropicalis est un Blastomycète de l'ordre des Cryptococcales, de la famille des Cryptococcaceae, la forme parfaite n'est pas connue et elle a été isolée pour la première fois par Berkhout en 1923. Les levures sont de forme variable, rondes à allongées. La reproduction se fait par bourgeonnement multipolaire. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. Il y a parfois présence de vrai mycélium. *C. tropicalis* n'assimile pas la créatinine et l'inositol. Les colonies sont de pousse rapide, crémeuse, blanche, lisse ou légèrement plissée. Ce sont de grosses levures rondes mais surtout ovalaires, de 6 à 11µm de long sur 5 à 7µm de large, souvent associées à du pseudomycélium. Le pseudomycélium sur PCB ou RAT se forme rapidement. Il est épais, peu ramifié avec de rares blastospores. *C. tropicalis* réduit de façon intense les sels de tétrazolium et donne ainsi une coloration violette sur milieu tétrazolium. Sur milieu Chromagar, il donne une coloration bleu vif. Il assimile et fermente les sucres (glucose, galactose, saccharose, maltose) (**Moran et al., 2002 ; Maenza and Merz, 1998**).

La levure est fréquemment isolée dans la nature, le sol, les végétaux, l'eau. Elle provoque chez l'homme des infections superficielles cutanéomuqueuses, des onyxis ainsi que des infections profondes : pulmonaires, urinaires et septicémiques (**Moran et al., 2002 ; Maenza and Merz, 1998**).

III.2. Aspects cliniques des candidoses muqueuses

III.2.1. Généralités

L'émergence des pathologies opportunistes a été largement favorisée par les modifications éco-éthologiques des populations, l'évolution rapide des techniques médico-chirurgicales, et l'immunodépression consécutive à l'infection par le VIH. En effet, ces facteurs facilitent le développement et l'expression du pouvoir pathogène d'organismes saprophytes. Les candidoses sont les infections opportunistes les plus fréquentes, et leur fréquence a doublé entre les années 1980 et 1990. Elles représentent désormais plus de 80% des infections à levures (**Owotade and Patel, 2014 ; Bodey et al., 2002 ; Hage et al., 2002 ; Martino et al., 2002**). Au niveau clinique, les candidoses peuvent être classées en deux groupes : les candidoses superficielles ou cutanéomuqueuses et les candidoses profondes (figure 8) (**Bodey et al., 2002**). Toutefois, nous ne traiterons ici que des candidoses muqueuses.

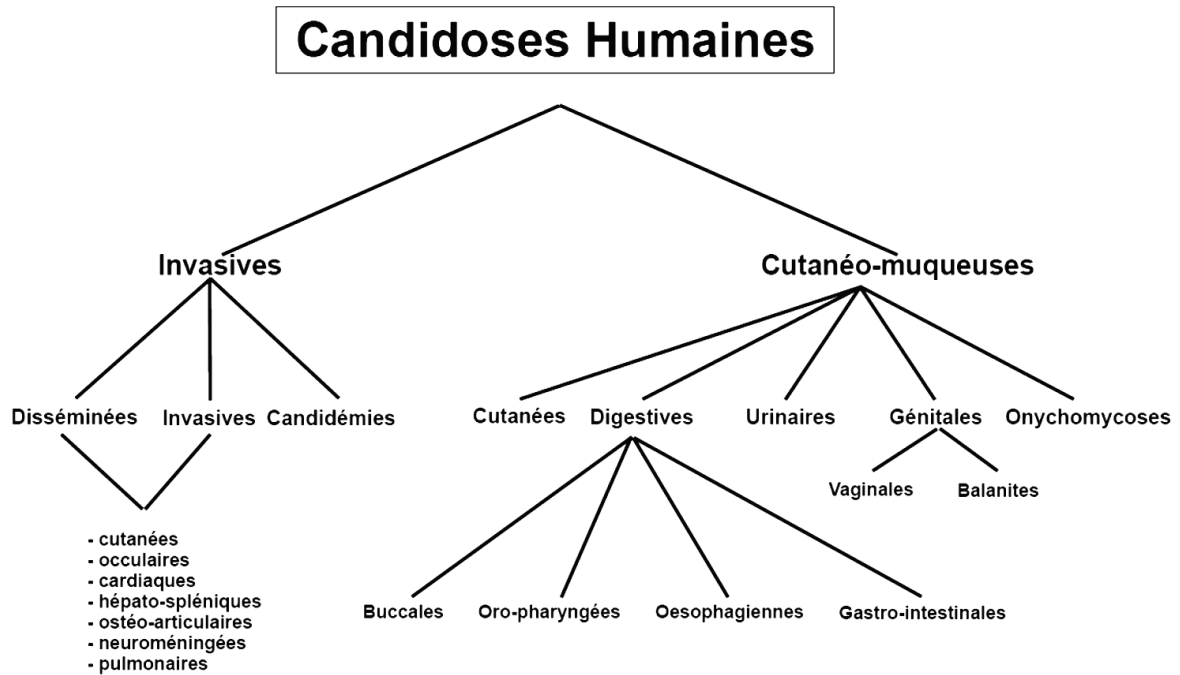


Figure 8 : Classification des candidoses chez l'homme (Bodey *et al.*, 2002)

III.2.2. Les candidoses muqueuses

Les candidoses muqueuses sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Elles peuvent atteindre les muqueuses telles que la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, les intestins, le système urinaire, et la muqueuse vaginale.

III.2.2.1. Les candidoses digestives

Ce sont les affections les plus représentées. C'est au niveau de l'intestin et de l'estomac, les plus importants réservoirs de *Candida*, que se multiplient les levures. Parmi les candidoses digestives, on distingue :

➤ La candidose oro-pharyngée

Manifestation la plus fréquente des candidoses, elle concerne surtout les sujets immunodéprimés, avec un caractère de gravité systématique chez ceux-ci. L'intérêt porté à cette infection s'est accru ces dernières années, car elle constitue l'une des manifestations orales de l'infection par le VIH, mais elle peut aussi survenir chez des patients leucémiques ou cancéreux. Globalement, il existe trois formes cliniques principales de la maladie qui peuvent être présentes simultanément chez un même patient: érythémateuse, pseudomembraneuse et

chéilite (**Owotade and Patel, 2014 ; Patton, 2008 ; Epstein et al., 2003 ; Narani et Epstein, 2001 ; Ellepola et al., 2000 ; Murray et al., 1997**). La fréquence de ces différentes formes varie en fonction de la population touchée.

La candidose au niveau de la muqueuse œsophagienne se traduit cliniquement par une dysphagie douloureuse, un pyrosis et une sensation de brûlure au passage des aliments. L'examen endoscopique révèle des membranes blanchâtres reposant sur une muqueuse très inflammatoire (**Patton, 2008 ; Epstein et al., 2003**).

➤ **La candidose de la muqueuse gastro-intestinale**

Elle intéresse tout l'intestin, de l'estomac au colon. Les lésions se présentent comme un muguet intestinal avec des ulcérations. Elle se manifeste par des douleurs abdominales atypiques, des nausées et des vomissements. Des colites intestinales avec gaz, ballonnements, démangeaisons anales, diarrhée, constipation associés à une fatigue progressive et inexpliquée sont souvent remarqués (**Patton, 2008**).

III.2.2.2. Les candidoses urogénitales

➤ **La vulvo-vaginite candidosique**

La vulvo-vaginite est une affection extrêmement fréquente chez la femme. En effet, on estime qu'environ 75% des femmes en activité sexuelle feront un épisode de candidose vulvo-vaginale. Les symptômes les plus évocateurs sont l'existence de leucorrhées abondantes blanchâtres, d'aspect granuleux, et d'un prurit vulvaire souvent intense. Le point de départ d'une telle infection reposerait sur un dysfonctionnement hormonal ou immunitaire local. La récurrence de la candidose vulvo-vaginale est un phénomène assez fréquent. Le caractère récidivant des infections candidosiques chez la femme est susceptible d'induire, lors de traitements répétés, des phénomènes de résistance passant par l'émergence de souches moins sensibles (**Sobel, 2007**).

➤ **La balanoposthite ou balanite**

Chez l'homme, l'atteinte génitale par *Candida* est plus rare et correspond à une balanite mycosique ou balanoposthite, qui débute au niveau du sillon balano-prépuce, puis s'étend au gland et au prépuce. L'homme n'est pas porteur sain de la levure au niveau génital. Le

développement de ces symptômes cliniques est plutôt secondaire à un rapport sexuel (**Johnson and Lewis, 2008**).

➤ La candidose urinaire

Une cystite candidosique peut s'observer essentiellement chez le patient diabétique ainsi que sur des malades porteurs d'une sonde vésicale à demeure. La lésion est localisée au niveau du bassinnet avec la formation d'une boule fongique. Elle s'accompagne d'une inflammation du méat urinaire et d'une urétrite (**Johnson and Lewis, 2008**).

III.3. Epidémiologie des candidoses muqueuses au cours de l'infection à VIH

Les candidoses sont ubiquitaires (**Sylvie, 2003 ; Sanglard et Odds, 2002**). Soixante à 80% de malades VIH positifs développent une candidose avec un taux de mortalité de 10 à 20% (**David, 2007**). Une étude menée par **Nelesh (2007)**, en Afrique du sud montre que 3,8 à 43,8% de PVVIH développent une candidose orale. En 2005, **Lohoué et al.** identifient à Yaoundé une candidurie chez 36,2% de personnes infectées par le VIH. **Mbu et al. (2007)** sur une étude de cohorte chez les femmes enceintes à Yaoundé ont montré une prévalence de 48,98% et 35,35% de candidoses génitales respectivement chez les séropositives et séronégatives au VIH. Le tractus digestif de l'Homme est le principal réservoir de *Candida*. La proportion de *Candida* est croissante au fur et à mesure que l'on avance dans le tractus (**Kuriyama et al., 2005**). Les candidoses bucco-pharyngées touchent environ 70% des patients atteints du SIDA dans le monde (**Baradkar and Kumar, 2009 ; Nadagir et al., 2008**). Au Brésil, 50,7% des PVVIH souffrent de candidose bucco-pharyngée de nature variée telles que le muguet, la candidose érythémateuse et la chéilite angulaire (**Gabler et al., 2008**). Dans la zone d'Afrique tropicale, la candidose œsophagienne représente l'une des infections opportunistes les plus rencontrées avec une fréquence variant entre 33 et 47% (**Baradkar and Kumar, 2009 ; Nadagir et al., 2008**). Au Nigeria, **Esebelahie et al. (2013)** trouvent une colonisation par *Candida* chez 52,5% de patients VIH positifs. Une étude menée au Cameroun chez les PVVIH a montré que 79,6% des prélèvements oraux présentent des levures dont l'espèce dominante est *C. albicans*. (**Yongabi et al., 2009**).

Du fait de la baisse des défenses de l'organisme dû à l'infection au VIH, La candidose vulvo-vaginale survient avec une plus grande incidence, persiste plus longtemps, mais n'est pas plus

sévère chez les femmes VIH+ (**Duerr, 2003**). Plusieurs études ont montré une augmentation de la fréquence de la candidose vulvo-vaginale avec un risque multiplié par 2 à 3 chez les femmes atteintes de VIH (**Helgott, 2000**). Une étude menée en 2001 au Nigeria sur les femmes infectées par le VIH, a répertorié la candidose vulvo-vaginale dans 34,8% des infections gynécologiques les affectant (**Nwosu et al., 2001**). Une étude menée en 2008 en Afrique du Sud par Johnson et Lewis sur 90 femmes infectées par le VIH-1 montre que la candidose vaginale augmente la concentration du VIH-1 dans les sécrétions vaginales de 1,3 à 2,4% (**Johnson and Lewis, 2008**). Dans une étude menée en 2011 au Brésil, sur 64 femmes infectées et 76 femmes non infectées par le VIH, il ressort que la fréquence de la candidose vaginale est respectivement de 29,7% et de 14,5%. Les espèces de *Candida* fréquemment isolées chez les femmes VIH+ sont *C. albicans*, *C. parasilopsis*, *C. glabrata*. Des co-infections entre *C. albicans* et *C. glabrata* ont également été identifiées (**Oliveira et al., 2011**). Chez les femmes infectées par le VIH, les candidoses vulvovaginales récidivantes seraient de plus en plus fréquemment dues aux *Candida* non *albicans*. En effet, 20% des femmes qui souffrent de candidoses vulvo-vaginales récurrentes sont infectées par *C. glabrata*. La raison pourrait provenir d'une sensibilité réduite de cette espèce aux imidazolés et aux triazolés (**Sobel, 2007**). Plus de 50% d'espèces de *Candida* isolées des candidoses urinaires sont des espèces autres que *C. albicans* (**Sobel et al., 2011**).

III.4. Facteurs de virulence de *Candida* et immunité anti-*Candida*

III.4.1. Facteurs de virulence

Bien que les facteurs de virulence soient semblables chez toutes les espèces de *Candida*, c'est surtout chez *C. albicans* que ceux-ci ont été bien étudiés. De nombreux facteurs de virulence sont associés à la pathogénèse de *C. albicans* dont les principaux sont les adhésines, les protéases aspartiques et les phospholipases (**Calderone et Fonzi, 2001**). De plus, la transition morphologique et la commutation phénotypique jouent aussi un rôle important dans la virulence de ce pathogène (**Karkowska-Kuleta et al., 2009**).

➤ L'adhérence aux surfaces

Elle peut se faire au niveau des muqueuses, mettant en jeu des interactions spécifiques de type ligand/récepteur avec les mannoprotéines de la paroi de la levure (**Hoyer et al., 2003**). L'adhérence peut se faire aussi à partir de la formation de biofilms à l'occasion d'un traumatisme de façon iatrogène ou chirurgicale (**Douglas, 2003**).

➤ **La transition morphologique**

Le polymorphisme de *C. albicans* joue un rôle important dans l'invasion et l'évasion des cellules de l'hôte. Les blastospores semblent initier l'infection, tandis que les hyphes sont impliqués dans sa propagation. Les hyphes sont phagocytés plus difficilement (dû à leur morphologie et leur grande taille) et peuvent provoquer éventuellement la mort des macrophages. Ils sont aussi capables de pénétrer facilement les couches épithéliales et endothéliales (**Karkowska-Kuleta et al., 2009 ; Roman et al., 2007; Leberer et al., 1997**). Les analyses moléculaires génétiques confirment l'implication de la transition morphologique dans la virulence de *C. albicans* en démontrant que les gènes gouvernant la morphologie cellulaire sont co-régulés avec les gènes codant pour les facteurs de virulence conventionnels, comme les protéases et les adhésines (**Kumamoto et Vines, 2005**).

➤ **L'interférence avec la phagocytose**

C. albicans est capable de produire des peptides acides pouvant inhiber la liaison aux phagocytes et le métabolisme oxydatif. De plus, la levure peut induire l'apoptose des macrophages et des neutrophiles, échappant ainsi aux cellules du système immunitaire (**Ibata-Ombetta et al., 2003 ; Rotstein et al., 2000**).

➤ **La sécrétion d'enzymes**

La sécrétion d'enzymes hydrolytiques au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires. Ces enzymes sont des aspartyl protéinases (Saps), des phospholipases et des lipases (**Schaller et al., 2005 ; Monod et Borg-Von Zepelin, 2002 ; Ghannoum, 2000 ; Fu et al., 1997**).

III.4.2. Immunité contre *Candida*

La première ligne de défense de l'hôte contre les agressions pathogènes est la barrière cutanéomuqueuse. La rupture physique de ce revêtement est la porte d'entrée à une colonisation fongique à partir de *Candida* saprophyte de la peau ou des muqueuses. Une fois le pathogène entré, les mécanismes de défense de l'hôte reposent sur une coopération étroite entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, dont la contribution relative varie en fonction du site d'infection (**Hoffmann et al., 1999**).

➤ **La résistance immunologique innée**

Il est prouvé que des anomalies de la résistance immunitaire innée prédisposent au développement de pathologies opportunistes. Le rôle de l'immunité innée est de limiter rapidement l'infection, grâce à des mécanismes effecteurs tels que la phagocytose des agents pathogènes, médiée par les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles (**Molero et al., 2005**). L'immunité innée joue un rôle primordial dans la résolution d'infections touchant en particulier les muqueuses. A ce titre, d'autres types cellulaires contribuent à la défense de l'hôte, tels que les neutrophiles, les cellules NK (Natural Killer), les cellules dendritiques, les lymphocytes $T\gamma\delta$, et certaines cellules non hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales des muqueuses (**Molero et al., 2005 ; Hoffmann et al., 1999**).

➤ **La résistance immunologique acquise**

Les anticorps anti-*Candida* sont en grande majorité des IgG, mais on peut parfois trouver des IgA, notamment au niveau des muqueuses (**Johansen and Brandtzaeg, 2004**). Les mécanismes exacts par lesquels ces anticorps protègent l'hôte de l'infection par *Candida* sont encore mal connus, mais il semblerait que ces anticorps permettraient l'inhibition de l'adhésion des blastospores, l'inhibition de la formation du tube germinatif, l'opsonisation des pathogènes, ainsi que la neutralisation des facteurs de virulence sécrétés par la levure telles que des enzymes (**Bernardis et al., 2010**). Il est clairement démontré que la résistance contre *C. albicans* est basée essentiellement sur une immunité à médiation cellulaire, où les macrophages et les cellules T jouent un rôle primordial, dans des proportions qui dépendent du site d'infection considéré (**Dongari-Bagtzoglou and Fidel, 2005**).

III.5. Diagnostic biologique des candidoses muqueuses

Le diagnostic mycologique consiste à prélever le produit biologique, à réaliser un examen direct, à mettre le prélèvement en culture sur milieu spécifique et enfin identifier l'agent fongique en cause (**Rispail, 2008**). La distinction entre colonisation et infection est difficile sur le plan purement biologique. Le caractère commensal de ces levures rend la confrontation aux symptômes cliniques nécessaires (**Fournier, 2011**).

➤ **Prélèvement et transport**

Le prélèvement doit être effectué avant tout traitement antifongique, le matériel utilisé obligatoirement stérile (**Fathallah et al., 2008**).

Dans le cadre des candidoses bucco-pharyngées, les prélèvements sont effectués soit par écouvillonnage, soit par gargarisme à l'aide d'eau physiologique (**Gabler et al., 2008 ; Coignard-Chatain et al., 1998**). Les leucorrhées vaginales sont prélevées par écouvillonnage du cul de sac vaginal après pose d'un spéculum stérile et non humidifié. Les urines sont prélevées dans un pot stérile après aseptie de l'orifice urinaire. Les selles sont prélevées dans un pot stérile en prenant soin de privilégier les sites glaireux ou sanguinolents (**Rispail, 2008**).

➤ **Examen direct**

L'examen direct est le test de première ligne. Il permet une orientation diagnostic rapide du genre. Il est peu coûteux, spécifique mais reste peu sensible.

L'examen direct à l'état frais consiste à observer au microscope entre lame et lamelle une émulsion du prélèvement sur une goutte d'eau physiologique additionnée de bleu de méthyle. Les levures apparaissent sous forme d'éléments ovalaires, ovoïdes ou allongés à paroi mince de 6 à 8µm, éventuellement bourgeonnantes de 3 à 5µm de diamètre aux extrémités arrondies et quelquefois les pseudofilaments (**Fournier, 2011**).

En pratique, différentes techniques et colorations spécifiques peuvent être mises en œuvre, rendant alors l'observation plus aisée. Les colorations sont les suivantes :

- Le noir chlorazol qui colore la paroi des éléments mycéliens en vert ;
- Le bleu de méthyle : colorant les éléments mycéliens en bleu ;
- La coloration de Gram : coloration utilisée en bactériologie, elle colore les éléments fongiques donnant ainsi une coloration bleu foncé ;
- Le May-Grunwald-Giemsa (MGG)
- L'usage des composés fluorescents (**Fournier, 2011**).
- La coloration de Musto (coloration de Gomori-Grocott modifié) est une coloration spécifique, elle permet l'imprégnation argentique de la chitine (**Fournier, 2011**).

➤ **Culture**

Le milieu d'isolement de référence utilisé est la gélose de Sabouraud additionnée d'antibiotiques. Il contient les éléments nécessaires à la croissance de la majorité des champignons : matières azotées (peptone à 10%), un sucre (glucose à 2%), des traces de vitamines (vitamines du groupe B). Les antibiotiques antibactériens utilisés peuvent être soit de la pénicilline G à 5000U/ml et de la Streptomycine à 0,5mg/ml, soit du Chloramphénicol à 0,5 mg/ml et/ou de la gentamycine 0,5 mg/ml (**Symms, 2007**).



Figure 9: Colonie du genre *Candida* sur gélose Sabouraud (**Symms, 2007**)

L'ensemencement débute par un dépôt du produit biologique à la surface du milieu de culture. Les milieux ensemencés sont incubés à 37°C à l'étuve pendant 24 à 48 heures. Pour les levures du genre *Candida*, l'on observe des colonies blanches, crémeuses (**Rispail, 2008**).

Les résultats prennent en compte l'examen direct et de la culture :

- Pour l'examen direct : présence de levures et/ou de pseudomycélium ;
- Pour la culture, il faut quantifier les champignons présents dans le milieu de culture en tenant compte de la notion de seuil (différent selon l'origine du prélèvement).

Les renseignements cliniques du patient ainsi que les facteurs de risques sont nécessaires à l'interprétation des examens biologiques comme par exemple l'âge (nouveau-né, nourrisson, vieillards) ; les pathologies sous-jacentes (diabète, immunodépression, SIDA), les antécédents médicaux (explorations fonctionnelles, cathéters, maladies nosocomiales) ou encore les antécédents thérapeutiques (antibiothérapie, corticothérapie).

➤ Identification

L'identification se fait sur la base des caractères morphologiques (macroscopique et microscopique), des tests biochimiques, immuno-sérologiques et plus récemment par les techniques de biologie moléculaire et la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Elle doit

désormais tenir compte de l'éventualité de l'association de deux, trois, voire quatre espèces de levure ou plus dans un même échantillon biologique (**Rispail, 2008**).

Les milieux chromogènes permettent simultanément la détection des associations d'espèces différentes dans un même échantillon biologique et une identification présomptive de certaines levures du genre *Candida* (**Rispail, 2008**).

- **Identification phénotypique**

L'utilisation des caractères phénotypiques en milieux spécifiques permet une identification présomptive. On peut ainsi citer le test de filamentation en sérum, la recherche des chlamydospores sur milieux pauvres en sucres et contenant un tensioactif (**Anane et Khalfallah, 2006 ; Fotedar et Al Hedaithy, 2003**).

L'étude de la croissance à 42-45°C après 24 à 48 heures d'incubation sur certains milieux (Sabouraud dextrose agar, Yeast peptone dextrose, Emmon's modified Sabouraud glucose agar) permet de distinguer les isolats de *C. dubliniensis* et *C. africana* qui ne poussent pas de ceux de *C. albicans* qui poussent (**Romeo and Criseo, 2009**).

- **Identification biochimique**

Les tests biochimiques permettent de mettre en évidence la capacité que possède une levure placée en aérobose d'assimiler (auxanogramme) ou de fermenter en anaérobiose (zymogramme) les sucres. D'autres caractères peuvent également être recherchés tels que l'activité enzymatique, le test de sensibilité à l'actidione, le test à l'esculine et la recherche de l'uréase (**Fathallah et al., 2008**). Ces tests sont explorés de nos jours grâce à des minigalleries permettant une approche beaucoup plus précise et simple. Les galleries de références sont : la galerie ID 32C BioMérieux et la galerie API 20C AUX BioMérieux. Il existe d'autres galleries commercialisées telles que : Auxacolor 2 (Bio-RaD), Fungichrom, Fungifast, API *Candida* (**Fathallah et al., 2008**). Les levures d'intérêt médical possèdent des caractères biochimiques connus (tableau 5).

Tableau 5 : Caractères morphologiques et physiologiques des principales levures d'intérêt médical (**Hakim et al., 2013**).

Espèces de levures	Morphologie			Auxanogramme										Zymogramme					Autres caractères				
	Pseudo ou vrai mycelium	chlamydosporos	Filamentation dans serum à 37°C	Glucose	Maltose	Saccharose	Galactose	Lactose	Raffinose	Inositol	Cellobiose	Xylose	Trehalose	Glucose	Maltose	Saccharose	Galactose	Lactose	Raffinose	KNO3	Urée	Réduction tetrazolium	Résistance
Candida albicans	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.stellatoidea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.tropicalis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.parapsilosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.krusei	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.pseudotropicalis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.guilliermondii	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.zeylanoides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- **Identification sérologique, moléculaire et protéomique**

Les tests immuno-sérologiques utilisés en mycologie sont des tests complémentaires pour le diagnostic. La détection d'antigènes repose sur des tests d'identification simples et rapides (5 à 20 minutes) basés sur les techniques d'agglutination de particules de latex utilisant les anticorps monoclonaux spécifiques de l'espèce (**Rispail, 2008**). On peut citer:

- Bichro-latex albicans Fumouze pour *C. albicans*;
- Bichro-Dubli Fumouze pour *C. dubliniensis* ;
- Krusei-color Fumouze pour *C. krusei*.

D'autres techniques le plus souvent utilisées pour la recherche d'anticorps spécifiques sont : les réactions d'hémagglutination, d'immunofluorescence indirecte, les réactions immuno-enzymatique de type ELISA et de précipitation telle que l'immunoélectrophorèse (**Rispail, 2008**).

Les méthodes de biologie moléculaire ont une spécificité parfaite et assurent une identification formelle (**Ellepola et al., 2003**). L'identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF qui identifie les espèces sur la base des spectres atomiques des protéines est de plus en plus utilisée de nos jours car donne des résultats rapides avec une très grande spécificité (**Bizzini et al., 2010**).

IV. Épidémiologie moléculaire de *Cryptococcus neoformans* et de *Candida albicans*

IV.1. Principales méthodes de typage moléculaire de *Cryptococcus neoformans* et de *Candida albicans*

L'épidémiologie moléculaire utilise la matière génomique comme support pour confronter les caractéristiques variables au sein d'une espèce, afin de préciser l'identité des souches et de retracer leur circulation dans un contexte documenté. L'efficacité de la méthode dépendra de sa capacité à confronter les régions les plus polymorphes. Cette efficacité est définie par le pouvoir discriminant de la méthode, qui caractérise son aptitude à distinguer deux souches n'ayant aucune relation entre elles. Suivant la méthode ou le marqueur utilisé, la confrontation des caractéristiques variables peut s'opérer sur un support qui représente soit la totalité du génome soit de simples fragments. Cet élément essentiel rend compte du fait que les différentes méthodes utilisées sont des modes d'approches différentes.

En mycologie médicale, le typage moléculaire est devenu un outil d'enquête épidémiologique incontournable. Il permet le « traçage » de souches et/ou d'isolats, nécessaire pour comprendre et/ou prouver le mode de transmission des souches notamment lors d'infections nosocomiales. Il permet de différencier rechute de réinfection lors d'un échec thérapeutique supposé ou sélection et acquisition d'une souche lors d'une résistance aux antifongiques apparue en cours de traitement (**Chapeland-Leclerc *et al.*, 2010 ; Albano *et al.*, 2009; Kidd *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2009**). Sur le plan fondamental, cet outil a permis l'analyse en génétique des populations de pathogènes fongiques comme *C. albicans* ou *C. neoformans* et aidé à préciser le mode de reproduction sexuée et/ou clonale (**Diogo *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; van Asbeck *et al.*, 2009 ; Nebavi *et al.*, 2006**) ainsi qu'à mettre en évidence des génotypes représentatifs des espèces étudiées (**Odds *et al.*, 2007**) qui devraient être utilisées lors d'études sur la pathogénie. Pour être fiables, les méthodes de typage moléculaire doivent répondre à des critères de qualité précis dont : la stabilité du profil des marqueurs étudiés chez une même souche, la typabilité ou capacité d'assigner un profil au plus grand nombre de souches, la spécificité pour l'espèce considérée, la reproductibilité et le pouvoir discriminant ou la capacité d'assigner des profils différents à deux souches non liées, sélectionnées au hasard dans la population d'une espèce donnée. Celui-ci est habituellement calculé en utilisant l'index de diversité de Simpson.

$$D = 1 - 1/N(N - 1) \sum_{i=1}^S n_j (n_j - 1)$$

où N est le nombre de souches testées, S est le nombre de profils différents et n_j est le nombre de souches ayant le profil j (**van Belkum et al., 2007**). Sa valeur est comprise entre 0 et 1 et tend vers 1 lorsque le pouvoir discriminant croît. Les groupes de European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) et du European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) ont émis des recommandations et considérés qu'une méthode de typage devait présenter un pouvoir discriminant $\geq 0,95$ (**van Belkum et al., 2007**).

Depuis une vingtaine d'années, des méthodes de typage moléculaire de *C. albicans* et *C. neoformans* ont été mises en œuvre pour l'étude de ces pathogènes en génétique des populations ou pour le traçage des souches dans un contexte pathologique. Elles comprennent des techniques basées sur l'étude en électrophorèse de l'ADN non amplifié avec (RFLP pour Restriction Fragment Length Polymorphism) ou sans (caryotypage en champ pulsé) restriction enzymatique préalable ; des techniques basées sur la PCR aléatoire (RAPD pour Random Amplified Polymorphic DNA, AP-PCR pour Arbitrarily Primed PCR, rep-PCR pour repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR ou inter-repeat PCR), ou ciblée (REA pour Restriction Enzyme Analysis). La technique MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) a également été appliquée à l'étude de ces pathogènes. Plus récemment, des méthodes utilisant le séquençage pour la recherche de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) sur plusieurs fragments de gènes (MLST pour Multilocus Sequence Typing) et des techniques basées sur l'analyse du polymorphisme de longueur des régions microsatellites (DNA fingerprinting) ont été développées.

➤ **Le caryotypage**

Le principe de cette méthode consiste à séparer les chromosomes par électrophorèse en gel d'agarose, par électrophorèse en champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)) ou Contour-clamped homogenous electric fields (CHEF). Elle travaille sur la totalité du matériel génétique et les profils obtenus sont comparés pour en tirer les conclusions nécessaires (**Kwong Shung et al., 1998**). Par ailleurs, cette méthode dont la reproductibilité est bonne reste coûteuse, fastidieuse et nécessite un équipement particulier.

➤ **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Cette méthode consiste à comparer les profils de migration électrophorétique des produits de digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction, suivie ou non d'un transfert sur membrane de nitrocellulose et hybridation avec une sonde radio-marquée (Southern blot) (**Di Francesco et al., 1999 ; Lockhart et al., 1997; Cormican et al., 1996**). Cette méthode a été utilisée sans Southern blot, pour l'investigation d'épidémies (**Lin et al., 2007 ; Cormican et al., 1996**) ou pour chercher un lien entre génotype et sensibilité aux antifongiques (**Cormican et al., 1996**). Le nombre de génotypes obtenus était plus faible que celui du caryotypage, (**Vazquez et al., 1993**).

L'utilisation de cette méthode est restée limitée en raison de plusieurs inconvénients : difficulté de réalisation due à la nécessité d'une grande quantité d'ADN, nécessité de numérisation des profils pour une comparaison objective, comparaison des résultats des différentes études difficile en raison du choix d'enzymes de restriction différentes, des conditions de migration (gel, voltage) et enfin un pouvoir discriminant mal défini ou insuffisant (**Lockhart et al., 1997**).

➤ **La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Le principe de cette méthode est de comparer le profil électrophorétique de produits PCR obtenus avec des amorces non spécifiques et de courtes tailles (environ 10 Pb) avec une température d'hybridation basse (35 à 40°C) (**Essendoubi et al., 2007 ; de Meeus et al., 2002**). Cette méthode est beaucoup utilisée du fait de sa facilité de mise en œuvre et de sa rapidité. Toutefois, elle présente plusieurs inconvénients : un manque de reproductibilité, notamment inter-laboratoires; une difficulté de lecture et de comparaison des profils qui sont complexes ; l'absence de corrélation avec d'autres méthodes de typage mis appart la MLEE (**Essendoubi et al., 2007 ; de Meeus et al., 2002 ; Arif et al., 1996**) et un pouvoir discriminant inférieur à celui du caryotypage et non évalué sur un nombre suffisant de souches épidémiologiquement non liées.

➤ **PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction.**

Dans cette approche, un gène cible est amplifié par une paire d'amorces spécifiques. L'ADN est ensuite digéré par une enzyme de restriction. Les fragments d'ADN ainsi obtenus, nommés

fragments de restriction, sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. La longueur et le nombre de fragments de restriction varie en fonction des individus du fait de la variabilité du gène cible choisi. Le polymorphisme existant entre individus d'une même espèce peut être ainsi visualisé grâce au polymorphisme de leur ADN. Cette technique permet également de montrer les relations génétiques qui peuvent exister entre individus. Elle est très utilisée pour le typage des bactéries et a beaucoup servi au typage moléculaire du complexe *C. neoformans/C. gattii*, surtout après amplification du gène URA5 (Bertout *et al.*, 2012 ; Meyer and Trilles, 2010 ; Ruiz *et al.*, 2000 ; Everett and Andersen, 1999).

➤ **AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur des fragments amplifiés)**

L'ADN génomique est digéré par deux enzymes de restriction. Des adaptateurs sont ensuite ajoutés aux extrémités des sites de coupure pour que les amorces puissent se fixer sur les fragments. Afin d'augmenter la quantité d'ADN, une pré-amplification est effectuée sur tous les fragments (amorces dégénérées). Une amplification PCR sélective permet ensuite d'augmenter le nombre de fragments. Sur gel d'acrylamide, plusieurs dizaines de fragments (généralement entre 500 pb et 100 pb) peuvent être visualisés en une seule PCR suivie d'un seul gel, sans connaissance préalable sur l'espèce. Les polymorphismes sont relativement fréquents. Cette technique reproductible est de réalisation simple. Cependant, il faut avoir un ADN de très bonne qualité, aussi, très souvent l'intensité des bandes est variable, rendant la lecture et l'interprétation difficiles. Le typage moléculaire de *C. neoformans* a déjà été effectué par cette approche (Meyer and Trilles, 2010 ; Bovers *et al.*, 2008).

➤ **Analyse du polymorphisme de longueur des régions microsatellites et minisatellites ou MLP (Microsatellites Length Polymorphism)**

Une séquence microsatellite est une séquence d'ADN formée par une répétition continue de motifs composés de 2 à 10 nucléotides. Ces « motifs » sont très abondants dans tout le génome de tous les eucaryotes (en milliers d'exemplaires dans le génome d'une espèce). Ils sont le plus souvent trouvés au niveau des introns et d'exons des gènes (van Marle-Köster and Nel, 2003). Les minisatellites sont des séquences du génome répétées en tandem dont la taille du motif unitaire est comprise entre 10 à 60 nucléotides. Elles sont présentes chez toutes les espèces. Il est fréquent d'observer des erreurs de réplication dans ces minisatellites, notamment par

glissement de réplication, qui sont à l'origine de variations interindividuelles quant au nombre de répétitions (**van Marle-Köster and Nel, 2003**).

La longueur de ces séquences minisatellites et microsatellites (c'est-à-dire le nombre de répétitions ; de 10 à 100 fois en général) varie selon l'espèce, mais aussi d'un individu à l'autre et d'un allèle à l'autre chez un même individu, voire d'une cellule à l'autre du fait d'« erreurs » au cours de la réplication. Mais la localisation de ces séquences dans le génome est relativement conservée entre espèces phylogéniquement proches (**van Marle-Köster and Nel, 2003**). La taille de ces régions, corrélée au nombre de répétitions des motifs de nucléotides, est variable d'un individu à l'autre et d'un allèle à l'autre chez le même individu. La transmission génétique de ces séquences suit les lois de Mendel sur l'hérédité.

L'analyse du polymorphisme de longueur des régions microsatellites consiste à amplifier des régions microsatellites en utilisant des amorces spécifiques de séquences cibles et de déterminer leur longueur. Il s'agit donc d'une méthode combinant analyse de séquence et migration électrophorétique. Le séquençage de nombreux génomes et leur mise à disposition sur internet a rendu possible et accessible la recherche des régions microsatellites par recherche bio-informatique et l'analyse de leur polymorphisme (**Richard et al., 2008**).

Cette méthode a démontré un haut pouvoir discriminant lors de l'étude de souches de *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans* (**Bertout et al., 2012 ; Foulet et al., 2005 ; Botterel et al., 2001 ; Bertout et al., 2001 ; Hennequin et al., 2001**). Sa facilité de mise en œuvre et son fort pouvoir discriminant en ont fait un bon outil de typage pour le traçage des souches.

➤ **MLST (Multilocus Sequence Typing)**

Cette technique a été initialement mise au point pour le génotypage des bactéries avant d'être ultérieurement développée pour le typage des levures du genre *Candida* et *Cryptococcus* (**van Asbeck et al., 2009 ; Dodgson et al., 2003**). Son principe repose sur l'analyse de séquences de gènes très conservés au sein de l'espèce considérée, le plus souvent des gènes impliqués dans le métabolisme (gènes de ménage) ne subissant pas de pression de sélection. Au sein de ces séquences, des points de polymorphisme (SNP) sont notés et répertoriés. Chaque séquence différente d'un même gène constitue un allèle et la combinaison des séquences des différents

gènes constitue un génotype MLST. L'avantage majeur de cette technique est de générer des résultats dont la lecture est parfaitement objective et qui sont stockés dans des banques de données numériques internationales (<http://www.mlst.net>) auxquelles tout laboratoire a accès pour analyser ses propres données. C'est cependant une technique contraignante et coûteuse (van Asbeck *et al.*, 2009).

IV.2. Génome et épidémiologie moléculaire de *Cryptococcus neoformans*

➤ Génome de *Cryptococcus neoformans*

Le génome de *C. neoformans* a été entièrement séquencé. Il a une taille approximative de 19Mb organisé en 14 chromosomes de 762Kb à 2,3Mb. Environ 5% du génome est fait de transposons. Il contient environ 6500 gènes. La richesse en transposons serait responsable de l'instabilité du caryotype et des variations phénotypiques. L'analyse de 2 souches différentes a montré des variations dans la composition des gènes ainsi qu'un polymorphisme de séquence entre les génomes (Loftus *et al.*, 2005).

La capsule est synthétisée par expression de plus de 30 gènes, incluant le gène CAP64 (capsule associated gene) qui est utilisé pour le sérotypage par PCR multiplex de *C. neoformans* (Loftus *et al.*, 2005).

➤ Épidémiologie moléculaire de *Cryptococcus neoformans* (Cogliati, 2013)

Du fait de l'importance clinique du complexe *C. neoformans*/*C. gattii*, plusieurs groupes de recherches se sont investis dans la détermination moléculaire du nombre de sous-groupes génétiquement divergents dans chaque espèce. Plusieurs techniques moléculaires ont été utilisées : MLEE, RAPD, PCR fingerprinting, AFLP, RFLP, séquençage de la région ITS1 et ITS2 du rDNA et plus récemment la MLST, le Multilocus Microsatellite Typing (MLMT) et les analyses basées sur la spectrométrie de masse MALDI-ToF.

La multitude de données obtenue avec ces différentes méthodes a généré le problème de comparaison des résultats et de standardisation de la nomenclature des génotypes. De ce fait, le groupe de travail sur *Cryptococcus* de l'ISHAM a proposé une méthode standardisée pour le typage moléculaire de *Cryptococcus* impliquant 3 techniques qui donnent des résultats comparables : la PCR fingerprinting, l'AFLP, et la MLST.

La combinaison de toutes ces analyses sur les 68811 isolats du complexe *C. neoformans/C. gattii* obtenus dans le monde donne de nombreux résultats. La majorité des isolats a été obtenue d'Asie et d'Afrique (19651 et 19647 isolats respectivement), suivi du centre et du sud de l'Amérique (10548), de l'Europe (8736), l'Amérique du nord (7922) et l'Océanie (2518). Ces isolats présentent 8 fois plus de souches de *C. neoformans* que de *C. gattii* (88,6% contre 11,4%). Les typages moléculaires ont été effectués seulement sur 8077 (12%) souches. Les données moléculaires sont très rares en Afrique, en Asie, dans l'Est de l'Europe.

Le type moléculaire VNI est le type prédominant dans le monde excepté en Australie où c'est le type VGI. Le type moléculaire VNII est rare dans tous les continents. Des études récentes en Italie avec la MLST ont montré la présence de 3 VNII parmi les isolats italiens. L'abondance des hybrides VNIII AD semble être strictement en relation avec la présence du type moléculaire VNIV. En Europe et aux USA où les souches de type VNIV sont fréquemment isolées, les mêmes proportions de type VNIII sont observées, suggérant une hybridation régionale entre VNI et VNIV. Il faut noter qu'un nouveau type moléculaire VNB de *C. neoformans* var. *grubii* a été isolé en Afrique. Il semble pour l'instant être présent au sud de l'Afrique, soit au Botswana et au Malawi.

Le type moléculaire VGI a été obtenu en Asie (13,2%), en Amérique du nord (7%) en Amérique centrale et sud (4%) et 3,4% en Europe. Cependant seulement 4 souches de type VGI ont été typées en Afrique. La distribution et la prévalence du type VGII montre 4 réservoirs, le Brésil, la Colombie, l'Australie et Porto Rico. Le profil VGIII est présent en Amérique latine et au sud de la Californie. Dans les autres continents, le profil VGIII est très rare. Le type moléculaire VGIV a été reporté en Afrique du sud, en Inde, en Colombie, et au Mexique. Aussi, les hybrides inter-espèces *C. neoformans/C. gattii* sont rarement rapportés.

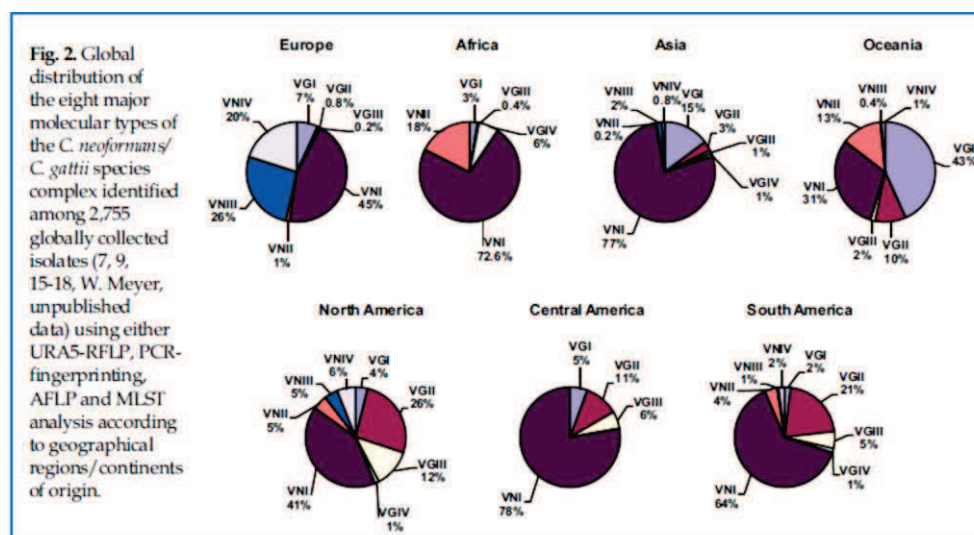


Figure 10 : Distribution globale des 8 types moléculaires majeurs du complexe *C. neoformans*/*C. gattii* (Meyer and trilles, 2010).

IV.3. Génome et épidémiologie moléculaire du complexe *Candida albicans*

➤ Génome de *Candida albicans*

Malgré son importance médicale et scientifique, le progrès dans l'élucidation du génome de *C. albicans* a été relativement lent comparé aux autres microorganismes. Ce fait est dû en partie aux difficultés rencontrées lors de l'utilisation de la génétique comme approche expérimentale d'étude. Comme ce pathogène est diploïde et possède un cycle sexuel incomplet, les analyses génétiques conventionnelles ne sont pas applicables. Malgré tous ces obstacles, les chercheurs ont développé des stratégies alternatives. Ainsi, à l'heure actuelle, plusieurs approches expérimentales sont disponibles pour l'étude de *C. albicans*, y compris le génotypage à grande échelle (Kabir and Hussain, 2009 ; Noble and Johnson, 2007). La séquence complète du génome diploïde de *C. albicans* a été publiée (Jones et al., 2004). La levure possède 8 paires de chromosomes, le plus grand étant appelé R et les suivants étant numérotés de 1 à 7 selon une taille décroissante. Son génome correspond approximativement à 16 Mb (haploïde) et code environ 6 400 gènes dont 774 sont spécifiques au *Candida*, avec une fonction majoritairement inconnue (Kabir and Hussain, 2009 ; vanhet Hoog et al., 2007). Le code génétique de *C. albicans* présente une particularité : le codon CUG code une sérine et non pas une leucine et il est retrouvé au moins une fois dans environ deux tiers des gènes (Odds et al., 2004). Beaucoup de gènes sont conservés entre *S. cerevisiae* et *C. albicans* et basés sur cette similarité, les mécanismes de plusieurs processus biologiques ont été découverts chez *C. albicans* (Biswas et

al., 2007). Cependant, le génome de *C. albicans* est très dynamique, avec des translocations, délétions et duplications chromosomiques courantes, ce qui rend difficile la découverte de la fonction de ses gènes. L'hypothèse courante de l'instabilité du génome de *C. albicans* est qu'elle permet à la levure pathogène d'acquérir la diversité génétique nécessaire pour survivre dans différentes niches environnementales (**Kabir and Hussain, 2009 ; Rustchenko, 2007**). La richesse en séquences microsatellites est une particularité de *C. albicans* avec plus de 1940 trinuécléotides dans les séquences ouvertes de lecture (**Kabir and Hussain, 2009 ; Rustchenko, 2007**).

Il y a l'espoir que les techniques récemment développées pour étudier cette levure, ainsi que le séquençage en entier de son génome, conduiront à une meilleure connaissance de sa pathogénèse et de sa biologie, offrant ainsi la possibilité de développer des nouvelles stratégies antifongiques. Grâce à ces avancées, jusqu'à présent plusieurs techniques d'étude de la variabilité génétique de *C. albicans* ont été développées et permettent de comprendre l'épidémiologie moléculaire de cette levure.

➤ **Epidémiologie moléculaire du complexe *C. albicans***

Dans une étude de l'épidémiologie moléculaire du complexe *C. albicans*, **Romeo et Criseo (2009)** trouvent parmi 389 souches de *Candida* ayant un test de filamentation positif, une répartition après amplification du gène *Hwp1*, de 89,9% pour *C. albicans*, 7,2% pour *C. africana* et 2,9% pour *C. dubiniensis*. Au Nigéria, au cours d'une étude de l'épidémiologie de la candidose, 177 *Candida* ont été isolés. Parmi eux 84 ont donné un test de blastèse positif et une couleur verte sur milieu chromagar. De ces 84(97,6%) souches présumées *C. albicans*, l'amplification du gène *Hwp1* a confirmé 82 comme étant *C. albicans*. Les deux autres (2,4%) souches ont été identifiées comme étant *C. africana*. Aucune souche de *C. dubiniensis* et de *C. stellatoidea* type I n'ont été observées (**Nnadi et al., 2012a**). Une étude menée au Royaume Uni par pyroséquencage a permis de montrer que *C. africana* représente 6% de tous les isolats du complexe *C. albicans* (**Borman et al., 2013**). Récemment en Inde, sur 269 isolats de *C. albicans* présumés, 4 (1,5%) ont été identifiés comme étant *C. africana* et aucune souche n'a été identifiée comme étant *C. dubliniensis* ou *C. stellatoidea* type I (**Sharma et al., 2014**).

C. albicans reste de loin l'espèce majoritaire de ce complexe et la plus impliquée en pathologie humaine, de microévolutions au sein de la population de cette espèce sont fréquemment détectées par des études de génotypage et de typage moléculaire. Cependant, les données sur

l'épidémiologie moléculaire de *C. albicans* sont éparpillées et un réel consensus sur les techniques de typage n'est pas encore arrêté. Toutefois, diverses études ont été menées, en particulier avec le génotypage *via* l'amplification d'une séquence sur le site de l'intron transposable de l'ADNr 25S, également le typage moléculaire par empreintes génétiques et MLST. Cinq génotypes distincts de *C. albicans* ont été décrits (A, B, C, D et E). Le génotype A est le plus rencontré, suivi de B et de C. le génotype D est assimilé à *C. dubliniensis* ; le génotype E a été récemment découvert et sa distribution globale est encore peu connue (**Bii et al., 2009**). **Yang et al. (2012)** ont trouvé une distribution de 75%, 8,3% et 16,7% pour les génotypes A, B, et C respectivement, dans une étude menée sur les espèces de *C. albicans* isolées des biofilms buccaux. **Nnadi et al., (2012a)** trouvent que 100% des isolats de *C. albicans* dans leur échantillon sont de génotype A. Au Brésil, **Sylva-Rocha et al. (2014)** dans une étude récente obtiennent 76,4% de *C. albicans* génotype A, 19,7% génotype C et 3,9% génotype B. Aussi, il a été montré que les isolats de *C. albicans* isolés chez les patients leucémiques présentent une prédominance du génotype A (génotype A 65,4%, génotype B 15,4%, génotype C, 19,2%) (**Abdulrahim et al., 2013**). Au-delà de cette répartition par génotypage ABC qui montre une nette prédominance du génotype A, d'autres méthodes de typage moléculaire permettent d'avoir d'autres distributions génétiques de *C. albicans*. La MLST classe *C. albicans* en 4 clades majeurs. Le clade 1 est le plus prépondérant (**Lyon et al., 2010**). Le typage moléculaire par analyse des séquences microsatellites HIS3, CDC3 et EF3 montre une grande diversité génétique entre les différents isolats de *C. albicans* (**Bonfim-Mendonça et al., 2010 ; Botterel et al., 2001**).

V. Traitement de la candidose muqueuse et de la cryptococcose neuro-méningée

V.1. Les principaux antifongiques

Les antifongiques utilisés dans le traitement des candidoses sont divisibles en quatre grandes classes chimiques. Ils agissent selon quatre grands mécanismes d'action :

- Action directe sur la membrane plasmique fongique (les polyènes)
- Action sur la synthèse des stérols fongiques et donc sur l'intégrité de la membrane plasmique fongique (les dérivés azolés, les allylamines)
- Action sur la paroi cellulaire fongique (les échinocandines)
- Inhibition de la synthèse d'acides nucléiques (la 5-fluorocytosine) (**Cannon et al., 2007 ; Ghannoum and Rice, 1999 ; Georgopapadakou and Walsh, 1996**).

V.1.1. Les antifongiques de la classe des polyènes

Les polyènes sont des antifongiques naturels produits à partir d'extraits de culture d'*Actinomycètes* (genre *Streptomyces*). Leur structure est caractérisée par un nombre variable de doubles liaisons conjuguées CH=CH (**Chabasse et al., 2006**). Il s'agit de molécules amphiphiles, qui s'intègrent à la bicouche lipidique de la membrane plasmique en se liant à l'ergostérol et s'agglomérant en anneaux pour former des pores (figure 11) (**Ghannoum and Rice, 1999**). Elles perturbent ainsi l'intégrité de la membrane plasmique, augmentant sa perméabilité et conduisant à la sortie du contenu cytoplasmique et notamment de cations telle qu'une fuite de potassium, de magnésium et de sucre ou encore l'entrée de sodium entraînant la mort de la cellule. Il semble qu'elles aient de plus des propriétés oxydantes sur *C. albicans*, renforçant leur activité fongicide (**Cannon et al., 2007 ; Chabasse et al., 2006 ; Georgopapadakou and Walsh, 1996**).

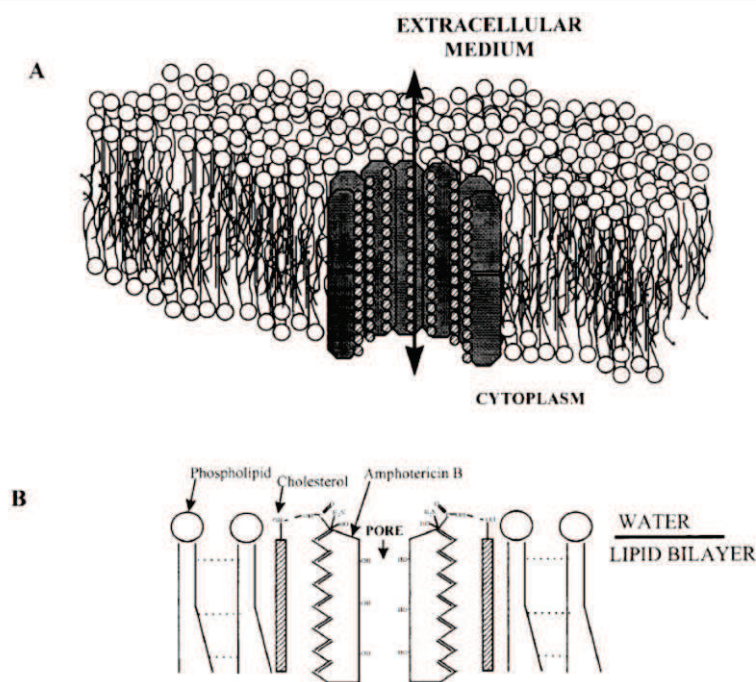


Figure 11 : Interaction entre l'amphotéricine B et l'ergostérol dans une bicouche lipidique. (A) Le pore est composé de la réunion de deux demi-pores. (B) l'orientation de la molécule d'amphotéricine B dans le pore. La ligne en pointillé entre les chaînes carbonées des phospholipides représentent les forces de Van der Waals. Les tirets représentent les liaisons hydrogènes qui se forment entre l'amphotéricine B et les molécules d'ergostérol (**Ghannoum and Rice, 1999**).

Cette classe contient deux principes actifs aujourd'hui utilisés dans le traitement des candidoses :

- L'amphotéricine B (figure 12) : principe actif de la Fungizone® (suspension buvable, gélule, poudre injectable).

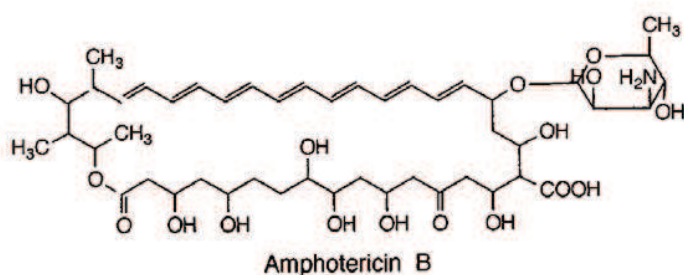


Figure 12 : Structure chimique de l'amphotéricine B (**Georgopapadakou and Walsh, 1996**)

- La nystatine : principe actif de la Mycostatine® (suspension buvable, comprimé) et d'autres spécialités pour le traitement des candidoses vaginales et auriculaires.

Depuis leur apparition dans les années 1950, jusqu'à la découverte des dérivés azolés, les polyènes étaient le traitement standard pour les infections fongiques systémiques. En effet,

l'amphotéricine B possède un large spectre d'activité, en particulier sur le genre *Candida* à l'exception de *C. lusitaniae* et *C. guilliermondii* chez qui l'on retrouve des résistances *in vitro*, bien qu'une concentration élevée permette une action fongicide. La nystatine présente une activité comparable (**Chabasse et al., 2006**).

Les polyènes présentent une mauvaise absorption intestinale et un faible volume de distribution dans l'organisme. De plus, si l'amphotéricine B possède une forte affinité pour l'ergostérol, c'est également le cas pour certains stérols de mammifères comme le cholestérol entraînant ainsi une certaine cytotoxicité, particulièrement la néphrotoxicité qui est l'effet indésirable majeur. En raison de cette mauvaise tolérance, des formulations lipidiques d'amphotéricine B ont été développées : l'amphotéricine B en complexe lipidique (ABLC ou Abelcet®), l'amphotéricine B incorporée dans des liposomes (Ambisome®), l'amphotéricine B en dispersion colloïdale (ABCD) et une émulsion lipidique d'amphotéricine B et d'Intralipide® à 20%. Ces nouvelles formes galéniques ont permis de diminuer sensiblement les effets secondaires (**Chabasse et al., 2006**).

V.1.2. Les dérivés azolés

Ils sont répartis en deux familles, selon qu'ils possèdent deux ou trois molécules d'azotes dans leur cycle azoté (figure 13) (**Georgopapadakou and Walsh, 1996**).

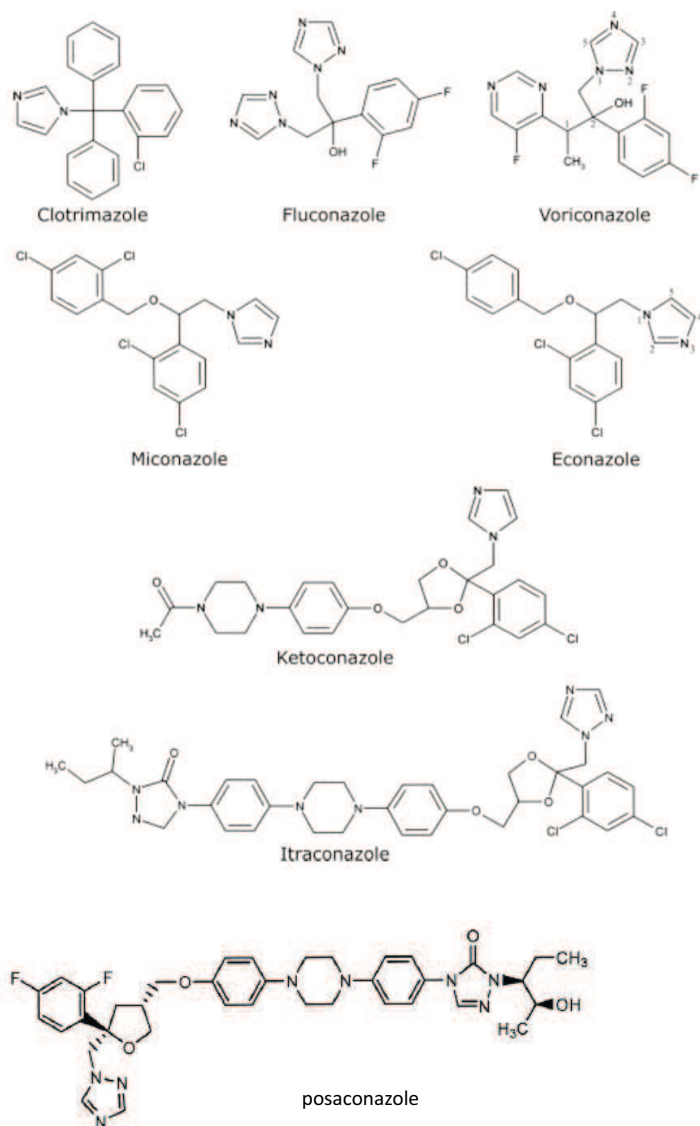


Figure 13 : Structure chimique de composés imidazolés (clotrimazole, miconazole, econazole et ketoconazole) et triazolés (fluconazole, itraconazole, voriconazole et posaconazole) (**Warrilow et al., 2010, Vazquez, 2007**).

- Les imidazolés (deux azotes) comprennent notamment :
 - Le miconazole, principe actif du Daktarin® (gel buccal, poudre) et Gyno Daktarin® (capsule vaginale)
 - Le kétoconazole, principe actif de Nizoral® (comprimé et suspension buvables) et du Ketoderm® (Gel et crème)
 - Le clotrimazole, principe actif de Mycohydralin® (crème et comprimé vaginal).

D'autres principes actifs existent, tel que le bifonazole avec l'Amycor® (crème, poudre, solution), l'éconazole sous forme de crème, ovule, émulsion, poudre, solution avec le Dermazol® (crème et émulsion), l'oxiconazole avec le Fonx® (crème, poudre, solution), le

tioconazole avec le Trosyd® (crème et ovule), l'omoconazole Fongamil® (crème, poudre, solution), le sertaconazole avec le Monazol® (crème).

En ce qui concerne plus précisément le miconazole, outre son activité sur les *Candida*, il est actif sur les dermatophytes, inhibant leur croissance. D'autre part, il possède une activité antibactérienne contre certains cocci et bacilles Gram positifs (**Sawyer et al., 1975**).

- Les triazolés (trois azotes) comprennent pour leur part :
 - Le fluconazole, principe actif de Triflucan® (gélule, suspension injectable, poudre orale)
 - Le posaconazole principe actif de Noxafil® (suspension buvable, réservé à l'usage hospitalier)
 - L'itraconazole, principe actif de Sporanox® (suspension buvable et gélule ; seule la suspension buvable est indiquée dans la candidose buccale)
 - Le voriconazole, principe actif de Vfend® (comprimé, poudre injectable, poudre orale suspension buvable).

L'ergostérol est un bio-régulateur de la fluidité membranaire et par conséquent intervient dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique fongique. Cette intégrité requiert l'insertion de stérols déméthylés. Plusieurs éléments suggèrent que la première cible des dérivés azolés est la protéine de l'hème qui co-catalyse la 14 α -déméthylation du lanostérol par le cytochrome P-450. L'inhibition de la 14 α -déméthylase (codée par le gène ERG11) conduit à la déplétion de l'ergostérol et l'accumulation de précurseurs toxiques du stérol, dont les stérols 14 α -méthylés (lanostérol; 4,14-diméthylzymostérol et 24-méthylènedihydrolanostérol) ainsi qu'à la formation d'une membrane plasmique avec une structure et des fonctions altérées rendant ainsi cette dernière plus fragile (**Cannon et al., 2007 ; Ghannoum and Rice, 1999 ; Georgopapadakou and Walsh, 1996**). La déplétion importante en ergostérol pourrait également affecter la croissance et la prolifération cellulaire (**Sheenan et al., 1999 ; Georgopapadakou and Walsh, 1996**).

Les dérivés triazolés tels que le fluconazole, l'itraconazole et le voriconazole, tiennent leur activité antifongique, au moins en partie, par l'inactivation de la 14- α -stérol déméthylase cytP450 dépendante (codée par le gène ERG11). Mais il existe une hétérogénéité du mode d'action parmi ces antifongiques.

Pour ce qui concerne le voriconazole, une accumulation de zymostérol et la synthèse de squalène a été observée chez *C. albicans* lors de la prise de ce principe actif. Cependant, la

question reste en suspens de savoir si cette accumulation d'intermédiaires vient d'une action du voriconazole sur de nombreuses enzymes (non 14- α -déméthylase) impliquées dans la synthèse de l'ergostérol ou bien s'il s'agit de la conséquence de l'inhibition de la 14- α -déméthylase.

Néanmoins, il faut bien noter que la synthèse du cholestérol des mammifères se retrouve aussi bloquée par les dérivés azolés au niveau de la 14- α -déméthylation. Mais la dose nécessaire pour obtenir le même degré d'inhibition est bien plus élevée que celle pour les champignons **(Ghannoum and Rice, 1999)**.

Les azolés possèdent un large spectre d'activité même s'il est plus étroit que celui des polyènes **(Vazquez, 2007 ; Chabasse et al., 2006)**. Les triazolés les plus anciens (fluconazole) ont montré d'excellentes efficacités et tolérances depuis de nombreuses années et sont devenus les antifongiques les plus prescrits notamment chez les patients atteints d'infection au VIH ; le fluconazole est aussi devenu l'antifongique de référence dans les études de non-infériorité **(Vazquez, 2007)**.

V.1.3. Les analogues de bases puriques

La 5-fluorocytosine (Flucytosine ou encore 5-FC) est un analogue de la pyrimidine. C'est le principe actif d'Ancotil®, spécialité qui existe sous forme de comprimé ou de solution injectable. Elle possède un mode d'action complètement différent des antifongiques précédemment décrits. La 5-FC est une prodrogue qui pénètre la cellule fongique grâce à une cytosine perméase. Elle est ensuite transformée en 5-fluorouracile (5-FU) par la cytosine désaminase, puis phosphorylée et intégrée dans l'ARN, interrompant la transcription. En effet, la 5-FC interfère dans le métabolisme de la pyrimidine. Ce composé est spécifique des champignons, les cellules animales ne disposant pas ou peu de cytosine désaminase **(Ghannoum and Rice, 1999 ; White et al., 1998 ; Georgopapadakou and Walsh, 1996)**.

En raison d'une prévalence élevée de résistance innée, la 5-FC possède un spectre d'activité limité. C'est pourquoi, elle est généralement utilisée en association à l'amphotéricine B ou au fluconazole, mais, rarement comme traitement unique **(Cannon et al., 2007 ; Ghannoum and Rice, 1999 ; Georgopapadakou and Walsh, 1996)**. Il est à noter que la 5-fluorocytosine est réservée au traitement de la cryptococcose neuro-méningée.



Figure 14 : Structure chimique de la 5-fluorocytosine (Cannon *et al.*, 2007).

V.1.4. Les échinocandines

Cette classe d'antifongiques fait partie des polypeptides. Il s'agit de métabolites lipopolypeptidiques obtenus par fermentation de divers champignons (Chabasse *et al.*, 2006). Comme nous l'avons vu précédemment, les champignons possèdent dans leur structure des composés tels que les mannanes, la chitine ou les α - et β -glucanes. Ces composants constituent les cibles idéales pour les traitements diminuant ainsi les risques de toxicité car on ne les retrouve pas chez l'homme. Les échinocandines sont des inhibiteurs spécifiques de la β -(1-3)-glucane synthase, complexe protéique intégré dans la paroi cellulaire (Ghannoum and Rice, 1999).

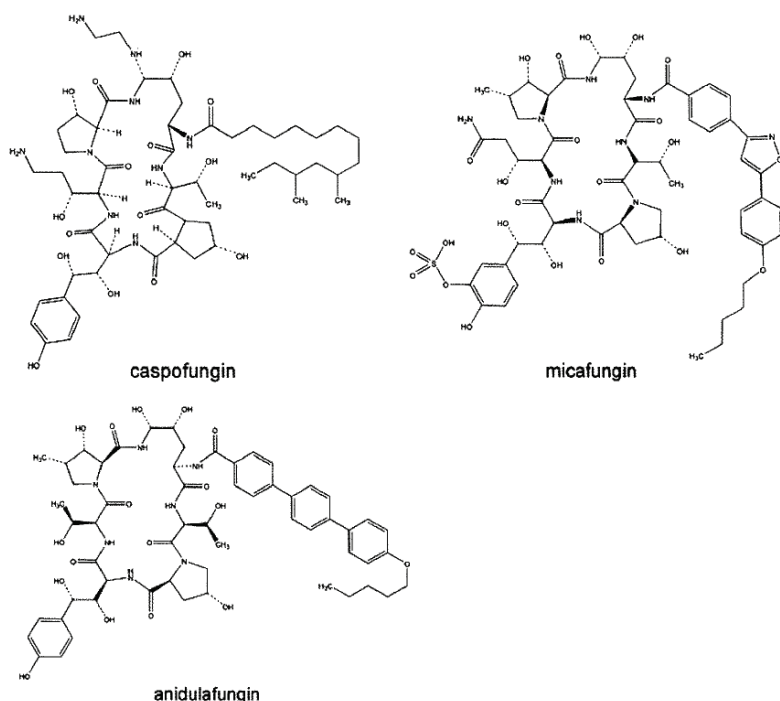


Figure 15: Structure chimique des échinocandines (Akins, 2005)

Aujourd'hui, trois échinocandines sont disponibles (figure 14) :

- La caspofungine, principe actif de Cancidas® (injectable, uniquement disponible par voie IV pour le traitement des candidoses systémiques, réservée à l'usage hospitalier)

- L'anidulafungine, commercialisée sous le nom d'Ecalta® (injectable), réservée à l'usage hospitalier
- La micafungine, principe actif de Mycamine® (injectable), réservée à l'usage hospitalier.

V.1.5. Les antifongiques en développement

Aujourd'hui encore, d'autres molécules sont en développement, pour répondre aux besoins toujours grandissant d'antifongiques. Après la course aux antibiotiques, c'est celle aux antifongiques qui a lieu avec une surenchère entre les résistances des champignons et les traitements mis en place.

Différents composés sont donc en développement à des stades divers :

- Un nouveau triazolé, développé par Basilea Pharmaceutica et Astellas, l'isavuconazole a montré son efficacité *in vivo* dans des modèles murins d'aspergilloses invasives et de candidoses. Il montre un spectre d'activité plus important que le fluconazole et a l'avantage de pouvoir être administré par voie orale, contrairement aux échinocandines. Il est actuellement au centre de trois essais cliniques de phase III, comprenant des centres répartis aux Etats-Unis, en Europe, pour des formes cliniques différentes dont la candidémie et les infections invasives à *Candida* (**Thompson et al., 2010**).
- Une arylamidine, le T-2307, développé par Toyama Chemical est en phase I, notamment pour une action sur *C. albicans*. C'est l'accumulation du principe actif dans le microorganisme à des concentrations toxiques qui entrainerait l'activité antifongique (**Nishikawa et al., 2010**).
- De nouveaux polyènes, de nouveaux imidazoles, un pyridobenzimidazole, inhibiteur de la β -1,6-glucane synthétase qui semble empêcher l'élongation des hyphes chez *C. albicans*, des inhibiteurs de la β -1,3-glucane synthase, des peptides (histatines, cathelicidine, des flavonoïdes (apigénine et kaempférol), des alcaloïdes (ibogaïne), des inhibiteurs d'enzymes telles que la glucosamine-6p synthétase, l'élastase, ou encore des inhibiteurs de la synthèse de la chitine, des phospholipases ou des acides gras (**Brautaset et al., 2011 ; Walker et al., 2011**).
- En 2010, Eisai avait en développement un antifongique avec un nouveau mécanisme d'action, l'inhibition de la biosynthèse du glycosylphosphatidylinositol fongique (**Hata et al., 2011**).

V.2. Traitement de la cryptococcose neuroméningée

➤ Traitement de première intention

Le taux de mortalité qui survient 6 mois après l'infection du système nerveux central (SNC) par le cryptocoque peut atteindre 20% (**Davis et al., 2009**). Un pronostic favorable exige le diagnostic précoce de l'infection, une thérapie initiale efficace ainsi qu'un contrôle de la pression intra-crânienne (**Davis et al., 2009**).

Le traitement de la cryptococcose neuro-méningée consiste en un traitement initial combiné d'amphotéricine B (0,7-1mg/kg/jour) et de flucytosine (100mg/kg/jour) pendant deux semaines, suivi d'un traitement de consolidation au fluconazole (**Davis et al., 2009; Ritter and Goldman, 2009**).

Bien que la thérapie combinée soit la plus efficace contre *Cryptococcus* chez les PVVIH, l'amphotéricine B n'est pas disponible ou est très rare en Afrique subsaharienne (**Jackson and Hosseinipour, 2010 ; Jarvis et al., 2008**). Les patients sont donc généralement traités en monothérapie à l'aide de fluconazole, pouvant laisser craindre l'apparition de résistances (**Jackson and Hosseinipour, 2010**).

➤ Traitement de seconde intention

Des traitements alternatifs doivent être considérés dans les cas où les patients ne répondent pas aux antifongiques donnés en première intention. La dexaméthasone est un glucocorticoïde pouvant être bénéfique chez les patients infectés au *C. gattii* qui ne répondent pas au traitement d'amphotéricine B/flucytosine, mais il ne constitue pas un traitement alternatif pour contrôler la pression intra-crânienne (**Phillips et al., 2009**). Mis à part le fluconazole, les autres azolés, comme le posaconazole, le voriconazole et l'itraconazole sont aussi efficaces contre *Cryptococcus*, mais leur plus grande hydrophobicité (excepté le voriconazole) réduit leur pénétration dans le système nerveux central (SNC) (**Gomez-Lopez et al., 2008**).

➤ Suivi biologique de la méningite cryptococcique

La répétition des prélèvements au niveau des sites infectés est importante à la fin du traitement d'induction (15 jours après l'initiation du traitement) et à 3 mois post traitement. La positivité de l'examen direct du LCR à 15 jours n'est pas un critère d'échec thérapeutique. En effet, l'examen à l'encre de Chine peut alors être positif malgré une culture négative du LCR

dans environ 50% des cas chez les patients infectés par le VIH et 20% des cas chez les patients séronégatifs au VIH. Le stockage de l'antigène dans certaines cellules (macrophages, cellules tubulaires rénales) et sa lenteur de dégradation rendent inutile la répétition trop fréquente des titrages. L'augmentation des titres dans le LCR serait un argument pour un échec mycologique au cours du traitement initial (dans les 10 semaines suivant le diagnostic) (**Lortholary et al., 2006**), celle d'un titre supérieur à 1/512 (dilution du LCR) au cours du traitement d'entretien (au-delà de 3 mois) serait un argument en faveur de rechute chez les patients infectés par le VIH (**Lortholary et al., 2006**).

V.3. Recommandations 2012 de l'ESCMID pour le traitement des infections muqueuses à *Candida* chez les patients infectés par le VIH (Lortholary et al., 2012)

➤ Traitement de la candidose oro-pharyngée due à des souches sensibles aux azolés

En première intention, le fluconazole (100 mg/j, 7 à 14 jours) est utilisé. Les alternatives sont : Le miconazole sous forme de pastille muco-adhésive, l'itraconazole sous forme de solution orale, le voriconazole ou le posaconazole en cas de souche résistante au fluconazole.

Les protocoles suivants ne sont plus recommandés: les traitements topiques (fungizone ou nystatine), plus contraignants, moins efficaces, le kétoconazole en raison de son hépatotoxicité et de ses interactions médicamenteuses, les échinocandines et les formulations lipidiques de l'amphotéricine B en raison de leur coût, de leur voie d'administration intra veineuse.

➤ Traitement de la candidose œsophagienne

Le fluconazole par voie orale 200 mg/j, 14 à 21 jours est utilisé en première intention. En cas d'œsophagite sévère, le fluconazole par voie intraveineuse peut être utilisé. Les alternatives suivantes sont envisagées : l'itraconazole en solution orale (mais pas en capsule), le voriconazole (200 mg, 2 fois par jour, 14-21 jours) ou le posaconazole, par voie orale, en cas de souche résistante au fluconazole. Les échinocandines sont réservées au cas où les dérivés azolés sont inefficaces ou non utilisables.

Les protocoles suivant sont non recommandés : les agents topiques (ne sont pas assez efficaces), le kétoconazole par voie orale ou la flucytosine, seule, par voie orale sont moins efficaces que le fluconazole, l'addition de flucytosine au fluconazole ou à l'itraconazole et les formulations lipidiques de l'amphotéricine B.

➤ **Prise en charge des candidoses oro-pharyngées et œsophagiennes réfractaires**

Elles sont définies par des symptômes persistant après plus de 14 jours de traitement par le fluconazole à la dose minimale de 200 mg/j.

Les traitements suivants sont proposés en première ligne: le fluconazole à forte dose en suspension, l'itraconazole en solution à une dose minimale de 600 mg/j, le voriconazole, le posaconazole en suspension orale à la dose de 400 mg, 2 fois par jour, les échinocandines en cas d'échec clinique du fluconazole et/ou de mise en évidence de souches résistantes *in vitro* au fluconazole. Les dérivés lipidiques de l'amphotéricine B représentent le traitement de dernier recours.

L'utilisation d'agents antifongiques locaux comme l'amphotéricine B est à éviter. Un traitement antirétroviral optimal est primordial.

➤ **Prévention des Candidoses oro-pharyngées et œsophagiennes**

Une prophylaxie secondaire n'est habituellement pas recommandée. Toutefois, lorsque les récurrences ou rechutes sont fréquentes et/ou sévères, un traitement au long cours par un dérivé azolé est envisageable : fluconazole si la souche de *Candida* y est sensible, à la dose de 100 à 200 mg, 3 fois par semaine ou 50 à 100 mg/j, sinon posaconazole par voie orale.

➤ **Candidose vulvo-vaginale**

Le traitement topique (ovules antifongiques) est recommandé en première intention. Le recours aux dérivés azolés systémiques doit être évité. En cas d'épisodes multiples un traitement par fluconazole une fois par semaine (150 mg/semaine) peut réduire la fréquence des récurrences.

V.4. Les limites des traitements antifongiques

V.4.1. Les résistances aux antifongiques

V.4.1.1. Définition du concept de résistance

Historiquement les résistances cliniques se définissent par une persistance ou une progression d'une infection en dépit d'un traitement antimicrobien. Une réponse clinique positive dépend non seulement de la sensibilité du microorganisme à l'antifongique, mais elle dépend de nombreux facteurs parmi lesquels la réponse immunologique du patient, la distribution du

principe actif, l'observance du patient ou encore les interactions médicamenteuses (**White et al., 1998 ; McGinnis and Rinaldi, 1996**). Lorsqu'elles se développent en réponse à une exposition à l'antifongique, elles sont appelées résistances secondaires ou acquises. A côté des résistances acquises, l'émergence d'agents pathogènes avec résistances intrinsèques ou primaires est observée. Cela signifie que le microorganisme est résistant avant même d'être confronté à l'antifongique et l'apparition de résistances croisées entre des antifongiques de même classe thérapeutique est observée (**White et al., 1998**). Pour chaque espèce, il existe une distribution populationnelle des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour chaque antifongique. De même, la CMI moyenne d'un antifongique particulier peut être déterminée pour chaque espèce. Ainsi, en utilisant ce type d'analyse, il est clair que *C. krusei* est intrinsèquement moins sensible aux azolés que *C. albicans*, chaque souche ayant des CMI élevées pour les azolés. De même, de très nombreuses souches de *C. glabrata* ont des CMI qui sont significativement plus élevées que pour la plupart des souches de *C. albicans*. Ces CMI permettent ainsi de comparer les sensibilités aux antifongiques et de voir le potentiel de résistance des différentes espèces et souches traitées. Avant le développement des tests de sensibilité des levures tels que définis par le Clinical and Laboratory Standards Institute ex NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), la détermination des CMI était variable en fonction des laboratoires. Le document M27 publié en 1992 et récemment mis à jour a permis une reproductibilité inter laboratoires de la mesure des CMI offrant ainsi la possibilité de comparer différentes souches analysées par des laboratoires différents (**Pfaller et al., 2008**).

V.4.1.2. Résistance de *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques

Des cas de résistance de *Cryptococcus* aux antifongiques ont été démontrés. Les pompes à efflux AFR1 chez *C. neoformans* lui confèrent une certaine résistance aux azolés (**Morschhauser, 2010**). Sa capacité à former des biofilms offre une résistance à l'amphotéricine B ainsi qu'aux triazolés (**Cowen and Steinbach, 2008**). *C. neoformans* ne possède pas la cible métabolique des échinocandines qui agissent essentiellement sur la β -glucane synthase (**Cowen and Steinbach, 2008**). *C. neoformans* (sérotypes A et D) s'adapte aux concentrations élevées de fluconazole en dupliquant ses chromosomes sur lesquels est situé le gène ERG11 codant pour la 14 α -demethylase (**Sionov et al., 2010**).

V.4.1.3. Mécanismes de résistances de *Candida* aux antifongiques

De nombreux mécanismes moléculaires permettant aux cellules de *Candida* de résister ont été décrits vis-à-vis des dérivés azolés (figure 16) (**Cannon *et al.*, 2007 ; Ghannoum and Rice, 1999 ; White *et al.*, 1998**) :

- La cellule peut surexprimer l'enzyme cible
- Des mutations peuvent altérer les affinités des antifongiques pour les enzymes cibles
- La cellule peut ne pas accumuler la molécule en augmentant l'expulsion de celle-ci par un flux actif, que ce soit par des protéines appartenant aux MFS (Major Facilitator Superfamily) ou des protéines de la superfamille des ABC (ATP-Binding Cassette)
- La cellule peut également empêcher l'entrée de la molécule
- La cellule peut utiliser des «by-pass» pour contrer le manque de certains substrats
- D'autres enzymes de la voie de synthèse de l'ergostérol, telle que la C5,6-stérol désaturase, peuvent être inactivées par mutation
- La cellule peut produire des enzymes qui dégradent la molécule

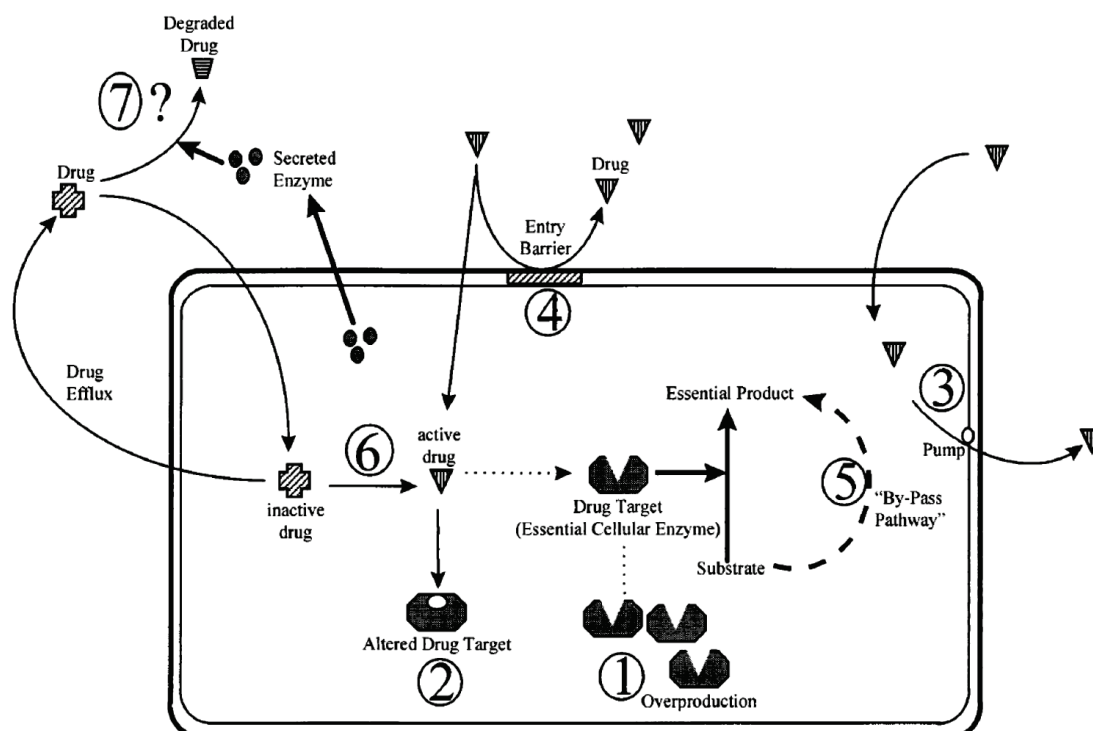


Figure 16 : Mécanismes de résistance développés par les cellules fongiques : 1. Surproduction de l'enzyme pour que le principe actif n'inhibe pas complètement la réaction. 2. Altération de la cible tel que le principe actif ne peut pas se lier à la cible. 3. Sortie du principe actif par des pompes. 4. Blocage du principe actif au niveau de la paroi de la cellule. 5. La cellule possède des «by-pass» qui compensent la perte d'activité provoquée par le principe actif. 6. Inhibition d'enzymes qui transforment la prodrogue en métabolite actif. 7. Sécrétion d'enzymes dans le milieu extracellulaire pour dégrader le principe actif (Ghannoum and Rice, 1999).

➤ Surexpression de l'enzyme cible

Il a été montré que l'échec à l'accumulation des dérivés azolés est un facteur majeur dans la résistance des isolats de *C. albicans* et de nombreuses études ont rapporté une association entre cette apparition de résistance et la surexpression des gènes codant pour les transporteurs. De plus, cette résistance est souvent multifactorielle, que ce soit chez *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, et elle implique les mêmes familles de gènes (Pinjon et al., 2005).

➤ Les pompes à efflux

Les pompes à efflux codées par les gènes de la famille CDR (*Candida* drug resistance) confèrent une résistance croisée aux azolés alors que celles codées par les gènes de la famille MDR (multidrug resistance) confèrent une résistance au seul fluconazole (Ghannoum and Rice, 1999).

➤ **Mutation des gènes codant pour les enzymes cibles**

Des mutations près du site de liaison des azolés compacts (fluconazole, voriconazole) semblent réduire leur affinité de liaison et pourraient être à l'origine de résistance aux azolés chez *C. albicans*. Le gène le plus impliqué est le gène ERG11 qui code pour la 14- α -déméthylase, cible principale des azolés. En modifiant la structure du gène, la protéine qui en découle présente une moindre affinité pour les azolés (**Vazquez, 2007**).

➤ **Altération de la cible**

La résistance peut également se traduire par une altération de la composition lipidique de la membrane qui peut affecter la fluidité de la membrane. En effet, les interactions entre les stérols et les phospholipides de la membrane cytoplasmique touchent la fluidité et l'asymétrie de la membrane. Il est possible qu'une diminution de l'entrée de principes actifs dans la cellule soit le résultat d'une modification de la composition en stérols et/ou en phospholipides. Ces modifications vont avoir un impact à la fois sur les azolés mais également sur les polyènes. Il a été montré que chez *C. albicans* une modification du profil en acides gras et phospholipides conduit à une augmentation de la résistance au miconazole par un changement de la perméabilité membranaire. La modification la plus significative dans une souche résistante aux azolés et polyènes, est que dans cette souche, l'ergostérol était remplacé par des stérols méthylés tels que le méthylfécostérol (**Ghannoum and Rice, 1999 ; White et al., 1998**).

Les modifications membranaires entrent en jeu pour les résistances aux polyènes. En effet, elles sont principalement associées à une altération des lipides membranaires et particulièrement des stérols empêchant la liaison des polyènes et la formation des pores dans la membrane (**White et al., 1998 ; Georgopapadakou and Walsh, 1996**).

➤ **Utilisation des by-pass**

Les résistances qui existent avec la 5-FC résultent d'une diminution de l'entrée du composé dans la cellule ou dans la perte d'activité enzymatique. La résistance intrinsèque à la 5-FC est généralement le résultat d'un défaut en cytosine désaminase. La résistance secondaire est due principalement à une diminution de l'activité de l'uracile phosphoribosyl transférase impliquée dans la transformation en acide 5-fluorouracil (**Ghannoum and Rice, 1999 ; White et al., 1998**).

➤ Formation des biofilms

Certains *Candida* ont la faculté de former des biofilms. La résistance aux antifongiques augmente lors de la formation de ces biofilms, ils sont 30 à 2000 fois plus résistants aux antifongiques que les cellules libres, cela inclut l'amphotéricine B, la nystatine, le fluconazole et l'itraconazole. La résistance aux antifongiques évolue parallèlement à l'augmentation de l'activité métabolique du développement du biofilm. Différentes explications sont avancées pour expliquer le mécanisme de résistance des biofilms dont la présence de barrières physiques qui empêchent la pénétration de l'antifongique, le ralentissement de la croissance et la régulation des activités métaboliques du biofilm en raison d'un apport limité de nutriments, l'activation d'une réponse au stress et l'existence de sous-population de cellules (cellules persistantes) qui sont préservées par la pression des antifongiques. La structure même des biofilms et la présence de la matrice extra cellulaire participent à la diminution de la diffusion des antifongiques (**Samaranayake et al., 2005 ; Chandra et al., 2001**).

V.4.2. Incidence des résistances

Aucune résistance initiale des *Candida spp.* au miconazole n'a été signalée dans la littérature, même chez des patients traités à plusieurs reprises (**Fothergill et al., 2006**). Une étude menée en Allemagne a révélé un faible taux de résistance au fluconazole, pour seulement 4% des isolats de *C. albicans* testés. Néanmoins, sur un autre azolé, l'itraconazole, une proportion importante des isolats a montré une sensibilité diminuée (**Borg Von Zepelin et al., 2007**).

Toutefois, ces données évoluent, elles varient également en fonction des souches de *Candida*, des lieux où elles sont prélevées. Ainsi dans des études plus récentes, il a été montré que l'utilisation fréquente du fluconazole à un dosage faible et sur de longues périodes, chez les patients VIH-positifs, a conduit à l'isolement de *C. albicans* résistants aux triazolés (**Thompson et al., 2010**). Une autre étude, toujours chez des patients VIH-positifs, a trouvé une résistance au fluconazole de *C. albicans* chez 21% des patients qui étaient atteints d'une candidose oropharyngée et chez 14% des porteurs de *Candida* ne présentant pas la pathologie (**Patton, 2008**). Cette utilisation répétée et suppressive de fluconazole à des dosages faibles (50-100 mg/jour) a contribué au développement de souches de *C. albicans* résistantes au fluconazole ainsi qu'à l'émergence d'autres levures intrinsèquement résistantes comme *C. krusei* et *C. glabrata*. (**Thompson et al., 2010 ; White et al., 2008**).

Pour ce qui est de la 5-FC, elle possède une action inhibitrice contre de nombreuses levures. Malheureusement, il s'avère qu'il existe une prévalence élevée de résistance innée également dans de nombreuses espèces fongiques. Ainsi, il a été montré qu'environ 60% des souches de *C. albicans* étaient sensibles, 36% étaient partiellement résistantes et 4% très résistantes. De plus, il est fréquent qu'il y ait des résistances secondaires et tout particulièrement chez les patients recevant de la 5-FC en monothérapie. C'est pourquoi, elle est généralement utilisée en combinaison avec d'autres traitements antifongiques, notamment, l'amphotéricine B ou le fluconazole, mais rarement, comme traitement unique (**Akins, 2005**).

En ce qui concerne les polyènes, même après plus de 40 ans d'utilisation, les résistances sont rares et n'ont pas posé de problème majeur dans la pratique clinique jusqu'alors, que ce soit pour la nystatine ou l'amphotéricine B. On peut cependant noter que quelques résistances ont été décrites chez *C. lusitaniae*, *C. glabrata* ou *C. guilliermondii*. Mais cette résistance est réversible. Les résistances aux polyènes s'expliquent par une moindre affinité du principe actif avec les stérols membranaires. Ainsi, une diminution en ergostérol diminue la liaison du polyène à la membrane et donc son action (**Kuriyama et al., 2005**). Les résistances des isolats de *C. albicans* à l'amphotéricine B sont rares. Il semble cependant que des résistances peuvent se développer chez les patients traités par chimiothérapie, notamment ceux ayant reçu un traitement antérieur par un polyène ou par un azolé. Enfin, il faut garder à l'esprit que des résistances croisées sont possibles et même fréquentes ; non seulement entre différents azolés, mais également entre des azolés et des polyènes (**Vazquez, 2006 ; White et al., 1998**).

Ces résistances soulignent la nécessité d'intensifier la recherche de nouvelles substances potentiellement antifongiques efficaces sur ces souches. L'investigation de nouveaux composés bioactifs peut se faire soit à partir des microorganismes, soit des plantes (**Dulger et al., 2006**) ; ces dernières peuvent être investiguées seules ou en combinaison soit avec les molécules antifongiques disponibles, soit avec d'autres plantes (**van Vuuren et Viljoen, 2011**).

VI. Les extraits de plantes médicinales comme alternative thérapeutique aux infections fongiques

Actuellement, tous les scientifiques, les firmes pharmaceutiques s'accordent sur la nécessité de développer de nouveaux médicaments antifongiques, potentiellement actifs sur toutes les variantes génétiques d'une espèce fongique, et faiblement toxiques. Nombreuses sont les substances bioactives isolées des plantes ; ainsi, dans la recherche de nouveaux composés antifongiques, des investigations sur les extraits de plantes doivent être menées (**van Vuuren et Viljoen, 2011**).

La médecine traditionnelle africaine n'utilise pas une seule plante pour soigner une maladie, mais plutôt une combinaison de différentes parties provenant de diverses espèces à des fins d'optimisation de l'effet recherché. En effet, l'utilisation des combinaisons en thérapeutique est de plus en plus acceptée, et particulièrement dans la lutte contre les maladies infectieuses. L'OMS a demandé aux compagnies pharmaceutiques d'arrêter la promotion de l'utilisation de la monothérapie pour le traitement des infections comme le paludisme ou la tuberculose. La polythérapie est donc devenue indispensable dans la lutte contre les souches microbiennes multi-résistantes (**van Vuuren et Viljoen, 2011**). La diversité végétale camerounaise comprend une liste non exhaustive de famille de plantes et il serait judicieux d'avoir un aperçu synoptique de celles ayant des activités antifongiques confirmées par des publications scientifiques.

VI.1. Les familles de plantes douées d'activités antifongiques

De la multitude des familles de plantes meublant la végétation, une petite partie a été prospectée pour leurs propriétés antifongiques (**Sati et Joshi, 2011**). Les principales familles de plantes médicinales camerounaises investiguées pour leurs activités antifongiques sont répertoriées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Quelques familles de plantes à activité antifongique du Cameroun

Familles de plantes	Exemples	Préparations utilisés
Annonaceae	<i>Piptostigma calophyllum</i>	Extraits (Zeuko'o et al., 2012)
	<i>Uvaria muricata</i>	Extraits (Toghueo, 2012)
	<i>Xylopia aethiopica</i>	Huiles essentielles (Kenfack, 2010)
Combretaceae	<i>Terminalia catappa</i>	Extraits et fractions enrichies (Toghueo, 2012)
Euphorbiaceae	<i>Croton zambesicus</i>	Extraits (Ngouana, 2008)
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i>	Huiles essentielles (Selguetia, 2012; Hounda, 2010)
	<i>Ocimum canum</i>	
	<i>Ocimum gratissimum</i>	
Verbenaceae	<i>Vitex grandifolia</i>	Extraits (Taffou, 2008)
	<i>Vitex rivularis</i>	
Myrtaceae	<i>Syzigium aromaticum</i>	Huiles essentielles (Eke, 2012)
Rutaceae	<i>Zanthoxylum</i>	Huiles essentielles (Eke, 2012 ; Ngumang, 2012)
	<i>xanthoxyloides</i>	
Hypéricaceae	<i>Hypericum lanceolatum</i>	Huiles essentielles (Ngumang, 2012)
	<i>Hypericum riparium</i>	

Dans le cadre du présent travail, les Annonaceae et les Combretaceae ont été utilisées.

VI.2. La famille des Annonaceae

Les Annonaceae sont une grande famille végétale avec environ 128 genres et plus de 2300 espèces végétales. Les plantes appartenant à cette famille sont ligneuses et comprennent les arbres, les arbustes, les arbrisseaux, les buissons sarmenteux ou encore les lianes (**Le Thomas, 1969**). Elle est constituée de plusieurs genres dont le genre *Monodora*.

VI.2.1. Le genre *Monodora* et l'espèce *Monodora tenuifolia*

Ce genre est composé d'arbres et d'arbustes persistants ; les feuilles, simples et entières, sont alternes et astipulées. Les fleurs, actinomorphes et hermaphrodites, sont solitaires, pendantes, souvent portées par de longs pédoncules. Les fruits sont ovoïdes à globuleux, avec un épicarpe souvent ligneux (**Le Thomas, 1969**). Ce genre est répandu dans les forêts d'Afrique tropicale et

de Madagascar ; il est constitué d'une vingtaine d'espèces avec notamment *Monodora tenuifolia*.

Tableau 7 : Les dénominations de *Monodora tenuifolia* (Focho et al., 2010 ; Njoku, 2005)

Synonymes	Noms communs	Noms vernaculaires
<i>Monodora cabrae</i>	<i>Monodora</i> à feuilles ténues,	Maka (Est) : pèpè ; Ntoumou, Bakweri
De Wild	Noix de muscade africaine, Arbre à fleurs d'orchidée.	(Sud-Ouest) : Ebo osé ; Igbo : Ehuru Ofia ; Yoruba : Lakosin.

➤ Description botanique

C'est un petit arbre de 4 mètres de hauteur sur 20 centimètres de diamètre, avec les fleurs pendantes, très décoratives apparaissant juste avant les feuilles. Les fruits sinueux, sont suspendus à une longue tige verte avec de nombreuses graines incorporées dans une pulpe blanchâtre ; les graines sont globulaires et ovoïdes, longues de 10 centimètres et avec un diamètre d'environ 8 centimètres (Njoku, 2005) ; elles sont protégées par une coque et ont une odeur aromatique caractéristique (Njoku, 2005 ; Neilson, 1965). Les feuilles sont longues et ovales, à la base arrondie, de couleur verte claire et répandues sur tout l'arbre (Ndoye, 2001) ; les fleurs ont des sépales également ovales, longues de 50 millimètres et des pétales blanchâtres, ponctués de rouge.



Figure 17 : *Monodora tenuifolia*, graines, fleurs et feuilles (Ezenwali et al., 2010)

➤ **Ecologie et distribution**

M. tenuifolia est typique des forêts arborescentes de taille moyenne ou arbustives ; la plante pousse sur la terre ferme, entre 0 et 900 mètres d'altitude. Elle est cultivée en Malaisie, dans l'Est de l'Inde et en Afrique occidentale (**Njoku, 2005**). Elle est également très répandue en Afrique de l'Ouest et Centrale allant de la Guinée à l'Est de la République Démocratique du Congo, en passant par le Cameroun. Cette espèce est rencontrée dans les régions du Centre, de l'Est et du Sud-Ouest Cameroun (**Ndoye, 2001**).

➤ **Usages ethnobotaniques**

Monodora tenuifolia est utilisée dans l'art culinaire traditionnel comme épice et agent relevant la saveur (**Irvine, 1961**). Ses graines sont comestibles et contiennent une huile utilisée pour la cuisson et les fritures en Afrique occidentale (**Eggeling, 1952**).

L'ethnomédecine utilise des parties de l'arbre pour soigner différentes pathologies, entre autres les feuilles contre la dysenterie, les racines contre les dermatoses, l'écorce contre les céphalées et le mal de dents (**Ndoye, 2001**). Les graines sont empâtées puis utilisées comme insecticides et pour le traitement de la constipation (**Oguntimein et al., 1989**). L'huile essentielle extraite des graines est utilisée dans diverses préparations pharmaceutiques (**Talalaji, 1965**). Les graines rôties et moulues sont utilisées contre les infections de la peau (**Irvine, 1961**). Les décoctions de racines et d'écorces sont utilisées par prise orale contre la fièvre et les dysenteries (**Focho et al., 2010**).

➤ **Travaux scientifiques effectués**

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle extraite des racines de cette plante par **Oguntimein et al. (1989)** a montré qu'elle est composée de 13,5% de monoterpènes hydrocarbonés, 3,1% de monoterpènes oxygénés, 33,4% de sesquiterpènes hydrocarbonés, de 20,0% de sesquiterpènes oxygénés.

En **2001**, **Ndoye** a fait une étude analytique de la composition chimique de l'huile essentielle extraite des graines de *M. tenuifolia* puis évalué ses propriétés antiradicalaires et antioxydantes.

En 2005, Njoku a montré que les extraits et fractions des graines de *M. tenuifolia* ont de très bonnes activités antioxydantes.

Ezenwali et al. (2010) ont mis en évidence les propriétés anti-diarrhéiques et la faible toxicité des extraits de graines de *M. tenuifolia*.

La fraction enrichie en flavonoïdes de l'extrait des graines présente une DL50 supérieure à 5000mg/kg lors des tests de toxicité sur des souris de souche *Swiss albino* (Ekeanyanwu et al., 2013).

VI.2.2. La famille des Combretaceae et le genre *Terminalia*

La famille des Combretaceae est constituée de plus de 600 espèces d'arbres, arbustes et de lianes, réparties en 20 genres (Satabié, 1983) ; parmi lesquels le genre *Terminalia*. Il se reconnaît par son tronc qui est fortement fissuré, ses feuilles alternes et surtout par ses fleurs apétales, hermaphrodites ou unisexuées males. Les fruits sont aplatis et portent deux ailes (Thiombiano et al., 2006). Ce sont des arbres forestiers de grande taille, ou des arbustes de la savane. Ce genre comprend 100 à 150 espèces tropicales, dont une trentaine en Afrique, 11 espèces au Cameroun, parmi lesquelles 9 espèces sont indigènes, 2 espèces ont été introduites (Satabié, 1983).

VI.2.2.1. *Terminalia Catappa* Linné

Tableau 8 : Les dénominations de *Terminalia catappa* (Fofana, 2004)

Synonymes	Noms communs	Noms vernaculaires
<i>Phytolacca javanica</i> Osbeck	Anglais : tropical, beach,	M'handaya (Comores)
<i>Terminalia mauritiana</i> Blanco	or Indian almond	Cocoma (Côte d'Ivoire)
<i>Terminalia moluccana</i> Lamk	Français : Amandier des	
<i>Terminalia procera</i> Roxb	tropiques, Badamier	

➤ Description botanique

C'est un arbre de 10 à 35 mètres, à fût court ; cime étagée et hémisphérique. Les feuilles sont spiralées, avec généralement 15 à 36 cm de long sur 8 à 24 cm de large ; le pétiole est court et épais, les nervures sont très marquées et peu nombreuses. Les fruits ont des drupes

fusiformes, plus ou moins aplaties, mesurant entre 3,5 et 7 cm de long, contre 2 à 5 cm de large (Fofana, 2004 ; Satabié, 1983).



Figure 18 : Illustration de quelques parties de *Terminalia catappa* Linné (Photo personnelle, Ngouana, 2013)

➤ **Ecologie et distribution**

La plante affectionne surtout les plages sableuses ou rocheuses et se retrouve ainsi au Cameroun tout le long de la côte. Elle est originaire d'Asie tropicale, introduite un peu partout dans les régions tropicales, où elle est très souvent plantée comme arbre d'avenue (Fofana, 2004).

➤ **Usages ethnobotaniques**

Le bois issu de *Terminalia catappa* est de très bonne qualité ; les graines, riches en huiles sont comestibles. Les feuilles sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner les plaies et la blennorrhagie ; infusées, elles sont utilisées contre la dysenterie, l'hypertension et les amygdalites ; les décoctions soignent l'asthme. Les graines saupoudrées sont utilisées contre les parasites intestinaux (Fofana, 2004).

➤ **Travaux scientifiques publiés**

Babayi *et al.* (2004) ont montré l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, avec une CMI de 1,25mg/ml et 5,00mg/ml respectivement.

Fofana (2004) a évalué le pouvoir immunogène de l'extrait aqueux des feuilles et a montré que la dose de 10 mg/kg de poids corporel induit un effet immunogène chez le lapin.

Caesar (2007) a évalué les activités antioxydante, antifongique, antibactérienne et complexatrice des molécules du complément des extraits aqueux, éthanolique, décocté et infusé des écorces du tronc.

Ackah et al. (2008) ont montré l'activité antifongique de l'extrait aqueux des écorces sur les isolats de *C. albicans*.

N'Guessan et al. (2011) ont évalué l'effet de l'extrait aqueux des feuilles sur la glycémie chez le lapin et ont observé qu'à 2,50 mg/ml il n'a aucun effet hypoglycémiant significatif mais à 10,00 mg/ml, il réduit l'hyperglycémie à 1,05 g/L.

Kuo-ChingWen et al. (2011) ont montré l'effet protecteur des extraits aqueux et méthanolique vis-à-vis des dommages causés par les radiations ultraviolettes sur les fibroblastes, à la dose d'1mg/ml.

Zirihi et al. (2012) ont évalué et comparé les activités antifongiques de *Terminalia catappa* et de *Terminalia mantaly* sur la croissance in vitro d'*Aspergillus fumigatus* ; de cette étude il est ressorti que l'extrait résiduel des écorces de *T. mantaly* est 128 fois plus actif que celui de *T. catappa*.

L'extrait aqueux des feuilles s'est montré non toxique à la dose de 2000mg/kg chez les rats (**Arjariya et al., 2013**).

VI.2.2.2. *Terminalia mantaly* H. Perrier de la Bâthie

Tableau 9 : Les dénominations de *Terminalia mantaly* (**Arbonnier, 2004**)

Synonymes	Noms communs	Noms vernaculaires
	Anglais : Umbrella tree	Terminalia (Malgache)
	Français : Amandier de Madagascar	

➤ Description botanique

T. Mantaly est un arbre de 10 à 20 mètres, à rameaux étagés et à écorce lisse. Ses branches, à la base longues et au sommet courtes, sont étagées et ont la forme d'un parasol. Les feuilles sont lisses, vertes claires quand elles sont jeunes, en rosettes terminales de 4 à 9 feuilles inégales sur des tiges courtes et épaisses, longues d'environ 7cm. Les fleurs sont petites et

verdâtres, en épis dressés de 5 cm de long ; les fruits sont petits, ovales et les graines, sans ailettes, peuvent atteindre 1,5 cm de long (Zirihi et *al.*, 2012; Arbonnier, 2004; Satabié, 1983).



Figure 19 : Quelques images de *Terminalia mantaly* (photo personnelle, Ngouana, 2013)

➤ **Ecologie et distribution**

Terminalia mantaly est une essence des forêts denses et sèches de l'Ouest de Madagascar, surtout le long des cours d'eau et dans les dépressions. L'espèce pousse sur tous les types édaphiques entre 0 et 2000 mètres, mais préfère les sols humides et les bords des cours d'eau. Elle a besoin d'un sol fertile pour mieux se développer. La plante est répartie en Afrique centrale, orientale et australe ; allant du Sénégal au Cameroun, jusqu'en Ouganda (Arbonnier, 2004).

➤ **Usages ethnobotaniques**

Le bois obtenu de la plante est utilisé en menuiserie d'intérieur ordinaire, dans la fabrication des portes, fenêtres, escaliers, les cloisons, les habillages ; le montage des manches d'outils et comme bois de feu (Arbonnier, 2004).

La plante est également très prisée en pharmacopée traditionnelle. En effet, l'écorce et le bois sont utilisés à Madagascar pour soigner la dysenterie. L'ethnomédecine africaine utilise les décoctions et infusions de feuilles dans le traitement de plusieurs pathologies, entre autres les gastroentérites, l'hypertension artérielle, le diabète, les affections buccodentaires et cutanées, les candidoses buccales et génitales (Coulibaly, 2006).

➤ **Travaux scientifiques publiés**

Yaye et al. (2011) ont évalué l'activité antifongique des extraits aqueux, hydroéthanolique et des fractions de l'écorce sur *Candida albicans* ; le résidu non soluble dans l'hexane s'est avéré être le plus actif alors que la fraction au chlorure de méthylène était la moins active.

Zirihi et al. (2012) ont effectué une étude à la fois évaluative et comparative des activités antifongiques de *T. catappa* et de *T. mantaly* sur la croissance *in vitro* d'*Aspergillus fumigatus* ; de cette étude il est ressorti que l'extrait résiduel de l'écorce de l'espèce *T. mantaly* est 128 fois plus actif que celui de *T. catappa*.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I. Cadre de l'étude

I.1. Choix et justification du lieu de l'étude

Cette étude s'est déroulée à l'Hôpital Central de Yaoundé au service de l'hôpital de jour. En effet, cet hôpital situé en plein cœur de la ville de Yaoundé est doté d'un Hôpital de jour (dirigé par le Dr Charles Kouanfack), qui fait office de centre de traitement agréé pour la prise en charge des PVVIH. Avec une file active de plus de 15 000 malades VIH positifs, l'échantillonnage et l'accès à la documentation des malades sont aisés. De plus, l'Hôpital Central est doté d'un service d'urgences médicales qui est la porte d'entrée des patients avec suspicion de méningite. Le laboratoire central de cet hôpital est pourvu d'un plateau technique qui permet la mise en place d'un processus de diagnostic mycologique respectant les normes de contrôle qualité.

I.2. Echantillonnage et considérations éthiques

Cette étude a été de nature prospective et descriptive avec pour population cible les patients VIH positifs, suivis à l'Hôpital Central de Yaoundé et étant suspectés de développer une candidose muqueuse ou la cryptococcose neuro-méningée. Etaient inclus dans l'étude tout patient VIH positif âgé de plus de 15 ans, présentant une suspicion de cryptococcose neuro-méningée et consentant à participer à l'étude. En outre, pour la recherche des *Candida*, les patients consentants pour donner leurs prélèvements muqueux étaient admis dans l'échantillonnage. Les patients VIH positif et diabétiques, sous chimiothérapie anticancéreuse, ou enceintes ont été exclus de l'étude.

Le recrutement des patients s'est fait de manière consécutive sur la période de décembre 2009 à novembre 2013 et l'effectif de l'échantillon évalué au terme de cette étude.

En prélude à cette étude, une clairance éthique a été obtenue auprès du Comité National d'Ethique (annexe 2). Une clairance administrative a été obtenue auprès de la Direction de l'Hôpital Central de Yaoundé permettant de mener l'étude dans ce site. Cette autorisation administrative a par la suite été renouvelée en cas de nécessité. Une fiche d'information a été mise à la disposition des patients pour être informés des objectifs de l'étude et des implications de leur participation (annexe 2). La notice de consentement éclairé a également été fournie et chaque patient devant participer à l'étude après avoir compris le contenu de la notice

d'information devait signer la fiche de consentement éclairé ou, au cas où il était dans l'incapacité de le faire, un représentant légal de sa famille le faisait à sa place.

L'enquête des patients a consisté à recueillir nombre d'informations épidémio-cliniques utiles dans la compréhension et l'analyse des données (annexe 2).

II. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques de *C. neoformans*

II.1. Diagnostic mycologique

II.1.1. Le prélèvement : la ponction lombaire

La ponction lombaire est un examen médical consistant à recueillir le liquide céphalo-rachidien (LCR) dans la cavité sub-arachnoïdienne par une ponction dans le dos, entre deux vertèbres. Elle est effectuée par un médecin.

II.1.2. L'examen direct

➤ Examen macroscopique

L'examen macroscopique du LCR consiste à noter l'aspect (trouble ou clair) et la couleur (eau de roche, jaunâtre, hématique).

➤ Examen microscopique à l'état frais

Une goutte de LCR est montée sur une cellule de Malassez puis observée au microscope objectif 10x puis 40x. Les leucocytes, les hématies, les éléments levuriformes sont recherchés et dénombrés.

➤ Examen à l'encre de Chine du LCR

Le LCR est centrifugé à 1000g pendant 15 minutes. Une goutte du culot de centrifugation est montée entre lame et lamelle dans une goutte d'encre de Chine diluée au 1/3 puis observée au microscope objectif 10x puis 40x. La capsule de *Cryptococcus* est mise en évidence par un halo clair entourant les cellules, car cette capsule repousse l'encre de Chine.

➤ **Examen microscopique après coloration de Gram**

Elle est utilisée pour compléter l'examen à l'état frais et rechercher d'éventuelles bactéries dans le LCR. Après confection du frottis et coloration, la préparation est observée au microscope, objectif 100X à immersion.

II.1.3. L'analyse biochimique du LCR

Il s'agit de doser le glucose, les protéines et les ions chlorure dans le LCR.

➤ **Principes**

Le glucose est dosé par la méthode de Trinder (**Tietz, 2006**). Le glucose est oxydé par la glucose oxydase en acide glucuronique et H_2O_2 qui réagit avec la peroxydase et le 4-Amino-antipyrine pour former une quinonéimine rouge. L'absorbance à 500nm du complexe formé est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon.

Les protéines sont titrées par la méthode de Fujita en 1983 et modifiée par **Watanabe et al., (1986)**. Le rouge de pyrogallol combiné au molybdate de sodium forme un complexe rouge qui absorbe à 460nm. En milieu acide, la fixation de ce complexe sur les groupements aminés déplace le pic d'absorption à 600nm. L'intensité de la coloration bleue mesurée à 600nm est proportionnelle à la concentration en protéines dans l'échantillon.

Les ions chlorures réagissent avec le thiocyanate mercurique non dissocié pour former du chlorure mercurique non dissocié et des ions thiocyanates libres. Les ions thiocyanates réagissent avec le fer ferrique pour former un composé coloré rouge, le thiocyanate ferrique dont l'absorbance est proportionnelle à la concentration en ions chlorure dans le spécimen (**Burtis et al., 2006**).

Les protocoles expérimentaux et les réactifs ont été fournis par Biolabo SA, Maizy, France.

II.1.4. La recherche de l'antigène cryptocoque par le test d'agglutination sur latex

Le test est basé sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées par un anticorps anti-cryptocoque avec des échantillons contenant des antigènes capsulaires polysaccharidiques de *C. neoformans* (**Reiss et al., 2002**).

Le LCR est centrifugé 15 minutes à 1000g pour le clarifier. Le surnageant est récupéré et chauffé à 100°C pendant 5 minutes. L'on ajoute 25µl de contrôle positif, de contrôle négatif et de chaque échantillon prétraité de LCR dans des cercles de la carte-test. Le réactif latex (25µl) est ajouté dans chaque cercle. Un mouvement de rotation est effectué manuellement à environ 100 trs/min pendant 5 minutes à température ambiante. Les réactions sont immédiatement lues sur fond foncé et les agglutinations sont comparées sur une échelle allant de Négatif à 4+. Le contrôle positif doit donner une agglutination 2+ ou supérieure et le contrôle négatif doit être inférieur à 1+.

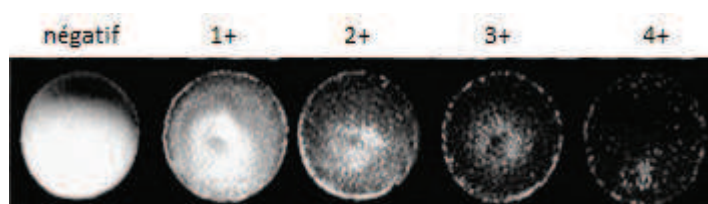


Figure 20: Images d'interprétation du test d'agglutination sur latex de négatif à 4+.

Négatif : suspension homogène de particules sans aucune agglutination visible

1+ : fine granulation sur fond blanc laiteux

2+ : agglutinats fins bien définis sur fond légèrement trouble

3+ : agglutinats gros et fins sur fond clair

4+ : gros agglutinats sur fond très clair

Les réactifs et le protocole ont été fournis par Fumouze diagnostics, Levallois Perret, France.

II.1.5. La culture

La culture est utilisée pour l'isolement et l'identification des levures. Le milieu de culture utilisé est la gélose Sabouraud+chloramphénicol (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

➤ Contrôle qualité du milieu de culture

Le milieu de culture préparé suivant les recommandations du fabricant et coulé en boîtes de Pétri de 90mm de diamètre est soumis à 3 contrôles : (i) Le contrôle de stérilité par incubation d'une boîte de Pétri à 37°C pendant 24 heures pour s'assurer de l'absence de pousse microbienne ; (ii) le contrôle de fertilité par culture d'une souche de *C. albicans* connue sur le milieu nouvellement préparé pendant 24h à 37°C ; et (iii) le contrôle de spécificité par ensemencement de plusieurs souches de microorganismes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus et *C. albicans*). L'inhibition de la croissance bactérienne et la croissance fongique témoignent de la spécificité du milieu.

➤ **Ensemencement, incubation et interprétation**

Le produit biologique est déposé à la surface de la gélose puis ensemencé selon la méthode des 3 cadrans. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 1 à 14 jours. Toute culture positive est prise en compte dans le cas du LCR comme infection.

II.1.6. Identification phénotypique et biochimique de *Cryptococcus neoformans*

➤ **Test à l'urée indole**

C. neoformans possède une uréase qui dégrade l'urée en ion ammonium et gaz carbonique. Cette hydrolyse s'accompagne d'une alcalinisation qui provoque le virage au rouge violet du rouge de phénol utilisé comme indicateur coloré (Cox et al., 2000).

Quelques colonies de la culture sont introduites dans un tube contenant 1ml d'urée indole, homogénéisé et incubé à 37°C pendant 3h. Un virage du milieu de l'orangé au rouge violet traduit une positivité du test (Cox et al., 2000).

➤ **Culture sur milieu aux graines de Niger (*Guizotia abyssinica*)**

La phénol-oxydase est une enzyme membranaire de *C. neoformans*. Elle catalyse l'oxydation des phénols en pigments mélaniques qui font virer les colonies vers le marron ou le noir sur le milieu aux graines de Niger (Ruchi et al., 2011).

Préparation du milieu : 50g de graines de Niger sèches sont broyées dans un mixeur puis transférés dans un erlenmeyer contenant 1l d'eau distillée. Le tout est porté à ébullition pendant 30 minutes, la phase huileuse est décantée, le reste de la suspension est filtré à travers le papier filtre Wattman N°1. Dans le filtrat sont ajoutés 1g de glucose, 1g de créatinine, 1g de KH_2PO_4 (phosphate de potassium), 15g de bacto-agar. Le volume est ensuite ajusté à 1l et le pH à 5,5. Le tout est autoclavé à 110°C pendant 20 minutes. Le milieu est ensuite coulé dans les boîtes de Pétri de 90mm de diamètre et laissé pour solidification.

Culture : La culture fraîche sur Sabouraud est repiquée sur le milieu Niger nouvellement préparé. L'incubation se fait à 37°C pendant 3 à 5 jours. La pureté de la culture de *C. neoformans* est établie par la présence dans la boîte de Pétri des colonies toutes marrons.

Les isolats de *C. neoformans* sont conservés dans des cryotubes avec cryobilles à -80°C.

II.2. Etude de la diversité génétique de *C. neoformans*

II.2.1. Isolement des clones de *C. neoformans*

Les isolats sont repiqués à partir des cryotubes sur milieu gélosé de Sabouraud+chloramphénicol. Un ensemencement par cadran est ensuite réalisé en boîte de Pétri de 90mm de diamètre et incubé 48 heures à 37°C. Cinq colonies prises au hasard sont isolées de chaque culture. Au terme de cette étape, l'on dispose pour chaque prélèvement de 5 colonies et d'un prélèvement initial.

II.2.2. Extraction de l'ADN de *C. neoformans*

L'ADN est extrait par la méthode de fixation sur membrane de silice à l'aide des sels chaotropiques. Le kit d'extraction est le NucleoSpin quick pure fourni par Macherey-Nagel Gmb et Co. KG, Duren, Allemagne.

L'ADN génomique est extrait dans une solution contenant de grandes quantités d'ions chaotropiques en présence de protéinase K. Les conditions optimales de fixation de l'ADN sur la membrane de silice sont établies par addition d'éthanol et de fortes concentrations en sel dans le lysat. Le lavage élimine les contaminants et l'ADN est élué prêt à l'emploi en présence de faible force ionique à pH alcalin (**Nedjma et al., 2005 ; Kamoun et al., 2003**).

Une öse de 10µl de culture fraîche de 48 heures est introduite dans un tube de 2ml contenant des billes de verre 0,45mm de diamètre (Glasperlen Braun Biotech International) et 350µl de tampon de lyse (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) fourni par Promega Co. Le mélange est passé 4 fois au broyeur cellulaire MagnaLyser (Roche) à 6000 vibrations par minutes pendant 40 secondes. Cette opération permet de casser les capsules, les parois et les membranes pour libérer le contenu intracellulaire. Ce lysat primaire est incubé 15 minutes à 70°C en présence de 25µl de protéinase K et de 200µl de tampon de lyse BQ1 ajoutés et homogénéisés 15 secondes au vortex.

On ajoute 200µl d'éthanol absolu au lysat obtenu, passé 15 secondes au vortex puis à la centrifugation short-spin pendant 10 secondes jusqu'à 12100xg (MiniSpin plus eppendorf) afin d'accélérer la précipitation des protéines. Six cent µl du surnageant sont récupérés délicatement et introduits dans la colonne chromatographique avec membrane de silice. Une centrifugation à 11000xg pendant 1 minute permet l'adsorption de l'ADN sur la membrane de silice et l'élimination des contaminants en même temps. La colonne est lavée avec 350µl de tampon BQ2 contenant 80% d'éthanol et du NaCl par centrifugation à 11000xg pendant 3 minutes. Pour l'élution de l'ADN, 50µl de tampon d'élution (Tris-HCl, 5mM, pH 8,5) préchauffé à 70°C sont ajoutés dans la colonne séchée, incubés 1 minute à température ambiante et centrifugés 1 minute à 11000xg. L'ADN récupéré est prêt à l'emploi.

Dosage de l'ADN et dilution

Après avoir fait un blanc (eau pure DEPC 0,1%) et calibré l'appareil (biophotomètre Eppendorf), 60µl de solution d'ADN diluée 1/50 sont introduits dans la cuve et l'analyse lancée. L'appareil affiche la concentration de l'ADN en ng/µl ainsi que la pureté qui est le rapport de l'absorbance 260nm/280nm. Des aliquotes sont constitués en diluant l'ADN à 50ng/µl et à 10ng/µl.

II.2.3. Principe et généralités de la PCR

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase), est une technique de répllication ciblée *in vitro* Imaginée par K. Mullis en 1985. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou «primers» en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. Le schéma général de la PCR est résumé dans la figure 21 (Sambrook *et al.*, 1989).

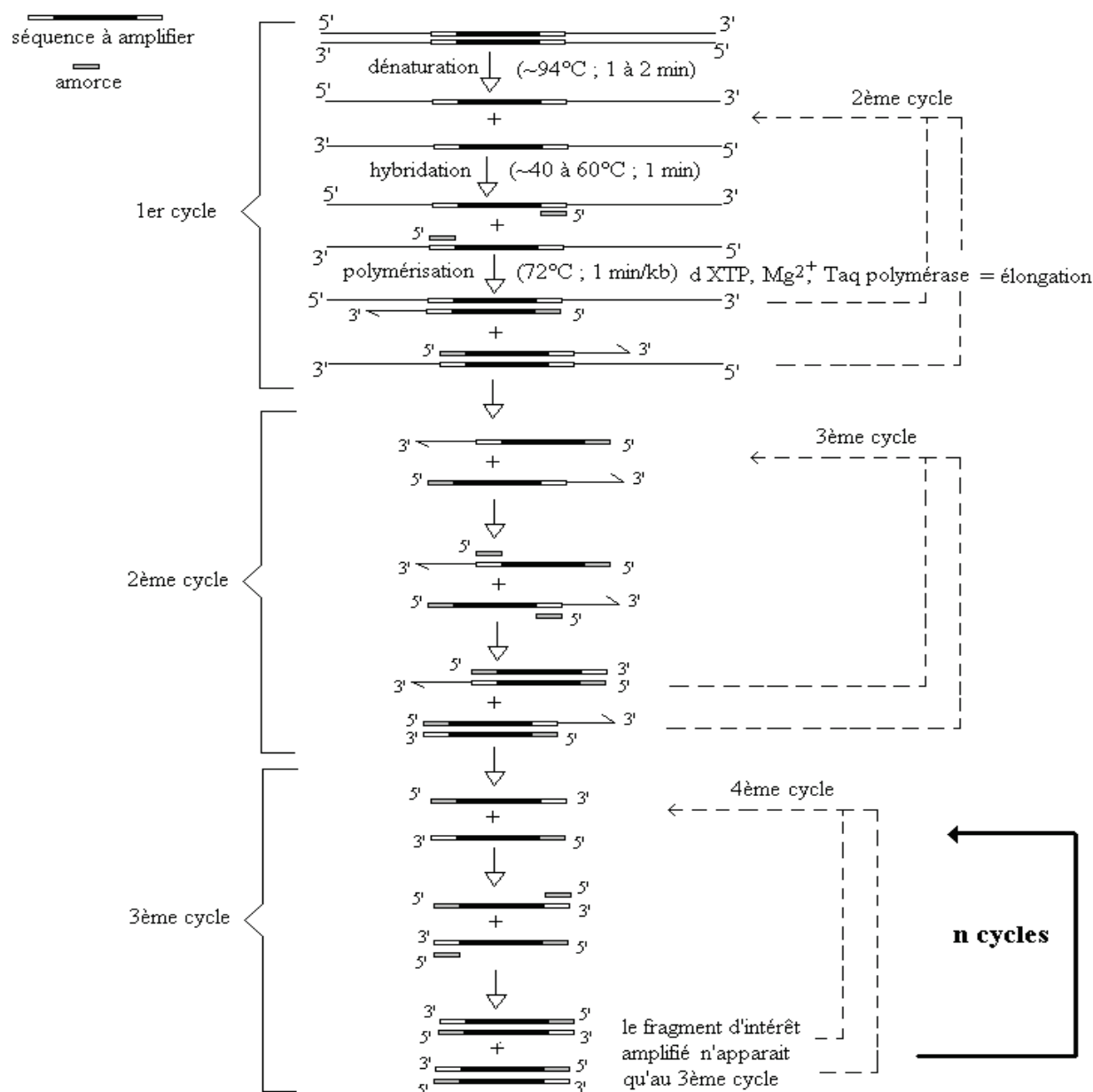


Figure 21: Schéma général de la PCR (Sambrook *et al.*, 1989).

II.2.4. Etude de la diversité génétique de *C. neoformans*

II.2.4.1. Sérotypage par PCR multiplex

Alors que la PCR standard utilise généralement une paire d'amorces pour amplifier une séquence spécifique, la PCR multiplex utilise des paires multiples d'amorces pour amplifier simultanément plusieurs séquences. Le sérotypage de *C. neoformans* utilise 6 amorces pour amplifier les gènes de l'antigène capsulaire CAP64 et de la laccase LAC1. En effet, les gènes de la laccase LAC1 différencient les sérotypes A, B, C, et D mais ne différencient pas le sérotype D

de l'Hybride AD, ce qui est possible par amplification du gène CAP64. Les séquences d'amorces utilisées sont ci-dessous présentées. Elles ont été fournies par Sigma Aldrich, St Louis, USA.

LAC1-1 : 5'-GGAACAGCAACCACACTACTG-3'

LAC1-2 : 5'-CATATTGGGTGGCATCTTACTGAGGGA-3'

LAC1-3 : 5'-CCAGGGAACATGTTGTTGAC-3'

LAC1-4 : 5'-GTTGTGGAAGGCAAAGAAAC-3'

CAP64-1 : 5'-GCCAAGGGAGTCTTATATGG- 3'

CAP64-2 : 5'-GCAAAGGGTTCACCAAATCG- 3'

Les conditions de réalisation du mélange réactionnel pour la PCR sont résumées dans le tableau 10 et ont été décrites par **Ito-Kuwa et al., 2007**.

Tableau 10: Mélange réactionnel pour la PCR multiplex du sérotypage de *C. neoformans*.

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume prélevé	Fournisseur
Eau DEPC		Qsp 50µL	22,5µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Tampon	5X	1X	10µL	Promega Co, Road·Madison, USA
MgCl ₂	25mM	1,5mM	3µL	Promega Co, Road·Madison, USA
dNTPs	10mM	0,2mM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
LAC1-1	5µM	0,2µM	2µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
LAC1-2	5µM	0,2µM	2µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
LAC1-3	5µM	0,2µM	2µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
LAC1-4	5µM	0,2µM	2µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
CAP64-1	5µM	0,2µM	2µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
CAP64-2	5µM	0,2µM	2µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Taq	5u/µL	0,05u/µL	0,5µL	Promega Co, Road·Madison, USA
ADN	10ng/µL	0,2ng/µL	1µL	

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type Primus 96 (Clemens GMBH Dachdeckerstr, 5 97297 Waldbuettelbrunn). Les conditions sont les suivantes : dénaturation

initiale 94°C, 3minutes ; dénaturation 94°C, 30secondes ; hybridation 47°C, 60secondes, extension 72°C, 1,5minutes pour 40 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 7 minutes (**Ito-Kuwa et al., 2007**). Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

II.2.4.2. Typage moléculaire par PCR-RFLP du gène URA5

II.2.4.2.1. Réalisation de la PCR

Le gène de l'orotidine monophosphate pyrophosphorylase (URA5) impliqué dans la synthèse des purines est utilisé pour étudier le polymorphisme génétique chez *C. neoformans* et permet de classer les espèces en types moléculaires VNI, VNII, VNIII, VNIV. Les endonucléases *Hha1* et *Sau96I* sont utilisées pour digérer les amplicons du gène URA5 (**Meyer et al., 2003**).

Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification du gène URA5 est URA5 (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') et SJ01 (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3'). La PCR se réalise selon le protocole décrit par **Meyer et al., 2003**.

Les conditions de réalisation du mélange réactionnel pour la PCR sont résumées dans le tableau 11.

Tableau 11: Mélange réactionnel pour la PCR du gène URA5 chez *C. neoformans*.

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume prélevé	Fournisseur
Eau DEPC		Qsp 50µL	32,5µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Tampon	5X	1X	10µL	Promega Co, Road·Madison, USA
MgCl ₂	25mM	1,5mM	3µL	Promega Co, Road·Madison, USA
dNTPs	10mM	0,2mM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
URA5	10µM	0,2µM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
SJO1	10µM	0,2µM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Taq	5u/µL	0,05u/µL	0,5µL	Promega Co, Road·Madison, USA
ADN	50ng/µL	1ng/µL	1µL	

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type Techne TC-5000 (Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA). Les conditions sont les suivantes : dénaturation initiale 94°C, 2 minutes ; dénaturation 94°C, 45 secondes ; hybridation 61°C, 60 secondes, extension 72°C, 2 minutes ; 35 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 10 minutes (**Meyer et al., 2003**).

II.2.4.2.2. Digestion des amplicons

Il s'agit d'une double digestion à l'aide des endonucléases *Sau96I* et *Hha1* fournies par Thermo scientific, USA.

Sau96I est isolée de *Staphylococcus aureus* et reconnaît le site

5'...G↓G N C C...3'

3'...C C N G↑G...5'

Hha1 est isolée de *Haemophilus haemolyticus* et reconnaît le site

5'...G C G↓C...3'

3'...C↑G C G...5'

Le mélange réactionnel de digestion est récapitulé dans le tableau 12.

Tableau 12: Mélange réactionnel pour la digestion des amplicons du gène URA5 chez *C. neoformans*.

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume prélevé
Eau millipore DEPC		Qsp 33µL	18µL
Tampon tango	10X	0,6X	2µL
<i>Sau96I</i>	220u/µL	10u/µL	1,5µL
<i>HhaI</i>	220u/µL	10u/µL	1,5µL
Produit PCR			10µL

Après formation du mélange réactionnel, celui-ci est délicatement homogénéisé et incubé à 37°C pendant 3 heures. La réaction est arrêtée par chauffage du milieu réactionnel à 95°C pendant 20 minutes. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

II.2.4.3. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA)₄, (GTG)₅ et minisatellite M13.

Les microsatellites (GACA)₄ (5' GACAGACAGACAGACA 3') et (GTG)₅ (5'GTGGTGGTGGTGGTG 3') ainsi que le minisatellite du phage M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') sont utilisés pour l'étude de la diversité génétique chez *C. neoformans* par détermination des empreintes génétiques (Meyer *et al.*, 2003).

Les conditions de réalisation des PCR sont regroupées dans le tableau 13.

Tableau 13: Mélange réactionnel pour les PCR des minisatellites M13 et microsatellites (GTG)₅ et (GACA)₄ chez *C. neoformans*

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume prélevé	Fournisseur
Amplification de M13 et (GTG)₅				
Eau DEPC		Qsp 50µL	32,5µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Tampon	5X	1X	10µL	Promega Co, Road·Madison, USA
MgCl ₂	25mM	1,5mM	3µL	Promega Co, Road·Madison, USA
dNTPs	10mM	0,2mM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Amorce	10µM	0,4µM	2µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Taq	5u/µL	0,05u/µL	0,5µL	Promega Co, Road·Madison, USA
ADN	50ng/µL	1ng/µL	1µL	
Amplification de (GACA)₄				
Eau DEPC		Qsp 50µL	38µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Tampon	10X	1X	5µL	Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France
MgCl ₂	50mM	1,5mM	1,5µL	Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France
dNTPs	10mM	0,2mM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Amorce	10µM	0,4µM	2µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Taq	5u/µL	0,05u/µL	0,5µL	Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France
ADN	50ng/µL	2ng/µL	2µL	

L'amplification de M13 et (GTG)₅ est réalisée dans un thermocycleur de type Techne TC-5000 (Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA). Les conditions sont les suivantes : dénaturation initiale 94°C, 3 minutes ; dénaturation 94°C, 30 secondes ; hybridation 50°C, 60 secondes, extension 72°C, 1,5 minutes ; 40 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 6 minutes (**Meyer et al., 2003**).

L'amplification du microsatellite (GACA)₄ est réalisée dans un thermocycleur de type Primus 96 (Clemens GMBH Dachdeckerstr, Waldbuettelbrunn). Les conditions sont les suivantes :

dénaturation initiale 94°C, 3 minutes ; dénaturation 94°C, 30 secondes ; hybridation 40°C, 60 secondes, extension 72°C, 1,5 minutes pour 40 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 7 minutes (**Meyer et al., 2003**).

Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel Poly(Nat) à 6% Wide Mini S-2x25 (Elchrom Scientific, Ebersberg, Allemagne). L'analyse des profils pour la génération des dendrogrammes est effectuée grâce à l'algorithme UGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean).

II.2.4.4. Electrophorèse des amplicons

La technique de l'électrophorèse est fondée sur le déplacement d'ions sous l'effet d'un champ électrique. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'électrophorèse, ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres.

Les acides nucléiques peuvent être séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel est réalisé en dissolvant 1-2% (m/v) d'agarose dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) additionné de bromure d'éthidium (BET, 5 µg/ml) qui permet de visualiser les acides nucléiques sous rayons UV. L'ADN à analyser est additionné de tampon de charge 4X (glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,25%, TBE 1X) et déposé dans un puits du gel. La migration s'effectue dans un appareil à électrophorèse jusqu'à la séparation désirée (**Reddy and Raju, 2012**).

- **Electrophorèse sur gel d'agarose**

Le gel à 1,5% est préparé en dissolvant 1,5g d'agarose (Euromedex) dans 100ml de tampon TBE 0,5X (Tris-HCl 90 mM, H₃BO₃ 90 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8). Le tout est porté à ébullition dans un four microonde pendant 2 minutes (jusqu'à disparition des grumeaux). Le gel est refroidi jusqu'à 60°C puis 5µl de BET (5µg/ml) sont ajoutés, le tout homogénéisé et coulé dans le moule contenant le peigne. Après polymérisation du gel, le peigne est enlevé et le gel est placé dans la cuve de migration contenant du tampon TBE 0,5X (Promega) jusqu'à immersion complète du gel.

Cinq μ l de chaque amplicon sont homogénéisés avec 1 μ l de tampon de charge 4X (glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,25%, TBE 1X) et introduits dans les puits correspondant du gel. Le marqueur de poids moléculaire est introduit dans le premier puits au volume indiqué par le fabricant. La cuve est fermée et le générateur mis en marche à 5V/cm (75V pour les cuves de 15cm). La migration se fait pendant 30 minutes.

Après migration, les gels sont emportés dans la chambre à rayons UV et la photographie est prise à partir d'un appareil photo relié à l'ordinateur et géré par le logiciel Gensnap sgd.

- **Electrophorèse sur gel haute résolution**

Le gel haute résolution PolyNat 6% (Elchrom Scientific, Ebersberg, Allemagne) est un polymère fourni prêt à l'emploi, il permet la séparation des fragments allant jusqu'à 2000 pb. Les gels sont utilisés dans les conditions définies par le fabricant.

Les gels sont sortis du réfrigérateur et laissés à température ambiante pendant 1 heure placés dans la cuve de migration (Origins, fournies par Elchrom Scientific, Ebersberg, Allemagne) contenant du TAE 1X (Tris Acetate EDTA). Les conditions de refroidissement sont : température 20°C et délai de pompe 4,5 minutes. Les amplicons préparés dans une microplaque de 96 puits avec 2 μ l de tampon de charge et 8 μ l d'amplicons sont introduits dans les puits du gel avec le marqueur de taille correspondant dans le premier puits. Le générateur et l'appareil de migration sont mis en marche. La migration se fait à 10V/cm (120V) pendant 1h45 minutes.

Après la migration, les gels sont détachés de leur support plastique et colorés dans un bac avec du BET (0,25 μ g/ml) dilué dans le tampon TAE 1X pendant 30minutes, puis les images des profils de migration sont prises par photographie dans la chambre à rayons UV.

II.3. Etude de la sensibilité de *C. neoformans* aux antifongiques par la méthode de dilution en milieu liquide à l'aide du kit Sensititre Yeast One

Le système de sensibilité Sensititre est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à tester la sensibilité des levures non-exigeantes dont *Candida* et *Cryptococcus* à divers antifongiques. Cette méthode de microdilution en milieu liquide fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sous forme d'une plaque sèche (**Espinel-Ingroff et al., 2004 ; Linares et al., 2004 ; Pfaller et al., 2004**).

On prélève plusieurs colonies bien isolées de plus de 1mm de diamètre dans une culture pure de 48 à 72 heures de l'isolat de *Cryptococcus*, et elles sont émulsifiées dans de l'eau physiologique stérile. La suspension est agitée au Vortex pendant 15 secondes, en veillant à ce que la suspension soit uniforme. S'il se produit des agglutinations, on les laisse se déposer avant d'ajuster la densité selon une norme 1 McFarland à l'aide du turbidimètre.

Ensuite, on transfère 20µl de la suspension dans 11ml de milieu liquide d'inoculum Yeast One, pour obtenir un inoculum de $1,5 \text{ à } 8 \times 10^3$ cellules/ml. Le milieu liquide est versé dans une cuve d'ensemencement stérile et 100µl sont inoculés dans chaque cupule de la plaque à l'aide d'une micropipette multicanaux.

Enfin, on couvre toutes les cupules avec la fermeture adhésive en évitant les plis car ils pourraient entraîner des sauts et les plaques sont incubées à 35°C pendant 72 heures. Le kit est fourni par TREK Diagnostic Systems Limited ; Imberhorne Lane, UK.

Lecture des résultats

Les plaques sont lues visuellement sous l'éclairage normal du laboratoire, à l'aide d'un miroir de lecture présentant le dessous des cupules. La croissance des levures dans les solutions antifongiques est mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance du bleu (négatif) au rouge (positif). Certaines levures peuvent ne pas faire virer complètement l'indicateur au rouge, mais entraînent une prise de teinte pourprée notamment pour les azolés.

La CMI représente la plus faible concentration d'un antifongique qui inhibe substantiellement la croissance de l'organisme, comme le détecte le changement de couleur. Le degré de changement de couleur dans les cupules contenant l'antifongique est comparé à la couleur des cupules de contrôle de croissance positive.

- Aucune croissance n'est survenue s'il n'y a pas de virage de l'indicateur bleu à n'importe quelle dilution d'un antifongique. L'organisme est sensible à la plus faible concentration de l'antifongique.
- La CMI est enregistrée comme la plus faible concentration de l'antifongique empêchant le développement d'une cupule de croissance rouge, c'est à dire le premier bleu ou pourpre.
- L'organisme est résistant à la plus haute concentration de l'antifongique quand la croissance est observée dans les cupules.
- Pour l'amphotéricine B à 24 heures, les points de virage se définissent en général facilement et la CMI est lue comme la plus faible concentration en antifongique empêchant tout changement de couleur discernable (premier puits bleu).
- La flucytosine et les azolés, tels que le fluconazole, l'itraconazole, le kétoconazole, le voriconazole et le posaconazole peuvent donner des points de virage en général moins tranchants en raison de la croissance diffuse. La CMI est lue comme la première cupule montrant un virage moins intense comparé à la cupule de contrôle à croissance positive.
- *C. neoformans* n'est pas sensible à la caspofungine, donc cet antifongique n'est pas pris en compte dans les antifongiques testés.

Les souches *Candida krusei* ATCC® 6258 et *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 sont utilisées comme souche de contrôle qualité.

Tableau 14: Antifongiques utilisés et dilutions des plaques Sensititre Yeast One.

Position	Antifongique	Abréviation	Fourchette de dilution (µg/ml)
A1	Control de croissance	+ cont	
A2-A12	Posaconazole	PZ	0,008-8
B1-B12	Amphotéricine B	AB	0,008-16
C1-C12	Fluconazole	FZ	0,125-256
D1-D12	Itraconazole	IZ	0,008-16
E1-E12	Kétoconazole	KZ	0,008-16
F1-F12	Flucytosine	FC	0,03-64
G1-G12	Voriconazole	VOR	0,008-16
H1-H12	Caspofungine	CAS	0,008-16

III. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques de *C. albicans*

III.1. Diagnostic mycologique

III.1.1. Le prélèvement

➤ Prélèvement bucco-pharyngé

Le prélèvement est réalisé par écouvillonnage de la muqueuse buccale et pharyngée à l'aide d'un écouvillon en coton stérile.

➤ Prélèvement des selles

Les selles sont émises dans un pot propre. Les parties douteuses (glaise, présence de sang) de la selle sont prélevées de préférence.

➤ Prélèvement vaginal

La patiente en dehors de sa période menstruelle, n'ayant pas eu de rapports sexuels la veille et n'ayant pas fait de toilette vaginale le matin, le prélèvement est effectué à l'aide de deux écouvillons en coton stérile au niveau du cul de sac vaginal après pose d'un spéculum non humidifié.

➤ Prélèvement urinaire

Les urines émises en milieu de jet sont recueillies pour environ 10 à 20ml dans un pot à urine stérile.

Tous ces prélèvements sont transportés au laboratoire dans une glacière entre 4 et 10°C.

III.1.2. L'examen direct

➤ Examen macroscopique

L'examen macroscopique des urines consiste à noter l'aspect (trouble ou clair) et la couleur (eau de roche, jaunâtre, hématique).

L'aspect, la consistance des selles, la couleur, la présence ou non de mucus, l'odeur sont les éléments observés pendant l'examen macroscopique des selles.

L'aspect des leucorrhées vaginales, leur couleur, leur odeur sont notés. La présence ou non de dépôt blanchâtre, d'érythème dans la muqueuse buccale sont les éléments macroscopiques du prélèvement buccopharyngien. Ils sont notés au moment du prélèvement.

➤ **Examen microscopique à l'état frais**

Une goutte d'urine est montée sur une cellule de Malassez puis observée au microscope objectif 10x puis 40x. Les leucocytes, les hématies, les levures sont recherchées et dénombrées.

Une goutte de selle, de prélèvement bucco-pharyngien ou de leucorrhées est montée entre lame et lamelle dans de l'eau physiologique puis observée au microscope. Pour les selles, en plus des levures, d'éventuels éléments parasitaires sont recherchés.

Au microscope, une recherche de levures positive se traduit par la présence de petites cellules de 2 à 4 μ , à paroi mince, rondes ou ovalaires, bourgeonnantes ou non, accompagnées parfois de filaments mycéliens, formés d'articles de longueur variable, de 3 à 5 μ m de diamètre ; aux extrémités arrondies.

➤ **Examen microscopique après coloration de Gram**

La coloration de Gram est utilisée pour compléter l'examen à l'état frais, typer la flore de Veillon (intestinale), la flore de Dodderlein (vaginale). Après confection du frottis et coloration, la préparation est observée au microscope, objectif 100X à immersion.

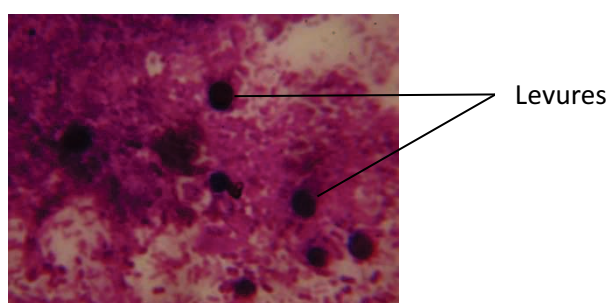


Figure 22 : Image des levures après coloration de Gram (100 $\times$) (photo personnelle, Ngouana, 2012)

III.1.3. La culture

➤ Ensemencement et incubation

Le produit biologique est déposé à la surface de la gélose puis ensemencé selon la méthode des 3 cadrans. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

➤ Lecture et interprétation

Au terme du temps d'incubation, les cultures sont interprétées selon les critères décrits par **Bouchara *et al.*, (2010)** ci-dessous et seules les levures à caractère pathogène (colonisation) sont prises en compte pour la suite :

- Une culture supérieure ou égale à 10^4 ufc/ml dans le cas des urines traduit une colonisation ou une probable infection urinaire dans le cas de patient non sondé.
- Un nombre de colonies supérieur ou égale à 10 d'une culture de prélèvement vaginal est considéré comme étant une colonisation.
- 5 à 10 colonies par cm^2 pour les cultures issues d'un écouvillonnage bucco-pharyngien sont en faveur du caractère pathogène (colonisation) de la levure isolée.
- Une culture $\geq 10^4$ ufc/g ($\approx$ noisette de selle) traduit une probable infection gastro-intestinale (colonisation).

III.1.4. Identification phénotypique et biochimique des levures

➤ Culture sur milieu chromogène

Les cultures de levures à caractère pathogène sont repiquées sur milieu chrom ID (Can2) fourni par bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Outre l'identification présomptive de *C. albicans*, la culture sur ce milieu permet de rechercher les cultures à plusieurs espèces de levures.

L'hydrolyse spécifique d'un substrat chromogène d'hexosaminidase (N-acétyl- β -D-galactosaminidase) en présence d'un inducteur de l'enzyme entraîne la coloration bleue des colonies de *C. albicans*. L'éventuelle hydrolyse d'un deuxième substrat permet de différencier les cultures mixtes et d'orienter l'identification vers d'autres espèces.

Les cultures sur milieu Sabouraud sont repiquées sur le milieu Can2 selon la méthode des cadrans pour avoir des colonies isolées. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h à 48h. Les

colonies isolées sont ensuite identifiées, leur couleur notée et elles sont repiquées sur des pentes de milieu Sabouraud chloramphénicol.

➤ **Test de filamentation ou test de blastèse**

Les cultures de colonies isolées sur milieu Can2 sont soumises au test de filamentation dans du sérum de mouton.

Les protéines et les sucres contenus dans le sérum permettent aux levures (ayant la capacité) de produire des tubes germinatifs suite à un accroissement de leur métabolisme protéique. Ce test permet une rapide identification présomptive des levures du complexe *C. albicans*. Le sérum humain, de mouton, ou de bovin est indiqué pour le test (Isibor *et al.*, 2005).

Une anse de culture pure est introduite dans un tube contenant 0,5ml de sérum de mouton, homogénéisé et incubé à 37°C pendant 3 heures. La suspension est ensuite observée entre lame et lamelle au microscope à 10x et 40x.

Le tube germinatif ne présente pas d'étranglement à sa base contrairement au bourgeon habituel ou au pseudomycélium. Si un certain nombre de cellules présente un tube germinatif, la souche étudiée appartient complexe *C. albicans*.

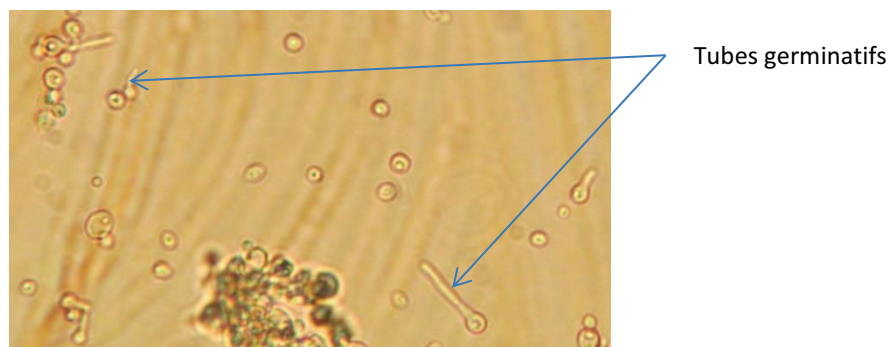


Figure 23 : Aspects des tubes germinatifs produits par les espèces du complexe *Candida albicans* lors du test de blastèse (photo personnelle, Ngouana, 2012).

➤ **Test de chlamydosporulation sur milieu Pomme de terre-Carotte-Bile (PCB)**

Dans des conditions de croissance difficile, notamment pauvreté en sucres simples, richesse en amidon, présence de tensioactif, semi-anaérobiose et basse température (25-30°C), *C. albicans* et *C. dubliniensis* sont capables de produire des spores de résistance appelées chlamydospores. Les autres levures du genre *Candida*, à l'exception de *C. glabrata*, produisent dans les mêmes conditions des mycéliums vrais (Sonneborn *et al.*, 1999).

Préparation du milieu PCB : l'on pèse 20g de pulpe de pomme de terre, 20g de pulpe de carotte, et on mesure 15ml de bile de poulet à l'aide de l'éprouvette graduée; puis le tout est dissout dans environ 300ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 10 à 15 minutes, laissé refroidir puis filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman N°1. Le filtrat est versé dans une fiole jaugée de 1000ml et 20g de bacto-agar y sont ajoutés. Le milieu est porté à ébullition, le volume complété à 1000ml et stérilisé à 121°C pendant 15 minutes.

Ensemencement : Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile une culture pure de levures puis la strier sur la gélose PCB en créant de fentes dans la surface de la gélose. Poser une lamelle stérile sur les stries. Refermer la boîte de Pétri et recouvrir ensuite les bords de la boîte à l'aide du papier parafilm. Incuber à 28°C pendant 72heures.

Lecture et résultats : Observer la culture à l'objectif 10x puis 40x.

- Une filamentation associée à des chlamydospores terminales ou latérales traduit l'espèce *C. albicans* ou *C. dubliniensis*.
- Une filamentation bien développée sans chlamydospore traduit une levure du genre *Candida*.
- Une absence de filamentation et de chlamydosporulation traduit la présence de toute autre levure non *Candida* à l'exception de *C. glabrata*.

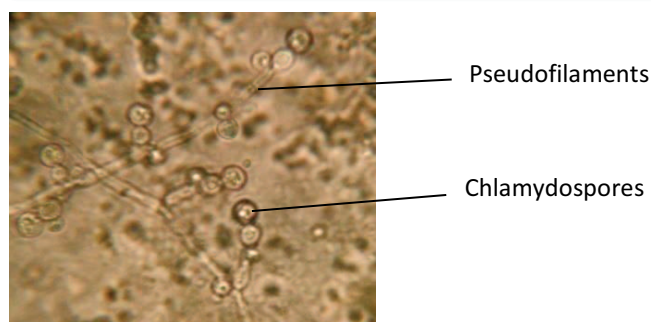


Figure 24: Aspect des chlamydospores de *Candida albicans* (40× sur PCB) (photo personnelle, Ngouana, 2012).

➤ **Croissance à 42°C**

C. albicans pousse bien à 42°C, ce que ne font pas les autres espèces de ce complexe, *C. dubliniensis*, *C. stellatoidea* type I et *C. africana*. Les cultures fraîches de 24 heures sont repiquées sur milieu Sabouraud chloramphénicol et incubées à 42°C pendant 48 heures.

➤ **Etude des caractères biochimiques par la galerie ID32C**

L'étude de l'assimilation de différentes sources carbonées (auxanogramme) permet d'identifier les différentes espèces de levures. La galerie ID32C comporte 32 cupules contenant chacune un substrat carboné sous forme déshydratée. La levure à tester est mise en suspension dans un milieu semi solide. La lecture s'effectue après 24-48 heures d'incubation à 30°C. L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

On prépare un inoculum fongique à une concentration correspondant à une densité de 2 sur l'étalon de McFarland. On transfère 250µl de cet inoculum dans 7ml du milieu API C medium et on homogénéise. Dans chaque cupule de la galerie, 135µl de la suspension précédente sont introduits et incubés à 30°C pendant 24-48 heures.

La croissance des levures dans les différentes cupules est codée en un profil numérique permettant l'identification en comparaison avec la base de données *apiweb*TM.

Les réactifs et les protocoles sont fournis par bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France.

III.1.5. Identification à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technologie apparue ces dernières années en microbiologie permettant d'identifier les microorganismes en analysant directement leur profil protéique.

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge. Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI=Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = Time-Of-Flight). Elle permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader. La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides.

L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge (M/Z). Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre. La matrice est constituée de molécules cristallisées dont les plus utilisées sont l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide sinapinique et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) (Bizzini *et al.*, 2010).

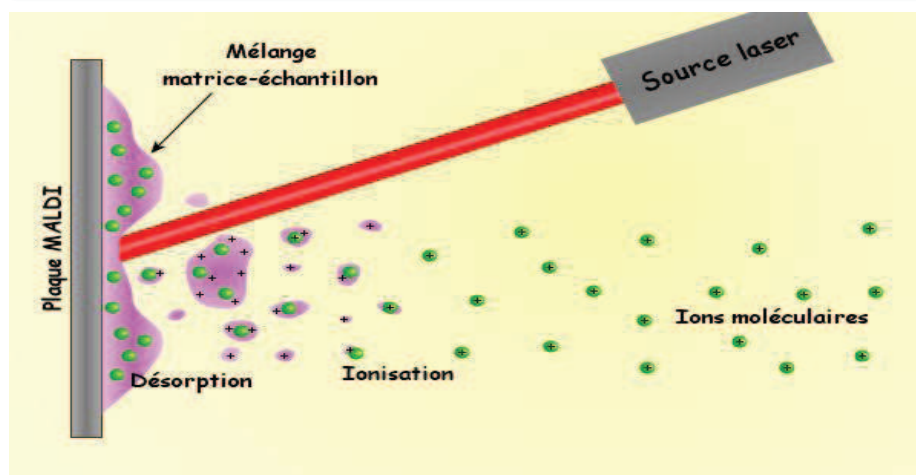


Figure 25 : Principe d'ionisation par la technique MALDI (Bizzini *et al.*, 2010).

La calibration se fait à l'aide d'une culture fraîche de 24 heures de la souche d'*Escherichia coli* ATCC 8739. Le dépôt de cette souche se fait sur lame DS, sur un puits prévu à cet effet (Figure 26). Le calibrateur est lu avant et après chaque série et sert de témoin interne à la validation des résultats.



Figure 26: Exemple de lame DS (à gauche) et porte lame contenant 4 lames (à droite) utilisés dans la technique MALDI-TOF (Bizzini *et al.*, 2010).

La préparation des échantillons se fait à partir de la Prep Station (Figure 27). C'est un module constitué d'un ordinateur et d'un scanner optique servant à introduire les différentes données des échantillons et leur emplacement sur la lame DS. La Prep Station est reliée au programme Myla qui intègre et gère les résultats du Vitek MS avant leur transfert au système informatique du laboratoire.



Figure 27 : Prep station en capture d'écran lors de la mise en place de la technique MALDI-TOF MS (Bizzini *et al.*, 2010).

Pour la préparation des lames DS, à partir d'une culture fraîche de levures de 24 heures, prélever avec une anse calibrée de 1µl une colonie à tester et la déposer sur les puits cibles. L'échantillon est testé en double. Ajouter 0,5µl d'acide formique. Laisser sécher, puis ajouter 1µl de matrice CHCA.

Pour la calibration, un dépôt avec la souche *E. coli* 8739 est réalisé dans le puits prévu à cet effet et 1µl de matrice CHCA est ajouté.

Une fois la lame terminée, les données sont transférées de la Prep Station vers le Vitek MS, la lame DS est placée sur le porte-lame, le tout introduit dans le Vitek MS et l'analyse lancée.

Lecture et interprétation des résultats

Une fois l'analyse terminée, le MS affiche les résultats dans le programme « Myla » et indique le pourcentage d'identification. Les résultats sont classés par famille dans des tableaux Excel afin de déterminer le pourcentage d'identification pour les différents germes.

Les souches provenant de la routine, sont testées sur le MS en parallèle avec une méthode de référence afin de pouvoir confirmer l'identification.

III.1.6. Conservation des levures isolées

Les isolats obtenus sont ensemencés en tubes de 2ml dans le bouillon cœur-cerveille (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) puis, après 48heures d'incubation à 37°C, le glycérol stérile y est ajouté pour faire une concentration finale en glycérol de 30%. Les tubes sont ensuite congelés à -20°C ou à -80°C.

III.2. Etude de la diversité génétique de *C. albicans*

III.2.1. Extraction de l'ADN de *C. albicans*

L'ADN est extrait par la méthode de fixation sur membrane de silice à l'aide des sels chaotropiques. Le kit d'extraction est le NucleoSpin quick pure fourni par Macherey-Nagel Gmb et Co. KG, Duren, Allemagne et le protocole est le même que pour l'extraction de l'ADN de *C. neoformans*.

III.2.2. Etude de la diversité génétique de *C. albicans*

III.2.2.1. Amplification du gène *Hwp1*

Le couple d'amorce utilisé est (CR-f 5'-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3'/CR-r 5' GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3') et les conditions d'amplification du gène *Hwp1* sont décrites dans le tableau 15.

Tableau 15: Mélange réactionnel pour la PCR du gène *Hwp1* chez *C. albicans*

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume prélevé	Fournisseur
Eau DEPC		Qsp 50µL	32,5µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Tampon	5X	1X	10µL	Promega Co, Road·Madison, USA
MgCl ₂	25mM	1,5mM	3µL	Promega Co, Road·Madison, USA
dNTPs	10mM	0,2mM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
CR-f	10µM	0,2µM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
CR-r	10µM	0,2µM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Taq	5u/µL	0,05u/µL	0,5µL	Promega Co, Road·Madison, USA
ADN	50ng/µL	1ng/µL	1µL	

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type Techne TC-5000 (Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA). Les conditions sont les suivantes : dénaturation initiale 95°C, 5 minutes ; dénaturation 94°C, 45 secondes ; hybridation 58°C, 40 secondes, extension 72°C, 55 secondes ; 30 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 10 minutes (**Romeo et Criseo 2008**). Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

III.2.2.2. Génotypage ABC de *C. albicans*

McCullough *et al.* en 1997 ont développé des amorces qui amplifient le gène codant pour la synthèse de la région 25S de l'ARNr. La diversité génétique de cette région permet de classer *C. albicans* en 4 génotypes en fonction de la longueur des produits PCR. Le génotype A est à 450 pb, le génotype B à 840 pb, le génotype C à 450 pb et 840 pb, le génotype D à 1080 pb. Le génotype D est reconnu comme étant *C. dubliniensis* (Bii *et al.*, 2009 ; McCullough *et al.*, 1997). Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification du gène de la région 25s de l'ARNr est CA-INT-L (5'-ATAAGGGAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAA-3') et CA-INT-R (5'CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT-3'). La PCR se réalise selon le protocole décrit par Bii *et al.*, 2009.

Les conditions de réalisation du mix pour PCR sont résumées dans le tableau 16.

Tableau 16: Mélange réactionnel pour la PCR du gène de la région 25s de l'ARNr de *C. albicans*

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume prélevé	Fournisseur
Eau DEPC		Qsp 50µL	32,5µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Tampon	5X	1X	10µL	Promega Co, Road·Madison, USA
MgCl ₂	25mM	1,5mM	3µL	Promega Co, Road·Madison, USA
dNTPs	10mM	0,2mM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
CA-INT-L	10µM	0,2µM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
CA-INT-R	10µM	0,2µM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Taq	5u/µL	0,05u/µL	0,5µL	Promega Co, Road·Madison, USA
ADN	50ng/µL	1ng/µL	1µL	

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type Primus 96 (Clemens GMBH Dachdeckerstr, Waldbuettelbrunn). Les conditions sont les suivantes : dénaturation initiale 94°C, 3 minutes ; dénaturation 94°C, 60 secondes ; hybridation 65°C, 60 secondes, extension 72°C, 2,5 minutes pour 30 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

III.2.2.3. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites HIS3, EF3 et CDC3

Les séquences microsatellites de *C. albicans* sont définies en aval des gènes particuliers. Le premier microsatellite est identifié en aval de la séquence du gène du facteur d'élongation 3 (EF3) localisé sur le chromosome 5, le deuxième est identifié en aval de la séquence du gène de la protéine du cycle de division cellulaire 3 (CDC3) sur le chromosome 1, et le troisième est identifié en aval de la séquence du gène de imidazole glycérol phosphate déshydratase (HIS3) sur le chromosome 2. Ces microsatellites sont alors nommés EF3, CDC3 et HIS3 respectivement (**Botterel *et al.*, 2001; DiDomenico *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1992 ; Magee *et al.*, 1988**).

Les séquences microsatellites et les séquences d'amorces respectives sont présentées dans le tableau 17 (**Botterel *et al.*, 2001**).

Tableau 17: Séquences microsatellites et séquences d'amorces utilisées pour le typage moléculaire de *C. albicans*

Locus (numéro d'accèsion GenBank), chromosome	Séquence microsatellite	séquences d'amorce (sens et reverse)
CDC3 (Z25869), chromosome 1	(AGTA) ₈	5'-CAGATGATTTTTGTATGAGAAGAA-3' 5'-CAGTCACAAGATTAAAATGTTCAAG-3'
EF3 (Z11484), chromosome 5	(TTTC) ₅ (TTC) ₅	5'-TTTCCTCTTCCTTCATATAGAA-3' 5'-GGATTCACTAGCAGCAGACA-3'
HIS3 (AF006605), chromosome 2	(ATTT) ₁₃	5'-TGGCAAAAATGATATTCCAA-3' 5'-TACACTATGCCCCAAACACA-3'

Les conditions d'amplification des microsatellites EF3, CDC3, et HIS3 sont décrites dans le tableau 18.

Tableau 18: Mélange réactionnel pour la PCR des microsatellites EF3, CDC3, et HIS3 chez *C. albicans*

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume prélevé	Fournisseur
Eau DEPC		Qsp 50µL	29,5µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Tampon	5X	1X	10µL	Promega Co, Road·Madison, USA
MgCl ₂	25mM	3mM	6µL	Promega Co, Road·Madison, USA
dNTPs	10mM	0,2mM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Amorce-f	10µM	0,2µM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Amorce-r	10µM	0,2µM	1µL	Sigma Aldrich, St Louis USA
Taq	5u/µL	0,05u/µL	0,5µL	Promega Co, Road·Madison, USA
ADN	50ng/µL	1ng/µL	1µL	

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type Primus 96 (Clemens GMBH Dachdeckerstr, Waldbuettelbrunn). Les conditions sont les suivantes : dénaturation initiale 95°C, 5 minutes ; dénaturation 95°C, 30 secondes ; hybridation 55°C, 30 secondes, extension 72°C, 60 secondes ; 30 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 7 minutes (**Botterel et al., 2001**).

Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel haute résolution Spreadex EL 400 Wide Mini S-4x25 (Elchrom Scientific, Ebersberg, Allemagne). L'analyse des profils pour la génération du dendrogramme est effectuée grâce à l'algorithme UGPMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean).

III.2.2.4. Identification des souches par amplification des séquences ITS par PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une technologie basée sur la réaction enzymatique de la PCR et sur la mesure en continue de son produit. À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN totale ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet la mesure de la température de fusion des amplicons, ce qui permet, par comparaison, d'identifier les espèces dont l'ADN a été amplifié (**Dunyach et al., 2008 ; Schabereiter-Gurtner et al., 2007 ; Espy et al., 2006 ; Ferns et al., 2006 ; Bretagne et al., 2005**). La figure 28 présente quelques courbes de températures de fusion des amplicons pour quelques espèces de *Candida*.

La paire d'amorce ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') et ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') est utilisée pour l'amplification. Elle cible les régions conservées de l'ADNr 18s et 28s dont la longueur et le %GC des séquences sont variables en fonction de l'espèce (**Chang et al., 2001**).

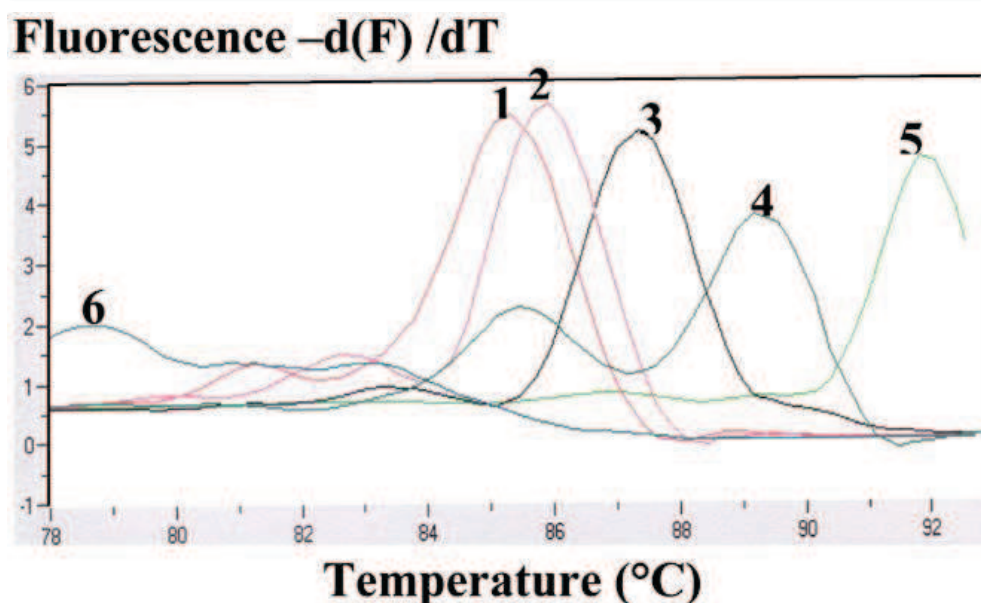


Figure 28: Exemple de résultats obtenus en PCR en temps réel. Les courbes de fusions donnent des pics correspondant à la température de fusion de chaque échantillon (**Dunyach et al., 2008**).

Les volumes requis de chaque composant du mélange réactionnel pour la PCR sont résumés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Mélange réactionnel pour la PCR en temps réel

	Concentration finale	Volumes prélevés
Eau de qualité PCR	Qsp20 μ l	12,4 μ l
MgCl ₂	3mM	2,4 μ l
Master Mix qPCR	1X	2 μ l
Amorce sens ITS1	0,3 μ M	0,6 μ l
Amorce antisens ITS4	0,3 μ M	0,6 μ l
Matrice ADN	(2,5ng/ μ l)	2 μ l

La PCR en temps réel nécessite l'utilisation du kit LightCycler® FastStart DNA master SYBR green kit (Roche Diagnostic, Meylan, France) contenant un tampon de réaction (KCl 100mM, Tris-HCl 40mM, pH=8,4), des dNTPs, une iTaq DNA polymérase, du SYBR Green I.

Le volume approprié de mélange réactionnel est transféré dans un tube capillaire et centrifugé brièvement.

Le programme PCR utilisé se divise en deux phases. La première est une phase d'amplification proprement dite. Elle comprend une dénaturation initiale de 10 min à 95°C puis 30 cycles avec

une étape de dénaturation (10s à 95°C), une étape d'hybridation (5s à 60°C) et une étape d'extension (30s à 72°C). Cette première partie s'achève par une élongation de 10 min à 72°C.

La seconde partie permet la détermination de la température de fusion. Il s'agit de réaliser des tests de dénaturation des doubles brins néo-synthétisés en passant de 51°C à 95°C avec des incréments de 0,1°C toutes les 10 secondes. Le T_m (température de fusion) des amplicons est ensuite déterminé à partir de l'évolution de la fluorescence émise dans le temps. Le T_m est la valeur de la température pour laquelle cette courbe a atteint son maximum. C'est à dire la température à partir de laquelle la chute de fluorescence émise est la plus rapide. La comparaison de ces T_m avec les T_m des souches connues permet d'identifier les souches d'identité inconnues.

III.2.2.5. Electrophorèse des amplicons

- **Electrophorèse sur gel d'agarose**

Le protocole est le même que précédemment décrit pour la migration des amplicons de *C. neoformans*.

- **Electrophorèse sur gel haute résolution**

Le gel haute résolution Spreadex EL 400 Wide Mini S-4x25 (Elchrom Scientific, Ebersberg, Allemagne) est un polymère fourni prêt à l'emploi, il permet la séparation des fragments de 75 à 400pb. Les gels sont utilisés dans les conditions définies par le fabricant.

Le gel est sorti du réfrigérateur et laissé à température ambiante pendant 1 heure et placé dans la cuve de migration (Origins, fournies par Elchrom Scientific, Ebersberg, Allemagne) contenant du TAE 1X (Tris Acetate EDTA), les conditions de refroidissement sont : température 55°C et délai de pompe 1,5 minutes. Les amplicons préparés dans une microplaque de 96 puits avec 2µl de tampon de charge et 8µl d'amplicons sont introduits dans les puits du gel avec le marqueur de taille correspondant dans le premier puits. Le générateur et l'appareil de migration sont mis en marche. La migration se fait à 10V/cm (120V) pendant 2h30 minutes.

Après la migration, les gels sont colorés avec du BET puis les images des profils de migration sont prises par photographie dans la chambre à rayons UV.

III.3. Etude de la sensibilité des isolats de *C. albicans* aux antifongiques

La microméthode de dilution en milieu liquide est la méthode de référence proposée par le Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) pour évaluer la sensibilité des levures aux antifongiques (CLSI, 2008).

- Les antifongiques sont l'amphotéricine B, le fluconazole, le kétoconazole, et l'itraconazole (Sigma Aldrich). La quantité de poudre nécessaire pour la réalisation de la solution stock est calculée par la formule :

$$\text{masse (mg)} = \frac{\text{volume (ml)} \times \text{concentration } (\mu\text{g/ml})}{\text{activité spécifique } (\mu\text{g/mg})}$$

- L'amphotéricine B, l'itraconazole et le kétoconazole sont dissouts dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) et le fluconazole est dissout dans de l'eau millipore stérile. Les concentrations testées sont dans les gammes :

Pour l'amphotéricine B : 0,0313 à 16µg/ml

Pour l'itraconazole : 0,0313 à 16µg/ml

Pour le kétoconazole : 0,0313 à 16µg/ml

Pour le fluconazole : 0,125 à 64µg/ml

- Le milieu RPMI 1640 (avec glutamine sans bicarbonate et sans indicateur coloré) est le milieu utilisé. Le tampon MOPS (acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique) est ajouté au milieu RPMI à la concentration finale de 0,165mol/l et le pH final ajusté à 7.
- Pour l'amphotéricine B, l'itraconazole et le kétoconazole, 2ml de solution stock sont préparés à 1600µg/ml dans un tube stérile (type Falcon). Les concentrations intermédiaires 100X de chaque dilution sont préparées comme décrit dans le tableau 20. Chacune de ces concentrations est ensuite diluée au 1/50 avec le milieu RPMI pour avoir les concentrations à 2X. Ces dernières concentrations sont ensuite réparties dans la microplaque à raison de 100µl par cupule et par concentration, de la cupule 10 (plus faible concentration) à la cupule 1 (plus forte concentration). Les cupules 11 et 12 reçoivent 100µl de milieu sans antifongique mais contenant du DMSO dilué à 1/50. Les plaques ainsi préparées sont stockées à -20°C jusqu'à usage.

Tableau 20: Préparation des dilutions d'antifongiques (amphotéricine B, itraconazole et ketoconazole) de concentration intermédiaire 100X dans le DMSO

Tube	Source/concentration d'antifongique (ATF) en µg/ml	Volumes (ml)		Concentration intermédiaire 100X (µg/ml)
		ATF	+ DMSO	
1	Solution stock à 1600µg/ml			1600
2	Tube 1 (1600)	0,5	+ 0,5	800
3	Tube 1 (1600)	0,5	+ 1,5	400
4	Tube 1 (1600)	0,5	+ 3,5	200
5	Tube 4 (200)	0,5	+ 0,5	100
6	Tube 4 (200)	0,5	+ 1,5	50
7	Tube 4 (200)	0,5	+ 3,5	25
8	Tube 7 (25)	0,5	+ 0,5	12,5
9	Tube 7 (25)	0,5	+ 1,5	6,25
10	Tube 7 (25)	0,5	+ 3,5	3,13

- Pour le fluconazole, 2ml de solution stock sont préparés à 1280µg/ml dans de l'eau millipore stérile. Les dilutions de concentrations intermédiaires (10X) sont préparées dans le RPMI tel que décrit dans le tableau 21. Ces concentrations sont ensuite diluées au 1/5^e dans le RPMI pour donner les concentrations de travail à 2X. Ces dernières concentrations sont ensuite réparties dans la microplaque à raison de 100µl par cupule et par concentration, de la cupule 10 (plus faible concentration) à la cupule 1 (plus forte concentration). Les cupules 11 et 12 reçoivent 100µl de milieu non supplémenté en antifongique. Les plaques ainsi préparées sont stockées à -20°C jusqu'à usage.

Tableau 21: Préparation des dilutions de fluconazole de concentration intermédiaire 10X dans le RPMI.

Tube	Source/concentration d'antifongique (ATF) en µg/ml	Volumes (ml)			Concentration intermédiaire 10X (µg/ml)
		ATF	+	DMSO	
1	Solution stock à 1280µg/ml	2	+	2	640
2	Tube 1 (640)	1	+	1	320
3	Tube 1 (640)	1	+	3	160
4	Tube 3 (160)	1	+	1	80
5	Tube 3 (160)	0,5	+	1,5	40
6	Tube 3 (160)	0,5	+	3,5	20
7	Tube 6 (20)	1	+	1	10
8	Tube 6 (20)	0,5	+	1,5	5
9	Tube 6 (20)	0,5	+	3,5	2,5
10	Tube 9 (2,5)	1	+	1	1,25

- L'inoculum est préparé à la concentration 0,5 de l'étalon de McFarland au densitomètre (Eppendorf) dans de l'eau physiologique stérile (NaCl, 0,85%) à partir d'une culture de levure (24 heures à 37°C). La concentration en microorganismes est de 1 à 5x10⁶ cellules/ml. Cet inoculum est ensuite dilué au 1/1000^e dans du milieu RPMI (10µl dans 10ml) puis, réparti dans les cupules de la microplaque préalablement dégivrée à raison de 100µl par cupule, excepté la cupule 11 dans laquelle seul 100µL de milieu RPMI sont encore ajoutés (cupule contrôle stérilité).
- Les plaques sont incubées à 35°C pendant 48 heures et les CMI déterminées à 24 heures et à 48 heures.
- Les souches de références qualité *Candida parapsilosis* ATCC 22019 et *Candida krusei* ATCC 6258 sont utilisées dans chaque test comme souches de contrôle qualité et la conformité de la CMI obtenue avec celle publiée confirme la validité des résultats obtenus.
- Les plaques sont lues à l'aide d'un miroir incliné. La culture de chaque puits est comparée à celle du témoin culture. Un score numérique de 0 à 4 est donné à chaque puits en utilisant l'échelle suivante :

- Score 0 : absence de culture, milieu optiquement clair (100% d'inhibition de croissance)
 - Score 1 : léger trouble (environ 75% d'inhibition, croissance d'environ 25% du témoin de culture)
 - Score 2 : forte réduction d'opacité (environ 50% d'inhibition, croissance d'environ 50% du témoin de culture)
 - Score 3 : légère réduction d'opacité ($\pm$ 25% d'inhibition, croissance d'environ 75% du témoin de culture)
 - Score 4 : pas de réduction d'opacité (pas de réduction d'opacité, croissance équivalente au témoin de culture sans antifongique).
- La CMI pour l'amphotéricine B est définie comme la concentration la plus faible pour laquelle on observe un score 0 ; pour les azolés, la CMI est la concentration la plus faible pour laquelle on observe un score 2.
- Les critères d'interprétation des résultats sont présentés dans le tableau 22.

Tableau 22: Critères d'interprétation de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) pour *Candida sp.* Après 48 heures d'incubation (CLSI M27-A3, 2008)

Antifongique	Sensible	Sensible selon la dose	Résistant
Fluconazole	≤ 8	16 – 32	≥ 64
Itraconazole	$\leq 0,125$	0,25 – 0,5	≥ 1
Kétoconazole	$\leq 0,125$	0,25 – 0,5	≥ 1
Amphotéricine B	≤ 1		≥ 2

IV. Etude de la sensibilité des isolats fongiques aux extraits de plantes

IV.1. Récolte et traitement du matériel végétal

Le matériel végétal est composé des organes de trois plantes médicinales très souvent sollicitées en médecine traditionnelle camerounaise pour soigner diverses pathologies infectieuses dont les mycoses et leurs manifestations.

Tableau 23: Récapitulatif des organes de plantes utilisés

Familles de plantes	Espèces utilisées	Organes prélevés
Annonaceae	<i>Monodora tenuifolia</i> Benth.	Feuilles, branches, tiges, pulpe des fruits, péricarpe des graines, pulpe des graines, péricarpe des fruits
Combretaceae	<i>Terminalia catappa</i> Linné	Feuilles et écorce du tronc
	<i>Terminalia mantaly</i> H.	Feuilles, fruits et écorce du tronc
	<i>Perrier de la Bâthie</i>	

Les échantillons de *M. tenuifolia* sont récoltés au mont Kalla (Périphérie de Yaoundé) ; les feuilles et les écorces de *T. catappa* sont récoltées à Yaoundé, au quartier Bastos; les organes de *T. mantaly* sont récoltés au sein du campus de l'Université de Yaoundé I (centre-ville). Les identités des plantes sont confirmées à l'Herbier National du Cameroun, et des spécimens y sont conservés sous les codes d'identification 30549/HNC pour *M. tenuifolia*, 51244/HNC pour *T. catappa*, et 64212/HNC pour *T. mantaly*.

Les organes de ces plantes sont découpés, puis séchés à l'ombre et à température ambiante jusqu'à déshydratation totale. Le matériel végétal sec est écrasé en fine poudre grâce à un Moulin.

IV.2. Obtention des extraits bruts

Cent grammes de chaque organe de *M. tenuifolia*, *T. catappa*, et de *T. mantaly* sont mis à macérer respectivement dans 300ml d'eau distillée, d'éthanol à 95° et d'une solution hydro-éthanolique (3/7, v/v), pendant 72 heures. Les mélanges sont agités deux fois par jour pour maximiser l'extraction des différents métabolites secondaires. Les macérâts obtenus sont filtrés à l'aide du papier filtre Wattman N°1, puis évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi 011) à 80°C pour les extraits éthanoliques et hydroéthanoliques, ou séchés dans un dessiccateur (Memmert UN30) à 60°C pour les extraits aqueux. Les résidus sont re-macérés deux fois de suite avec les mêmes volumes des différents solvants. Les extraits totaux ainsi obtenus sont pesés en vue de l'évaluation de leurs rendements d'extraction, calculés par la formule ci-dessous. Les extraits bruts sont conservés au réfrigérateur à 4°C pour utilisation ultérieure.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait brut obtenu (g)}}{\text{Masse de l'échantillon de matière végétale (g)}} \times 100$$

Les extraits bruts sont par la suite soumis à un test d'activité antifongique, à des fins de sélection de ceux qui ont une activité conséquente sur les isolats utilisés.

IV.3. Screening initial d'activité antifongique des extraits bruts

IV.3.1. Sélection primaire par la méthode de dilution en milieu solide

Principe : La dilution en milieu liquide consiste à incorporer l'extrait à tester au milieu de culture avant de le couler dans les boîtes de Pétri. Après inoculation et incubation, la croissance microbienne est mesurée et, en comparaison avec une boîte témoin, l'effet de l'extrait est évalué en calculant le pourcentage d'inhibition (**Therese et al., 2006 ; Moulari, 2005**).

Technique :

- Les isolats utilisés ont été sélectionnés des isolats issus de l'étude épidémiologique du fait de leur fréquence dans les isolements et de leur sensibilité réduite aux antifongiques testés. Il s'agit de : *Candida albicans* 194B, *Candida glabrata* 44B, *Candida parapsilosis* 56B et *Cryptococcus neoformans* CM003 et une souche de référence *Candida albicans* ATCC 37037. Ces souches sontensemencées sur gélose Sabouraud (Oxoid, UK) 48 heures avant la manipulation et incubées à 37°C.
- Les suspensions de levures utilisées pour les tests de sensibilité sont préparées à 2.10^4 Cellules/ml à partir des cultures de 48 heures, par dénombrement direct au microscope optique, *via* un hématimètre de Malassez. En effet, une öse de la culture jeune est introduite dans 5ml d'eau physiologique stérile, homogénéisée et comptée au microscope pour en déterminer la charge initiale. A partir de cet inoculum mère, une dilution est effectuée de manière à avoir une suspension de concentration 2.10^4 cellules/ml.
- Un gramme (1g) de chaque extrait brut est introduit dans un flacon étiqueté ; le volume est complété à 5ml avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10% pour les extraits éthanoliques et hydroéthanoliques ou de l'eau distillée pour les extraits aqueux. La solution est homogénéisée au vortex jusqu'à dissolution complète de l'extrait. Cette solution mère est concentrée à 200 mg/ml.

- Le milieu de culture, Mueller Hinton Agar (Oxoid, UK) est préalablement préparé d'après les consignes du fabricant et stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et maintenu en surfusion à 45°C dans le bain marie.
- Douze ml de ce milieu sont successivement introduits dans des tubes à essai à vis stériles, 3ml d'un seul extrait sont ajoutés par tube, homogénéisés instantanément puis coulés dans une boîte de Pétri identifiée de 90mm et laissés pour solidification. La concentration d'un extrait par boîte est de 40mg/ml.
- L'ensemencement se fait par écouvillonnage de la boîte de Pétri avec une suspension de levure préparée.
- Des témoins contenant le milieu de culture sans extrait et les levures utilisées sont également préparés dans les mêmes conditions que celles des essais. Le milieu de culture est supplémenté en DMSO à la même concentration dans les boîtes témoins que dans les boîtes tests.
- Le fluconazole à la concentration de 100µg/ml est utilisé comme contrôle positif.
- L'ensemble des boîtes de Pétri est incubé à 37°C pendant 48 heures ; quotidiennement, la croissance des colonies sur chaque boîte est appréciée et, à la fin du temps approprié d'incubation, les colonies sont dénombrées et les pourcentages d'inhibition évalués par la formule ci-après.

$$PI (\%) = \frac{\text{Nbre de colonies dans la boîte témoin} - \text{Nbre de colonies dans la boîte test}}{\text{nombre de colonies dans la boîte témoin}} \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition ; Nbre : nombre

Seuls les extraits présentant un pourcentage d'inhibition supérieur ou égal à 75 % sur au moins deux des isolats de levures sont retenus pour la suite des essais. Chaque test est effectué deux fois.

IV.3.2. Sélection secondaire par la méthode de dilution en milieu liquide

La recherche de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits bruts est effectuée *via* la méthode de microdilution en milieu liquide inspirée du protocole CLSI M27-A3 (**CLSI, 2008**) auquel des ajustements ont été effectués.

Principe : Une série de dilutions successives de la solution stock de l'extrait à une concentration déterminée est effectuée dans le milieu de culture ; on y ajoute ensuite un volume précis d'une

suspension microbienne (levures) de titre connu. A l'issue du temps nécessaire d'incubation à la température requise, on détermine la croissance ou l'inhibition de la croissance des microorganismes, par une observation visuelle du culot formé par le dépôt de levures dans le bouillon de culture (CLSI, 2008).

Technique :

- Les essais sont effectués dans les microplaques de titration de 96 puits, fond en U. le bouillon Mueller Hinton (Oxoid, UK) est utilisé comme milieu de culture et est préparé suivant les instructions du fabricant, puis stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15min.
- Cent cinquante µl de milieu de culture stérile sont introduits dans les huit premières cupules de la ligne 1 et 100µl dans le reste des cupules de la plaque ; ensuite, 50µl d'une solution d'un extrait concentré à 200 mg/ml sont prélevés et ajoutés aux 150 µl des premiers puits, diluant la concentration de ce dernier à 40mg/ml. Une série de dilutions de raison géométrique 2 est effectuée de la ligne 1 à la ligne 10 ; enfin, 50µl d'une suspension d'un seul isolat de levure, préparée au titre de 2.10^3 Cellules/ml sont ensemencés dans les cupules de la plaque (pour une concentration finale de $0,5.10^3$ cellules/ml et un volume final de 200µl), excepté celles de la ligne 11 qui ne contiennent que le milieu de culture et servent donc de témoin de stérilité du milieu de culture ; les concentrations d'extraits dans les puits d'une colonne de la plaque vont de 40 à 0.0391 mg/ml. Le contrôle positif fluconazole a une gamme de concentration de 64 à 0,12µg/ml. Les essais sont effectués en duplicate.
- Les plaques ainsi préparées sont incubées à 37 °C pendant 48 heures. A l'issue du temps d'incubation, la plus petite concentration d'une ligne donnée dans une plaque n'ayant aucune croissance visible du microorganisme testé correspond à la CMI de l'extrait concerné.
- Les extraits ayant une CMI moyenne ≤ 5 mg/ml avec une CMI médiane de 1,25mg/ml sur les 5 microorganismes testés sont retenus pour le fractionnement bio-guidé.

IV.4. Fractionnement bio-guidé des extraits bruts sélectionnés après le screening

IV.4.1. Chromatographie de partition liquide-liquide eau-chlorure de méthylène et détermination de la CMI des fractions

Dix grammes de chaque extrait brut sélectionné sont partitionnés entre 150ml d'eau (densité 1000Kg/m³) et 150ml de chlorure de méthylène (densité 1330Kg/m³) dans une ampoule à décanter. Le mélange effectué est agité et laissé reposer jusqu'à apparition de l'interface. La fraction au chlorure de méthylène (en dessous) est récupérée, concentrée à l'évaporateur rotatif. Le chlorure de méthylène récupéré est réintroduit dans l'ampoule. L'opération est répétée jusqu'à obtention d'une phase au chlorure de méthylène claire. La fraction aqueuse est enfin recueillie et séchée. Les rendements de partition sont calculés par rapport à la masse d'extrait de départ.

Les fractions obtenues sont testées sur les levures pour déterminer leurs concentrations minimales inhibitrices respectives. La méthode utilisée est celle de microdilution précédemment utilisée pour les extraits bruts, à la seule différence que la concentration de départ pour les fractions est fixée à 5mg/ml et la gamme de concentrations dans les puits d'une colonne va de 5 à 0.00488mg/ml.

L'évaluation des CMI des différentes fractions permet de sélectionner pour la seconde partition les fractions présentant une réduction de CMI par rapport à l'extrait brut et ayant une CMI moyenne inférieure ou égale à 1,25 mg/ml et une CMI médiane ≤0,62mg/ml sur les isolats testés.

IV.4.2. Chromatographie de partition liquide-liquide (hexane-méthanol) des fractions et détermination de la CMI des subfractions

Cinq grammes de chaque fraction sont partitionnés entre le méthanol (densité 791,8kg/m³) à 90% et l'hexane (densité 654,8kg/m³) à volume égal (75ml de chaque) donnant ainsi la subfraction hexanique et la subfraction méthanolique. Le protocole de partition est le même que précédemment.

Les subfractions obtenues sont soumises au test d'évaluation de l'activité antifongique *via* la méthode de microdilution précédemment décrite; la concentration de départ étant fixée à 1,25 mg/ml. Les subfractions présentant une réduction de CMI par rapport à la fraction de départ et

ayant une CMI moyenne $\leq 0,30\text{mg/ml}$ et CMI médiane $\leq 0,32\text{mg/ml}$ sont retenues pour les études d'interactions et de leur analyse phytochimique ; et la subfraction ayant la plus grande activité est sélectionnée pour la purification.

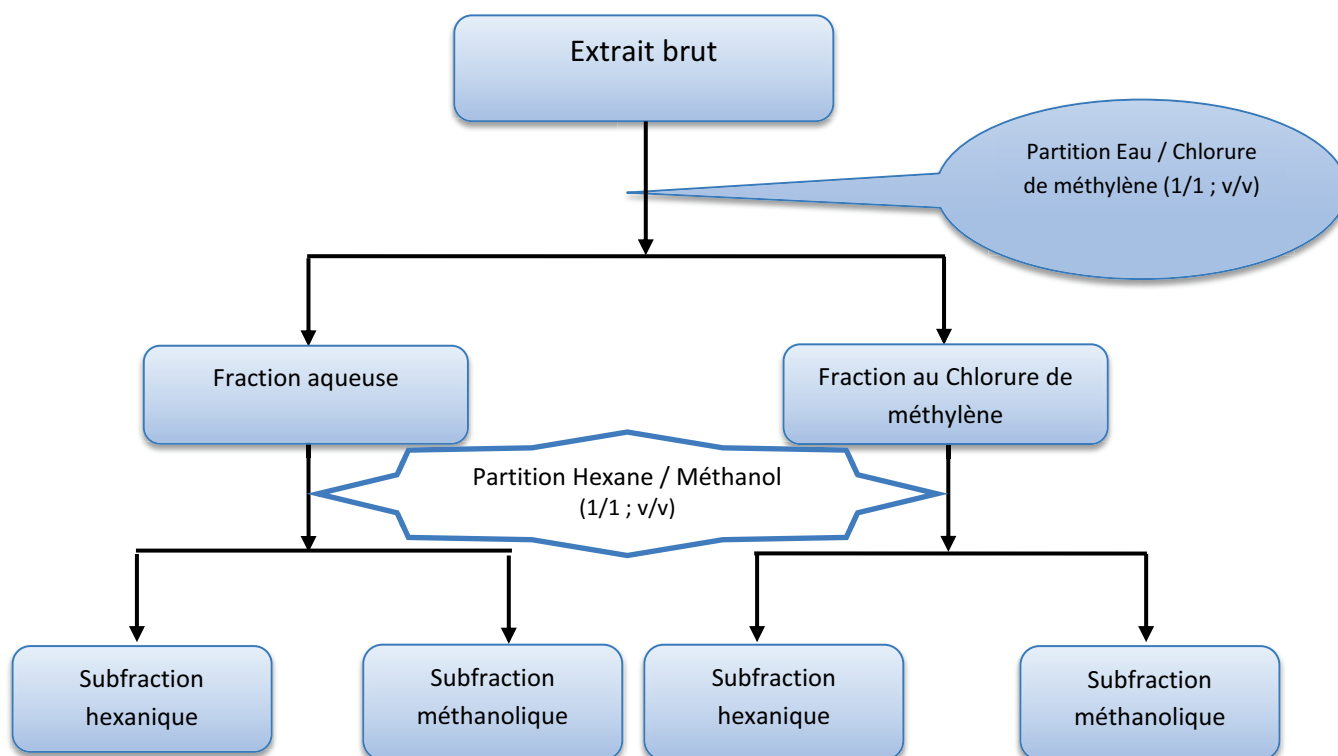


Figure 29: Protocole général de partition Liquide-Liquide des extraits bruts de plante utilisés. Après chaque partition, les extraits obtenus sont séchés et testés pour la détermination de leur CMI sur les isolats en fongiques.

IV.5. Obtention des fractions purifiées à partir de la subfraction la plus active et détermination de la CMI des molécules et sub-subfractions obtenues

Le prélude à la réalisation de la chromatographie sur colonne est le choix du système solvant d'élution. Pour ce faire, une série de CCM (chromatographie sur couche mince) est réalisée avec la subfraction à chromatographier, ceci en utilisant plusieurs phases mobiles de polarité différentes.

La phase stationnaire est un gel de silice standard comportant un indicateur fluorescent.

- Un trait horizontal (la ligne de base) est tracé à environ 1 cm du bas de la plaque de CCM. A l'aide d'un tube capillaire, une petite quantité d'une solution de la subfraction ou du control (dissouts dans du méthanol) de départ est déposée sur la ligne de base.

- Un éluant qui recouvre le fond de la cuve sur environ 5mm de hauteur est introduit dans la cuve et laissé pour saturation de celle-ci. Les systèmes éluants testés sont hexane-acétate d'éthyle 50%, acétate d'éthyle-méthanol 2%, hexane-chlorure de méthylène 50%, chlorure de méthylène-méthanol 2%, acétate d'éthyle-méthanol 10%, chlorure de méthylène-méthanol 10%, acétate d'éthyle-acétone 70%, chlorure de méthylène-méthanol 30%, chlorure de méthylène-méthanol-eau (100-10-0,5).
- La plaque de CCM est placée dans la cuve de migration. Le solvant monte le long de la plaque par capillarité. Lorsqu'il arrive sur la ligne de front, la plaque est sortie de la cuve.
- Pour visualiser les différentes taches, la plaque est d'abord placée sous une lampe UV à 254 nm. La plaque apparaît en vert fluorescent et les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches. Cette méthode de détection est utilisée en priorité car elle n'endommage pas la plaque. La plaque est ensuite pulvérisée avec des vapeurs d'acide sulfurique concentrée et chauffée sur une plaque chauffante 5 minutes, et le nombre total de taches dénombré.
- Le système éluant qui permet d'obtenir le plus grand nombre de taches est sélectionné pour la confection de la phase mobile en chromatographie sur colonne.

Après sélection du système d'élution, la colonne est montée et la séparation des composés est réalisée. La technique utilisée ici est la chromatographie sur colonne avec pompe à vide pour accélérer l'élution. En effet,

- Cent grammes de subfraction sont dissouts dans du méthanol et mélangés à 300g de silice brute de diamètre des grains de 70-230, concentrés à l'évaporateur rotatif et laissés sécher toute la nuit puis écrasés pour obtenir une poudre.
- La colonne est un Buchner fermé à sa base par du verre fritté. Une couche de papier filtre Wattman N°1 est déposée au fond de la colonne. La silice est ajoutée dans la colonne jusqu'à la moitié de la colonne en prenant soin de faire vibrer la colonne pour améliorer le tassement. Du méthanol est ensuite passé dans cette colonne jusqu'à saturation. Le mélange silice subfraction précédemment préparé est ajouté dans la colonne pour faire le plein (à environ 2cm du bord). Du coton est déposé au-dessus et le tout fixé à une fiole à vide, laquelle est connectée à une pompe à vide.

- L'élution se fait en recueillant 10 fractions de 500ml de chaque système d'élution. Ces fractions sont concentrées à l'évaporateur rotatif et soumises à une CCM analytique. Les fractions présentant le même profil de CCM sont regroupées dans le même contenant.
- L'observation des cristaux et un profil de CCM à une seule tache signe la présence d'une fraction purifiée, qui est séparée et conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Le schéma général de réalisation de l'élution est ci-dessous représenté (figure 3)

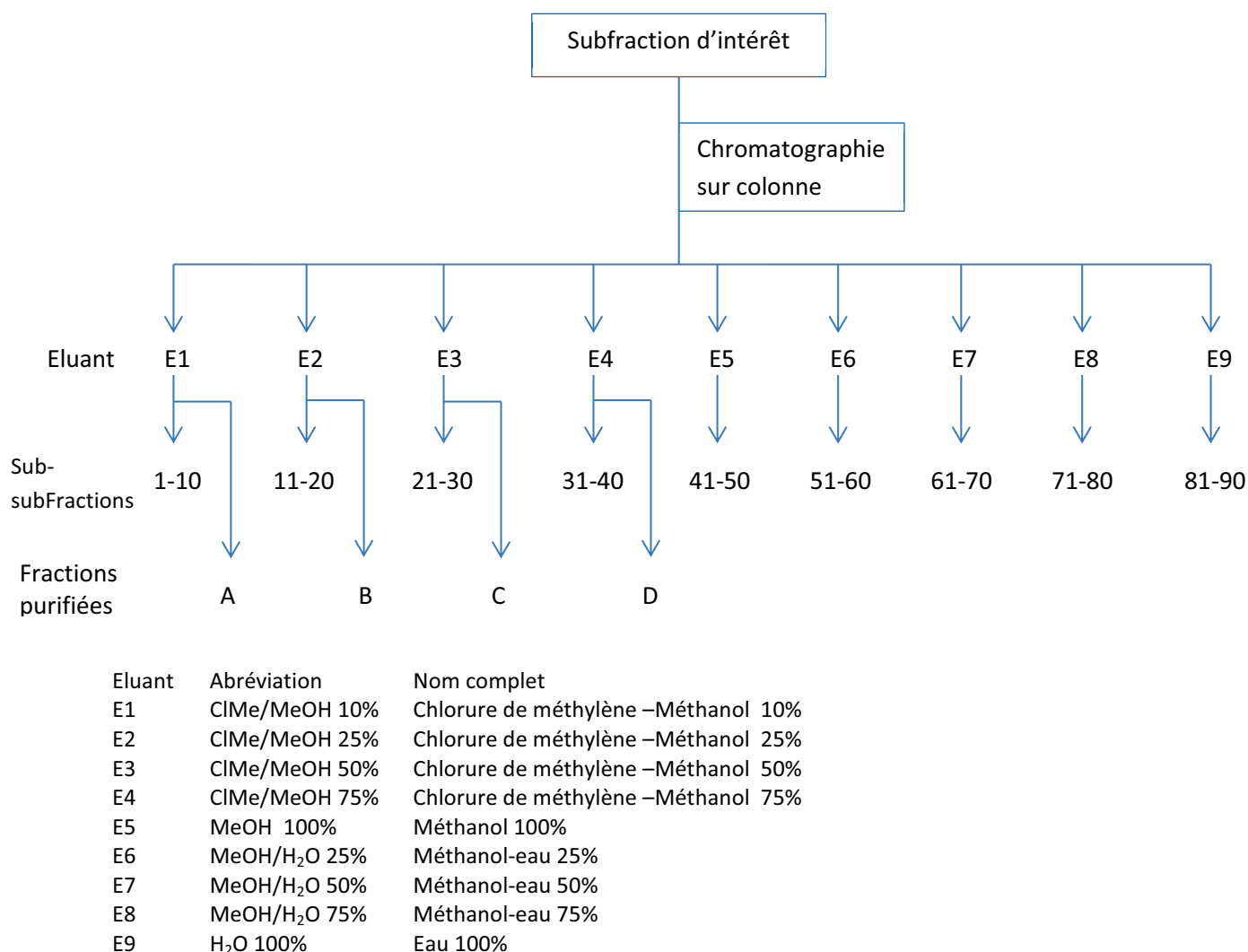


Figure 30: Schéma général de la chromatographie sur colonne utilisé pour la purification de la subfraction d'intérêt. Après récupération de chaque éluât, une CCM analytique est réalisée et permet de regrouper les fractions en fonction de leur profil CCM.

Les sub sub-fractions et les fractions purifiées obtenues sont soumises au test d'évaluation de l'activité antifongique par la méthode de microdilution en milieu liquide, la concentration de départ étant fixée à 2,5 mg/ml.

IV.6. Etude de l'activité antifongique des combinaisons des subfractions

IV.6.1. Détermination des combinaisons efficaces par la méthode de l'échiquier

L'évaluation de l'activité inhibitrice des combinaisons des subfractions actives entre elles est effectuée par microdilution dans les plaques de microtitration de 96 puits, en utilisant la méthode de l'échiquier, basée sur le protocole M7-A6 du NCCLS (**NCCLS, 2003**) avec quelques modifications.

En effet, 150µl de bouillon stérile Mueller Hinton (Oxoid, UK) sont introduits dans les onze cupules des deux premières lignes (A2-A12 et B2-B12) et les sept cupules de la première colonne (B1-H1), 100µl de milieu dans le reste des puits de la plaque. Cinquante µl d'une solution d'extrait 1, concentrée à 40×CMI sont ensuite ajoutés aux 150µl des cupules des premières lignes et 50µl d'un extrait 2, préparé à la même concentration, aux 150µl des puits de la première colonne. Le contenu des cupules A2 à A12 est homogénéisé puis 100 µl du mélange sont retranchés pour ramener les volumes à 100µl dans ces cupules.

Une série de 5 dilutions de raison géométrique 2 permet de diluer la subfraction 1 de la ligne B à la ligne G ; une autre série de 10 dilutions de même raison répartit la subfraction 2 dans les cupules, de la colonne 1 à la colonne 11. Les puits de la ligne H (H1-H11) contiennent différentes concentrations de l'extrait 2 et servent à la vérification de sa CMI alors que celles de la colonne 12 (A12-G12) comportent les dilutions de l'extrait 1 et servent à la vérification de sa CMI. Les cupules A1 et H12 contiennent uniquement 100 µl de milieu stérile.

Cinquante µl d'un inoculum d'un microorganisme, préparé au titre 2.10^3 cellules/ml sontensemencés dans les puits d'une plaque, excepté la cupule A1 qui ne contient que le milieu de culture et sert de contrôle de stérilité du milieu ; la cupule H12 sert de contrôle de croissance de la souche fongique inoculée. Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 48 heures.

A l'issue du temps d'incubation, la turbidité des puits contenant les diverses combinaisons d'extraits est observée en comparaison au contrôle négatif (H12) et au contrôle de stérilité du milieu (A1) ; les plus petites combinaisons de concentrations ne permettant aucune croissance

visible de la levure sont considérées comme les couples de CMI et utilisées pour la détermination des index de concentrations inhibitrices fractionnelles (FICI).

Les différents couples de CMI des subfractions permettent de calculer les index de concentrations inhibitrices fractionnelles (FICI) des combinaisons à partir des concentrations inhibitrices fractionnelles (FIC) individuelles par les formules ci-dessous (**Berenbaum, 1978**) :

$$FIC(1) = \frac{\text{Conc. de 1 dans la combinaison}}{\text{CMI de 1 testée seule}} \quad FIC(2) = \frac{\text{Conc. de 2 dans la combinaison}}{\text{CMI de 2 testée seule}}$$

$$\Sigma FIC = FICI = FIC(1) + FIC(2)$$

La détermination du type d'interaction est faite sur la base des valeurs de ΣFIC ; ainsi, pour :

- $\Sigma FIC \leq 0,5$, l'interaction est dite synergique,
- $0,5 < \Sigma FIC \leq 1,0$, elle est dite additive,
- $1,0 < \Sigma FIC \leq 4,0$ on parle d'indifférence,
- $\Sigma FIC > 4,0$ l'interaction est qualifiée d'antagoniste (**Iten et al., 2009**).

IV.6.2. Etude pharmacodynamique de la combinaison la plus efficace

Les combinaisons d'extraits ayant une interaction synergique sur au moins trois des cinq levures testées sont soumises à l'étude de leur pharmacodynamique *in vitro*, via l'évaluation de la cinétique de mort en fonction du temps (time kill kinetics). Le protocole utilisé est celui décrit par **Klepser et al. (1998)**, auquel des modifications ont été apportées.

- Les suspensions fongiques calibrées à 1.10^6 cellules/ml, sont préparées dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune de 48 heures.
- Pour chaque combinaison à tester sur une levure de l'essai, trois tubes coniques stériles sont utilisés ; à l'intérieur des deux premiers, on introduit uniquement l'un des produits de la combinaison et le milieu Mueller Hinton stérile ; le troisième tube reçoit la combinaison des produits et le milieu. L'ensemble formé par les extraits à tester à $4 \times \text{CMI}$ et le milieu de culture occupe un volume de 900 μ l dans les tubes; enfin, 100 μ l d'un inoculum sontensemencés dans le triplet de tubes correspondant, ce qui permet d'avoir comme charge de départ 1.10^5 cellules/ml.
- Immédiatement après inoculation, 50 μ l du contenu de chaque tube sont prélevés, puisensemencés dans d'autres tubes coniques portant les étiquettes correspondantes et

contenant chacun 950µl de milieu Mueller Hinton stérile; ces derniers sont incubés à 37°C pendant 24 heures. Les charges microbiennes sont déterminées par comptage sur hématimètre et servent de control des charges initiales et représentent également les différentes concentrations microbiennes au temps initial (To).

- Les solutions sont incubées à 37°C sous agitation à 32xg grâce à un agitateur mécanique (IKA-Vibrax-VXR). À des intervalles de temps respectifs de 2, 4, 6, 8, 12, 16 et 24 heures, 50µl de chaque essai sont prélevés pour ensemençer 950 µl de milieu stérile dans le tube correspondant; les tubes sont par la suite incubés pendant 24 heures à 37°C.
- Les témoins négatifs, constitués de tubes contenant uniquement les levures et le bouillon nutritif sont préparés dans les mêmes conditions de stérilité et incubés avec les tubes de l'essai ; aux différents intervalles de temps suscités, des aliquotes de ces cultures sont prélevés, le comptage des cellules est directement effectué.
- À l'issue du temps requis d'incubation, les charges microbiennes des subcultures sont déterminées par comptage direct au microscope à l'aide d'une cellule de Malassez
- Avec les charges en microorganismes obtenues pour chaque combinaison et à différents intervalles de temps, la cinétique de mort cellulaire est représentée en fonction du temps pour chaque combinaison sur une levure donnée.
- En plus de donner les informations sur la pharmacodynamie *in vitro* de la combinaison, la méthode fournit des données utiles pour l'étude d'interaction des substances en combinaison. Les critères d'interprétation permettant de définir le type d'interaction sont les suivants :
 - Une diminution de la concentration microbienne $\leq 2\log$ par la combinaison en comparaison à la cinétique de l'extrait le plus actif seul témoigne d'une interaction synergique,
 - Lorsque la décroissance de cette concentration est $< 2\log$ et $> 1\log$ en comparaison à l'extrait le plus actif, on a une additivité,
 - Une augmentation de la charge microbienne $< 2\log$ et $> 1\log$ en comparaison à la cinétique de l'extrait le moins actif montre une indifférence,
 - Pour une croissance $\geq 2\log$, la cinétique de la combinaison comparée à celle de l'extrait le moins actif met en exergue une interaction antagoniste (**Mukherjee et al., 2005 ; Lewis et al., 2000**).

IV.7. Etude phytochimique des extraits sélectionnés

IV.7.1. Test de mise en évidence des alcaloïdes

Cinquante milligrammes d'un extrait ou d'une fraction d'extrait sont dilués dans 10 ml de H₂SO₄ à 2% ; le mélange est homogénéisé puis porté à ébullition pendant 2 minutes et filtré. A 1ml du filtrat, 5 gouttes du réactif de Mayer sont ajoutés ; le développement d'une turbidité confirme la présence des alcaloïdes (**Odebeyi et Sofowara, 1978**).

IV.7.2. Test de mise en évidence des flavonoïdes

Cinq ml d'une solution d'ammoniaque diluée sont ajoutés à une solution aqueuse d'extrait et additionné d'acide sulfurique concentré. Une coloration jaune qui disparaît au fil du temps caractérise la présence des flavonoïdes (**Harbone, 1976**).

IV.7.3. Test de mise en évidence des saponines

Vingt-cinq milligrammes d'extrait ou de fraction sont mélangés à 15 ml d'eau distillée dans un tube à essai et l'ensemble est porté au bain-marie bouillant pendant 5 min. Après refroidissement, un volume suffisant de solution est introduit dans un tube à essai puis agitée vigoureusement pendant 10 secondes au vortex. La présence d'une mousse épaisse d'un centimètre environ qui persiste plus d'une minute après agitation matérialise la présence des saponines (**Harbone, 1976**).

IV.7.4. Test de mise en évidence des tanins

À une solution alcoolique ou aqueuse d'extrait, on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique. La présence des tanins se manifeste par un changement de coloration de la solution qui vire au bleu foncé (tanins galliques) ou alors au vert noirâtre marquant la présence des tanins catéchiques (**Harbone, 1976**).

IV.7.5. Test de mise en évidence des phénols

Cinquante milligrammes d'extrait sont dissouts dans 15 ml de méthanol et la solution est chauffée au bain marie bouillant pendant 15 minutes ; au mélange, on ajoute 3 gouttes d'une solution de cyanure ferrique fraîchement préparée. La formation d'un précipité vert met en exergue la présence des phénols (**Harbone, 1976**).

IV.7.6. Test de mise en évidence des stéroïdes

Deux cent mg d'extrait sont dissouts dans 10 ml de chloroforme ; 2 ml d'acide acétique sont ensuite introduits dans la solution et l'ensemble est refroidi dans un bain de glace. On y ajoute de l'acide sulfurique concentré et la formation d'un anneau bleu-gris témoigne de la présence des stéroïdes (**Sofowara, 1993**).

IV.7.7. Test de mise en évidence des triterpènes

A 10 ml d'une solution d'extrait à 10 % (m/v), on ajoute 2 ml de chloroforme et l'ensemble est homogénéisé ; ensuite 3 ml d'acide sulfurique sont ajoutés afin de former deux phases. La formation d'une interface brun rougeâtre traduit la présence des triterpènes (**Trease et Evans, 1989**).

IV.7.8. Test de mise en évidence des glucosides

Un gramme d'extrait est dissout dans 5 ml de HCl, puis neutralisé par 5 ml d'une solution de NaOH à 5% ; au mélange, on ajoute goutte à goutte une solution de Fehling (A + B). La présence des glucosides se manifeste par l'apparition d'un précipité rouge brique (**Odebeyi et Sofowara, 1978**).

IV.7.9. Test de mise en évidence des anthocyanines

Cinquante milligrammes d'extrait sont mélangés à 15 ml d'HCl à 1% et l'ensemble est porté à ébullition. La variation de coloration du rouge orangé au bleu orangé met en exergue la présence des anthocyanines (**Odebeyi et Sofowara, 1978**).

IV.7.10. Test de mise en évidence des anthraquinones

Cinquante milligrammes d'un extrait ou d'une fraction d'extrait sont dilués dans 4 ml d'un mélange de chloroforme et d'éther de pétrole (v/v), homogénéisé puis filtré ; à 1 ml de filtrat, on ajoute un égal volume de NaOH à 10%. Le développement d'une coloration rouge est caractéristique des anthraquinones (**Odebeyi et Sofowara 1978**).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques de *C. neoformans*

I.1. La cryptococcose neuro-méningée

I.1.1. Caractéristiques de la population d'étude et fréquence de la cryptococcose neuro-méningée

Entre décembre 2009 et juillet 2013, 171 patients VIH positifs présentant des signes de méningite ont été prélevés pour l'analyse de leur LCR. Ils comprenaient 61% de femmes et 39% d'hommes. L'âge moyen des patients est de $38,9 \pm 10,8$ avec les extrêmes à 25 et 74 ans.

De ces 171 patients, 48 ont été diagnostiqués positifs à la cryptococcose neuro-méningée, soit une fréquence de 28,08%. Par ailleurs, 10 (5,84%) ont été diagnostiqués positifs au pneumocoque. Les hommes sont plus infectés avec une fréquence de 37,7% pour 25,3% chez les femmes. La figure 31 montre quelques images à l'examen direct et à la culture de *C. neoformans*.

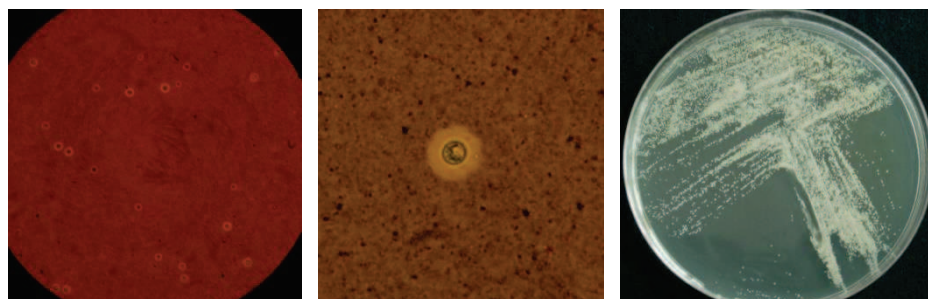


Photo 1

Photo 2

Photo 3

Figure 31: Quelques images de blastospores et aspect en culture de *C. neoformans* (Photos personnelles Ngouana, 2010)

Photos 1 et 2 : images de *C. neoformans* au microscope objectif 40x dans de l'encre de chine ; (apprécier la capsule caractéristique).

Photo 3 : culture de *C. neoformans* sur milieu Sabouraud chloramphémicol

La survenue de la maladie est sans lien significatif avec l'IMC (indice de masse corporelle) du patient. Le test de Chi-2 permet de conclure avec une statistique de test de 0,211 et une P-value de 0,90 à une absence de liaison entre l'IMC et la survenue de la maladie.

L'analyse de la relation entre la survenue de la cryptococcose neuro-méningée et le stade OMS de l'infection à VIH montre que le stade antérieur de la maladie n'influence pas la survenue de

la cryptococcose neuro-méningée au vu des résultats du test du Chi-2 d'indépendance (P-Value= 0,089).

I.1.2. Variations biochimiques et macroscopiques du LCR dans la population d'étude

Chez les patients atteints de cryptococcose neuro-méningée, les résultats de la réaction cellulaire et de la biochimie du LCR sont résumés dans le tableau 24.

Tableau 24 : Constantes biochimiques du LCR chez les patients atteints ou non de cryptococcose neuro-méningée

		Cryptococcose neuro-méningée	
		Positive	Négative
Hématies /mm ³	Moyenne	514,28	1522,82
	Ecart-type	2579,88	9220,40
Leucocytes/mm ³	Moyenne	5,92	28,13
	Ecart-type	26,59	117,88
Glucorachie (g/l)	Moyenne	0,43	0,48
	Ecart-type	0,19	0,28
Protéïnorachie (g/l)	Moyenne	0,84	0,84
	Ecart-type	0,53	0,53
Chlororachie (mEq/l)	Moyenne	111,91	112,14
	Ecart-type	11,32	16,63

Il est noté d'après le tableau 25 que 50% des patients présentant un LCR trouble se sont avérés atteints de cryptococcose neuro-méningée. Globalement, l'aspect du LCR à lui seul ne suffit pas à trancher quant à la maladie.

Tableau 25: Evaluation de l'aspect macroscopique des LCR

Macroscopie	Cryptococcose neuro-méningée		Total
	Positive	Négative	
Clair	20,34	79,66	100,00
Clair eau de roche	44,19	55,81	100,00
Xanthochromique	42,86	57,14	100,00
Trouble	50,00	50,00	100,00
Hématique	19,05	80,95	100,00

I.1.4. Discussion

Dans ce travail, la fréquence de 28,08% corrobore les résultats d'autres études (**Nelesh, 2007 ; Sivasangeetha et al., 2007**). Des travaux antérieurs ont trouvé que la fréquence de cette pathologie varie entre 2 et 30% (**Nigam et al., 2012 ; Nelesh, 2007 ; Soumaré et al., 2005 ; Millogo et al., 2004**). **Luma et al., (2013)** ont mené une étude rétrospective sur une population de 672 PVVIH enregistrés sur 5 ans à l'Hôpital Général de Douala et ont trouvé une fréquence de 11,2% de cryptococcose neuro-méningée chez ces patients. Dans ce travail, la fréquence de 28,08% de patients présentant la cryptococcose neuro-méningée associée au fait que 5,84% de patients recrutés ont été diagnostiqués positifs à la méningite à pneumocoque, montre que la cryptococcose neuro-méningée est la première cause de méningite chez ces patients à Yaoundé. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Pappas, 2010 ; David, 2007 ; Maslin et al., 2005**. Cette fréquence est élevée du fait d'une écologie favorable et des conditions climatiques favorisant le développement et la survie de *C. neoformans*. En effet, la levure survit facilement dans l'air des températures subtropicales, ce qui facilite sa dissémination (**Heyderman et al., 2001**). De plus, près de 70% de la population mondiale VIH positive se retrouve en Afrique subsaharienne, dans un environnement où la prise en charge de l'infection à VIH par les antirétroviraux n'est que partiellement engagée, et la couverture médicale des infections opportunistes est faiblement assurée (**ONUSIDA, 2013 ; Oumar et al., 2008 ; Homa, 2007**). Malgré le fait que les femmes soient plus infectées par le VIH que les hommes, ces derniers sont plus infectés par la cryptococcose neuro-méningée, tel qu'observé aussi bien dans ce travail que dans des études antérieures (**McClelland et al., 2013 ; Aberg et Powerly, 2006**). Cette situation pourrait refléter une différence d'exposition (**Prasad et al., 2003**) associée ou non à des différences d'efficacité du système immunitaire (**McClelland et al., 2013**). En effet **McClelland et al. (2013)** ont récemment montré que les macrophages féminins ont un plus grand pouvoir phagocytaire de *C. neoformans* et résistent mieux à la destruction par les levures que les macrophages masculins. Cette étude ne prenant pas en compte le suivi clinique des patients, le pronostic vital n'a pas été évalué, mais il reste toutefois que la mortalité liée à la méningite à cryptocoque est très élevée (**Luma et al., 2013 ; Pappas, 2010 ; David, 2007 ; Maslin et al., 2005 ; Mbuagbaw et al., 2002**).

Les stades III et IV de l'infection à VIH sont ceux correspondant à une immunodépression avancée ou sévère (**Oumar et al., 2008**). A ce stade de l'infection, les infections opportunistes

sont fréquentes, particulièrement la cryptococcose neuro-méningée qui survient chez le sujet fortement immunodéprimé et est un indicateur majeur du stade SIDA (Homa, 2007 ; Aberg et Powderly, 2006 ; Millogo *et al.*, 2004). L'aspect macroscopique du LCR n'a pas de relation avec la présence ou non de *C. neoformans* tel qu'observé aussi bien dans cette étude que dans d'autres (Yassibanda *et al.*, 2002 ; Bissagnene *et al.*, 1994). L'analyse cytologique et biochimique du LCR a donné des profils déjà connus, apparaissant au cours de la cryptococcose neuro-méningée (Park *et al.*, 2009 ; Maslin *et al.*, 2002 ; Ennig et Saag, 1993).

I.2. Etude de la diversité génétique des isolats de *C. neoformans*

I.2.1. Extraction d'ADN

Les résultats d'extraction de l'ADN des isolats (25 prélèvements initiaux et 125 colonies), la pureté et la concentration de l'ADN obtenu sont présentés dans le tableau 26. Des aliquotes à la concentration de 50ng/μl ont ensuite été réalisés pour effectuer les PCR.

Tableau 26: Rendement d'extraction d'ADN et de la pureté de l'ADN de *C. neoformans*

Souche	A _{260/280}	Concentration (ng/μl)	Vi (50ng/μl)	Veau qsp 50μl					
CM001A	1,34	487,3	5,1	44,9	CM004E	1,63	305,8	8,2	41,8
CM001B	1,14	1341,4	1,9	48,1	CM004M	1,38	592,3	4,2	45,8
CM001C	1,34	557,6	4,5	45,5	CM005A	1,7	119,1	21,0	29,0
CM001D	1,36	710,2	3,5	46,5	CM005B	2,02	412,9	6,1	43,9
CM001E	1,38	577,6	4,3	45,7	CM005C	1,98	380,6	6,6	43,4
CM001M	1,19	781,1	3,2	46,8	CM005D	2,02	683,4	3,7	46,3
CM002A	1,6	379,8	6,6	43,4	CM005E	2	384,7	6,5	43,5
CM002B	1,19	48,6			CM005M	1,79	835,8	3,0	47,0
CM002C	1,45	38,5			CM006A	1,42	942,8	2,7	47,3
CM002D	1,34	10			CM006B	1,68	605,3	4,1	45,9
CM002E	1,48	308,2	8,1	41,9	CM006C	1,43	745,9	3,4	46,6
CM002M	1,17	125,1	20,0	30,0	CM006D	1,95	650,7	3,8	46,2
CM003A	1,69	741	3,4	46,6	CM006E	1,74	375,1	6,7	43,3
CM003B	1,31	624,6	4,0	46,0	CM006M	1,85	452	5,5	44,5
CM003C	1,69	137,9	18,1	31,9	CM007A	1,63	373,5	6,7	43,3
CM003D	1,58	89,2	28,0	22,0	CM007B	2,08	129,3	19,3	30,7
CM003E	1,17	486,4	5,1	44,9	CM007C	1,52	316,9	7,9	42,1
CM003M	1,3	414,2	6,0	44,0	CM007D	1,59	483,8	5,2	44,8
CM004A	1,79	205,8	12,1	37,9	CM007E	1,68	686,8	3,6	46,4
CM004B	1,54	256,6	9,7	40,3	CM007M	1,69	79,2	31,6	18,4
CM004C	1,48	456,1	5,5	44,5	CM008A	1,23	862,7	2,9	47,1
CM004D	1,44	710,6	3,5	46,5	CM008B	1,44	1370	1,8	48,2
					CM008C	1,36	1002,2	2,5	47,5
					CM008D	1,28	1101,3	2,3	47,7

Diversité génétique d'isolats de Cryptococcus et Candida issus des patients VIH+ à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes

CM008E	1,35	738,3	3,4	46,6	CM016C	1,19	1608,6	3,1	46,9
CM008M	1,6	701,2	3,6	46,4	CM016D	1,64	747,1	6,7	43,3
CM009A	1,91	278,2	9,0	41,0	CM016E	1,25	2549,9	2,0	48,0
CM009B	2,11	357,7	7,0	43,0	CM016M	1,86	950,5	5,3	44,7
CM009C	2,15	265	9,4	40,6	CM017A	2,12	658,2	7,6	42,4
CM009D	1,86	320,6	7,8	42,2	CM017B	2,07	904,4	5,5	44,5
CM009E	1,72	680,2	3,7	46,3	CM017C	2,08	693,1	7,2	42,8
CM009M	2,06	460,9	5,4	44,6	CM017D	2,08	486,1	10,3	39,7
CM010A	2,02	623,5	4,0	46,0	CM017E	2,08	632,7	7,9	42,1
CM010B	1,76	1053,4	2,4	47,6	CM017M	2,03	766	6,5	43,5
CM010C	1,68	666,1	3,8	46,2	CM018A	1,54	722,5	6,9	43,1
CM010D	2,01	479,4	5,2	44,8	CM018B	1,19	1164,7	4,3	45,7
CM010E	1,84	799,1	3,1	46,9	CM018C	1,29	1011	4,9	45,1
CM010M	1,48	1092,1	2,3	47,7	CM018D	1,26	1125,2	4,4	45,6
CM011A	1,66	556,8	4,5	45,5	CM018E	1,3	925,5	5,4	44,6
CM011B	1,74	462,4	5,4	44,6	CM018M	1,22	1336,4	3,7	46,3
CM011C	1,53	126,2	19,8	30,2	CM019A	1,25	1083,1	4,6	45,4
CM011D	1,91	478,4	5,2	44,8	CM019B	1,28	925,3	5,4	44,6
CM011E	1,65	792,4	3,2	46,8	CM019C	1,42	628,4	8,0	42,0
CM011M	1,65	523,7	4,8	45,2	CM019D	1,22	1222,7	4,1	45,9
CM012A	2	406	6,2	43,8	CM019E	1,33	1177,3	4,2	45,8
CM012B	1,8	495,6	5,0	45,0	CM019M	1,23	946,7	5,3	44,7
CM012C	1,59	694,2	3,6	46,4	CM020A	1,7	268,3	18,6	31,4
CM012D	1,85	390,2	6,4	43,6	CM020B	1,33	863,6	5,8	44,2
CM012E	1,95	339,6	7,4	42,6	CM020C	1,28	1329,6	3,8	46,2
CM012M	1,91	517,5	4,8	45,2	CM020D	1,45	758,3	6,6	43,4
CM013A	1,28	1050,8	2,4	47,6	CM020E	1,3	1047,4	4,8	45,2
CM013B	1,93	761,8	3,3	46,7	CM020M	1,29	931,8	5,4	44,6
CM013C	1,99	559,1	4,5	45,5	CM021A	1,85	435,5	11,5	38,5
CM013D	1,98	782,7	3,2	46,8	CM021B	2	540	9,3	40,7
CM013E	1,86	420,9	5,9	44,1	CM021C	1,96	339	14,7	35,3
CM013M	1,83	548,9	4,6	45,4	CM021D	1,77	367,8	13,6	36,4
CM014A	1,57	570,8	8,8	41,2	CM021E	1,88	414	12,1	37,9
CM014B	1,75	544,1	9,2	40,8	CM021M	1,89	416,5	12,0	38,0
CM014C	1,49	457,1	10,9	39,1	CM022A	1,53	314,9	15,9	34,1
CM014D	1,29	549,6	9,1	40,9	CM022B	1,69	826,8	6,0	44,0
CM014E	1,48	414,8	12,1	37,9	CM022C	2	282,9	17,7	32,3
CM014M	1,56	308,6	16,2	33,8	CM022D	1,47	353,4	14,1	35,9
CM015A	1,37	656,7	7,6	42,4	CM022E	1,31	532,9	9,4	40,6
CM015B	1,35	956,8	5,2	44,8	CM022M	1,22	634,6	7,9	42,1
CM015C	1,9	786,9	6,4	43,6	CM023A	1,35	913,7	5,5	44,5
CM015D	1,3	727,3	6,9	43,1	CM023B	1,76	365,8	13,7	36,3
CM015E	1,26	366,7	13,6	36,4	CM023C	1,47	817	6,1	43,9
CM015M	1,62	261	19,2	30,8	CM023D	1,66	421,6	11,9	38,1
CM016A	1,35	1636,2	3,1	46,9	CM023E	2,03	425,6	11,7	38,3
CM016B	1,57	765,7	6,5	43,5	CM023M	1,59	540,6	9,2	40,8

CM024A	1,7	130,3	38,4	11,6	CM025A	1,81	198,6	25,2	24,8
CM024B	1,72	411,6	12,1	37,9	CM025B	1,96	357,6	14,0	36,0
CM024C	1,76	285,6	17,5	32,5	CM025C	1,97	310,8	16,1	33,9
CM024D	1,88	324,2	15,4	34,6	CM025D	2,01	457,2	10,9	39,1
CM024E	1,74	434,2	11,5	38,5	CM025E	2,02	320,6	15,6	34,4
CM024M	1,76	386,8	12,9	37,1	CM025M	1,65	675,2	7,4	42,6

I.2.2. Sérotypage par PCR multiplex

Le sérotypage des souches a montré que les 150 isolats sont *C. neoformans* sérotype A variété *grubii* (figure 32).

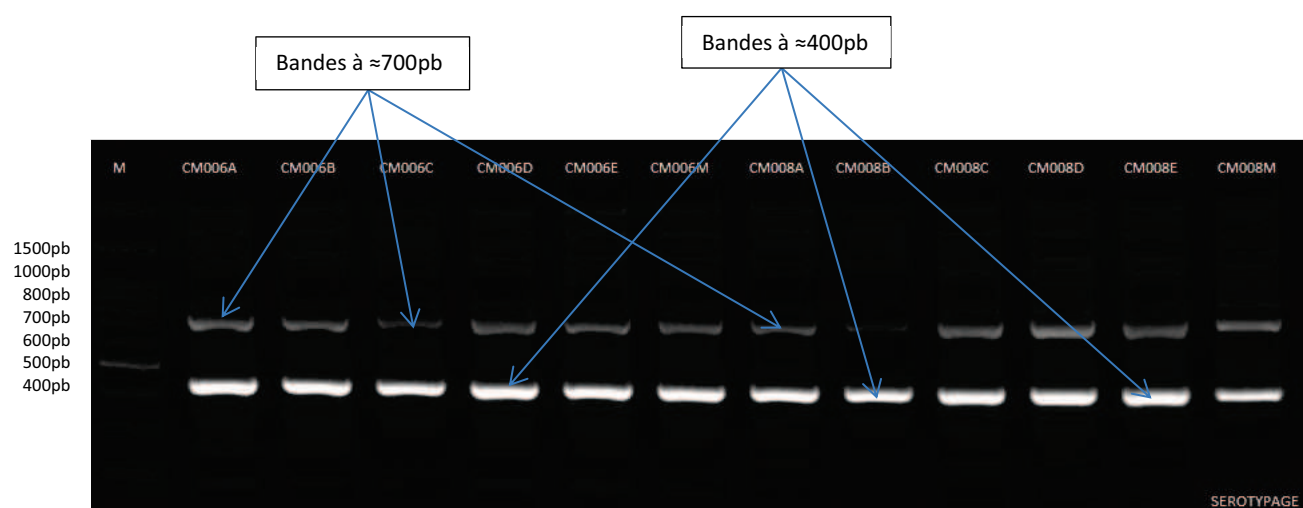


Figure 32: Exemple de profils électrophorétiques du sérotypage des isolats de *C. neoformans*. M est le marqueur de poids moléculaire à 100pb. Les bandes majeures observées pour le sérotype A sont les bandes à 400 et à 700pb.

I.2.3. Typage moléculaire

I.2.3.1. Typage moléculaire par PCR-RFLP

Après digestion des amplicons du gène *URA5* par *Hha1* et *Sau96*, les profils électrophorétiques des 150 isolats sont tous identiques, et correspondent au type moléculaire VNI, en comparaison avec les souches de référence citées dans la littérature. La figure 33 montre quelques profils de migration pour les souches testées.

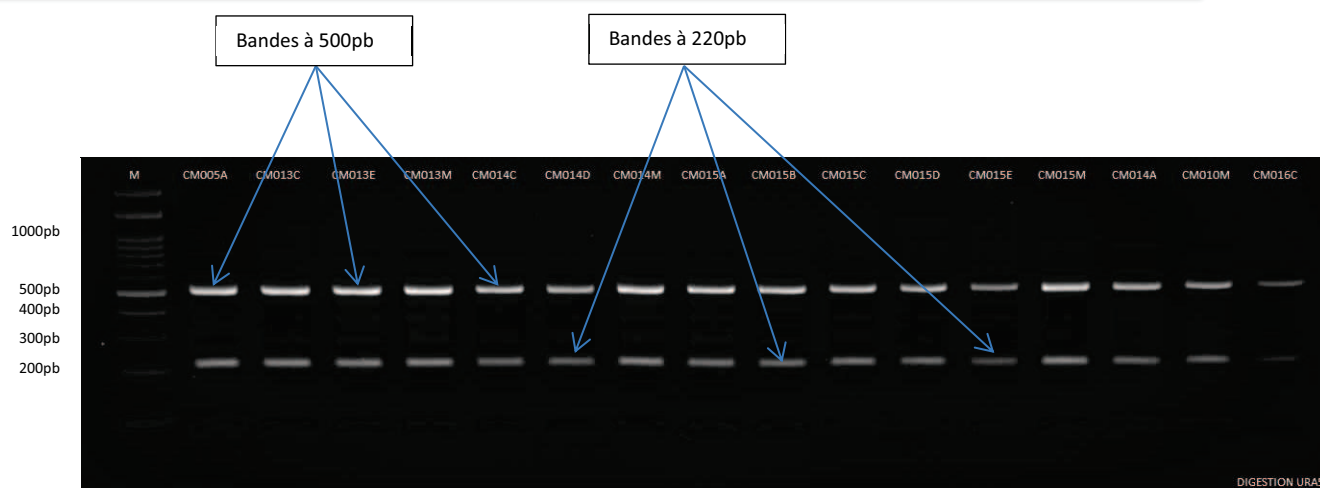


Figure 33: Exemples de profils électrophorétiques obtenus après digestion des amplicons du gène URA5 des isolats de *C. neoformans*. M est le marqueur de poids moléculaire à 100pb. Les bandes majeures observées pour le génotype VNI sont les bandes à 220 et à 500pb.

I.2.3.2. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA)₄, (GTG)₅ et minisatellite M13

L'analyse des profils de migration de chaque micro ou minisatellite a permis d'observer des polymorphismes de séquences (figures 34, 35, 36).

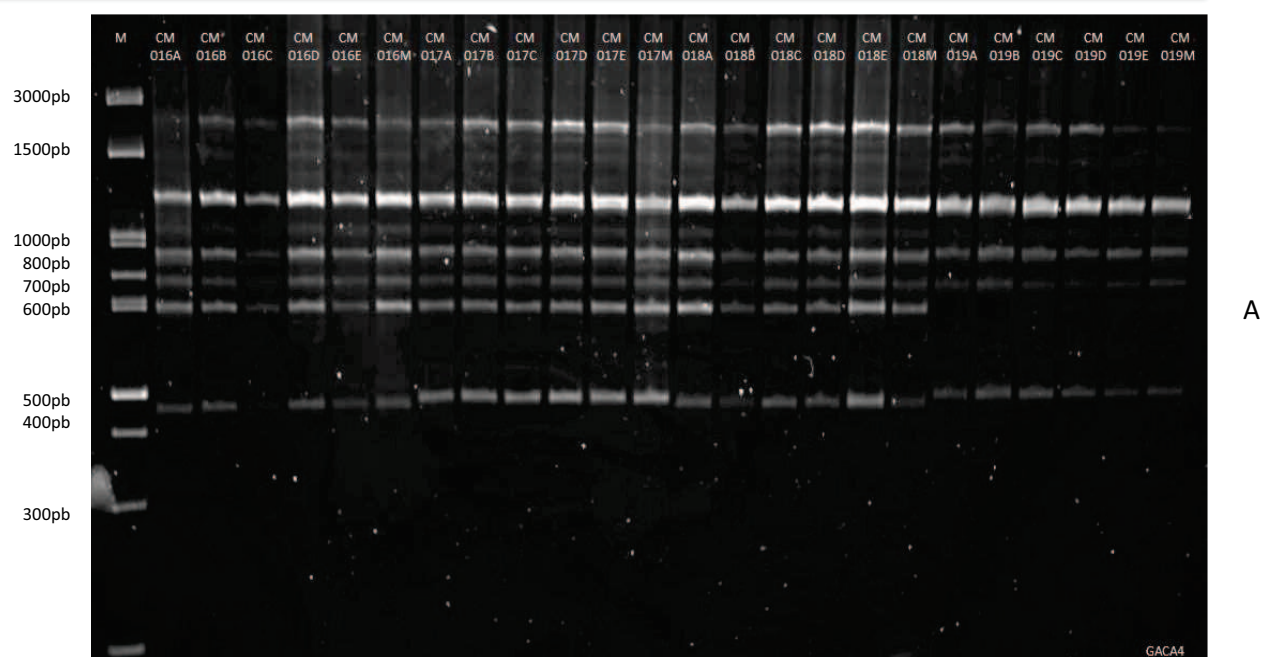


Figure 34: Quelques profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GACA)₄ des isolats de *C. neoformans*. M est le marqueur de poids moléculaire, la bande A à approximativement 600pb est absente chez les isolats du patient CM019 (CM019A à CM019M).



Figure 35: Quelques profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GTG)₅ des isolats de *C. neoformans*. M est le marqueur de poids moléculaire. Les bandes A et B sont présentes sur les isolats CM008A-CM008M et CM011A-CM011M ; elles sont par contre absentes sur les isolats CM009A-CM009M et CM010A-CM010M. La bande C n'est présente que chez les isolats CM011A-CM011M.



Figure 36: Quelques profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences minisatellite M13 des isolats de *C. neoformans*. M est le marqueur de poids moléculaire. Les bandes A et B sont présentes sur les isolats CM013A-CM013M et CM014A-CM014M; elles sont par contre absentes sur les isolats CM012A-CM012M et CM015A-CM015E.

Le dendrogramme de la figure 37 a été construit avec un pourcentage de similitude de 95%, il permet de ressortir 15 types moléculaires différents à partir de l'analyse des 150 isolats. Trois types moléculaires sont majoritaires. Six/vingt-cinq (24%) patients sont infectés par deux souches différentes. En effet, les isolats 4 et 5 (CM007D et CM007E) du patient CM007 présentent un profil différent des autres isolats et du prélèvement initial. Le prélèvement initial du patient CM008 (CM008M) présente un type moléculaire différent de celui des autres isolats du même patient qui eux présentent un même type moléculaire. Le prélèvement initial CM025M se retrouve dans un type moléculaire différent de celui des colonies. Les isolats 1 et 3 (CM003A et CM003C) du patient CM003 se retrouvent dans un type moléculaire différent de celui des autres isolats. Les isolats CM015A et CM015B appartiennent à un type moléculaire différent de celui des autres isolats du même patient CM015. Les isolats CM020A et CM021A forment un type moléculaire qui est différent de celui des autres isolats issus du même patient.

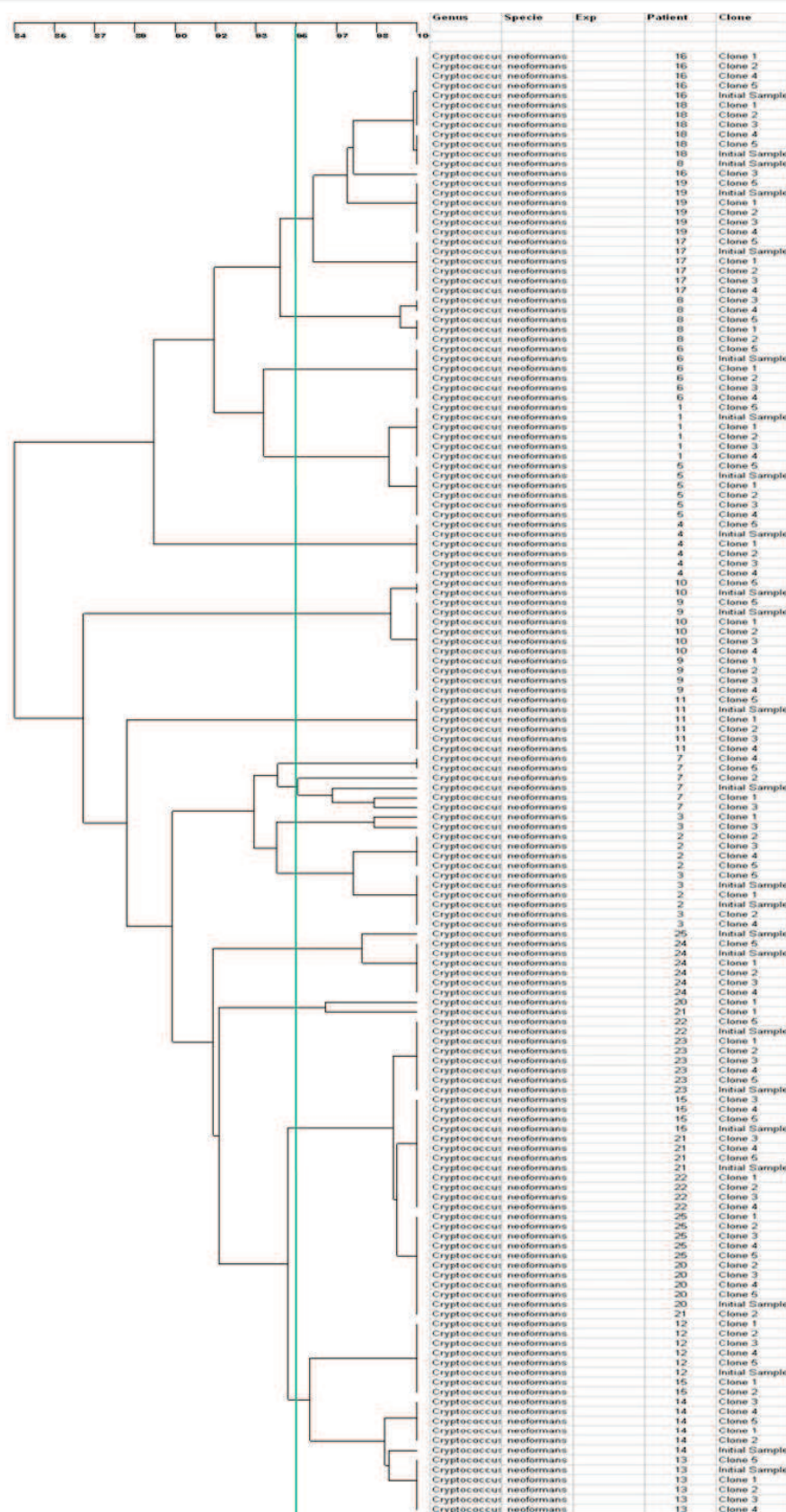


Figure 37 : Dendrogramme de la diversité génétique de *C. neoformans* obtenu par analyse des séquences mini et microsatellites. Les profils ont été définis à 95% de similitude (trait vertical).

I.2.4. Discussion

Les 150 isolats issus de 25 patients testés dans ce travail sont tous sérotype A. Ces résultats sont en accord avec l'étude précédemment menée par **Bertout et al., (2012)** sur 114 isolats issus de 19 patients, et montre que *C. neoformans* var. *grubii* serotype A est le seul sérotype de *C. neoformans* impliqué dans la cryptococcose neuro-méningée chez les patients VIH positifs à l'Hôpital Central de Yaoundé. Plusieurs études démontrent d'ailleurs que ce sérotype est le plus répandu dans le monde et particulièrement en Afrique subsaharienne (**Cogliati, 2013 ; Enache-Angoulvant et al., 2007 ; Casadeval et Perfect, 1999**). Il est également le plus impliqué dans la cryptococcose neuro-méningée, particulièrement chez les patients ayant le SIDA (**Enache-Angoulvant et al., 2007 ; Ito-Kuwa et al., 2007 ; Litvintseva et al., 2005**). Le sérotypage de *C. neoformans* a pendant longtemps été réalisé par des techniques sérologiques (kit Crypto Check) ou par la combinaison du milieu canavanine-glycine-bromothymol (CGB) bleu et la technique d'immunofluorescence directe (**Carvalho et al., 2007 ; Dromer et al., 1993**). C'est d'ailleurs cette approche qui fut la première utilisée pour l'identification des sérotypes de *C. neoformans*. Cependant, la découverte des mutants non capsulés (**Jin et al., 2013 ; O'Meara et al., 2013**) associée à l'arrêt de la production du kit Crypto Check (**Ito-Kuwa et al., 2007**) a poussé à la recherche de nouvelles approches de sérotypage de *C. neoformans*. Plusieurs approches moléculaires ont été proposées, parmi lesquelles la PCR multiplex amplifiant les gènes de la laccase (LAC1) et de la capsule (CAP64). Cette approche permet de différencier dans une PCR unique les 5 sérotypes du complexe *C. neoformans/C. gattii* (**Ito-Kuwa et al., 2007**).

L'étude des génotypes des isolats par la PCR-RFLP du gène URA5 montre que tous les isolats sont de type VNI. En effet, plusieurs études montrent que la majorité des souches de *C. neoformans* var. *grubii* serotype A sont de type moléculaire VNI et que très peu sont de type moléculaire VNII (**Cogliati, 2013 ; Bertout et al., 2012 ; Feng et al., 2008 ; Escandón et al., 2006 ; Litvintseva et al., 2006 ; Meyer et al., 2003 ; Meyer et al., 1999**). **Trilles et al. (2012)** ont récemment montré qu'il existe une relation entre la sensibilité aux antifongiques et les génotypes, mettant de l'emphase sur la détermination de ceux-ci pour une meilleure lutte contre les infections à *Cryptococcus*.

L'étude du typage moléculaire du complexe *C. neoformans/C. gattii* est essentiellement réalisée par l'analyse des séquences mini- et microsatellites. L'analyse de ces séquences microsatellites

a permis de grouper les souches dans les principaux types moléculaires connus VN et VG (Cogliati, 2013 ; Ribeiro et Ngamskulrungronj, 2008 ; Trilles *et al.*, 2008 ; Litvintseva *et al.*, 2006 ; Igraja *et al.*, 2004 ; Meyer *et al.*, 2003 ; Meyer *et al.*, 1999). Cependant, très peu d'études se sont focalisées sur la diversité génétique pouvant survenir dans une population de sérotype précis d'une part et en combinant les analyses des séquences microsatellites d'autres parts. Les auteurs qui s'y sont engagés ont montré une diversité génétique importante au sein d'un génotype VN/VG précis (Cogliati *et al.*, 2013 ; Bertout *et al.*, 2012 ; Illnait-Zaragozi *et al.*, 2010 ; Escandon *et al.*, 2006). Dans ce travail, l'usage des microsatellites (GACA)₄, (GTG)₅ et minisatellite M13 a permis de découvrir une diversité génétique importante au sein de la population de *C. neoformans* var. *grubii* sérotype A étudiée. En effet, 15 types moléculaires différents ont été obtenus. Cet important polymorphisme génétique des séquences microsatellites a déjà été obtenu par Bertout *et al.* (2012) et a également été démontré comme existant chez *Aspergillus* et *Candida* (Nébavi *et al.*, 2006 ; Bertout *et al.*, 2001). En utilisant la MLST, Cogliati *et al.* (2013) ont trouvé 16 génotypes chez *C. neoformans* var. *grubii* sérotype A en Italie à partir de 53 isolats. L'analyse de 9 séquences microsatellites chez *C. neoformans* var. *grubii* sérotype A par Illnait-Zaragozi *et al.* (2010) a permis de générer 14 types moléculaires différents à partir de 19 isolats au Cuba. L'analyse de la diversité génétique au sein d'un même patient montre que 24% des patients sont infectés par deux souches de génotypes différents. Cette diversité intra patient a aussi été démontrée par Bertout *et al.* (2012). Desnos-Ollivier *et al.* (2010) ont trouvé 20% d'infections mixtes au cours de la cryptococcose neuro-méningée. Cette variabilité génétique intra-individuelle serait due à des microévolutions de la souche originale ou à une infection chez le même patient par deux souches différentes (Desnos-Ollivier *et al.*, 2010) et la détermination de cette diversité trouverait son application dans une éventuelle différence de sensibilité aux antifongiques entre les différentes souches chez le même patient.

I.3. Sensibilité de *C. neoformans* aux antifongiques

Le tableau 27 représente les intervalles de CMI de chaque prélèvement initial et de ses isolats dérivés. La caspofungine n'a pas été prise en compte car *C. neoformans* y est naturellement résistant. La sensibilité des isolats varie au sein du même patient avec les écarts de CMI de 1 à 4 dilutions. La différence la plus importante est observée sur la variation de la CMI de l'amphotéricine B chez les isolats du patient CM006. La plus faible variabilité intra-prélèvement s'observe sur le posaconazole. Le prélèvement présentant la plus grande variation de sensibilité entre les colonies est celui du patient CM005, avec une variabilité importante d'un facteur de 4 sur 5 antifongiques (Fluconazole, Itraconazole, Ketoconazole, Flucytosine et Voriconazole).

Le CLSI n'a pas encore publié de catégories de sensibilités pour les isolats de *C. neoformans*. Certains auteurs ont défini les cut-off épidémiologiques (ECVs) qui permettent de distinguer les souches sauvages dites sensibles des souches mutantes, ayant acquis une résistance à un antifongique donné (**Espinel Ingroff et al., 2012a et b ; Pfaller et al., 2011**). Ces références ont permis d'identifier dans ce travail les isolats à sensibilité réduite. La figure 38 représente le pourcentage d'isolats pour lesquels un antifongique donné montre une valeur de CMI. Il ressort qu'un isolat/150 (0,7%) a une sensibilité réduite au fluconazole (CMI=16µg/ml) et 1/150 (0,7%) également à la flucytosine (CMI=16µg/ml).

Tableau 27 : Concentrations minimales inhibitrices des antifongiques testés sur les isolats de *C. neoformans*.

Fourchettes de CMI (µg/ml) pour chaque antifongique sur chaque prélèvement initial et ses colonies dérivées							
Prélèvement	Antifongiques						
	Posaconazole	Amphotericine B	Fluconazole	Itraconazole	Ketoconazole	Flucytosine	Voriconazole
CM001	0,06-0,12	0,25-0,5	2-4,0	0,03	0,015-0,03	1-2,0	0,015-0,03
CM002	0,06-0,12	0,5	2-8,0	0,06-0,25	0,06	2-4,0	0,03-0,06
CM003	0,06-0,12	0,25-0,5	4-16,0	0,06-0,12	0,03-0,06	1-4,0	0,03-0,12
CM004	0,03-0,06	0,25-0,5	1-2,0	0,03	0,008-0,015	0,25-1	0,008-0,015
CM005	0,03-0,12	0,5-1	2-8,0	0,03-0,12	0,015-0,06	4-16,0	0,015-0,06
CM006	0,06-0,25	0,06-1	2-4,0	0,06	0,015-0,03	2-4,0	0,015-0,03
CM007	0,06-0,12	0,25-0,5	2-4,0	0,03-0,12	0,015-0,06	0,5-2	0,015-0,03
CM008	0,06-0,12	0,5	2-4,0	0,06	0,03	1	0,015-0,03
CM009	0,03-0,12	0,25-0,5	1-4,0	0,03-0,06	0,015-0,06	2	0,015-0,03
CM010	0,06-0,12	0,5	2-4,0	0,015-0,06	0,015-0,03	2-4,0	0,015-0,03
CM011	0,03	0,25-0,5	1-2,0	0,015	0,008-0,015	2	0,008-0,015
CM012	0,03	0,05	2	0,015	0,008-0,015	2	0,008-0,015
CM013	0,03-0,06	0,25-1	1-2,0	0,015-0,06	0,008-0,03	4-8,0	0,008-0,015
CM014	0,06-0,12	0,5	4	0,06	0,03	4	0,03
CM015	0,015-0,03	0,25-0,5	1-2,0	0,008-0,03	0,008-0,015	0,25-2	0,008-0,015
CM016	0,06-0,12	0,06-0,5	2	0,03-0,06	0,015-0,03	1	0,015-0,12
CM017	0,06-0,12	0,5-1	2-4,0	0,015-0,06	0,015-0,03	4	0,015-0,03
CM018	0,015-0,06	0,5-1	2	0,03-0,06	0,015-0,03	1	0,015
CM019	0,03-0,06	0,25-0,5	2-4,0	0,03-0,06	0,015-0,03	4	0,015-0,06
CM020	0,015-0,03	0,25-1	0,5-1	0,008-0,015	0,008	2	0,008
CM021	0,03-0,12	0,5-1	2-8,0	0,015-0,06	0,008-0,06	2-4,0	0,008-0,06
CM022	0,03	0,5	1	0,03	0,015	1	0,008-0,015
CM023	0,03-0,06	0,05	2	0,03	0,015	2	0,015
CM024	0,03-0,06	0,5	2	0,03	0,015	4	0,015
CM025	0,06-0,25	0,25-1	4-8,0	0,06-0,12	0,03-0,12	2-4,0	0,03-0,06
Sensibilité Globale	0,015-0,25	0,06-1	0,5-16	0,008-0,12	0,008-0,12	0,25-16	0,008-0,12

Les cellules colorées sont celles pour lesquelles la variation de la CMI entre l'isolat ayant la plus grande CMI et celui ayant la plus petite CMI est d'au moins 2 dilutions.

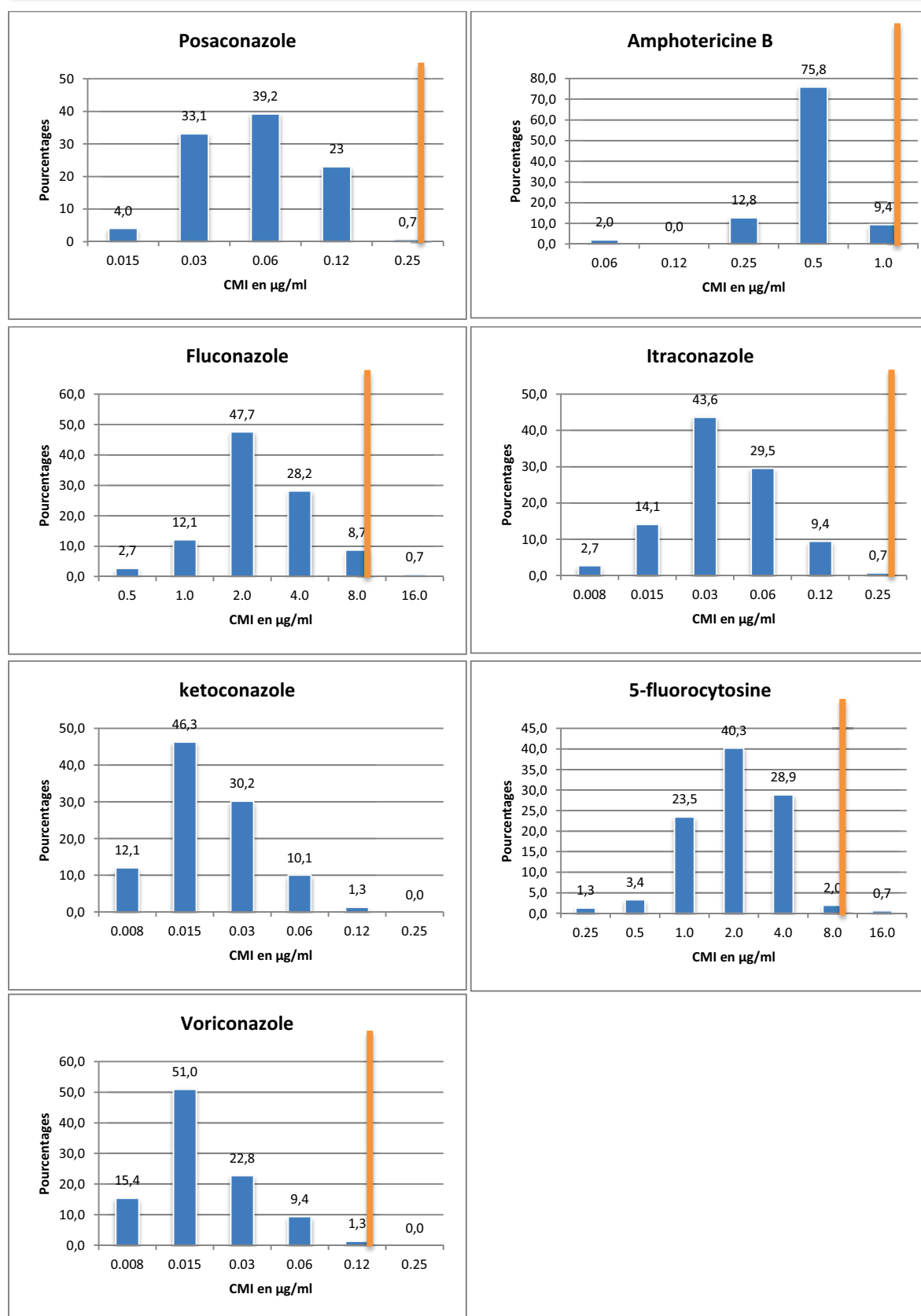


Figure 38 : Pourcentage de isolats de *C. neoformans* sensibles à chaque CMI et pour chaque antifongique testé. Les lignes orange représentent les cutoff épidémiologiques publiés pour ces antifongiques par *Espinel Ingroff et al., (2012a et b)* et *Pfaller et al., (2011)*.

I.4. Discussion

La sensibilité globale des isolats est semblable aux résultats obtenus par **Bertout et al. (2012)** travaillant également sur les isolats issus des patients VIH positifs à Yaoundé. Le CLSI n'a pas encore publié des valeurs limites de CMI permettant de classer les souches de *C. neoformans* selon leur sensibilité (**Pfaller et al., 2011**). Toutefois, il a été démontré dans des modèles animaux (**Velez et al., 1993**) et dans des cas d'échecs thérapeutiques cliniques (**Berg et al., 1998; Venkateswarlu et al., 1997; Armengou et al., 1996; Birley et al., 1995; Viard et al., 1995; Paugam et al., 1994**) que la CMI du fluconazole peut être prédictive de son efficacité thérapeutique. Ainsi, **Aller et al. (2000)** ont montré qu'un patient infecté par *C. neoformans* dont la CMI du fluconazole est $\leq 8\mu\text{g/ml}$ répond mieux au traitement qu'un patient infecté par une souche pour qui la CMI est $\geq 16\mu\text{g/ml}$. **Lee et al. (2012)** ont également établi que la CMI du fluconazole permet de prédire l'efficacité thérapeutique. Une souche (0,7%) a présenté une sensibilité réduite pour le fluconazole et la flucytosine. Des cas de sensibilité réduite pour le fluconazole ont déjà été démontrés par **Bertout et al. (2012), Mdodo et al. (2011), Pfaller et al. (2011), Thompson III et al. (2008)**. Il est connu que la flucytosine présente un taux élevé de développement de résistance, c'est la raison pour laquelle elle n'est jamais utilisée en monothérapie (**Lewis, 2011; David et William, 2010**). Une souche (0,7%) a présenté une sensibilité réduite pour la 5-fluorocytosine. Les auteurs qui ont défini une limite de sensibilité la classerait dans la catégorie intermédiaire (**Bertout et al., 2012; Mdodo et al., 2011; Pfaller et al., 2005**). Cependant, aucune évidence n'est établie pour une exposition antérieure de ces patients à ces antifongiques, ce qui justifierait d'une résistance acquise. En outre, il a été constaté que pour les isolats obtenus du même patient, la CMI peut varier de plus de 3 dilutions pour un antifongique donné. Cette remarque a été faite pour la première fois par **Bertout et al., (2012)**. Cette variation de la CMI intra individuelle pourrait être due à des mutations ou adaptations de la souche originelle, générant des souches à sensibilité réduite aux antifongiques ou encore à une infection multiple à partir des souches de sensibilités différentes.

I.5. Conclusion partielle 1

L'objectif de cette première partie était d'étudier l'épidémiologie et la sensibilité aux antifongiques d'isolats de *C. neoformans*.

Il ressort que la fréquence de la cryptococcose neuro-méningée chez les PVVIH présentant des signes de méningite à l'Hôpital Central de Yaoundé est de 28,08%. Les hommes étant plus infectés que les femmes.

Concernant l'étude de la diversité génétique, nous avons montré que le serotype A génotype VNI est le seul génotype isolé dans la population d'étude. L'analyse des séquences microsatellites a permis d'obtenir 15 types moléculaires issus des 150 isolats testés. Par ailleurs, il a également été observé que le même patient peut être infecté par 2 isolats différents, et la fréquence des infections mixte est de 24%.

L'étude de la sensibilité aux antifongiques a montré que les isolats de *C. neoformans* sont sensibles aux antifongiques testés. Toutefois, une différence de sensibilité des isolats d'un même patient aux antifongiques a été observée.

II. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques de *C. albicans*

II.1. La candidose muqueuse

II.1.1. Caractéristiques de la population d'étude

Pendant la période d'étude, de janvier 2012 à octobre 2013, 402 patients ont accepté de participer à l'étude en donnant par signature leur consentement éclairé. Ils ont été prélevés et ont permis de collecter 1218 prélèvements muqueux (selles, urines, prélèvements vaginaux, écouvillonnage buccal).

On trouve 306 (76,1%) femmes et 96 (23,9%) hommes. L'âge moyen est de $40,22 \pm 9,54$ ans avec les extrêmes allant de 23 à 66 ans.

250 (62,14%) patients ont eu au moins une culture positive à caractère infectieux pour leur prélèvement d'après les critères proposés par **Bouchara et al., (2010)**. 232 patients (57,62%) sont colonisés par *Candida*.

Tous les patients sont infectés par le VIH 1-M, excepté un patient qui est co-infecté par les types 1-M et 1-0. Un seul des patients est sous traitement antifongique au fluconazole, les autres n'ont pas d'historique de traitement antifongique connu.

L'indice de masse corporelle (IMC) moyen chez les patients colonisés par *Candida* est de $25,05 \pm 5,21$.

Le taux de CD4 moyen chez les patients colonisés par *Candida* est de 371 ± 222 CD4/mm³ avec les extrêmes allant de 34 à 1127 CD4/mm³. Dans la tranche de CD4 comprise entre 200 et 500 CD4/mm³, on trouve une plus forte colonisation fongique (65%). Il n'y a pas de relation entre le taux de CD4 et la colonisation fongique (p-value = 0,7) (tableau 28).

La colonisation est présente chez 88,9% de patients naïfs au traitement ARV et est présente chez 59,02% de patients sous ARV ; la statistique du test de Chi2 d'indépendance qui est de 4,101 avec une p-valeur de 0,129 montre qu'il n'y a pas de relation entre la survenue de la candidose et le traitement ARV.

Tableau 28: Répartition de la présence des *Candida* en fonction des taux de CD4 d'après la classification OMS de 2006

	Tranche de CD4 (CD4/mm ³)			
	<200 (ID sévère)	200-349 (ID avancée)	350-499 (ID modérée)	≥500 (pas ID)
<i>Candida</i> + (%)	53,84	65,85	65,62	57,5
<i>Candida</i> - (%)	46,16	34,15	34,38	42,5
Total (%)	100	100	100	100

ID = immunodépression

II.1.2. Répartition et fréquences des colonisations par site de prélèvement

Les 1218 prélèvements muqueux (selles, urines, prélèvements vaginaux, écouvillonnage buccal) sont répartis dans le tableau 29. Les cas de culture positive à germe autre que *Candida* ont été exclus. La fréquence globale de la colonisation des muqueuses dans la population d'étude est de 24,13%.

Tableau 29 : Répartition des prélèvements muqueux par sites prélevés pour la recherche de *Candida* dans la population d'étude

	Bouche	Prélèvements vaginaux	Selles	Urines	Total
Nombre de prélèvements	322	262	308	326	1218
Cultures positives	92	38	128	36	294
Fréquence des cultures positives (%)	28,57	14,50	41,55	11,04	24,13

II.1.3. Répartition des germes isolés

La figure 39 présente quelques images obtenues pendant les processus d'identification des isolats. Sur la base de leurs caractères morphologiques, phénotypiques, biochimiques, spectrométriques et moléculaires, les 317 isolats obtenus ont été regroupés en 21 espèces, dont 15 du genre *Candida*. Les 5 espèces de *Candida* les plus représentées sont dans l'ordre *C. albicans* (43,01%), *C. krusei* (18,38%), *C. glabrata* (10,66%), *C. tropicalis* (8,09%) et *C. parapsilosis* (5,15%). *C. africana* a été identifié, mais les autres espèces du complexe *C. albicans* (*C. dubliniensis* et *C. stellatoidea* type I) n'ont pas été isolées. Parmi les espèces non *Candida*, *Trichosporon inkin* et *Saccharomyces cerevisiae* sont les plus fréquemment rencontrées (figure 40).

L'analyse de la répartition des souches par site de prélèvement à partir de la figure 41 montre que *C. albicans* est le germe le plus important quel que soit le prélèvement. Il représente 66,67% des espèces isolées dans la bouche, 47,9% dans les prélèvements vaginaux, 32% dans les selles et 25% dans les urines. *C. glabrata* est isolé dans les prélèvements vaginaux (18,8%), les selles (10,2%) et les urines (17,9%). *C. krusei* est la deuxième espèce la plus fréquente dans les selles (27,3%). Dans les urines, *C. tropicalis* (21,4%), *C. albicans* (25%), et *C. glabrata* (17,9%) sont les espèces majoritairement isolées. Les espèces les plus abondantes dans les selles sont *C. albicans* (32%) et *C. krusei* (27,3%). *C. africana* ne se retrouve que dans le prélèvement vaginal. *Kodamaea ohmeri* est la seule espèce non *Candida* isolée de la bouche.

Quinze/quatre-vingt-douze (11,36%) patients étaient porteurs deux souches différentes dans leurs selles. L'association *C. albicans* et un autre germe est de 66,67%. L'association avec *C. krusei* est de 40%, suivie de *C. glabrata* (13,33%), *C. parapsilosis* (6,66%) et de *C. rugosa* (6,66%). L'association d'un autre germe avec *C. krusei* est de 53,33%. Dans la bouche, l'on a 4 associations de germes dont 3 associations de 2 germes (*C. albicans* avec respectivement *C. krusei*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*). Une association de 4 germes dans un même prélèvement buccal a été observée (*Kodamaea ohmerii*, *C. kefyr*, *C. krusei* et *C. guilliermondii*). La seule association dans les urines est entre *C. albicans* et *C. tropicalis*. Dans les prélèvements vaginaux, il n'y a aucune association de germes observée.

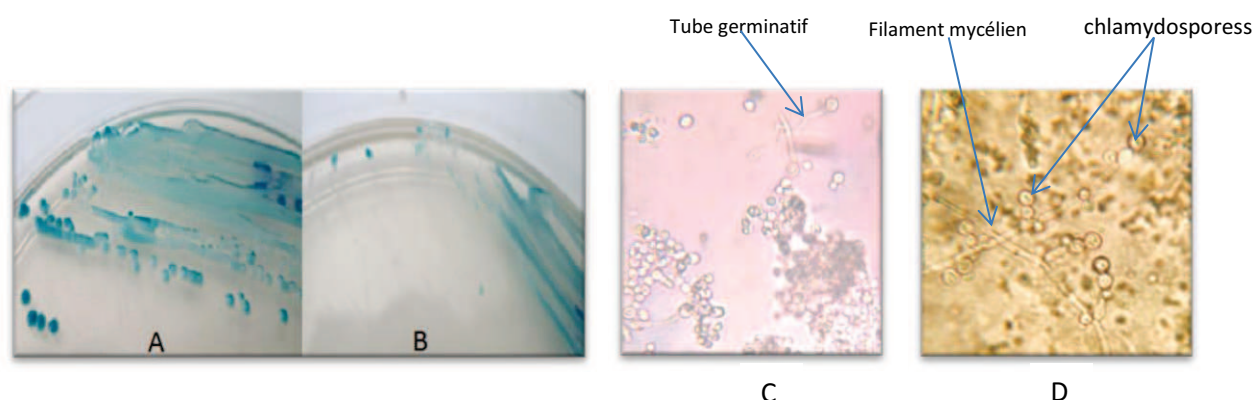


Figure 39: Quelques images des tubes germinatifs obtenus lors du test de blastèse, chlamydospores sur milieu PCB et couleur des isolats du complexe *Candida albicans* sur milieu chromogénique Can2. A, culture de *C. albicans* sur milieu Can2 ; B culture de *C. africana* sur milieu Can2 ; C, tube germinatif de *C. albicans* lors du test de blastèse ; D, filament mycélien et chlamydospores de *C. albicans* sur milieu PCB gélosé.

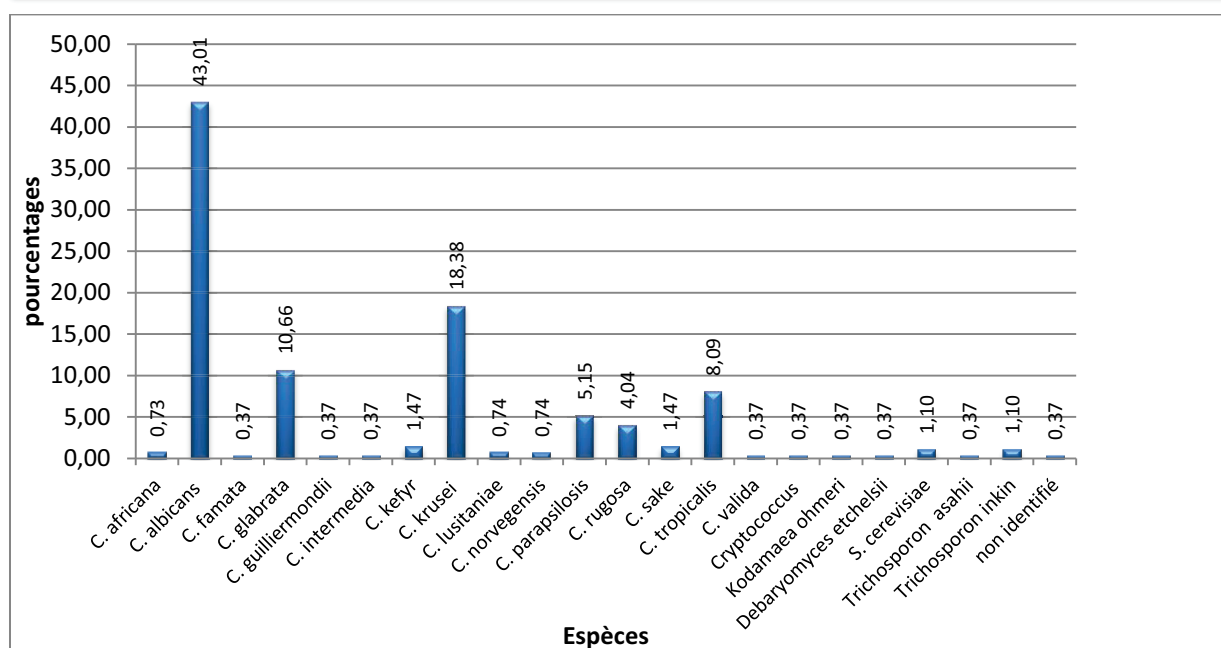


Figure 40 : Répartition générale des levures isolées des prélèvements muqueux

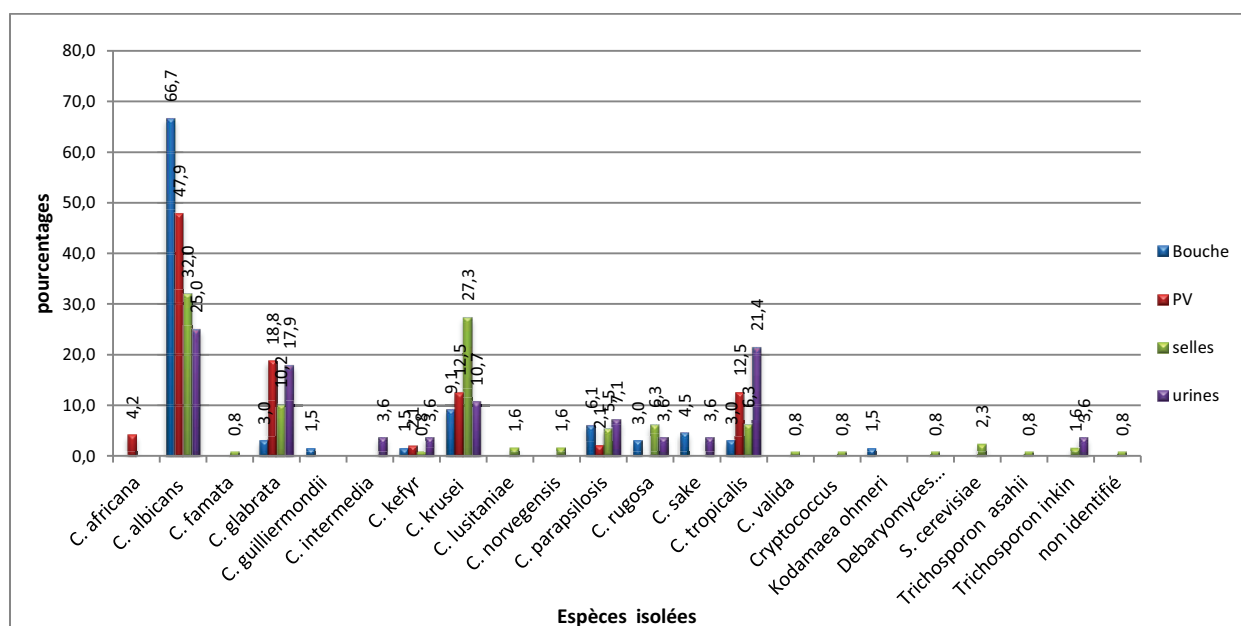


Figure 41 : Répartition des espèces obtenues par site de prélèvement muqueux

II.1.4. Discussion

La candidose muqueuse est fréquente chez les patients VIH positifs naïfs ou non au traitement antirétroviral (Lortholary *et al.*, 2012). Soixante à 80% de malades VIH positifs développent une candidose avec un taux de mortalité pouvant aller de 10 à 20% (David, 2007). La colonisation est souvent effective chez près de 90% de patients (Lortholary *et al.*, 2012) mais avec l'avènement de la trithérapie antirétrovirale, cette fréquence se trouve réduite (Merenstein *et*

al., 2013) comme cela a été observé au cours de cette étude avec 57,62% de patients présentant une colonisation. La répartition du genre dans la population d'étude est disproportionnée avec un sexe ratio de 3,18 en faveur du sexe féminin. En effet, même si les femmes sont plus affectées par le VIH (5,6% contre 2,9% chez les hommes) au Cameroun (**ONUSIDA, 2012**), il reste tout de même qu'elles sont plus aptes à donner leur consentement éclairé pour participer à l'étude. Selon les résultats de l'Enquête Démographique et de Santé (EDS-MICS 2011) la prévalence du VIH chez les 15 – 49 ans est établie à 4,3 %. La tranche de 35 à 39 ans est la plus touchée avec une prévalence de 8,1% en 2011 (**ONUSIDA, 2012**). Ces données corroborent les résultats obtenus dans la présente étude. Le VIH 1-M est le type de VIH le plus rencontré dans le monde et en Afrique subsaharienne (**Osmanov et al., 2002**), cette donnée a été également observée dans la présente étude avec plus de 99% des cas.

L'étude de la candidose muqueuse chez les PVVIH est très souvent limitée à la muqueuse oropharyngée. La fréquence de *Candida* isolé au niveau de cette muqueuse est supérieure à 50% (**Kalpanadevi et al., 2012; Lortholary et al., 2012 ; Vazquez, 2010 ; Yang et al., 2010 ; Yang et al., 2006 ; Hung et al., 2005**). Il ressort de ce travail que toutes les muqueuses peuvent être colonisées par *Candida*. **Merenstein et al. (2013)** trouvent une colonisation buccale chez 67% et une colonisation vaginale chez 18,8% de patients VIH positifs. Une autre étude a trouvé 65% de *Candida* dans la muqueuse buccale et 5% dans la muqueuse gastro-intestinale (par analyse des selles) (**Khan et al., 2012**). En 2005, **Lohoué et al.** identifient à Yaoundé une candidurie chez 36,2% de personnes infectées par le VIH. Une équipe à Buea a travaillé sur la colonisation orale et urinaire chez 207 PVVIH et a trouvé 81,2% de colonisation orale et 18,2% de colonisation urinaire (**Longdoh et al., 2012**). **Lehman et al. (2013)** en couplant la recherche des parasites intestinaux à celle des levures chez 201 PVVIH à Douala, ont trouvé une fréquence de 14,9% de *Candida* dans les prélèvements.

Dans ce travail, 21 espèces de levures ont été isolées, avec une prédominance de *C. albicans* (43,01%). Dans plusieurs études portant sur l'isolement des levures des sites muqueux chez les PVVIH, une diversité d'espèce est très souvent observée. **Yang et al. (2010)** ont isolé 26 espèces de levures de la cavité buccale avec *C. albicans* représentant 68% des germes isolés. **Hung et al., (2005)** avaient trouvé la répartition suivante dans leur étude : 86,7% *C. albicans*, 3% *C. glabrata*, 3% *C. parapsilosis*, 2,1% *C. tropicalis*, 5 1,5% *C. lusitaniae*, et 3,7% autres espèces non

Candida. **Khan et al., (2012)** retrouvent 5 espèces dans leur étude, nommément *C. albicans* 61,7%, *C. parapsilosis* 9,57%, *C. tropicalis* 7,34%, *C. guilliermondii* 14,9%, *C. dubliniensis* 6,38%. Dans une étude de 2010, chez des patients au stade SIDA, 54% des *Candida* isolés étaient *C. albicans*, suivie de *C. dubliniensis* (17%) et *C. glabrata* (16%) (**Thompson et al., 2010**). Une autre étude, en Allemagne, montre que *C. albicans* est toujours l'espèce la plus fréquemment isolée (58,5%), suivi par *C. glabrata* (19,1%), *C. parapsilosis* (8,0%) et *C. tropicalis* (1,4%) (**Borg Von Zepelin et al., 2007**).

Si *C. albicans* reste l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les mycoses muqueuses (**Ellepolá et al., 2000**), l'incidence des espèces non *albicans* telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei* a beaucoup augmenté non seulement chez les PVVIH, mais aussi dans d'autres groupes à risque, vraisemblablement en raison de l'utilisation d'antifongiques à spectre étroit n'agissant essentiellement que sur *C. albicans* (**Sullivan et al., 1995**). En Europe, une étude conduite dans 7 pays, a montré que 43,6% des infections systémiques étaient dues à des *Candida* non *albicans*, dont les principaux sont : *C. glabrata* (13.6%), *C. parapsilosis* (13.3%) et *C. tropicalis* (7.2%) (**Tortorano et al., 2004**). Aux Etats-Unis, le programme de surveillance a montré que 48% des candidoses systémiques étaient dues à des *Candida* non *albicans*, *C. glabrata* (20%), *C. tropicalis* (11%), *C. parapsilosis* (8%) et *C. krusei* (5%) (**O'Grady et al., 2002**). Plus récemment le programme SENTRY a indiqué que dans des infections systémiques, près de 50% des isolats étaient *C. albicans*, 18% *C. glabrata*, 17% *C. parapsilosis*, 11% *C. tropicalis* et 2% *C. krusei* (**Pfaller et al., 2011**). Cela montre bien que la prévalence est variable d'une étude à l'autre, d'une région à l'autre, d'une population d'étude à une autre, mais d'une manière globale il est certain qu'il existe une augmentation de la prévalence des *Candida* non *albicans*. Ceci justifie la particularité des résultats obtenus dans la présente étude. Cette modification de la cartographie des espèces de *Candida* chez les PVVIH à Yaoundé est un paramètre important devant désormais guider la prise en charge des infections fongiques opportunistes chez ces patients. L'obtention des cultures ayant plus d'une espèce est remarquable, surtout dans l'association *C. albicans/C. krusei* et est en accord avec les travaux de **Yang et al., (2010)**.

Une attention particulière est ici portée sur les espèces du complexe *C. albicans*. *C. dubliniensis* et *C. stellatoidea* type I n'ont pas été identifiés au cours de cette étude. Toutefois, *C. dubliniensis* a précédemment été isolé dans la cavité buccale d'un patient VIH positifs à Buea

au Cameroun (**Longdoh et al., 2013**). Cette identification a été faite par des méthodes biochimiques car les galeries d'identification incorporent désormais l'identification de cette levure qui, contrairement à *C. albicans* n'assimile pas le α -methyl-D-glucoside, le lactate et le xylose (**Sullivan et al., 1995**). *C. stellatoidea* est un mutant sucrose négatif de *C. albicans* et la différenciation entre *C. stellatoidea* type I et type II ne peut se faire que par des méthodes moléculaires (**Yazdanpanah and Khaithir, 2014 ; Jacobsen et al., 2008**). Dans cette étude, il est rapporté pour la première fois un isolement de *C. africana* au Cameroun. L'isolement de cette levure dans le prélèvement vaginal est en accord avec les résultats issus des travaux précédents (**Romeo and Criseo, 2011**). La cavité vaginale reste la niche écologique probable de *C. africana*. Depuis la découverte du gène Hwp1 comme pouvant être à la base de la différenciation des espèces du complexe *C. albicans*, *C. africana* a été identifié dans plusieurs pays dont l'Italie, l'Inde, le Nigeria, l'Allemagne, Madagascar, Angola, Sénégal, Royaume Uni, Chili, Arabie Saoudite, USA, Espagne (**Sharma et al., 2014 ; Borman et al., 2013 ; Dieng et al., 2012 ; Nnadi et al., 2012b ; Romeo and Criseo, 2010 ; Romeo and Criseo, 2009**). Bien que la différenciation phénotypique et biochimique de *C. africana* et de *C. albicans* soit difficile, il reste tout de même admis que *C. africana* donne un test de blastèse négatif, n'assimile pas la glucosamine et la N-acetylglucosamine et ne pousse pas à 42-45°C, contrairement à *C. albicans* comme cela a été également observé dans ce travail. Seules les approches moléculaires permettent de différencier cette espèce, bien que la controverse reste quant à la considérer véritablement comme une espèce isolée (**Sharma et al., 2014 ; Borman et al., 2013 ; Dieng et al., 2012 ; Nnadi et al., 2012b ; Romeo and Criseo, 2010 ; Romeo and Criseo, 2009**) ou comme un clade distinct de *C. albicans* (**Jacobsen et al., 2008**).

II.2. Epidémiologie moléculaire de *Candida albicans*

II.2.1. Extraction d'ADN

Les 115 isolats issus des colonies bleues sur milieu chromogène ont été soumis à l'extraction d'ADN pour les PCR (tableau 30).

Tableau 30 : Rendements d'extraction d'ADN et pureté de l'ADN extrait des isolats du complexe *C. albicans*

Souche	A _{260/280}	C(ng/μl)	Vi (50ng/μl)	Veau qsp 50μl
130S	2,14	1041,8	4,8	45,2
140B	2,09	952,1	5,3	44,7
140PV	2,18	1469,6	3,4	46,6
140U	2,12	1262,3	4,0	46,0
141B	2,15	1459,6	3,4	46,6
141PV	2,15	1493,1	3,3	46,7
141S	2,06	809,6	6,2	43,8
141U	2,13	1259	4,0	46,0
143PV	2,12	715,7	7,0	43,0
149B	2,12	1027,8	4,9	45,1
149B	1,97	256,4	19,5	30,5
150B	2,16	1376,6	3,6	46,4
160B	2,15	447,5	11,2	38,8
161B1	2,1	773,2	6,5	43,5
176S1	2,17	718,3	7,0	43,0
214S3	2,13	1238,8	4,0	46,0
301B	2,15	711	7,0	43,0
303PV	2,14	689,3	7,3	42,7
312S	2,11	734,1	6,8	43,2
314S1	2,09	470,7	10,6	39,4
322S1	2,03	590,9	8,5	41,5
324B	2,11	551,6	9,1	40,9
325B	1,95	545,2	9,2	40,8
325S1	1,8	546,8	9,1	40,9
326B	1,58	156,9	31,9	18,1
327S1	2,03	431	11,6	38,4
328B2	2,08	456	11,0	39,0
329B	2,08	439,8	11,4	38,6
330S	1,89	331,4	15,1	34,9
332B	2,04	474,4	10,5	39,5
332PV	2,09	468,6	10,7	39,3
332S	2,11	165,7	30,2	19,8
332U	2,07	315	15,9	34,1
333B	2,1	407	12,3	37,7
333S	2,1	516,4	9,7	40,3
334PV	1,57	136,1	36,7	13,3
334U	2,15	554,1	9,0	41,0
337S	2	669,8	7,5	42,5
338B	2,08	450,9	11,1	38,9
338PV	2,14	483,8	10,3	39,7
340B	2,02	556,3	9,0	41,0
340S	1,97	311,9	16,0	34,0
345S	2,08	678,1	7,4	42,6
348B	2,03	350,7	14,3	35,7
348S	1,83	675,7	7,4	42,6
349B	1,96	282,8	17,7	32,3
349S	1,96	314,6	15,9	34,1
352S	1,81	312,1	16,0	34,0
357B	2,01	431,7	11,6	38,4
357PV	1,95	413,5	12,1	37,9
357S1	2,06	426,8	11,7	38,3
357U1	1,97	309,9	16,1	33,9
358B	2	451,9	11,1	38,9
360B	1,88	350,9	14,2	35,8
363B	1,89	205,3	24,4	25,6
373B	1,76	575,3	8,7	41,3
373S	1,63	334,5	14,9	35,1
374S	1,69	421,2	11,9	38,1
378S	1,51	301	16,6	33,4
381B	1,61	348,9	14,3	35,7
383B	1,66	385,8	13,0	37,0
384B	1,72	487,3	10,3	39,7
387PV	1,55	272,5	18,3	31,7
388B	1,56	356,2	14,0	36,0
389B	1,77	449,8	11,1	38,9
390B	1,57	417,1	12,0	38,0

391B	1,71	536,3	9,3	40,7	441B2	1,66	1263,7	4,0	46,0
391PV	1,66	104,6	47,8	2,2	441S	1,74	865,1	5,8	44,2
392S	1,54	324,8	15,4	34,6	443B1	1,72	673,9	7,4	42,6
393PV	1,89	666,1	7,5	42,5	443S1	1,29	446,5	11,2	38,8
394PV	1,85	713,7	7,0	43,0	445PV	1,79	440,7	11,3	38,7
394S	1,87	700,3	7,1	42,9	445U	1,92	572,5	8,7	41,3
394U	1,63	420,8	11,9	38,1	446S	1,69	611,7	8,2	41,8
395B1	1,97	250,2	20,0	30,0	448PV	1,93	723,2	6,9	43,1
395S	1,66	433,7	11,5	38,5	453S	1,57	567,1	8,8	41,2
396PV	1,59	329,4	15,2	34,8	454B	1,79	506,8	9,9	40,1
409S	1,4	314,9	15,9	34,1	457PV	1,76	585	8,5	41,5
410PV	1,64	333,6	15,0	35,0	463S	1,26	1042,6	4,8	45,2
410S	1,91	693,8	7,2	42,8	466B	1,61	1045	4,8	45,2
412B	1,66	361,2	13,8	36,2	470B	2,04	917,1	5,5	44,5
415B	1,92	370,3	13,5	36,5	470S	2,02	686,9	7,3	42,7
416B	2,07	660,5	7,6	42,4	472PV	1,83	782,7	6,4	43,6
416S	1,69	366,4	13,6	36,4	472S	1,83	806,3	6,2	43,8
422PV	1,93	745,5	6,7	43,3	473S	1,52	180,5	27,7	22,3
425B	2,14	584	8,6	41,4	477S	1,85	332,4	15,0	35,0
426S	1,89	453,2	11,0	39,0	478PV	1,6	520,4	9,6	40,4
427PV	1,89	464,6	10,8	39,2	478U	1,71	545,4	9,2	40,8
429B	1,84	436,6	11,5	38,5	479B	1,86	360,6	13,9	36,1
430B	2	379,3	13,2	36,8	479S1	1,7	472,3	10,6	39,4
433S1	1,96	779,5	6,4	43,6	480PV	1,75	240,9	20,8	29,2
435PV	1,66	508,4	9,8	40,2					
435U	1,62	673,2	7,4	42,6					
440B	1,76	339,4	14,7	35,3					

II.2.2. Recherche des espèces du complexe *Candida albicans* par amplification du gène Hwp1

La PCR du gène Hwp1 permet de différencier les différentes espèces du complexe *C. albicans*. En effet, *C. albicans* présente un gène d'une longueur de 941pb, *C. dubliniensis* de 569bp, *C. africana* de 700pb et *C. stellatoidea* type I de 800pb (Romeo et Criseo, 2009).

Sur les 115 isolats soumis à cette PCR, 65 ont présenté un profil à une bande à 941pb, et ont été identifiés formellement *C. albicans*. 48 autres souches ont présenté un profil à 2 bandes. Elles ont été également soumises à l'identification par PCR en temps réel, et ont été confirmées *C. albicans*. Quelques profils obtenus après électrophorèse des amplicons du gène Hwp1 sont représentés dans la figure 42.

Cependant, les souches ayant donné les profils à 2 bandes et confirmées *C. albicans* en association avec les souches de profil classique à une bande ont été regroupées au sein d'un nouveau génotype nommé H, et 5 profils ont été identifiés : H1 (941pb), H2 (941 et 1080pb), H3 (941 et 800pb), H4 (941 et 1200pb) et H5 (800 et 1080pb). Les fréquences obtenues pour ces différents profils sont : H1-57,52%, H2-18,58%, H3-16,81%, H4-6,19% et H5-0,9%.

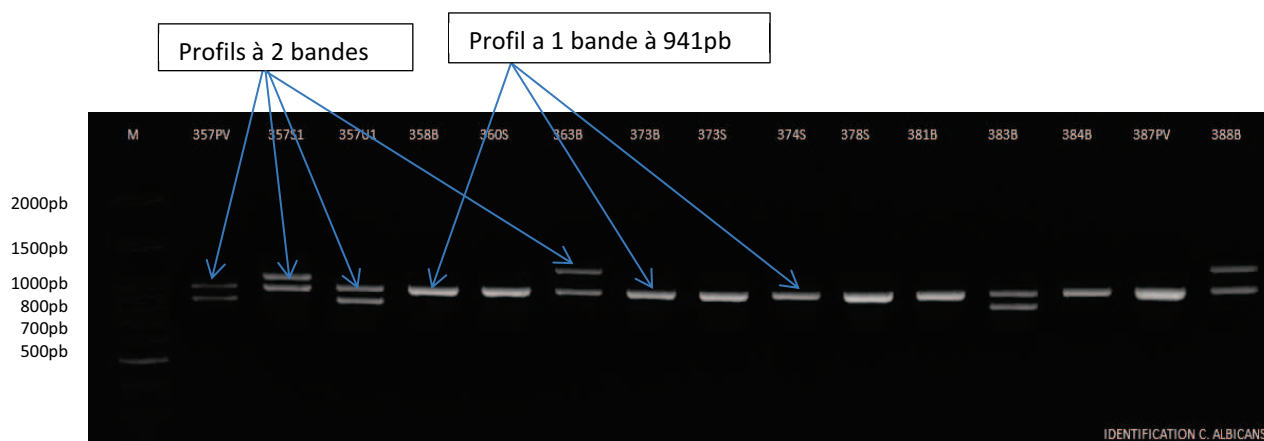


Figure 42 : Exemples de profils obtenus après électrophorèse des amplicons du gène Hwp1 des isolats du complexe *C. albicans*. M est le marqueur de poids moléculaire. Les profils à 2 bandes présentent des tailles de bandes variables entre 800 et 1200pb.

II.2.3. Génotypage ABC de *Candida albicans*

L'amplification du gène codant pour la synthèse de l'ARNr avec l'amorce CA-INT de *C. albicans* permet de différencier 3 génotypes majeurs A (450pb), B (840pb) et C (450pb et 840pb). Le génotype D est actuellement reconnu comme étant *C. dubliniensis* (Bii *et al.*, 2009).

Le génotypage ABC de *C. albicans* a permis d'obtenir 79 (69,91%) isolats de génotype A, 24 (21,23%) isolats de génotype B et 10 (8,84%) isolats de génotype C. Quelques profils obtenus sont présentés dans la figure 43.

Globalement, les isolats issus du même patient présentent le même génotype. Cependant, quelques cas de différences de génotype par site de prélèvement ont été observés. Ces infections mixtes chez le même patient représentent 3,94% sur toute la population d'étude. En effet, le patient 338 présente une souche *C. albicans* génotype A dans le prélèvement de la bouche et une souche génotype B dans le prélèvement vaginal. Le patient 441 était porteur d'une souche de génotype A dans la bouche et une autre de génotype B dans les selles. Le patient 479 a la souche génotype A dans la selle et la souche génotype B dans la bouche. Le

patient 140 a la souche génotype A dans les urines, le prélèvement vaginal et a la souche génotype B dans la bouche. Il n'y a pas de relation entre le site de prélèvement et le génotype.

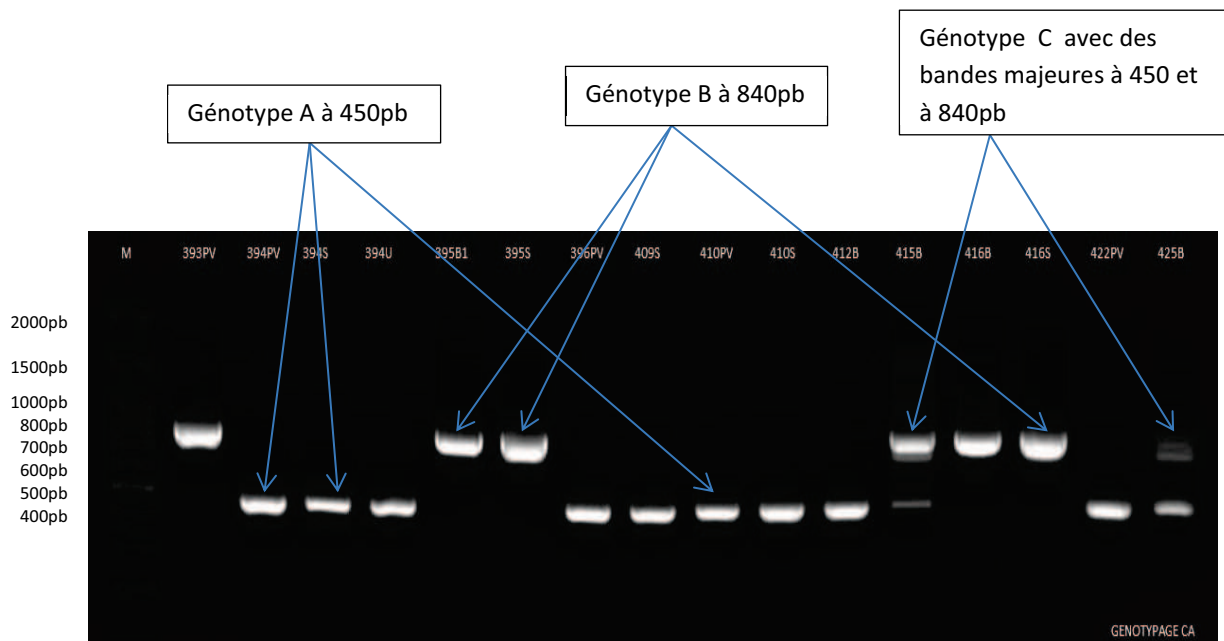


Figure 43: Profils de migration PCR obtenus pour le génotypage de *C. albicans*

Tableau 31: Répartition des génotypes de *Candida albicans* par site de prélèvement.

	Génotype			Total
	A	B	C	
PV	16	5	0	21
S	26	9	4	40
U	6	2	1	9
B	30	8	5	43
Total	79	24	10	113

PV=prélèvement vaginal ; S=selles ; U=urines ; B=bouche

II.2.4. Typage moléculaire de *Candida albicans* par amplification des séquences microsatellites HIS3, EF3, CDC3

La figure 44 présente quelques profils obtenus après séparation des amplicons des séquences microsatellites CDC3, HIS3 et EF3 par électrophorèse. Certaines souches présentent des profils hétérozygotes (2 bandes), d'autres à une seule bande (homozygotes) et d'autres à 3 bandes.

L'analyse de ces diversités par l'algorithme UGPMA a permis de générer un dendrogramme (figure 45). L'analyse du dendrogramme montre une diversité génétique de *C. albicans* avec 65 types moléculaires différents issus de 113 isolats testés. Le groupe le plus important regroupe 12 isolats et de nombreux isolats sont représentés par un seul type moléculaire. Plusieurs génotypes peuvent être observés chez le même patient. Toutefois certains isolats issus du même patient ont le même type moléculaire. C'est le cas des souches issues des patients 333, 394, 395, 416, 472, 141 et 340. Il n'y a pas de correspondance entre un type moléculaire particulier et le type de prélèvement.

L'analyse de la liaison entre le type moléculaire et le génotype ABC montre que, pour le groupe le plus important (à 12 souches), 8 (66,67%) des 12 isolats sont génotype B, représentant 32% de tous les isolats génotype B. 3 isolats sont génotype C et 1 seul est génotype A.

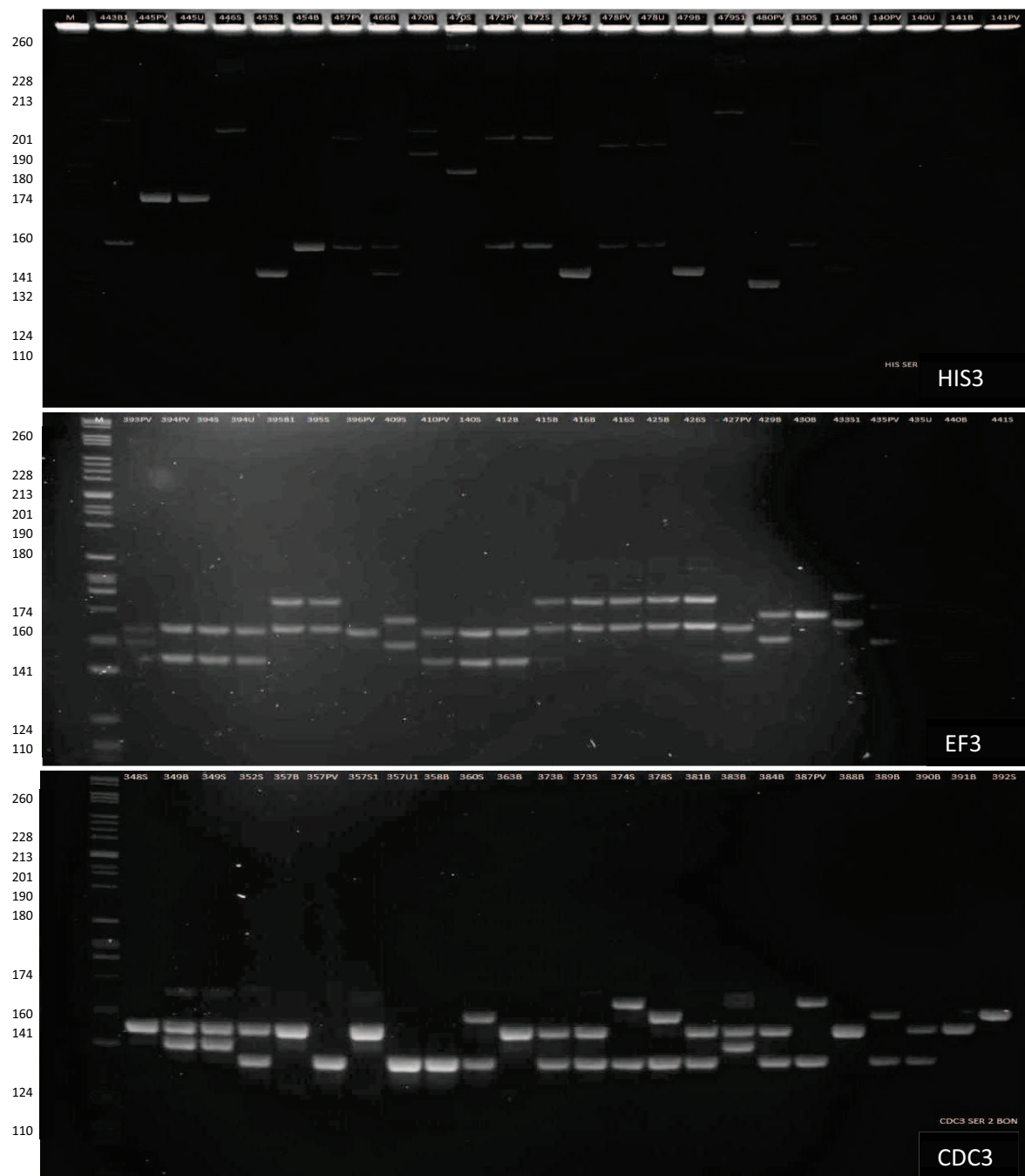


Figure 44: Profils de migration des amplicons des microsatellites CDC3, HIS3 et EF3 de *C. albicans*.

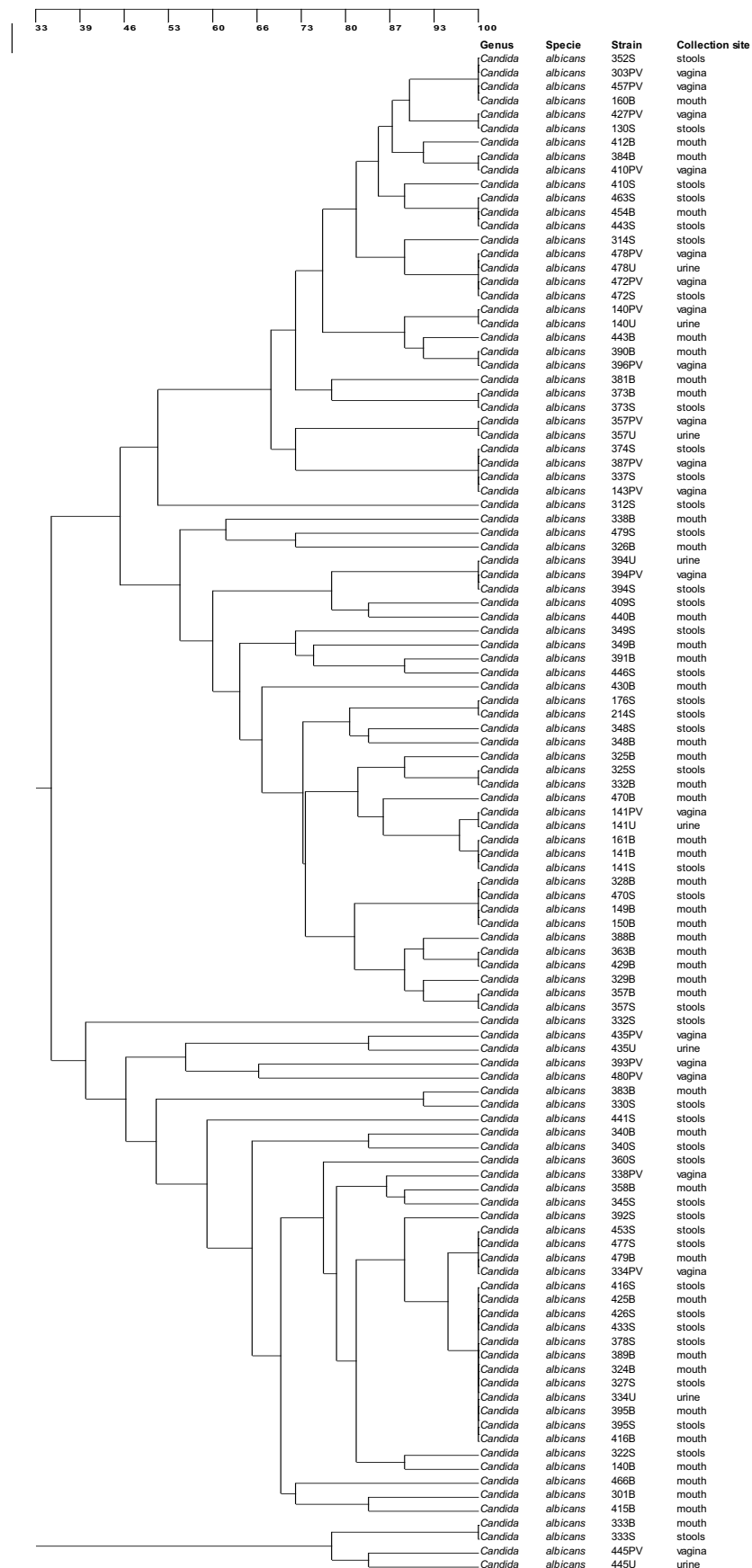


Figure 45 : Dendrogramme de l'analyse des séquences microsatellites de *C. albicans*

II.2.5. Discussion

Dans ce travail, *C. albicans* reste l'espèce majoritaire du complexe *C. albicans* avec une fréquence de 98,28% (113/115). *C. africana* occupe 1,72% (2/115). La découverte d'espèces mineures du complexe *C. albicans* contribue à réduire la fréquence de *C. albicans* en la recadrant dans son contexte réel. Même si *C. dubliniensis* a été découvert bien avant *C. africana*, il se pourrait que la fréquence de *C. africana* soit plus élevée que celle de *C. dubliniensis*, au regard du présent travail et des publications récentes. En effet, 3,84% de *C. africana* ont été isolés dans une étude moléculaire de 52 souches de *C. albicans*, et aucune souche de *C. dubliniensis* n'a été identifiée dans cette même étude (**Romeo and Criseo, 2009**). Par ailleurs, si l'amplification du gène Hwp1 permet de mieux différencier les espèces du complexe *C. albicans*, la confirmation de l'espèce *C. albicans* en elle-même dans cette étude a été difficile au regard des 48 isolats ayant donné des profils atypiques avec des bandes doubles. De ce fait, il a fallu l'amplification des régions ITS1 et ITS2 du rDNA par PCR en temps réel pour confirmer l'identité de ces isolats comme étant *C. albicans*. En effet, *C. albicans* est diploïde. Cette particularité expliquerait la diversité génétique observée pour des isolats obtenus et dès lors nous avons, pour le gène Hwp1, nommé les génotypes H1-H5. Cette diversité est donc l'une des premières caractéristiques des souches de *C. albicans* isolées au Cameroun. Le génotype H1 homozygote majoritaire serait le premier à partir duquel les autres génotypes (forme allèles) ont été générés par mutation. De plus, la présence des profils hétérozygotes avec une bande à 800pb montre la proximité génétique entre *C. albicans* et *C. stellatoidea* qui lui est décrit comme homozygote à 800pb pour le gène Hwp1 (**Romeo and Criseo, 2009**).

L'analyse du génotype ABC à l'aide de l'amorce CA-INT, donne une nette prédominance du génotype A, ce qui est en accord avec les travaux antérieurs (**Silva-Rocha et al., 2014 ; Bii et al., 2009**). Cependant, si le génotype B est le deuxième plus fréquent dans cette étude, il vient en opposition aux résultats de **Silva-Rocha et al.** et ceux de **Bii et al.** qui trouvent dans leur travaux que le génotype C est plus fréquent que le génotype B (**Silva-Rocha et al., 2014; Bii et al., 2009**). La fréquence de 3,94% (4/113) d'infections multiples chez le même patient présente un intérêt particulier dans la compréhension de l'épidémiologie moléculaire de *C. albicans* chez les PVVIH. En effet, elle témoignerait d'une multiple contamination ou d'une mutation intrinsèque d'une souche unique de départ (**Desnos-Olivier et al., 2010**).

L'analyse des séquences microsatellites de *C. albicans* est une très bonne méthode de typage moléculaire des souches de cette espèce (Bai, 2014). En combinant l'analyse des 3 séquences microsatellites HIS3, CDC3 et EF3, Botterel *et al.* (2001) ont obtenu un pouvoir discriminant de 0,97. Le premier typage moléculaire des souches de *C. albicans* au Cameroun qui est réalisé dans ce travail montre une importante diversité des souches isolées des PVVIH avec 65 types moléculaires sur les 113 souches testées. Dalle *et al.* (2008) trouvent une aussi importante diversité sur les souches de *C. albicans* isolées des patients cancéreux. Des résultats similaires ont également été obtenus par Botterel *et al.* (2001). Cette même diversité a été observée dans l'étude de Sampaio *et al.*, (2010) utilisant d'autres séquences microsatellites (CAI, CEF et CAVI). La diversité génétique est due au polymorphisme de longueur de chaque microsatellite amplifié d'une part et à la combinaison de ces diversités individuelles dans une seule analyse. En effet, le génome de *C. albicans* est très dynamique, avec des translocations, délétions et duplications chromosomiques courantes. L'hypothèse courante de l'instabilité du génome de *C. albicans* est qu'elle permet à la levure pathogène d'acquérir la diversité génétique nécessaire pour survivre dans différentes niches environnementales (Kabir and Hussain, 2009 ; Rustchenko, 2007).

II.3. Sensibilité des isolats de *Candida albicans* aux antifongiques

II.3.1. Sensibilité globale

La classification des isolats en sensible, sensible-dose-dépendant ou résistant est fonction de la classification du CLSI (2008). Les antifongiques testés sont ceux utilisés en routine au Cameroun pour le traitement des candidoses muqueuses dans la population générale et le fluconazole est préconisé en prophylaxie et en traitement d'appoint des candidoses chez les patients VIH positifs au Cameroun. Les résultats de la sensibilité de *C. albicans* aux antifongiques sont répertoriés dans les tableaux (32, 33 et 34).

Tous les isolats sont sensibles à l'amphotéricine B en 24heures. Mais après 48heures, l'on observe une augmentation de la CMI lue pour 10,61% d'isolats. La sensibilité aux azolés varie de 65,48% à 91,15%. Toutefois, il est constaté que la CMI lue est différente à 24h et à 48h. L'azolé le plus efficace est le fluconazole, avec une activité sur 86,72% des souches à 48 heures d'incubation.

Si l'on étudie la variation de la sensibilité en fonction des sites de prélèvement (tableau 34), il ressort qu'il n'y a pas de relation entre la sensibilité d'un isolat et le site de prélèvement.

Certains isolats issus du même patient présentent le même profil de sensibilité, notamment les isolats 140B, 140PV et 140U ; 340B et 340S ; 357PV, 357U1, 357S1 ; 416B et 416S. Cependant, d'autres isolats issus du même patient présentent des profils de sensibilité différents aux antifongiques testés ; il s'agit entre autres de 325B et 325S1, 373B et 373S, 332B et 332S pour le kétoconazole ; 348B et 348S pour l'itraconazole.

Les isolats 422PV et 448PV identifiées comme étant *C. africana* sont sensibles aux antifongiques testés sauf 448PV qui est résistant au kétoconazole.

L'analyse de la relation entre le génotype H et la sensibilité des isolats aux antifongiques donne des résultats remarquables. En effet, le test de Chi2 d'indépendance au seuil de probabilité de 5% montre que, pour l'itraconazole, la statistique du test est de 18,383 et la p-value de 0,049. Ce qui permet d'objectiver une relation entre la sensibilité des isolats à l'itraconazole et le génotype H. En effet, les génotypes H2 et H3 ont une plus grande tendance de développement de la résistance que les autres génotypes. Même si la statistique ne montre pas de relation entre le génotype H et la sensibilité aux autres azolés (fluconazole (p-valeur 0,7) ; kétoconazole (p-value 0,092)), il reste tout de même que les génotypes H2 et H3 ont une plus grande tendance de développement de résistances aux azolés. La susceptibilité à l'amphotéricine B semble ne pas être en relation avec le génotype (p-valeur 0,057). Le génotype H1 présente une plus grande sensibilité aux antifongiques testés.

L'analyse de la relation entre le génotype ABC et la sensibilité à un antifongique donné réalisée par le test de Chi2 d'indépendance donne les valeurs de statistiques de test (au seuil de probabilité 5%) de 3,48 (p-value=0,175), de 4,06 (p-value=0,398), de 7,52 (p-value=0,11) et de 3,47 (p-value=0,48) pour l'amphotéricine B, le kétoconazole, l'itraconazole, et le fluconazole respectivement. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de relation entre le génotype et la sensibilité des isolats aux antifongiques testés.

Tableau 32: Concentrations minimales inhibitrices pour 113 isolats de *C. albicans* testés

Code souche	Génotype	Amphotéricine B		Ketoconazole		Itraconazole		Fluconazole	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
130 S	A	0,25	0,25	0,03	2	0,06	0,25	0,25	0,5
140 B	B	1	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,25
140 PV	A	1	1	0,06	0,125	0,06	0,06	0,25	0,5
140 U	A	1	1	0,06	0,125	0,06	0,06	0,25	0,25
141 B	A	1	1	1	1	8	8	8	16
141 PV	A	0,015	0,015	0,25	4	1	16	2	64
141 S	A	1	1	1	1	8	8	2	2
141 U	A	1	2	2	2	8	8	2	2
143 PV	A	1	1	0,03	16	0,06	0,06	0,25	0,25
149 B	A	0,5	2	0,5	2	2	2	2	2
150 B	A	1	2	1	2	0,5	1	1	1
160 B	A	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,25	0,25
161 B1	A	0,25	0,25	0,25	4	1	16	2	4
176 S1	A	0,5	1	0,06	0,06	0,125	0,125	1	1
214 S3	A	1	2	0,125	0,125	1	1	1	2
301 B	B	1	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,5
303 PV	A	0,5	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	> 64
312 S	A	1	1	0,03	0,06	0,06	0,125	0,25	1
314 S1	A	1	1	0,03	0,125	0,25	0,125	0,5	0,5
322 S1	B	1	1	0,03	0,03	0,03	0,06	0,25	0,25
324 B	B	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,06	0,25	0,25
325 B	A	0,25	0,5	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,25
325 S1	A	0,5	1	2	2	0,06	0,125	0,25	0,25
326 B	A	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,25	0,5
327 S1	B	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,25
328 B2	A	0,5	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	1
329 B	A	0,5	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	1
330 S	A	0,5	1	0,125	1	0,25	8	0,5	16
332 B	A	0,5	2	8	8	0,25	8	2	2
332 S	A	0,5	1	0,03	0,03	0,125	0,06	0,25	0,5
333 B	B	0,5	1	2	2	0,25	8	32	> 64
333 S	B	0,25	1	8	8	0,125	16	16	64
334 PV	A	0,5	1	0,03	0,03	0,125	0,125	0,25	0,25
334 U	C	0,25	1	8	16	0,125	0,25	0,25	1
337 S	A	0,5	2	0,03	0,06	0,125	0,125	0,5	2
338 B	A	0,5	0,5	0,03	0,06	0,06	0,25	0,5	2
338 PV	B	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,125
340 B	C	0,5	0,5	0,03	0,03	0,03	0,06	0,125	0,125
340 S	C	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,5

Diversité génétique d'isolats de Cryptococcus et Candida issus des patients VIH+ à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes

345 S	A	0,5	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	0,5
348 B	A	0,5	1	0,03	0,06	0,125	0,125	1	1
348 S	A	0,5	1	0,03	0,03	0,25	> 16	0,5	1
349 B	A	0,5	1	2	4	0,25	> 16	> 64	> 64
349 S	A	0,5	1	8	8	0,25	> 16	> 64	> 64
352 S	A	0,5	1	8	8	0,06	8	4	2
357 B	A	0,5	1	0,03	0,03	2	8	2	2
357 PV	A	0,5	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,125	0,25
357 S1	A	0,5	1	0,03	0,03	0,125	0,125	1	0,5
357 U1	A	1	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,25
358 B	C	0,5	0,5	1	8	0,06	0,125	2	4
360 S	B	0,5	0,5	1	8	0,06	0,06	0,5	0,5
363 B	A	0,5	0,5	0,06	0,06	0,03	0,125	0,5	0,5
373 B	A	0,5	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	0,5
373 S	A	1	1	> 16	> 16	0,125	0,06	1	1
374 S	A	0,5	1	0,03	0,5	0,125	8	1	1
378 S	B	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,06	0,25	0,25
381 B	A	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,06	0,125	0,25
383 B	A	1	2	0,125	4	4	8	4	8
384 B	A	1	2	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,5
387 PV	A	1	1	0,03	0,03	0,03	0,06	0,25	0,5
388 B	A	0,5	1	0,25	0,25	0,125	0,125	2	4
389 B	B	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,125
390 B	A	1	1	0,03	0,06	0,03	0,06	0,5	0,5
391 B	A	0,5	1	8	8	16	16	> 64	> 64
391 PV	A	1	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,25
392 S	B	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,125
393 PV	B	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,5
394 PV	A	0,5	1	> 16	> 16	0,06	4	0,5	2
394 S	A	1	1	> 16	> 16	0,06	0,06	> 64	> 64
394 U	A	0,5	1	> 16	> 16	0,03	0,06	0,5	1
395 B1	B	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,25
395 S	B	1	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,25
396 PV	A	0,5	1	0,25	0,25	0,5	0,5	32	32
409 S	A	0,5	1	0,125	0,125	0,125	0,25	0,5	1
410 PV	A	0,5	1	0,03	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5
410 S	A	0,5	1	0,125	0,125	0,125	0,25	4	4
412 B	A	1	2	0,03	16	0,03	0,06	2	> 64
415 B	C	1	1	0,03	16	0,03	0,06	0,25	0,25
416 B	B	1	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,125
416 S	B	1	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,125
422 PV	A	0,25	0,5	0,03	0,06	0,03	0,06	0,25	1
425 B	C	1	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,125	0,25
426 S	C	1	1	8	16	0,03	0,06	0,25	0,25

Diversité génétique d'isolats de Cryptococcus et Candida issus des patients VIH+ à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes

427 PV	A	1	1	0,03	0,06	0,06	0,06	0,25	0,25
429 B	A	0,5	1	8	8	8	8	32	32
430 B	A	1	1	4	4	8	8	32	32
433 S1	B	1	1	0,03	0,03	0,03	0,06	0,125	0,25
435 PV	B	0,5	1	0,03	0,06	0,03	0,06	0,5	1
435 U	B	0,5	1	0,03	0,06	0,125	0,125	0,5	0,5
440 B	A	1	1	0,03	0,06	0,125	0,125	2	4
441 S	B	1	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	0,5
443 B1	A	1	2	> 16	> 16	0,125	> 16	> 64	> 64
443 S1	A	1	1	0,03	0,03	4	8	1	2
445 PV	B	0,5	1	8	8	0,125	> 16	0,25	0,25
445 U	B	0,5	0,5	2	2	0,125	1	0,5	0,5
446 S	A	0,5	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,25	0,25
448 PV	A	0,5	0,5	2	2	0,125	0,125	1	2
453 S	C	1	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,25	0,25
454 B	A	1	1	0,03	0,03	0,03	0,06	0,25	0,25
457 PV	A	1	1	0,03	0,03	0,03	0,06	0,5	0,5
463 S	C	1	2	0,03	0,03	0,03	0,06	0,5	0,5
466 B	A	1	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,25
470 B	A	0,5	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	0,5
470 S	A	0,5	1	0,03	0,03	0,125	0,125	1	1
472 PV	A	1	1	0,03	0,03	0,125	0,125	1	1
472 S	A	0,5	0,5	2	2	0,06	0,06	0,25	0,25
477 S	A	1	0,5	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,25
478 PV	A	1	1	0,03	0,03	0,125	0,125	0,5	0,5
478 S	A	1	0,5	0,03	0,03	0,125	0,125	0,25	0,25
478 U	A	1	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	0,5
479 B	B	0,5	1	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,25
479 S1	A	0,5	0,5	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	0,5
480 PV	B	0,25	0,5	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5	2
C. krusei ATCC 6258		1	1	0,5	0,5	0,125	0,125	32	64
		1	1	0,5	0,5	0,125	0,125	32	64
		0,25	0,25	0,125	0,5	0,5	0,5	16	32
C. parapsilosis ATCC 22019		1	2	0,06	0,06	0,125	0,25	2	2
		0,5	2	0,06	0,125	0,25	0,25	2	2
		0,25	1	0,03	0,06	0,125	0,25	4	4

S : selles, B : bouche, PV : prélèvements vaginal, U : urine

Tableau 33: Sensibilité globale des isolats de *C. albicans* pour les antifongiques testés.

	Antifongiques							
	Amphotéricine B		Kétoconazole		Itraconazole		Fluconazole	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
intervalle de CMI	0,015-1	0,015-2	0,03->16	0,03->16	0,03-16	0,03->16	0,125->64	0,125->64
% de sensible	100	89,39	71,68	65,48	79,64	69,02	91,15	86,72
% SDD	NA	NA	4,42	2,65	8,84	7,07	4,42	4,42
% résistant	0,00	10,61	23,90	31,87	11,52	23,91	4,43	8,86

NA : Non attribué ; SDD : sensible dose-dépendant

Tableau 34: Sensibilité des isolats de *C. albicans* en fonction des sites de prélèvement

		Antifongiques							
		Amphotéricine B		Ketoconazole		Itraconazole		Fluconazole	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Prélèvement Vaginal	% de sensible	100	100	78,26	69,56	91,3	73,91	95,66	86,95
	% SDD	NA	NA	8,69	4,34	4,34	13,04	4,34	4,34
	% résistant	0	0	13,04	16,08	4,34	13,04	0	8,69
Selles	% de sensible	100	88,37	65,85	68,29	82,92	70,74	92,68	90,24
	% SDD	NA	NA	0	2,44	9,7	7,31	2,44	2,44
	% résistant	0	11,63	31,7	29,27	7,31	21,95	4,88	7,32
Bouche	% de sensible	100	81,82	68,18	61,36	70,45	63,63	86,36	81,82
	% SDD	NA	NA	6,81	2,27	11,36	6,81	6,81	6,81
	% résistant	0	18,18	25,01	36,37	18,18	29,56	6,81	11,36
Urines	% de sensible	100	88,89	55,55	44,45	88,89	55,55	100	100
	% SDD	NA	NA	0	0	0	22,22	0	0
	% résistant	0	11,11	44,45	55,55	11,11	22,23	0	0

SDD : sensible dose-dépendant ; NA : Non attribué

II.3.2. Discussion

L'évaluation de la sensibilité des *Candida* aux antifongiques tient compte du délai de lecture des résultats. Certains chercheurs pensent que la lecture à 24 heures est plus appropriée que la lecture à 48 heures en raison du problème de dilution de certains antifongiques (**Pfaller et al., 2012 ; Pfaller et al., 2004**). La norme CLSI officielle indique cependant que les lectures doivent être réalisées à 24 et 48 heures (**CLSI, 2008**). **Pfaller et al. (2012)** ont également proposé de nouveaux break points pour la détermination de la sensibilité des espèces de *Candida* aux antifongiques. Sous réserve qu'assez de données soient collectées et analysées, la question du délai de lecture le plus pertinent au plan clinique reste sans réponse. C'est pourquoi dans cette

étude les résultats de CMI sont présentés pour 24 et 48 heures d'incubation et les différences au niveau de la sensibilité ont effectivement été fortement influencées par le délai de lecture. Le fluconazole est homologué au Cameroun pour la prise en charge des infections fongiques chez les PVVIH en prophylaxie et en traitement d'appoint. L'amphotéricine B est l'antifongique le plus anciennement utilisé et est fortement sujet à l'automédication parmi les populations camerounaises. Le kétoconazole est lui aussi fortement distribué et utilisé dans le traitement de nombreuses affections fongiques superficielles. L'itraconazole est moins distribué et n'est pas assez utilisé par les populations locales du fait de sa faible prescription. Le fluconazole a été pendant longtemps utilisé pour le traitement des infections fongiques chez les patients VIH positifs et cette situation a entraîné une émergence progressive de la résistance des souches au fluconazole (**Magaldi et al., 2001**). Entre 1995, les patients traités à long terme par le fluconazole ont acquis une résistance de 40%, elle était de 43% en 1997 et 45% en 2000 (**Magaldi et al., 2001; Tumbarello et al., 1997 ; Johnson et al., 1995**).

Barchiesi et al., (2002) ont trouvé que 93% de *Candida* collectés de la cavité buccale des PVVIH sous traitement ARV restent sensibles au fluconazole même après traitement répété aux triazolés. Dans la présente étude, le fluconazole est l'azolé le plus efficace avec 86,72% des souches qui lui sont sensibles au bout de 48 heures, corroborant ainsi l'étude de **Barchiesi et al., (2002)**. Egalement, **Yang et al., (2010)** ont trouvé des résultats similaires à Taiwan avec 11% de résistances et 89% de sensibilités de *C. albicans* au fluconazole. **Hung et al., (2005)** ont aussi obtenu une sensibilité de *C. albicans* au fluconazole à 93,1%. Dans la présente étude, l'on ne saurait dire si la résistance observée au fluconazole est une résistance acquise ou naturelle, l'histoire thérapeutique de ces patients aux antifongiques étant peu documentée. La résistance à l'itraconazole et au kétoconazole pourrait s'expliquer par l'existence des résistances croisées (**Khan et al., 2012 ; Cartledge et al., 1997 ; Martins et al., 1997 ; Rex et al., 1995**). Très peu de souches de *C. albicans* ont jusqu'ici développé une résistance à l'amphotéricine B (**Yang et al., 2010**). Cette étude a donné des résultats similaires. L'amphotéricine B, bien qu'étant l'un des plus anciens antifongiques utilisés dans le traitement des infections fongiques reste l'un des plus efficaces, surtout du fait de sa fongicidie qui limite l'émergence des résistances (**Kalpanadevi et al., 2012**). L'isolement des souches chez le même patient avec des profils de sensibilités différents aux antifongiques serait lié soit à une mutation de la souche initiale, soit à

la contamination du même patient par 2 souches différentes, ce qui renforce la nécessité de prendre en compte l'examen biologique avant d'initier un quelconque traitement.

Par ailleurs, la relation entre les profils génétiques et la sensibilité aux antifongiques a été étudiée. Les génotypes H2 et H3 issus de la diversité du gène *Hwp1* ont une plus grande tendance à développer les résistances aux azolés. Cette étude est la première à prendre en compte la relation entre cette diversité génétique et la sensibilité aux azolés. Le gène *Hwp1* code pour une protéine de la paroi impliquée dans la pathogénicité de *C. albicans* (**Hoyer et al., 2003**). La modification au niveau de l'expression de ce gène modifierait la structure de la protéine Hwp1p, ce qui à terme pourrait influencer la pénétration des azolés dans la cellule fongique. Une autre hypothèse serait l'implication du gène *Hwp1* dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la résistance (ERG11 par exemple) (**White et al., 1998**). **Liu et al. (2009)** ont trouvé que les souches résistantes à l'itraconazole appartiennent à un génotype spécifique après analyse de la séquence microsatellite CAI. **Ge et al. (2010)** ont également montré une sensibilité au fluconazole dépendante des génotypes par analyse des séquences microsatellites CAI.

II.4. Conclusion partielle 2

Cette deuxième partie a porté sur l'étude épidémiologique et sur la sensibilité des isolats de *C. albicans* aux antifongiques.

Il ressort que la fréquence des patients colonisés par *Candida* est de 57,62% et la fréquence de colonisation par *Candida* est de 24,13%. Trois cent dix-sept isolats ont été obtenus, répartis en 21 espèces dont 15 du genre *Candida*. Les 5 espèces les plus fréquentes sont dans l'ordre, *C. albicans* (43,01%), *C. krusei* (18,38%), *C. glabrata* (10,66%), *C. tropicalis* (8,09%) et *C. parapsilosis* (5,15%). Par ailleurs, *C. africana* est isolée pour la première fois au Cameroun.

Pour *C. albicans*, le génotype A (69,91%) est prédominant, suivi du génotype B (21,23%) puis du C (8,84%). L'amplification du gène *Hwp1* a permis d'observer une nouvelle diversité génétique qui a été nommée H, avec 5 profils observés H1-H5. L'analyse des séquences microsatellites a permis d'obtenir une diversité génétique importante avec 65 types moléculaires issus des 113 souches testées. L'on a par ailleurs observé des infections mixtes chez 3,94% de patients.

Il a été noté une sensibilité des isolats de *C. albicans* aux azolés proche des résultats publiés dans la littérature avec une émergence des souches à sensibilité diminuée. Ces résistances émergentes montrent la nécessité de rechercher des alternatives thérapeutiques, particulièrement en explorant les extraits de plantes qui sont une source potentielle de molécules bioactives.

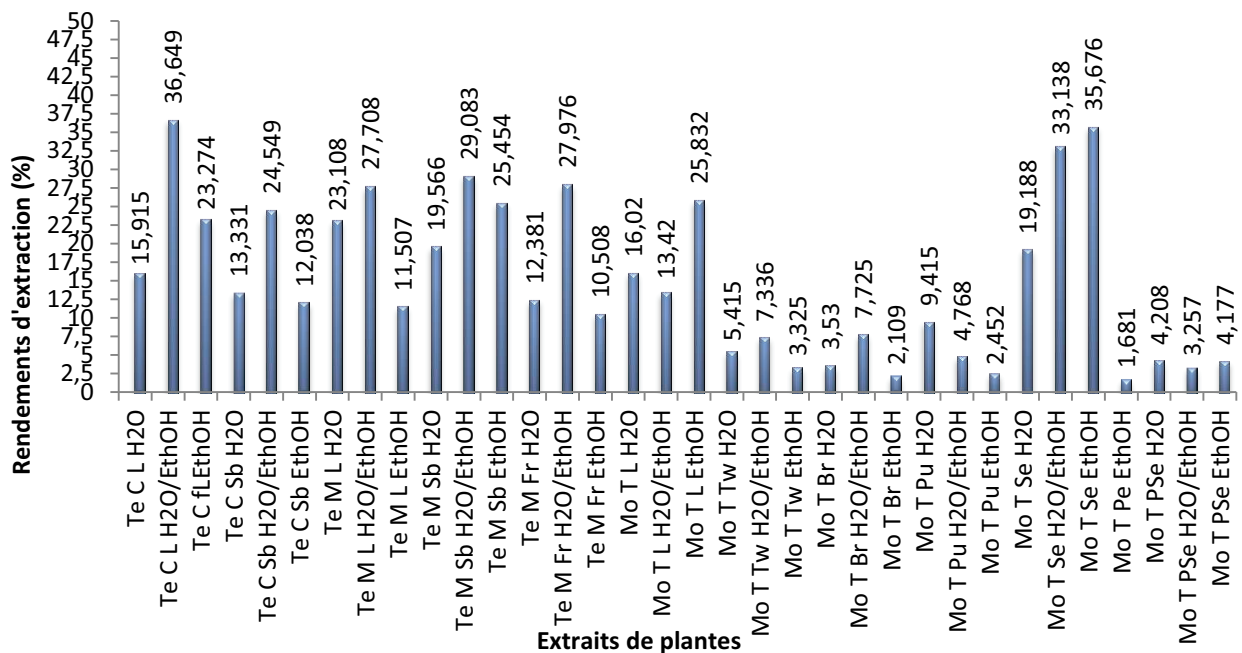
III. Etude de l'activité antifongique des extraits de plantes

III.1. Screening préliminaire

III.1.1. Rendements d'extractions

Les plantes récoltées, traitées et soumises à l'extraction par divers solvants ont permis d'obtenir 34 extraits bruts dont 6 de *T. catappa*, 9 de *T. mantaly*, et 19 de *M. tenuifolia*. Les rendements d'extraction sont présentés dans la figure 46. Les rendements vont de 1,68 à 36,65%. Ils varient d'une plante à l'autre, en fonction de l'organe et du solvant d'extraction.

Au regard des rendements obtenus, on constate que l'hydroéthanol (70%) est le meilleur solvant d'extraction. En effet, le rendement d'extraction est élevé tant pour les feuilles et écorces de *T. catappa* (36,649 % et de 24,549% respectivement) que pour les feuilles, écorces de tronc et fruits de *T. mantaly* (27,708%, 29,083% et 27,976% respectivement). Chez *M. tenuifolia*, les graines donnent les meilleurs rendements d'extraction (35,67%).



Mo T : *Monodora tenuifolia* ; **Te C** : *Terminalia catappa* ; **Te M** : *Terminalia mantaly* ; **L** : leaves (feuilles) ; **Sb** : stem bark (écorce du tronc) ; **Fr** : fruits ; **Tw** : twigs (brindilles) ; **Br** : branches ; **Pu** : pulp ; **Se** : seeds ; **PSe** : pericarp of seeds ; **Pe** : pericarp ; **H₂O** : distilled water (eau distillée) ; **H₂O/EthOH** : hydroethanol ; **EthOH** : ethanol.

Figure 46 : Rendements d'extraction des 34 échantillons des plantes utilisées

III.1.2. Sélection des extraits actifs par la méthode de dilution en milieu liquide

Les pourcentages d'inhibition des extraits totaux obtenus suite à une évaluation de leurs activités antifongiques sur les isolats de levures, sont conciliés dans le tableau 35.

Il est remarqué que tous les extraits des feuilles et des écorces de *T. catappa* et de *T. mantaly* ont une inhibition totale (100%) de la croissance des quatre isolats de levures testés ; les extraits de fruits de *T. mantaly* ont montré une faible inhibition avec des pourcentages allant de 0 à 30 %.

Outre les 3 extraits de feuilles de *M. tenuifolia* qui ont donné un pourcentage d'inhibition supérieur ou égale à 75%, les extraits d'autres organes de la plante ont des pourcentages d'inhibition qui varient en fonction du solvant d'extraction et de la susceptibilité de l'isolat.

A l'issu de cette étude préliminaire, les extraits ayant un pourcentage d'inhibition supérieur ou égale à 75 % sur au moins deux des quatre isolats ont été retenus pour la suite des travaux.

Tableau 35 : Pourcentages d'inhibition des extraits bruts de plantes testés sur les quatre isolats de levures *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. neoformans*

Codes des extraits	Pourcentages d'inhibition (%)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>
Te C _f H ₂ O	100	100	100	100
Te C _f H ₂ O/EthOH	100	100	100	100
Te C _f EthOH	100	100	100	100
Te C _{et} H ₂ O	100	100	100	100
Te C _{et} H ₂ O/EthOH	100	100	100	100
Te C _{et} EthOH	100	100	100	100
Te M _f H ₂ O	100	100	100	100
Te M _f H ₂ O/EthOH	100	100	100	100
Te M _f EthOH	100	100	100	100
Te M _{et} H ₂ O	100	100	100	100
Te M _{et} H ₂ O/EthOH	100	100	100	100
Te M _{et} EthOH	100	100	100	100
Te M _{fr} H ₂ O	25	30	00	00
Te M _{fr} H ₂ O/EthOH	00	00	00	00
Te M _{fr} EthOH	10	00	00	00
Mo T _f H ₂ O	100	100	100	100
Mo T _f H ₂ O/EthOH	100	100	100	100
Mo T _f EthOH	100	100	100	100
Mo T _{bri} H ₂ O	80	75	75	95
Mo T _{bri} H ₂ O/EthOH	00	00	00	00
Mo T _{bri} EthOH	00	00	00	00
Mo T _{br} H ₂ O	95	100	90	90
Mo T _{br} H ₂ O/EthOH	00	10	00	00
Mo T _{br} EthOH	00	00	00	00
Mo T _{pu} H ₂ O	30	100	50	95
Mo T _{pu} H ₂ O/EthOH	80	80	80	80
Mo T _{pu} EthOH	90	90	90	90
Mo T _{gr} H ₂ O	20	25	10	10
Mo T _{gr} H ₂ O/EthOH	75	75	00	00
Mo T _{gr} EthOH	00	00	00	00
Mo T _{per} EthOH	95	95	75	75
Mo T _{pgr} H ₂ O	00	15	00	15
Mo T _{pgr} H ₂ O/EthOH	10	00	00	00
Mo T _{pgr} EthOH	90	75	75	75
Nystatine	100	100	100	100
Fluconazole	100	100	100	100

Mo T : *Monodora tenuifolia* ; **Te C :** *Terminalia catappa* ; **Te M :** *Terminalia mantaly* ; **f :** feuilles ; **ec :** écorce du tronc ; **bri :** brindilles ; **Bra :** branches ; **Pu :** pulpe ; **gr :** graines ; **Pgr :** pericarpe des graines ; **Pe :** pericarpe ; **H₂O :** eau distillée ; **H₂O/EthOH :** hydroethanol ; **EthOH :** ethanol. Celules colorées : extraits sélectionnés pour la suite des tests.

III.1.3. Détermination de la CMI des extraits sélectionnés

Les extraits bruts ont été soumis au test de détermination des CMI et les résultats sont consignés dans le tableau 36.

La sensibilité des isolats testés vis-à-vis des différents extraits varie en fonction de la plante, de l'organe et du solvant d'extraction. Les extraits les plus actifs sont ceux de *T. mantaly* avec des CMI moyenne sur les 5 souches allant de 0,05mg/ml à 0,72mg/ml, suivi des extraits de *T. catappa* ($0,16 \leq \text{CMI moyenne} \leq 1,31$). Les CMI moyennes de *M. tenuifolia* sont toutes au-dessus de 1mg/ml. L'extrait hydroéthanolique des feuilles de *T. mantaly* est le plus actif avec une CMI moyenne de 0,05mg/ml et une CMI médiane de 0,04mg/ml. Les extraits des feuilles de *M. tenuifolia* sont les plus actifs de tous les extraits de cette plante avec des CMI moyennes variant de 1,75 à 4,63mg/ml. Il n'y a pas de relation entre la sensibilité d'un isolat et un extrait particulier ou un type de solvant d'extraction.

Les extraits ayant une CMI médiane inférieure ou égale à 1,25mg/ml ont été retenus pour le fractionnement bio-guidé.

Tableau 36 : Concentrations minimales inhibitrices des extraits bruts d'intérêts sur les isolats de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. neoformans* et la souche *C. albicans* ATCC P37037

Codes des extraits	Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml)					CMI moyenne	Ecart type	CMI médiane
	<i>Candida albicans</i> ATCC P37037	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>			
Te C _f H ₂ O	0,31	2,50	0,63	2,50	0,63	1,31	1,09	0,63
Te C _f H ₂ O/EthOH	0,08	0,31	0,08	0,31	0,16	0,19	0,12	0,16
Te C _f EthOH	0,31	0,16	0,08	0,31	0,31	0,23	0,11	0,31
Te C _{et} H ₂ O	0,16	0,63	0,31	0,31	0,63	0,41	0,21	0,31
Te C _{et} H ₂ O/EthOH	0,08	2,50	0,63	0,31	0,63	0,83	0,96	0,63
Te C _{et} EthOH	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,00	0,16
Te M _f H ₂ O	0,31	2,50	0,31	0,31	0,16	0,72	1,00	0,31
Te M _f H ₂ O/EthOH	0,04	0,04	0,04	0,08	0,08	0,05	0,02	0,04
Te M _f EthOH	0,04	0,08	0,08	0,16	0,16	0,10	0,05	0,08
Te M _{et} H ₂ O	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00	0,08
Te M _{et} H ₂ O/EthOH	0,08	0,31	0,16	0,16	0,08	0,16	0,10	0,16
Te M _{et} EthOH	0,08	0,16	0,16	0,08	0,04	0,10	0,05	0,08
Mo T _f H ₂ O	10,00	1,25	0,63	10,00	1,25	4,63	4,91	1,25
Mo T _f H ₂ O/EthOH	5,00	0,63	0,63	1,25	1,25	1,75	1,84	1,25
Mo T _f EthOH	2,50	5,00	1,25	1,25	0,08	2,02	1,88	1,25
Mo T _{bri} H ₂ O	20,00	10,00	5,00	5,00	2,50	8,50	6,98	5,00
Mo T _{bra} H ₂ O	10,00	5,00	5,00	2,50	5,00	5,50	2,74	5,00
Mo T _{pu} H ₂ O	2,50	10,00	5,00	5,00	10,00	6,50	3,35	5,00
Mo T _{pu} H ₂ O/EthOH	5,00	5,00	5,00	10,00	2,50	5,50	2,74	5,00
Mo T _{pu} EthOH	5,00	2,50	5,00	10,00	2,50	5,00	3,06	5,00
Mo T _{gr} H ₂ O/EthOH	40,00	10,00	10,00	40,00	40,00	28,00	16,43	40,00
Mo T _{pe} EthOH	10,00	5,00	5,00	10,00	2,50	6,50	3,35	5,00
Mo T _{pgr} EthOH	20,00	10,00	20,00	40,00	20,00	22,00	10,95	20,00
Fluconazole (µg/ml)	0,50	1,00	8,00	8,00	2,00	3,90	3,78	2,00

Mo T : *Monodora tenuifolia* ; **Te C** : *Terminalia catappa* ; **Te M** : *Terminalia mantaly* ; **f** : feuilles ; **ec** : écorce du tronc ; **bri** : brindilles ; **Bra** : branches ; **Pu** : pulpe ; **gr** : graines ; **Pgr** : pericarpe des graines ; **Pe** : pericarpe ; **H₂O** : eau distillée ; **H₂O/EthOH** : hydroethanol ; **EthOH** : ethanol. Cellules colorées : extraits sélectionnés pour la suite des tests.

III.1.4. Analyse phytochimique des extraits sélectionnés

Le tableau 37 donne les résultats de l'analyse phytochimique réalisée sur les vingt-trois extraits bruts sélectionnés.

Excepté les anthocyanines qui sont absentes dans tous les extraits, les autres grands groupes de métabolites secondaires sont distribués dans les différents extraits des trois plantes. Dans l'ensemble, les extraits de *T. mantaly* ont une plus grande diversité en métabolites secondaires (9/10) et ceux de *M. tenuifolia* en sont les moins pourvus (6/10). Les extraits de *T. catappa* possèdent en commun les phénols et les tannins ; la présence des autres groupes de principes bioactifs est fonction de l'organe et du solvant d'extraction. Ainsi, les alcaloïdes sont présents dans les extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles alors qu'ils sont absents dans l'extrait éthanolique ; les flavonoïdes sont absents dans les extraits aqueux et hydroéthanolique, et présents dans l'extrait éthanolique. Les saponines sont absentes dans l'extrait aqueux de l'écorce mais présentes dans les extraits hydroéthanolique et éthanolique.

Le profil phytochimique est très conservé avec les extraits *T. mantaly*. Les extraits sont tous constitués de saponines, tannins, glucosides, phénols, stéroïdes et d'anthraquinones.

Les tannins, les phénols, les anthraquinones et les anthocyanines sont absents dans les extraits de *M. tenuifolia*.

Tableau 37 : Résultats de l'analyse phytochimique des extraits bruts sélectionnés à l'issu de la méthode de dilution en milieu solide

	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Saponines	Tanins	Glucosides	Phénols	Steréïdes	Triterpènes	Anthocyanines	Anthraquinones
Te C _f H ₂ O	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Te C _f H ₂ O/EthOH	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Te C _f EthOH	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Te C _{et} H ₂ O	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Te C _{et} H ₂ O/EthOH	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Te C _{et} EthOH	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Te M _f H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Te M _f H ₂ O/EthOH	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Te M _f EthOH	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Te M _{et} H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Te M _{et} H ₂ O/EthOH	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Te M _{et} EthOH	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Mo T _f H ₂ O	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Mo T _f H ₂ O/EthOH	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Mo T _f EthOH	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Mo T _{bri} H ₂ O	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Mo T _{br} H ₂ O	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Mo T _{pu} H ₂ O	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Mo T _{pu} H ₂ O/EthOH	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Mo T _{pu} EthOH	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Mo T _{gr} H ₂ O/EthOH	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Mo T _{pgr} EthOH	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Mo T _{pef} EthOH	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-

+: présence du groupe de composés

- : absence du groupe de composés

Mo T : *Monodora tenuifolia* ; **Te C** : *Terminalia catappa* ; **Te M** : *Terminalia mantaly* ; **f** : feuilles ; **ec** : écorce du tronc ; **bri** : brindilles ; **Br** : branches ; **Pu** : pulpe ; **gr** : graines ; **Pgr** : pericarpe des graines ; **Pe** : pericarpe ; **H₂O** : eau distillée ; **H₂O/EthOH** : hydroethanol ; **EthOH** : ethanol.

III.1.5. Discussion

Les infections fongiques à *Cryptococcus* et à *Candida* sont de nos jours un réel problème de santé parmi les populations du monde entier. L'exploration de plantes médicinales est une potentielle voie pour la découverte de nouveaux médicaments antifongiques. Les praticiens préparent leurs remèdes essentiellement par macération à froid ou à chaud dans de l'eau ou du vin alcoolique des différents organes de plantes récoltés. Ces informations ont orienté le choix des solvants d'extraction. Ce choix s'est avéré à terme judicieux au regard des rendements d'extractions élevés obtenus. En effet, une explication serait la grande solubilité des métabolites de ces plantes dans l'eau ou l'éthanol. Toutefois, les rendements d'extraction présentent une très grande variabilité d'une plante à une autre, d'un organe à un autre et d'un solvant d'extraction à un autre. Des résultats similaires ont déjà été rapportés par d'autres auteurs (**Parekh et Chanda, 2008 ; Dekunle et Ikumapayi, 2006**). **Kuo-ChingWen et al. (2011)** ont obtenu un rendement d'extraction de 22,5% avec l'extrait aqueux des feuilles de *T. catappa*. **Caesar (2007)** a obtenu avec les écorces de tronc les rendements de 13,56% et 7,77% pour les extraits aqueux et éthanolique respectivement de *T. catappa*. Concernant *M. tenuifolia*, **Njoku (2007)** a obtenu un rendement d'extraction de 18,9% avec l'extrait à l'éther de pétrole des graines et **Ezenwali et al. (2010)** les ont extraites au méthanol avec un rendement de 8,12%. En effet, la production des métabolites de la plante est fonction de la physiologie du végétal, de son âge, des conditions environnementales, du niveau de stress ou d'agression de la plante ou de l'organe de la plante. Cette diversité de composés produits présente donc une plus ou moins grande affinité avec un quelconque solvant ayant pour corolaire une diversité d'extraction en fonction du solvant utilisé, de l'organe ou de la plante concernée (**Cowan, 1999**).

Les activités antifongiques obtenues pour *T. catappa*, *T. mantaly* et *M. tenuifolia* confirment l'usage traditionnel de ces plantes dans le traitement des infections fongiques et corroborent les résultats obtenus par d'autres chercheurs (**Zirihi et al., 2012 ; Yapi et al., 2011 ; Ackah et al., 2008**). Les extraits aqueux et éthanoliques de l'écorce de *T. catappa* récoltée en Côte d'Ivoire ont montré une activité antifongique sur *C. albicans* avec une IC_{50} de 0,55 et 0,15mg/ml respectivement (**Ackah et al., 2008**). **Yapi et al. (2011)** ont utilisé le même protocole que Ackah et ont trouvé une IC_{50} de 0,02 et 0,025mg/ml respectivement sur les extraits aqueux et

éthanoliques de l'écorce de *T. catappa* récoltée en Côte d'Ivoire. **Njoku et al. (2005)** ont montré que les extraits de graines de *M. tenuifolia* possèdent des activités antimicrobiennes. Ces trois plantes ne possèdent à notre connaissance aucune publication sur les extraits de plantes récoltées au Cameroun.

Les activités antifongiques obtenues trouvent leur explication dans la composition en métabolites secondaires de ces extraits de plantes. En effet, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les tannins, les phénols, les saponines, les glucosides, les terpènes, les anthraquinones sont les principaux métabolites secondaires impliqués dans les activités antifongiques des extraits de plantes (**Kuete et Efferth 2010 ; Abad et al., 2007; Cowan, 1999**). Cependant, l'absence des flavonoïdes, tannins, phénols, saponines, terpènes, anthraquinones dans les extraits de *M. tenuifolia* pourrait justifier leur faible activité antifongique (**Fankam et al., 2011 ; Zore et al., 2011 ; Li et al., 2010**). **Fofana (2004)** a relevé la présence des phénols, terpènes, stéroïdes, flavonoïdes, tanins, et quinones dans l'extrait aqueux des feuilles de *T. catappa* et l'absence des alcaloïdes ; **Caesar (2007)** a montré que les extraits aqueux et hydroéthanolique des écorces contiennent les tanins, les stéroïdes et les triterpènes. Ces métabolites secondaires agissent sur les microorganismes par divers mécanismes. Les tannins se fixent aux protéines riches en proline et interfèrent avec la synthèse protéique de la levure (**Shimada, 2006**). Les flavonoïdes sont des phénols hydroxylés qui sont synthétisés dans la plante en réponse à une infection microbienne. Ils agissent en formant des complexes insolubles avec les protéines de la paroi cellulaire, fragilisant celle-ci (**Marjorie, 1999; Hout et Paya, 1996**). Les saponines causent la lyse de certaines protéines membranaires et plasmiques (**Zablotowicz et al., 1996**). Les stéroïdes s'associent aux lipides membranaires et causent la lyse des liposomes (**Raquel, 2007**).

III.2. Fractionnement bio-guidé

III.2.1. Partition eau-chlorure de méthylène et concentrations minimales inhibitrices des fractions

Les résultats de la sensibilité des isolats aux fractions obtenues sont présentés dans le tableau 38. Certains extraits bruts ont donné des fractions plus actives et d'autres ont plutôt donné des fractions moins actives en comparaison avec les CMI des extraits bruts. Pour *T. catappa*, seule l'activité des fractions issues des extraits éthanoliques et hydroéthanoliques de *T. catappa* a été améliorée. Les extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles de *T. mantaly* ont une activité améliorée au niveau des fractions au chlorure de méthylène. Les fractions ayant une CMI médiane $\leq 0,63$ mg/ml et inférieures à celles de l'extrait brut de départ ont été retenues pour le deuxième fractionnement.

Tableau 38: Concentrations minimales inhibitrices des fractions obtenues sur les isolats de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. neoformans* et la souche *C. albicans* ATCC P37037

Codes des extraits	Fractions	Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml)					CMI moyenne	Ecart type	CMI Médiane
		<i>Candida albicans</i> ATCC P37037	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>			
Te C L H ₂ O	Fr H ₂ O	1,25	1,25	5,00	0,63	0,16	1,66	1,93	1,25
	Fr CH ₂ Cl ₂	0,63	1,25	5,00	0,16	0,16	1,44	2,04	0,63
Te C L H ₂ O/EthOH	Fr H ₂ O	0,31	2,50	0,63	0,31	0,31	0,81	0,95	0,31
	Fr CH ₂ Cl ₂	0,31	5,00	0,63	0,31	0,31	1,31	2,07	0,31
Te C L EthOH	Fr H ₂ O	0,63	>5,000	0,63	0,31	0,16	0,43	0,23	0,47
	Fr CH ₂ Cl ₂	0,63	5,00	0,63	0,63	0,31	1,44	2,00	0,63
Te C Sb H ₂ O	Fr H ₂ O	1,25	2,50	2,50	0,63	0,31	1,44	1,03	1,25
	Fr CH ₂ Cl ₂	1,25	5,00	5,00	2,50	0,63	2,88	2,05	2,50
Te C Sb H ₂ O/EthOH	Fr H ₂ O	0,31	5,00	2,50	2,50	0,63	2,19	1,88	2,50
	Fr CH ₂ Cl ₂	0,16	0,63	1,25	1,25	0,63	0,78	0,47	0,63
Te C Sb EthOH	Fr H ₂ O	0,16	0,63	2,50	1,25	0,63	1,03	0,91	0,63
	Fr CH ₂ Cl ₂	0,31	>5,000	5,00	5,00	1,25	2,89	2,47	3,13
Te M L H ₂ O	Fr H ₂ O	2,50	1,25	0,31	0,31	0,16	0,91	0,99	0,31
	Fr CH ₂ Cl ₂	2,50	0,63	0,16	0,08	0,08	0,69	1,04	0,16
Te M L H ₂ O/EthOH	Fr H ₂ O	2,50	1,25	0,31	0,16	0,04	0,85	1,04	0,31
	Fr CH ₂ Cl ₂	2,50	0,16	0,31	0,16	0,08	0,64	1,04	0,16
Te M L EthOH	Fr H ₂ O	2,50	0,63	0,63	0,31	0,31	0,88	0,92	0,63
	Fr CH ₂ Cl ₂	0,63	0,31	0,08	0,04	0,04	0,22	0,25	0,08
Te M Sb H ₂ O	Fr H ₂ O	1,25	0,63	0,16	0,08	0,08	0,44	0,51	0,16
	Fr CH ₂ Cl ₂	0,63	0,31	0,16	0,16	0,08	0,27	0,22	0,16
Te M Sb H ₂ O/EthOH	Fr H ₂ O	0,31	1,25	0,31	0,31	0,16	0,47	0,44	0,31
	Fr CH ₂ Cl ₂	0,63	1,25	0,63	0,31	0,31	0,63	0,38	0,63
Te M Sb EthOH	Fr H ₂ O	0,63	1,25	0,31	0,16	0,16	0,50	0,46	0,31
	Fr CH ₂ Cl ₂	1,25	1,25	0,31	0,16	0,16	0,62	0,57	0,31
Mo T L H ₂ O	Fr H ₂ O	5,00	5,00	0,08	>5,000	>5,000	3,36	2,84	5,00
	Fr CH ₂ Cl ₂	2,50	2,50	0,63	2,50	2,50	2,13	0,84	2,50
Mo T L H ₂ O/EthOH	Fr H ₂ O	2,50	5,00	5,00	5,00	2,50	4,00	1,37	5,00
	Fr CH ₂ Cl ₂	2,50	2,50	1,25	0,63	0,31	1,44	1,03	1,25
Mo T L EthOH	Fr H ₂ O	2,50	>5,000	2,50	5,00	5,00	3,75	1,44	3,75
	Fr CH ₂ Cl ₂	2,50	2,50	0,63	0,63	0,63	1,38	1,03	0,63

Mo T : *Monodora tenuifolia* ; **Te C** : *Terminalia catappa* ; **Te M** : *Terminalia mantaly* ; **f** : feuilles ; **ec** : écorce du tronc ; **bri** : brindilles ; **Bra** : branches ; **Pu** : pulpe ; **gr** : graines ; **Pgr** : pericarpe des graines ; **Pe** : pericarpe ; **H₂O** : eau distillée ; **H₂O/EthOH** : hydroethanol ; **EthOH** : ethanol. **Fr H₂O** : fraction aqueuse ; **Fr CH₂Cl₂** : fraction au chlorure de méthylène ; Cellules colorées : extraits sélectionnés pour la suite des tests.

III.2.2. Partition Hexane - méthanol et concentrations minimales inhibitrices des subfractions

Les résultats des tests de détermination des CMI des subfractions sont conciliés dans le tableau 39.

Le deuxième fractionnement a amélioré l'activité de certaines fractions et altéré l'activité d'autres. En effet, pour *T. catappa*, seule la subfraction issue de la fraction aqueuse de l'extrait hydroéthanolique des feuilles trouve sa CMI médiane abaissée à 0,31mg/ml. Cinq subfractions de *T. mantaly* trouvent leurs CMI abaissées. Ces 5 subfractions proviennent des extraits de l'écorce pour 4 subfractions et de l'extrait des feuilles pour une subfraction. Une seule subfraction de *M. tenuifolia* a une CMI moyenne inférieure à celle de la fraction dont elle est dérivée. Les subfractions les plus actives sont les subfractions méthanoliques. La subfraction la plus active est la subfraction méthanolique de la fraction au chlorure de méthylène de l'extrait hydroéthanolique de l'écorce de *T. mantaly* (Te M Sb H₂O/EthOH Fr H₂O) avec une CMI médiane de 0,08mg/ml, activité variant entre 0,04 et 0,16mg/ml sur les 5 levures testées.

Au final, 7 subfractions ayant des CMI considérablement réduites ont été retenues avec des CMI médianes comprises entre 0,08 et 0,94mg/ml.

Le calcul de l'évolution des CMI médianes globales des extraits bruts aux subfractions donne les résultats représentés dans le tableau 40. Ils permettent de constater que le fractionnement a globalement augmenté l'activité des extraits sur les levures testées. Toutefois, c'est surtout la deuxième partition qui a provoqué une augmentation considérable de l'activité des extraits concernés avec une diminution d'un facteur de plus de 3 entre les CMI des subfractions et celles des extraits bruts et fractions.

Tableau 39 : Concentrations minimales inhibitrices des subfractions obtenues sur les isolats de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. neoformans* et la souche *C. albicans* ATCC P37037

Codes des Fractions	Sub fractions	Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml)					CMI moyennes	Ecart Type	CMI médianes
		<i>Candida albicans</i> ATCC P37037	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Crypto-coccus neoformans</i>			
Te C L H ₂ O/EthOH Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	0,31	0,62	0,31	0,31	0,16	0,34	0,17	0,31
Te C L H ₂ O/EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	0,31	0,62	0,31	0,62	0,31	0,44	0,17	0,31
Te C L EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr C ₆ H ₁₂	0,62	1,25	0,62	1,25	0,62	0,88	0,34	0,62
	Fr CH ₃ OH	1,25	1,25	1,25	>1,25	1,25	1,25	0,00	1,25
Te C Sb H ₂ O/EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	0,16	1,25	0,31	0,62	0,08	0,48	0,48	0,31
Te M L H ₂ O Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	0,16	0,62	0,31	0,31	0,16	0,31	0,19	0,31
Te M L H ₂ O Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	0,31	0,62	0,08	0,08	0,08	0,23	0,24	0,08
Te M L H ₂ O/EthOH Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	0,31	0,62	0,16	0,16	0,16	0,28	0,20	0,16
Te M L H ₂ O/EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr C ₆ H ₁₂	0,31	0,31	0,31	0,31	0,16	0,28	0,07	0,31
	Fr CH ₃ OH	0,16	0,16	0,16	0,62	0,16	0,25	0,21	0,16
Te M L EthOH Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	0,31	0,16	0,31	0,31	0,62	0,34	0,17	0,31
Te M L EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	0,16	0,16	0,31	0,31	0,31	0,25	0,08	0,31
Te M Sb H ₂ O Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	0,16	0,08	0,08	0,16	0,04	0,10	0,05	0,08
Te M Sb H ₂ O Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	0,16	0,08	0,08	0,16	0,04	0,10	0,05	0,08
Te M Sb H ₂ O/EthOH Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	0,04	0,08	0,08	0,16	0,08	0,08	0,04	0,08
Te M Sb H ₂ O/EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	0,31	1,25	1,25	1,25	0,62	0,94	0,44	1,25
Te M Sb EthOH Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,00	0,31
Te M Sb EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	0,16	0,08	0,08	0,16	0,08	0,11	0,04	0,08
Mo T L H ₂ O/EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr C ₆ H ₁₂	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25			
	Fr CH ₃ OH	1,25	1,25	1,25	1,25	>1,25	1,25	0	1,25
Mo T L EthOH Fr CH ₂ Cl ₂	Fr C ₆ H ₁₂	1,25	>1,25	>1,25	>1,25	1,25	1,25	0	1,25
	Fr CH ₃ OH	1,25	0,62	0,62	>1,25	1,25	0,94	0,36	0,94

Mo T : *Monodora tenuifolia* ; **Te C :** *Terminalia catappa* ; **Te M :** *Terminalia mantaly* ; **f :** feuilles ; **ec :** écorce du tronc ; **bri :** brindilles ; **Bra :** branches ; **Pu :** pulpe ; **gr :** graines ; **Pgr :** pericarpe des graines ; **Pe :** pericarpe ; **H₂O :** eau distillée ; **H₂O/EthOH :** hydroethanol ; **EthOH :** ethanol. **Fr H₂O :** fraction aqueuse ; **Fr CH₂Cl₂ :** fraction au chlorure de méthylène ; **Fr C₆H₁₂ :** subfraction Hexanique ; **Fr CH₃OH :** subfraction Methanolique
Cellules colorées : extraits sélectionnés pour la suite des tests.

Tableau 40: Visualisation globale de l'évolution des CMI médianes avec le fractionnement

Extrait	CMI médiane (mg/ml)
Extrait brut	0,31
Fraction	0,31
Subfraction	0,08

III.2.3. Analyse phytochimique des subfractions sélectionnées

Les résultats obtenus à l'issu des tests de caractérisation phytochimique des subfractions sont conciliés dans le tableau 41.

Il ressort que la subfraction issue de *M. tenuifolia* contient 3 métabolites secondaires sur les 10 testés, notamment les alcaloïdes, les glucosides et les stéroïdes. Aussi, cette composition en métabolites secondaires est identique à celle de l'extrait brut dont elle dérive. Les extraits issus des plantes du genre *Terminalia* possèdent en commun les flavonoïdes, les tannins, les glucosides, les phénols, les stéroïdes. Cette composition est proche de celle des extraits bruts dont ils dérivent.

Tableau 41 : Profil phytochimique des 7 subfractions sélectionnées

			Alcaloïdes	Flavonoïdes	Saponines	Tanins	Glucosides	Phénols	Stéroïdes	Triterpènes	Anthocyanines	Anthraquinones
Te C _f H ₂ O/EtOH	Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Te M _f H ₂ O	Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Te M _{et} H ₂ O	Fr H ₂ O	Fr CH ₃ OH	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Te M _{et} H ₂ O	Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Te M _{et} H ₂ O/EtOH	Fraq	Fr CH ₃ OH	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Te M _{et} EthOH	Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Mo T _f EthOH	Fr CH ₂ Cl ₂	Fr CH ₃ OH	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-

+ : présent ; - : absent

III.2.4. Chromatographie sur colonne et CMI des subfractions et fractions purifiées obtenues

La chromatographie sur colonne en vue d'isoler les principes actifs de la subfraction la plus active Te M Sb H₂O/EthOH Fr H₂O a permis d'obtenir 4 fractions purifiées et 9 sub-subfractions. Ces fractions ont été testées pour la détermination de leur CMI sur les souches en présence. Les résultats ont donné des CMI toutes supérieures à 2,5mg/ml. Ces activités sont inférieures à celle de la fraction, de la subfraction et de l'extrait brut dont ils sont issus.

III.2.5. Discussion

Le fractionnement a pour but de concentrer les principes actifs des extraits de plantes et à termes optimiser l'activité. Dans cette étude, le double fractionnement a réellement concentré les principes actifs de certains extraits, ce qui a augmenté l'activité de plus de 50%. Certains auteurs ont également montré l'effet bénéfique des fractions ; les fractions des extraits de *Terminalia arjuna* et de *Croton zambesicus* ont donné des activités inhibitrices sur les bactéries et les champignons plus élevées que celles des extraits bruts (**Nema et al., 2012 ; Ngouana et al., 2011**). **Nwodo et al. (2010)** ont également obtenu un accroissement de l'activité antibactérienne des extraits de plantes après fractionnement. Cependant, durant le fractionnement, certains extraits ont vu leur activité diminuer. En effet, **Cowan (1999)** a montré que les métabolites secondaires sont séparés en fonction de leur solubilité et de leur polarité durant le fractionnement. Ainsi, les composés agissant en synergie sont séparés, entraînant une perte d'activité. Cet effet a surtout été marqué pendant la chromatographie sur colonne où ni les sub-subfractions ni les fractions purifiées n'ont donné une activité plus importante que celle de la subfraction de départ.

III.3. Etude des combinaisons des subfractions sélectionnées

Les subfractions retenues ont été combinées entre elles en utilisant un plan de combinaison inter-plantes et, pour facilement exprimer les résultats, des codes ont été attribués aux différentes subfractions. Le tableau 42 définit la codification de chaque subfraction. De la mise en commun des subfractions, 11 combinaisons ont été obtenues.

Tableau 42 : Codes d'identification des différentes subfractions pour la réalisation des tests de combinaison

Codes	Subfractions
C2	Te C _f H ₂ O/EthOH Fr H ₂ O Fr CH ₃ OH
C12	Te M _f H ₂ O Fr CH ₂ Cl ₂ Fr CH ₃ OH
C22	Te M _{et} H ₂ O Fr H ₂ O Fr CH ₃ OH
C24	Te M _{et} H ₂ O Fr CH ₂ Cl ₂ Fr CH ₃ OH
C26	Te M _{et} H ₂ O/EthOH Fr H ₂ O Fr CH ₃ OH
C32	Te M _{et} EthOH Fr CH ₂ Cl ₂ Fr CH ₃ OH
C36	Mo T _f EthOH Fr CH ₂ Cl ₂ Fr CH ₃ OH

III.3.1. Combinaison par la méthode de l'échiquier

Les tableaux 43 à 48 contiennent les CMI des subfractions testées seules puis en combinaisons, sur les cinq levures ; ils donnent aussi les valeurs des FIC et des FICI représentant l'interprétation des types d'interaction.

Au regard des valeurs de FICI du tableau 43, deux combinaisons, C36/C2 et C36/C12 ont une interaction synergique, la meilleure valeur de FICI soit 0,37, est obtenue avec la combinaison C36/C12 sur la souche *C. albicans* ATCC P37037

Les résultats conciliés dans le tableau 44 montrent qu'une interaction synergique a été obtenue avec les combinaisons C2/C22 et C36/C32, toutes ayant une valeur de FICI égale à 0,50 ; 6 combinaisons ont donné une interaction additive.

Dans le tableau 45, les combinaisons C36/C2 et C36/C24 ont une interaction synergique avec des FICI égale à 0,50 ; des 9 autres combinaisons, 8 présentent une additivité avec les FICI compris entre 0,56 et 0,75, et la combinaison de C2 à C12 révèle une indifférence avec un FICI égale à 1,06 sur *C. glabrata*.

Les combinaisons ayant présenté une interaction synergique sont C36/C2 et C36/C12 dans le tableau 46, le meilleur index de FIC soit 0,37 étant obtenu avec la deuxième combinaison. Huit

des combinaisons ont montré une additivité et la combinaison C2/C26 a donné une indifférence avec un FICI égale à 1,12 sur *C. parapsilosis*.

Les résultats du tableau 47 montrent que 8 des 11 combinaisons ont une interaction synergique et les trois autres une interaction additive. La meilleure valeur de FICI, 0,25 est obtenue avec les combinaisons C36/C12 et C36/C26.

De façon générale, au vu de tableau 48 de synthèse, la majorité des interactions synergiques est obtenue avec la combinaison des subfractions de *T. catappa* et de *M. tenuifolia* et des subfractions de *T. mantaly* et de *M. tenuifolia*. Les combinaisons entre plantes du genre *Terminalia* donnent essentiellement des interactions additives. Les combinaisons ayant au moins trois interactions synergiques sur les cinq levures, soit C36/C2 et C36/C12, ont été retenues pour l'évaluation de leur activité inhibitrice en fonction du temps.

Tableau 43 : CMI et interprétations des combinaisons sur *Candida albicans* ATCC P37037

<i>Candida albicans</i> ATCC P37037						
Combinaisons	CMI individuelles (mg/ml)	CMI en combinaison (mg/ml)	FIC individuelles	Index de FIC (FICI)	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
C2/C12	0,3125/0,3125	0,0195/0,3125	0,060/1,000	1,06	93,75/00,00	Indifférence
C2/C22	0,3125/0,1562	0,1562/0,0391	0,500/0,250	0,75	50,00/75,00	Additivité
C2/C24	0,3125/0,1562	0,1562/0,0097	0,500/0,060	0,56	50,00/93,75	Additivité
C2/C26	0,3125/0,0391	0,1562/0,0048	0,500/0,125	0,62	50,00/87,50	Additivité
C2/C32	0,3125/0,1562	0,0195/0,0781	0,060/0,500	0,56	93,75/50,00	Additivité
C36/C2	1,2500/0,3125	0,3125/0,0781	0,250/0,250	0,50	75,00/75,00	Synergie
C36/C12	1,2500/0,3125	0,3125/0,0391	0,250/0,125	0,37	75,00/87,50	Synergie
C36/C22	1,2500/0,1562	0,6250/0,0048	0,500/0,030	0,53	50,00/96,87	Additivité
C36/C24	1,2500/0,1562	0,6250/0,0781	0,500/0,500	1,00	50,00/50,00	Additivité
C36/C26	1,2500/0,0391	0,3125/0,0195	0,250/0,500	0,75	75,00/50,00	Additivité
C36/C32	1,2500/0,1562	0,1562/0,0781	0,125/0,500	0,62	87,50/50,00	Additivité

Tableau 44 : CMI et interprétations des combinaisons sur l'isolat de *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>						
Combinaisons	CMI individuelles (mg/ml)	CMI en combinaison (mg/ml)	FIC individuelles	Index de FIC (FICI)	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
C2/C12	0,6250/0,6250	0,0391/0,6250	0,060/1,000	1,06	93,75/00,00	Indifférence
C2/C22	0,6250/0,0781	0,1562/0,0195	0,250/0,250	0,50	75,00/75,00	Synergie
C2/C24	0,6250/0,0781	0,1562/0,0391	0,250/0,500	0,75	75,00/50,00	Additivité
C2/C26	0,6250/0,0781	0,3125/0,0195	0,500/0,250	0,75	50,00/75,00	Additivité
C2/C32	0,6250/0,0781	0,0781/0,0781	0,125/1,000	1,12	87,50/00,00	Indifférence
C36/C2	0,6250/0,6250	0,3125/0,0781	0,500/0,125	0,62	50,00/87,50	Additivité
C36/C12	0,6250/0,6250	0,3125/0,0781	0,500/0,125	0,62	50,00/87,50	Additivité
C36/C22	0,6250/0,0781	0,3125/0,0097	0,500/0,125	0,62	50,00/87,50	Additivité
C36/C24	0,6250/0,0781	0,0781/0,0781	0,125/1,000	1,12	87,50/00,00	Indifférence
C36/C26	0,6250/0,0781	0,3125/0,0195	0,500/0,250	0,75	50,00/75,00	Additivité
C36/C32	0,6250/0,0781	0,1562/0,0195	0,250/0,250	0,50	75,00/75,00	Synergie

Tableau 45 : CMI et interprétations des combinaisons sur l'isolat de *Candida glabrata*

<i>Candida glabrata</i>						
Combinaisons	CMI individuelles (mg/ml)	CMI en combinaison (mg/ml)	FIC individuelles	Index de FIC (FICI)	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
C2/C12	0,3125/0,0781	0,0195/0,0781	0,060/1,000	1,06	93,75/00,00	<i>Indifférence</i>
C2/C22	0,3125/0,0781	0,0781/0,0391	0,250/0,500	0,75	75,00/50,00	<i>Additivité</i>
C2/C24	0,3125/0,0781	0,0781/0,0391	0,250/0,500	0,75	75,00/50,00	<i>Additivité</i>
C2/C26	0,3125/0,0781	0,0781/0,0391	0,250/0,500	0,75	75,00/50,00	<i>Additivité</i>
C2/C32	0,3125/0,0781	0,1562/0,0195	0,500/0,250	0,75	50,00/75,00	<i>Additivité</i>
C36/C2	0,6250/0,3125	0,1562/0,0781	0,250/0,250	0,50	75,00/75,00	<i>Synergie</i>
C36/C12	0,6250/0,0781	0,3125/0,0048	0,500/0,060	0,56	50,00/93,75	<i>Additivité</i>
C36/C22	0,6250/0,0781	0,3125/0,0195	0,500/0,250	0,75	50,00/75,00	<i>Additivité</i>
C36/C24	0,6250/0,0781	0,1562/0,0195	0,250/0,250	0,50	75,00/75,00	<i>Synergie</i>
C36/C26	0,6250/0,0781	0,3125/0,0097	0,500/0,125	0,62	50,00/87,50	<i>Additivité</i>
C36/C32	0,6250/0,0781	0,3125/0,0195	0,500/0,250	0,75	50,00/75,00	<i>Additivité</i>

Tableau 46 : CMI et interprétations des combinaisons sur l'isolat de *Candida parapsilosis*

<i>Candida parapsilosis</i>						
Combinaisons	CMI individuelles (mg/ml)	CMI en combinaison (mg/ml)	FIC individuelles	Index de FIC (FICI)	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
C2/C12	0,3125/0,0781	0,1562/0,0391	0,500/0,500	1,00	50,00/50,00	Additivité
C2/C22	0,3125/0,1562	0,1562/0,0195	0,500/0,125	0,62	50,00/87,50	Additivité
C2/C24	0,3125/0,1562	0,1562/0,0048	0,500/0,030	0,53	50,00/96,87	Additivité
C2/C26	0,3125/0,1562	0,0391/0,1562	0,125/1,000	1,12	87,50/00,00	Indifférence
C2/C32	0,3125/0,1562	0,1562/0,0781	0,500/0,500	1,00	50,00/50,00	Additivité
C36/C2	1,2500/0,3125	0,3125/0,0781	0,250/0,250	0,50	75,00/75,00	Synergie
C36/C12	1,2500/0,0781	0,3125/0,0097	0,250/0,125	0,37	75,00/87,50	Synergie
C36/C22	1,2500/0,1562	0,3125/0,0781	0,250/0,500	0,75	75,00/50,00	Additivité
C36/C24	1,2500/0,1562	0,6250/0,0391	0,500/0,250	0,75	50,00/75,00	Additivité
C36/C26	1,2500/0,1562	0,6250/0,0097	0,500/0,060	0,56	50,00/93,75	Additivité
C36/C32	1,2500/0,1562	0,6250/0,0097	0,500/0,060	0,56	50,00/93,75	Additivité

Tableau 47 : CMI et interprétations des combinaisons sur l'isolat de *Cryptococcus neoformans*

<i>Cryptococcus neoformans</i>						
Combinaisons	CMI individuelles (mg/ml)	CMI en combinaison (mg/ml)	FIC individuelles	Index de FIC (FICI)	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
C2/C12	0,1562/0,0781	0,0781/0,0097	0,500/0,125	0,62	50,00/87,50	Additivité
C2/C22	0,1562/0,0391	0,0391/0,0024	0,250/0,060	0,31	75,00/93,75	Synergie
C2/C24	0,1562/0,0391	0,0391/0,0024	0,250/0,060	0,31	75,00/93,75	Synergie
C2/C26	0,1562/0,0781	0,0195/0,0391	0,125/0,500	0,62	87,50/50,00	Additivité
C2/C32	0,1562/0,0781	0,0391/0,0097	0,250/0,125	0,37	75,00/87,50	Synergie
C36/C2	1,2500/0,1562	0,3125/0,0391	0,250/0,250	0,50	75,00/75,00	Synergie
C36/C12	1,2500/0,0781	0,1562/0,0097	0,125/0,125	0,25	87,50/87,50	Synergie
C36/C22	1,2500/0,0391	0,3125/0,0048	0,250/0,125	0,37	75,00/87,50	Synergie
C36/C24	1,2500/0,0391	0,3125/0,0097	0,250/0,250	0,50	75,00/75,00	Synergie
C36/C26	1,2500/0,0781	0,1562/0,0097	0,125/0,125	0,25	87,50/87,50	Synergie
C36/C32	1,2500/0,0781	0,1562/0,0391	0,125/0,500	0,62	87,50/50,00	Additivité

Tableau 48: Récapitulatif des interactions obtenues par la méthode de l'échiquier

Combinaisons	<i>Candida albicans</i> ATCC P37037		<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
	FICI	Int	FICI	Int	FICI	Int	FICI	Int	FICI	Int
C2/C12	1,06	I	1,06	I	1,06	I	1,00	A	0,62	A
C2/C22	0,75	A	0,50	S	0,75	A	0,62	A	0,31	S
C2/C24	0,56	A	0,75	A	0,75	A	0,53	A	0,31	S
C2/C26	0,62	A	0,75	A	0,75	A	1,12	I	0,62	A
C2/C32	0,56	A	1,12	I	0,75	A	1,00	A	0,37	S
C36/C2	0,50	A	0,62	A	0,50	S	0,50	S	0,50	S
C36/C12	0,37	S	0,62	A	0,56	A	0,37	S	0,25	S
C36/C22	0,53	A	0,62	A	0,75	A	0,75	A	0,37	S
C36/C24	1,00	S	1,12	I	0,50	S	0,75	A	0,50	S
C36/C26	0,75	A	0,75	A	0,62	A	0,56	A	0,25	S
C36/C32	0,62	S	0,50	S	0,75	A	0,56	A	0,62	A

I : indifférence ; A : additivité ; S : synergie; Int:interaction

III.3.2. Combinaisons par la méthode du time kill kinetic

La figure 49 résume les courbes de variation du nombre logarithmique de cellules en fonction du temps au cours du test. Le tableau 55 donne l'interprétation de ces courbes pour en tirer le type d'interaction.

Dans l'ensemble, les deux combinaisons inhibent la croissance des levures dans la plage horaire des tests. Toutes les subfractions testées seules sont fongistatiques. Cependant, lorsqu'elles sont mises en combinaison, l'activité de la combinaison donne une fongicidie totale dans un temps inférieur à 24heures. La combinaison C36/C12 est en définitive la plus efficace avec une interaction synergique et une fongicidie sur 4 des 5 levures testées. La cinétique des deux combinaisons sur *C. albicans* donne une fongicidie totale au bout de 6 heures d'exposition aux combinaisons. De même les deux combinaisons sont fongicides sur *C. glabrata* au bout de 8 heures. Cette fongicidie est observée sur *C. albicans* ATCC P37037 après 16 heures et 24 heures d'exposition aux combinaisons C36/C2 et C36/C12 respectivement. Seule la combinaison C36/C12 a été fongicide sur *C. parapsilosis* après 16 heures d'exposition. Enfin, les deux combinaisons n'ont pas d'effet fongicide sur *C. neoformans*.

Diversité génétique d'isolats de Cryptococcus et Candida issus des patients VIH+ à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes

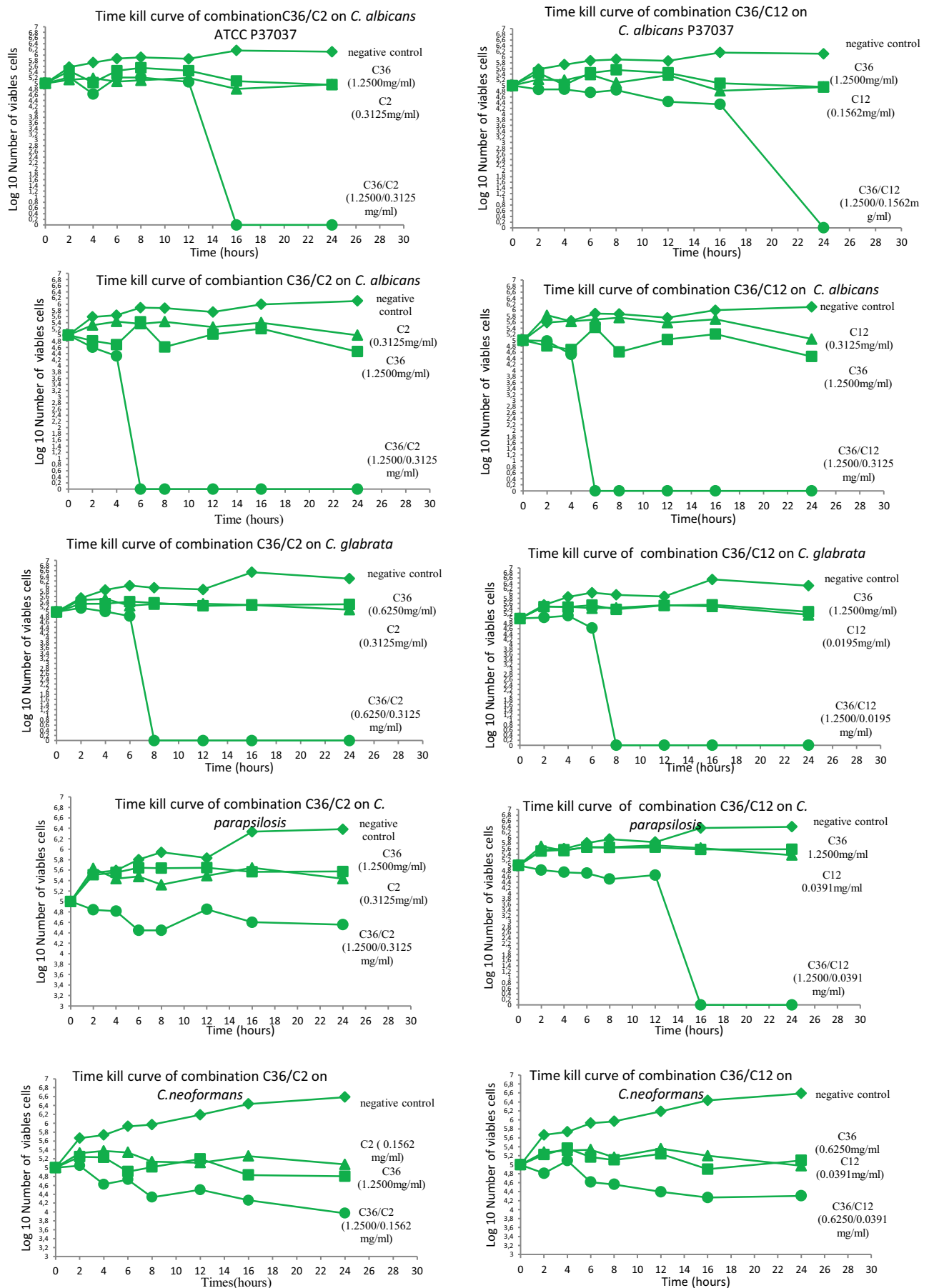


Figure 47 : « Time kill curves » à l'issu du time kill test sur les isolats de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. neoformans* et la souche *C. albicans* ATCC P37037

Table 49: Résumé et type d'interaction après le time kill kinetic test.

	C36/C2			C36/C12		
	Réduction de la densité cellulaire	Interprétation	Type d'activité	Réduction de la densité cellulaire	Interprétation	Type d'activité
<i>C. albicans</i> ATCC P37037	4,95log ₁₀	Synergie	Fongicide	4,95log ₁₀	Synergie	Fongicide
<i>C. albicans</i>	4,47log ₁₀	Synergie	Fongicide	4,46log ₁₀	Synergie	Fongicide
<i>C. glabrata</i>	5,08log ₁₀	Synergie	Fongicide	5,14log ₁₀	Synergie	Fongicide
<i>C. parapsilosis</i>	0,88log ₁₀	Additivité	Fongistatique	5,36log ₁₀	Synergie	Fongicide
<i>C. neoformans</i>	0,83log ₁₀	Additivité	Fongistatique	0,67log ₁₀	Additivité	Fongistatique

C2: Te C L H₂O/EthOH Fr H₂O Fr CH₃OH; **C12:** Te M L H₂O Fr CH₂Cl₂ Fr CH₃OH; **C36:** Mo T L EthOH Fr CH₂Cl₂ Fr CH₃OH.

III.3.3. Discussion

La valeur thérapeutique des interactions synergiques est connue depuis l'antiquité et plusieurs méthodes de traitements traditionnels se sont basées sur le fait que la combinaison thérapeutique pourrait augmenter l'efficacité, réduire la toxicité, augmenter la biodisponibilité, réduire la dose et réduire l'émergence des résistances (**van Vuuren et Viljoen, 2011 ; Inui et al., 2007 ; Cottarel et Wierzbowski, 2007 ; Li et al., 1993**). Cette même croyance a été scientifiquement prouvée et beaucoup de formulations médicamenteuses sont des combinaisons de plusieurs molécules. En effet, les antirétroviraux sont des combinaisons des molécules aux cibles différentes, les combinaisons à base d'artémisinine dans le traitement du paludisme, l'association amoxicilline-acide clavulanique dans le traitement des infections bactériennes, l'amphotéricine B combinée à la flucytosine ou au fluconazole pour le traitement de la cryptococcose neuro-méningée (**Arts et Hazuda, 2012 ; van Vuuren et Viljoen, 2011 ; Davis et al., 2009 ; Ritter and Goldman, 2009 ; Cottarel et Wierzbowski, 2007 ; Fallon, 2005**). La combinaison des subfractions de *Terminalia* et de *Monodora* dans ce travail a permis d'obtenir des interactions synergiques, qui d'une part confirment l'usage traditionnel de ces combinaisons thérapeutiques et d'autres parts ouvrent une voie dans le développement des médicaments antifongiques à partir des combinaisons d'extraits de plantes. Il n'existe à notre connaissance aucune publication sur les travaux de combinaisons des plantes ici utilisées. Toutefois, d'autres auteurs ont montré que les combinaisons d'extraits de plantes ont des effets potentialisateurs de l'activité antimicrobienne. **Ncube et al. (2012)** ont établi l'effet synergique de la combinaison d'extraits de plantes médicinales Sud-Africaine. **Adwan et al. (2010)** ont montré l'effet bénéfique des combinaisons de plantes chinoises contre *Pseudomonas aeruginosa*. Les huiles essentielles de *Melaleuca alternifolia* et de *Lavandula*

angustifolia en combinaison se sont montrées très efficaces contre *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes* (Cassella et al., 2002).

La prédominance des interactions additives dans les combinaisons des plantes du genre *Terminalia* pourrait trouver son explication dans la similitude de composition en métabolites secondaires. Cependant, les interactions synergiques qui se font remarquer dans les combinaisons des subfractions issues *Monodora* avec celles issues de *Terminalia* sont d'un intérêt particulier. Ces deux genres ont une composition en métabolites secondaires différente. Les cibles métaboliques des molécules d'un genre étant probablement différentes de celles de l'autre genre, l'attaque de plusieurs cibles métaboliques différentes à la fois dans les combinaisons rendrait plus vulnérable la levure d'où l'action synergique et amplification de l'activité antifongique ; également est envisageable la modification des propriétés pharmacocinétiques et physicochimiques ainsi que la modification des principes actifs par complexation ou modification chimiques des molécules pour générer des nouveaux principes actifs plus efficaces (Ncube et al., 2012; van Vuuren and Viljoen, 2011; Nwodo, 2010; Onyewu et al., 2003, Williamson, 2001).

La combinaison de ces subfractions n'a pas qu'amplifié l'activité mais a changé la pharmacodynamie des extraits. Les extraits seuls ont été fongistatiques sur toutes les levures testées mais une fois en combinaison, la combinaison a été fongicide. L'intérêt d'un antifongique fongicide est important. En effet, l'amphotéricine B qui est l'antifongique pour lequel des résistances sont pour le moment peu connues est fongicide. Cependant, les azolés, fongistatiques, sont sujets à une forte émergence de résistances, surtout chez les patients immunodéprimés. Ceci est dû au fait que les cellules à croissance inhibée restent en vie dans l'organisme et le système immunitaire n'est plus efficace pour éliminer les cellules résiduelles, qui vont par la suite développer des mécanismes de résistance à l'antifongique et reprendre leur action pathogène (Shimada, 2006). La fongistasie de ces combinaisons sur *C. neoformans* pourrait s'expliquer par la présence de sa capsule qui apporte une résistance supplémentaire aux antifongiques. La fongicidie des combinaisons observée ici trouve son explication dans l'effet multi-cibles des molécules de la combinaison. La combinaison la plus active C36/C12 (Mo T_f EthOH Fr CH₂Cl₂ Fr CH₃OH/Te M_f H₂O Fr CH₂Cl₂ Fr CH₃OH) serait ainsi un bon candidat dans la poursuite du développement d'un phytomédicament à activité antifongique pour le traitement de la candidose et de la cryptococcose neuro-méningée chez les PVVIH au Cameroun et ailleurs.

III.4. Conclusion partielle 3

Cette partie avait pour objectif de développer de nouvelles possibilités thérapeutiques contre la cryptococcose neuro-méningée et la candidose muqueuse à partir des extraits de plantes.

Il ressort que les extraits de *T. mantaly*, *T. catappa* et *M. tenuifolia* sont doués de propriétés antifongiques. Le fractionnement bio-guidé a permis d'accroître l'activité antifongique des extraits bruts aux subfractions. La subfraction la plus active a eu une CMI moyenne et médiane de 0,08mg/ml, et est issue de l'extrait des feuilles de *T. mantaly*. La combinaison des subfractions actives a permis d'obtenir des combinaisons synergiques et fongicides, avec la combinaison la plus active C36/C12 (Mo T_f EthOH Fr CH₂Cl₂ Fr CH₃OH/Te M_f H₂O Fr CH₂Cl₂ Fr CH₃OH) qui s'est montrée fongicide et synergique sur tous les isolats de *Candida*, et synergique fongistatique sur l'isolat de *C. neoformans*.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était d'obtenir et de caractériser génétiquement des isolats de *Cryptococcus* et *Candida* issus des PVVIH à Yaoundé, d'étudier leur profil de sensibilité aux antifongiques donnés en thérapeutique courante au Cameroun et d'évaluer leur sensibilité aux extraits de plantes potentiellement utiles au développement de nouvelles thérapies contre les infections fongiques chez ces patients à risque.

L'étude épidémiologique de la cryptococcose a permis de montrer que la fréquence de la cryptococcose neuro-méningée est de 28,08%. *C. neoformans* var *grubii* est la seule espèce isolée des LCR. Le typage moléculaire de *C. neoformans* a montré que les 150 isolats testés présentent une diversité génétique importante. *C. neoformans* sérotype A et génotype VNI est le seul retrouvé dans la population d'étude et présente 15 types moléculaires différents. L'étude de la sensibilité des isolats aux antifongiques a permis de faire les constats suivants : *C. neoformans* est sensible aux antifongiques testés. Cependant, une souche présente une sensibilité réduite à la 5-fluorocytosine et une autre au fluconazole. On peut cependant noter que les isolats issus du même patient présentent des différences de sensibilité importantes aux antifongiques.

L'étude épidémiologique de *Candida* a permis de montrer que 57,62% de PVVIH sont colonisés par *Candida* et que la fréquence de la colonisation des muqueuses est de 24,13% dans la population étudiée. *C. albicans* est l'espèce majoritairement retrouvée. *C. africana* a été pour la première fois isolé au Cameroun. L'épidémiologie moléculaire de *C. albicans* a montré que *C. albicans* génotype A est majoritaire dans la population d'étude. L'analyse des séquences microsatellites montre que cette espèce présente une importante variabilité génétique avec 65 types moléculaires différents. Par ailleurs, l'analyse de l'amplification du gène *Hwp1* a permis de définir de nouveaux génotypes (H1-H5). L'étude de la sensibilité des isolats aux antifongiques montre que *C. albicans* présente une sensibilité réduite aux azolés et que l'amphotéricine B est efficace sur la totalité des souches testées.

L'étude de la sensibilité des isolats aux extraits de plantes donne de constater que les extraits issus de *T. mantaly*, *T. catappa* et *M. tenuifolia* présentent des activités inhibitrices contre les levures testées. Par ailleurs, le fractionnement bio-guidé permet d'améliorer l'activité des

extraits bruts et la combinaison des subfractions a permis d'obtenir une combinaison synergique sur les levures testées, associée à une action fongicide et une mortalité de la plupart des isolats dans un délai de moins de 24 heures.

Cette étude a apporté des éléments nouveaux dans la compréhension de la cryptococcose neuro-méningée et de la candidose muqueuse chez les PVVIH à Yaoundé. Elle apporte également une voie prometteuse dans l'amélioration de la prise en charge de ces infections par le développement d'une thérapie alternative à base d'extraits de plantes.

Références

- Abad MJ, Ansuategui M and Bermejo P, (2007).** Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, 2007(7):116-145.
- Abdulahim MH, McManus BA, Flint SR and Coleman DC, (2013).** Genotyping *Candida albicans* from *Candida* Leukoplakia and Non-*Candida* Leukoplakia Shows No Enrichment of Multilocus Sequence Typing Clades but Enrichment of ABC Genotype C in *Candida* Leukoplakia. *PLoS ONE* 8(9): e73738. doi:10.1371/journal.pone.0073738
- Aberg JA and Powderly WG, (2006).** Cryptococcosis and HIV. *HIV In Site Know. Base Chapter*, New York University, New York.
- Ackah JAB, Kra AKM, Zirihi GN et Guede-Guina F, (2008).** Évaluation et essais d'optimisations de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* Linné (tekam3), un extrait de *Combretaceae* de la pharmacopée ivoirienne. *Bull Soc Roy Sci Liège*, 77 :120-136.
- Akins RA, (2005).** An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol*, 43(4):285-318.
- Albano LS, Bretagne MF, Mamzer-Bruneel I, Kacso M, Desnos-Ollivier P, Guerrini T, Le Luong EC, Dromer F and Lortholary O, (2009).** Evidence that graft-site candidiasis after kidney transplantation is acquired during organ recovery: a multicenter study in France. *Clin Infect Dis*, 48(2): 194-202.
- Alcoba-Florez J, Mendez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Perez-Roth E and del Pilar AM, (2005).** Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol*, 43(8): 4107-4111.
- Aller AI, Martin-Mazuelos E et al., (2000).** Correlation of Fluconazole MICs with Clinical Outcome in Cryptococcal Infection. *Antimicrob Ag Chemother* 44(6):1544–1548.
- Almeida GM, Andrade RM et al., (2001).** The capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* activate normal CD4+ T cells in a dominant Th2 pattern. *J Immunol*, 167(10): 5845-5851.
- Almirante B, Rodriguez D et al., (2006).** Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 44: 1681-1685.
- Almirante BD, Rodriguez B et al., (2005).** Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 43:1829-1835.
- Al-Sweih N, Ahmad S, Khan ZU, Khan S and Chandy R, (2005).** Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. *Mycoses*, 48: 347-351.

- Anane S et Khalfallah F, (2006).** Diagnostic des candidoses systémiques : difficultés et perspectives. *Pathol Biol* 11 ; sous presse.
- Andeme S, Benmostef A, Chevalier A, Bouyou-Akotet M, Bailly E, Kombila M, Chandenier J, Hennequin C, (2014).** *Candida africana* : un agent fongique commun des vaginites candidosiques à Libreville, Gabon. *J Myc Med*, Doi : 10.1016/j.mycmed.2014.06.026
- Antinori S, (2013).** New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. *ISRN AIDS*. doi: 10.1155/2013/471363
- Appleton SS, (2000).** Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics, and treatment. *J Calif Dent Assoc*, 28(12):942-948.
- Arbonnier M, (2004).** Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. *CIRAD, Paris, France; Margraf, Weikersheim, Germany; MNHN, Paris, France*.
- Arif S, Barkham T, Power EG and Howell SA, (1996).** Techniques for investigation of an apparent outbreak of infections with *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*, 34(9):2205-2209.
- Arjariya S, Nema N, Tiwari S, (2013).** Investigate the Toxicological Effect on Aqueous Extract of *Terminalia catappa* Linn. in Rat. *Research Gate: Pharmaceut Sces*, 1: 80-83.
- Armengou A, Porcar C, Mascaro J, Garcia-Bragado F, (1996).** Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 23: 1337–1338.
- Arts EJ and Hazuda DJ, (2012).** HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(4): a007161. doi: 10.1101/cshperspect.a007161.
- Babayi H, Kolo I, Okogun JI, Ijah UJJ, (2004).** Antimicrobial activities of methonolic extract of *Eucalytus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathologenic microorganisms. *Biochemistry*, 16 (2): 106-111.
- Bachewich C, Thomas DY and Whiteway M, (2003).** Depletion of a polo-like kinase in *Candida albicans* activates cyclase-dependent hyphal-like growth. *Mol biol cell*, 14: 2163-2180.
- Bahn YS and Muhlschlegel FA, (2006).** CO₂ sensing in fungi and beyond. *Curr op microbial*, 9:572-578.
- Bai F-Y, (2014).** Association of genotypes with infection types and antifungal susceptibilities in *Candida albicans* as revealed by recent molecular typing strategies. *Mycology*, 5(1):1–9.
- Baradkar VP and Kumar S, (2009).** Species identification of candida isolates obtained from oral lesions of HIV infected patients. *Indian J Dermatol*; 54(4): 385–386. doi: 10.4103/0019-5154.57622
- Barbosa FM, Fonseca FL, et al., (2007).** Binding of glucuronoxylomannan to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production. *Clin Vaccine Immunol*, 14(1): 94-98.
- Barchiesi F, Cogliati M, et al., (2005).** Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. *J Infect*, 51(1): 10-16.

- Barchiesi F, Maracci M, Radi B et al., (2002).** Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother*, 50: 999–1002.
- Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Vittoria AD, Arzeni D, Manso E, and Scalise G, (2006).** Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 2719-2727.
- Barnett JA, (2010).** A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast*, 27(11): 875-904.
- Barnett JA, Payne RW, and Yarrow D, (1983).** Yeasts: Characteristics and identification, third ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bennett RJ, (2010).** Coming of Age—Sexual Reproduction in *Candida* Species. *PLoS Pathog*, 6(12): e1001155.
- Berenbaum MC, (1978).** A method for testing for synergy with any number of agents. *J Inf Dis*, 137:122–130.
- Berg J, Clancy CJ, Nguyen MH, (1998).** The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. *Clin Infect Dis*, 26: 186–187.
- Berman J and Sudbery PE, (2002).** *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat rev*, 3:918-930.
- Berman J, (2006).** Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr op microbial*, 9: 595-601.
- Bertout S, Drakulovski P, Kouanfack C, Krasteva D, Ngouana T, Dunyach-Remy, Dongtsa J, Aghokeng A, Delaporte E, Koulla-Shiro S, Reynes J, and Mallie M, (2012).** Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients. *Clin Microbiol Infect*, 19(8):763-769. doi: 10.1111/1469-0691.12019.
- Bertout S, Renaud F, Barton R et al., (2001).** Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: investigation using four typing methods. *J Clin Microbiol*, 39:1731–1737.
- Bicanic T, Muzoora C et al., (2009).** Independent association between rate of clearance of infection and clinical outcome of HIV-associated cryptococcal meningitis: analysis of a combined cohort of 262 patients. *Clin Infect Dis*, 49:702-709.
- Bii CC, Kangogo MC, Revathi G and Wanyoike MW, (2009).** Genotypes of *Candida albicans* from clinical sources in Nairobi Kenya. *Af J Microbiol Res*, 3(9): 475-477.
- Birley HD, Johnson EM, McDonald P, Parry C, Carey PB, Warnock DW, (1995).** Azole drug resistance as a cause of clinical relapse in AIDS patients with cryptococcal meningitis. *Int J STD AIDS*, 6:353–355.

- Bissagnene E, Ouhon J, Kra O, Kadio A, (1994).** Aspects actuels de la cryptococcose neuroméningée à Abidjan. *Med Mal Infect*, 24:580-585.
- Biswas S, Van Dijck P and Datta A, (2007).** Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71:348-376.
- Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G and Prod'hom G, (2010).** Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol*, 48(5): 1549-1554.
- Blevins LB, Fenn J, Segal H, Newcomb-Gayman P, Carroll KC, (1995).** False-positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. *J Clin Microbiol* 33:1674-1675.
- Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, Hachem RY, Kontoyiannis DP and Raad II, (2002).** The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med*, 112: 380-385.
- Bolotin-Fukuhara M, Fairhead C, (2014).** *Candida glabrata*: a deadly companion? *Yeast*; 31(8):279-88. doi: 10.1002/yea.3019.
- Bonfim-Mendonça PS, Fiorini A, Shinobu-Mesquita CS, Baeza LC, Fernandez MA, Svidzinski TI, (2013).** Molecular typing of *Candida albicans* isolates from hospitalized patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 55(6): 385-391.
- Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM, (2013).** Epidemiology, Antifungal Susceptibility, and Pathogenicity of *Candida africana* Isolates from the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 51(3):967–972.
- Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit AC, Savelkoul PH, (2003).** Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp, including *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*, 41 : 1357-1362.
- Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G, and Doering TL, (2003).** A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 2:655-663.
- Botterel F, Desterke C, Costa C, and Bretagne S, (2001).** Analysis of Microsatellite Markers of *Candida albicans* Used for Rapid Typing. *J Clin Microbiol*, 39(11): 4076–4081.
- Botts MR and Hull CM, (2010).** Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. *Curr Opin Microbiol*, 13(4): 437-442.
- Botts MR, Giles SS et al., (2009).** Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. *Eukaryot Cell*, 8(4): 595-605.
- Bouchara JP, Pihet M, de Gentile L, Cimon B et Chabasse D, (2010).** Les levures et les levuroses, Cahiers de formation Biologie médicale, N°44, imprimerie vert, Paris France, 200p.

- Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G and Boekhout T, (2008).** *Emerg Infect Dis*, 14(7):1105-1108.
- Brautaset T, Sletta H et al., (2011).** New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*. *Appl Environ Microbiol*, 77(18):6636-6643.
- Bretagne S and Costa J-M, (2005).** Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 45:361-368.
- Brinkman NE, Haugland RA, Wymer LJ, Byappanahalli M, Whitman RL and Vesper SJ, (2003).** Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. *Appl Environ Microbiol*, 69(3): 1775-1782.
- Brito Gamboa A, Mendoza M, Fernandez A and Diaz E, (2006a).** Detection of *Candida dubliniensis* in patients with candidiasis in Caracas, Venezuela. *Rev Iberoam Micol*, 23: 81-4.
- Brito LR, Guimarães T, Nucci M, Rosas RC, Paula Almeida L, Da Matta DA and Colombo AL, (2006b).** Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol*, 44(3):261-266.
- Brockert PJ, Lachke SA, Srikantha T, Pujol C, Galask R and Soli DR, (2003).** Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. *Infect Immun*, 71(12): 7109-7118.
- Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Sugizaki MF, Sadatsune TA, Cezar M, Mondelli AL and Bagagli E, (2010).** Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. 3:1. doi:10.1186/1756-0500-3-1.
- Burtis Carl A, Ashwood ER, and Bruns DE, (2006).** Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fourth Edition. Editors. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 2448p, ISBN 0-7216-0189-8.
- Butler G, Rasmussen MD et al., (2009).** Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247): 657-662.
- Caesar LN, (2007).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de deux plantes utilisées en médecine traditionnelle gabonaise : *Terminalia catappa* linn. (Combretaceae) et *Kalanchoe crenata* (andr.) Haw. (Crassulaceae). Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bamako, 179p.
- Calderone RA and Fonzi WA, (2001).** Virulence factors of *Candida albicans*. *T microbiol*, 9:327-335.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M and Monk BC (2007).** *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiol*, 153(10):3211-3217.
- Cartledge JD, Midgely J and Gazzard BG, (1997).** Clinically significant azole cross-resistance in *Candida* isolates from HIV positive patients with oral candidosis. *AIDS*, 11: 1839-1844.

- Carvalho VG, Terceti MS, Dias AL, Paula CR, Lyon JP, de Siqueira AM and Franco MC, (2007).** Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 49(4):207-210.
- Casadevall A, (2010).** Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? *J Clin Invest*, 120(5): 1389-1392.
- Cassella S, Cassella JP and Smith I, (2002).** Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection. *Int J Aromather*, 12: 2–14.
- Castillo L, Calvo E, Martínez AI, Ruiz-Herrera J, Valentín E, Lopez JA and Sentandreu R, (2008).** A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics*, 8(18):3871-3881. doi: 10.1002/pmic.200800110.
- Chabasse D, Bouchara JP, de Gentile L and Chennebault JM, (1988).** *Candida albicans* chlamydospores observed in vivo in a patient with AIDS. *Ann biol clin*, 46 :817-818.
- Chabasse D, Robert R, Marot A and Phiet M, (2006).** *Candida pathogènes*. Monographies de microbiologie. Lavoisier, Pp158-178.
- Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D and Martínez JP, (1998).** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1):130-80.
- Chakrabarti A, (2007).** Epidemiology of central nervous system mycoses. *Neurol India*, 55(3): 191-197.
- Chan MY and Tay ST, (2010).** Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp. *Myc*, 53(1): 26-31.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T and Ghannoum MA, (2001).** Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 183(18):5385-5394.
- Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC, (2001).** Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol*, 39:3466–3471.
- Chang YC, Stins MF et al., (2004).** Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun*, 72(9): 4985-4995.
- Chang ZL, Netski D et al., (2006).** Binding and internalization of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, by murine peritoneal macrophages. *Infect Immun* 74(1): 144-151.
- Chapeland-Leclerc F, Hennequin C, Papon N, Noel T, Girard A, Socie G, Ribaud P and Lacroix C, (2010).** Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3): 1360-1362.

- Charlier C, Dromer F, Leveque C, Chartier L, Cordoliani YS, Fontanet A, Launay O and Lortholary O, (2008).** Cryptococcal neuroradiological lesions correlate with severity during cryptococcal meningoencephalitis in HIV-positive patients in the HAART era. *PLoS One*, **3**:e1950.
- Charlier C, Nielsen K et al., (2009).** Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, **77**(1): 120-127.
- Chayakulkeeree M and Perfect JR, (2006).** Cryptococcosis. *Infect, Dis, Clin, North, Am*, **20**:507-544.
- Chen S, Sorrell T et al., (2000).** Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis*, **31**(2): 499-508.
- Chen SH, Stins MF et al., (2003).** *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol*, **52**(11): 961-970.
- Chrisman CJ, Albuquerque P et al., (2011).** Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog*, **7**(5): e1002047.
- Chukwuma ER and Njoku OU, (2013).** Biochemical studies on Nigerian *Monodora tenuifolia* seed *Am J Agr Biol Sces* ; **8**(4): 257-267.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), (2008).** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. *Approved standard, M27-A3*. Wayne, P A:
- Cogliati M, (2013).** Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, Article ID 675213, 23 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/675213>, Review Article.
- Cogliati M, Zamfirova RR, Tortorano AM and Viviani MA, (2013).** Molecular epidemiology of Italian clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates. Fimua Cryptococcosis Network. *Med Mycol*, **51**(5):499-506. doi: 10.3109/13693786.2012.751642.
- Coignard-Chatain C, Ajana F and Caillaux M, (1998).** Identification des principales levures d'intérêt médical: apport de la gélose CHROMagar. *TM Candida*. **56**(3): 348-350.
- Cole GT, Seshan KR, Phaneuf M and Lynn KT, (1991).** Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Canad j microbial*, **37**:637-646.
- Cordero RJ, Frases S et al., (2011).** Evidence for branching in cryptococcal capsular polysaccharides and consequences on its biological activity. *Mol Microbiol*, **79**(4): 1101-1117.
- Cormican MG, Hollis RJ and Pfaller MA, (1996).** DNA macrorestriction profiles and antifungal susceptibility of *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **25**(2): 83-87.
- Correia A, Sampaio P, James S and Pais C, (2006).** *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **56**(1): 313-317.

- Cottarel G and Wierzbowski J, (2007).** Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends Biotechnol*, 12: 547–555.
- Coulibaly K, (2006).** Evaluation of the antifungal activity of extracts of bark of commercial species, category P1 the forest of Mopri, Tiassalé (Southern Ivory Coast). *Memory Master in Tropical Ecology, Plant Option, University of Cocody-Abidjan, Dept Biosci*, Pp. 23-25.
- Cowan MM, (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 12:564-582.
- Cowen LE and Steinbach WJ, (2008).** Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell*, 7(5): 747-764.
- Cox GM, Harrison TS et al., (2003).** Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun*, 71(1): 173-180.
- Cox GM, Mukherjee J et al., (2000).** Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*, 68(2): 443-448.
- Currie BP, Freundlich LF, Soto MA and Casadevall A, (1993).** False-negative cerebrospinal fluid cryptococcal latex agglutination tests for patients with culture-positive cryptococcal meningitis. *J Clin Microbiol*, 31:2519-2522.
- Dalle F, Lafon I et al., (2008).** A prospective analysis of the genotypic diversity and dynamics of the *Candida albicans* colonizing flora in neutropenic patients with de novo acute leukemia. *Haematologica*, 93(4):581-587. doi: 10.3324/haematol.11882
- Dan M, Segal R, Marder V and Leibovitz A, (2006).** *Candida* colonization of the vagina in elderly residents of a long-term-care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25(6): 394-396.
- David WD and William W, (2010).** Hope Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol*, 18(5): 195-204.
- David WW, (2007).** Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn J Med Mycol*, 18(1): 1-12.
- Davis JA, Horn DL et al., (2009).** Central nervous system involvement in cryptococcal infection in individuals after solid organ transplantation or with AIDS. *Transpl Infect Dis*, 11(5): 432-437.
- De Bernardis F, Santoni G, Boccanera M et al., (2010).** Protection against rat vaginal candidiasis by adoptive transfer of vaginal B lymphocytes. *FEMS Yeast Res*; 10(4).
- de Meeus T, Renaud F, Mouveroux E, Reynes J, Galeazzi G, Mallie M and Bastide JM, (2002).** Genetic structure of *Candida glabrata* populations in AIDS and non-AIDS patients. *J Clin Microbiol*, 40(6): 2199-206.
- De Pauw B, Walsh TJ et al., (2008).** Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group

- and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*, 46(12):1813-1821.
- Desnos-Ollivier M, Patel S, Spaulding AR et al., (2010).** Mixed infections and in vivo evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*.; 9: 2 e00091–10.
- Di Francesco LF, Barchiesi F, Caselli F, Cirioni O and Scalise G, (1999).** Comparison of four methods for DNA typing of clinical isolates of *Candida glabrata*. *J Med Microbiol*, 48(10): 955-963.
- DiDomenico BJ, Brown NH, Lupisella J, Greene JR, Yanko M and Koltin Y, (1994).** Homologs of the yeast neck filament associated genes: isolation and sequence analysis of *Candida albicans* CDC3 and CDC10. *Mol Gen Genet*, 242:689–698.
- Dieng Y, Sow D et al., (2012).** Identification of three *Candida africana* strains in Senegal. *Med Myc*, Doi: 10.1016/j.mycmed.2012.07.052.
- Diogo D, Bouchier C, d'Enfert C and Bournoux ME, (2009).** Loss of heterozygosity in commensal isolates of the asexual diploid yeast *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*, 46(2): 159-68.
- Djordjevic JT, (2010).** Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol*, 1: 125.
- Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR and Fox AJ, (2003).** Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J Clin Microbiol*, 41(12): 5709-5717.
- Dongari-Bagtzoglou A and Fidel PL Jr, (2005).** The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res*, 84: 966-977.
- Douglas LJ, (2003).** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, 11: 30-36.
- Dromer F, and Lortholary O, (2004).** Cryptococcose. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. *Traité de maladies infectieuses*, 8:613-670.
- Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Launay O and Lortholary O, (2007).** Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. *PLoS Med*, 4:e21.
- Dromer F, Gueho E, Ronin O and Dupont B, (1993).** Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J Clin Microbiol*, 31(2): 359–363.
- Duerr A, (2003).** Immunodépression à VIH : facteur de risque de la candidose vulvo-vaginale. *Obstet Gynecol*, 101(3):548-556.
- Dufait R, Velho R and De Vroey C, (1987).** Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen*, 30:483-487.
- Dumitru R, Hornby JM and Nickerson KW, (2004).** Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 2350-2354.

- Dunyach C, Bertout S, Phelipeau C, Drakulovski P, Reynes J, Mallié M, (2008).** Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diag Microbiol Infect Dis*, 60:263-271.
- Eggeling WJ, (1952).** The Indigenous Trees of the Uganda protectorate (Revised and enlarged by Ivan R. Dale). *Government printer, Entebbe Uganda, Crown Agents for the Colonies London*. pp. xiii and 491.
- Eggiman P, Garbino J and Pittet D, (2003).** Epidemiology de *Candida* species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis*, 3: 685-702.
- Eisenman HC, Mues M et al., (2007).** *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiol*, 153(12): 3954-3962.
- Eke p, (2012).** Caractérisation des huiles essentielles de quelques épices camerounaises et leurs fongitoxicité sur *P. megakarya*, pathogène des cabosses du cacaoyer. *Mémoire de master en Biochimie. Université de Yaoundé I*. Pp :37-43.
- Ellepola AN et al., (2000).** Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11(2):172-198.
- Ellepola AN, Hurst SF, Elie CM and Morrison CJ, (2003).** Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol*, 18: 379-388.
- Ellis D, (2002).** Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother*, 49: 7.
- Enache-Angoulvant A, Chandenier J, Symoens F, Lacube P, Bolognini J, Douchet C, Poirot JL and Hennequin C, (2007).** Molecular Identification of *Cryptococcus neoformans* Serotypes. *J Clin Microbiol*, 45(4):1261–1265.
- Epstein JB, Hancock PJ and Nantel S, (2003).** Oral candidiasis in hematopoietic cell transplantation patients: an outcome-based analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 96(2):154-163.
- Escandón P, Sanchez A, Martinez M, Meyer W and Castaneda E, (2006).** Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res*, 6: 625-635.
- Esebelahie NO, Enweani IB, Omoregie R, (2013).** *Candida* colonisation in asymptomatic HIV patients attending a tertiary hospital in Benin City, Nigeria. *Libyan J Med*; 8:20322. doi: 10.3402/ljm.v8i0.20322.
- Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, et al., (2012b).** *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*; 56(11):5898-5906. doi: 10.1128/AAC.01115-12.

- Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, et al., (2012a).** *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B and Flucytosine. *Antimicrob Agents Chemother*; 56(6): 3107–3113. doi: 10.1128/AAC.06252-11.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Holliday N and Killian SB, (2004).** Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol*, 42: 718- 721.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill III FR and Smith TF, (2006).** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 19:165-256.
- Essendoubi M, Toubas D, Lepouse C, Leon A, Bourgeade F, Pinon JM, Manfait M and Sockalingum GD, (2007).** Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. *J Microbiol Methods*, 71(3): 325-31.
- Everett KD and Andersen AA, (1999).** Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int J Syst Bacteriol*, 49(2):803-813.
- Ezenwali MO, Njoku OU et Okoli CO, (2010).** Studies on the anti-diarrheal properties of seed extract of *Monodora tenuifolia*. *Int J App Res Nat Prod*, 2(4):20-26.
- Fallon J, (2005).** Could one of the most widely prescribed antibiotics amoxicillin/clavulanate "augmentin" be a risk factor for autism? *Med Hypotheses*, 64(2):312-315.
- Fankam AG, Kuete V, Voukeng IK, Kuiate JR and Pages J-M, (2011).** Antibacterial activities of selected Cameroonian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. *BMC Compl Altern Med*, 11:104, doi: 10.1186/1472-6882-11-104.
- Fathallah A and Saghruni F, (2008).** Le diagnostic des Mycoses superficielles. *STPI : Tunis*
- Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W and Wu J, (2008).** Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. *FEMS Yeast Res*, 8(6):930-938.
- Ferns RB, (2006).** Evaluation of the role of real-time PCR in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Leuk Lymphoma*, 47:15-20.
- Ferreira N, Belloch C, Querol A, Manzanares P, Vallez S and Santos A, (2010).** Yeast microflora isolated from brazilian cassava roots: taxonomical classification based on molecular identification. *Curr Microbiol*, 60(4): 287-93.
- Fidel PL, (2002).** Distinct protective host defences against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol*, 40: 359-375.

- Focho DA, Egbe EA, Chuyong GB, Fongod AGN, Fonge BA, Ndam W T et Youssoufa BM, (2010).** An ethnobotanical investigation of the *Annonaceae* on Mount Cameroon. *J Med Plants Res*, 4(20):2148-2158.
- Fofana S, (2004).** Exploration Biochimique sur le pouvoir immunogène de trois plantes en Côte d'Ivoire: *Alstonia Boonei* (Apocynaceae), *Mitragyna Ciliata* (Rubiaceae) et *Terminalia Catappa* (Combretaceae). Thèse de doctorat d'état en Pharmacie. Université de Bamako. Pp100-130.
- Forsman A and Weiss RA, (2008).** "Why is HIV a pathogen?" *Trends Microbiol*, 16(12): 555-560.
- Fotadar R and Al Hedaithy SSA, (2003).** *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol*, 41: 1907-1911.
- Fothergill AW, (2006).** Miconazole: a historical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 4:171–175.
- Foulet F, Nicolas N, Eloy O, Botterel F, Gantier JC, Costa JM and Bretagne S, (2005).** Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*, 43(9): 4574-9.
- Fournier P, (2011).** Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida* sp. Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble. Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie, université Joseph Fourier, 93p.
- Fowler Z L, Baron CM et al., (2011).** Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases. *Yeast*, 28(3): 181-188.
- Frases S, Salazar A et al., (2007).** *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. *Appl Environ Microbiol*, 73(2): 615-621.
- Fries BC, Goldman DL et al., (1999).** Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect Immun*, 67(11): 6076-6083.
- Gabler G, Barbosa IAC, Vilela RR, Lyon S and Rosa CA, (2008).** Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with aids hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. *J Appl Oral Sci*, 16(4):247-250.
- Galanis E and Macdougall L, (2010).** Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis*, 16(2): 251-257.
- Ganendren R, Carter E et al., (2006).** Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect*, 8(4): 1006-1015.
- Garcia-Hermoso D, Dromer F, Mathoulin-Pelissier S and Janbon G, (2001).** Are two *Cryptococcus neoformans* strains epidemiologically linked? *J Clin Microbiol*, 39: 1402-1406.
- Garcia-Rivera J, Tucker SC et al., (2005).** Laccase expression in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*, 73(5): 3124-3127.

- Garro AP, Chiapello LS et al., (2011).** Rat eosinophils stimulate the expansion of *Cryptococcus neoformans*-specific CD4(+) and CD8(+) T cells with a T-helper 1 profile. *Immunology*, 132(2): 174-187.
- Ge SH, Wan Z, Li J, Xu J, Li RY and Bai FY, (2010).** Correlation between azole susceptibilities, genotypes, and ERG11 mutations in *Candida albicans* isolates associated with vulvovaginal candidiasis in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 54:3126–3131. doi:10.1128/AAC.00118-10.
- Georgopapadakou NH and Walsh TJ, (1996).** Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(2):279-291.
- Ghannoum MA and Rice LB, (1999).** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 12(4):501- 517.
- Ghannoum MA, (2000).** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 13: 122-143.
- Giles SS, Dagenais TR et al., (2009).** Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77(8): 3491-3500.
- Goldman D, Song X et al., (2001).** *Cryptococcus neoformans* induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta in human microglia: role of specific antibody and soluble capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 69(3): 1808-1815. 118
- Goldman DL, Fries BC et al., (1998).** Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. *Proc Natl Acad Sci*, 95(25): 14967-14972.
- Gomez-Lopez A, Zaragoza O et al., (2008).** Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother*, 9(16): 2801-2816.
- Greub G and Raoult D, (2004).** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*, 17(2): 413-433.
- Gross NT, Arias ML, Moraga M, Baddasarow Y and Jarstrand C, (2007).** Species distribution and susceptibility to azoles of vaginal yeasts isolated prostitutes. *Infect Dis Obstet Gynecol*, doi: 10.1155/2007/82412.
- Guerrero A and Fries BC, (2008).** Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response. *Infect Immun*, 76(9): 4322-4331.
- Guerrero A, Jain N et al., (2006).** Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 152(1): 3-9.
- Guerrero A, Jain N et al., (2010).** *Cryptococcus neoformans* variants generated by phenotypic switching differ in virulence through effects on macrophage activation. *Infect Immun*, 78(3): 1049-1057.

- Guillot L, Carroll SF et al., (2008).** *Cryptococcus neoformans* induces IL-8 secretion and CXCL1 expression by human bronchial epithelial cells. *Respir Res*, 9: 9.
- Haag-Wackernagel D and Moch H, (2004).** Health hazards posed by feral pigeons. *J Infect*, 48(4): 307-313.
- Hage CA, Goldman M and Wheat LJ, (2002).** Mucosal and invasive fungal infections in HIV/AIDS. *Eur J Med Res*, 7: 236-241.
- Harborne JB, (1976).** *Phytochemical Methods. A Guide of modern techniques of plants analysis.* Chapman and Hall. London, 150p.
- Hardison SE, Wozniak KL et al., (2010).** Interleukin-17 is not required for classical macrophage activation in a pulmonary mouse model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*, 78(12): 5341-5351.
- Harrison TS, Nong S et al., (1997).** Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression in monocytic cells by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *J Infect Dis*, 176(2): 485-491.
- Hata K, Horii T, Miyazaki M et al., (2000).** Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19(9): 663-670.
- Hennequin C, Thierry A, Richard GF, Lecointre G, Nguyen HV, Gaillardin C and Dujon B, (2001).** Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Clin Microbiol*, 39(2): 551-9.
- Heyderman RS, Gangaidzo IT, Hakim JG, Mielke J, Taziwa A et al., (2001).** Cryptococcal meningitis in human immunodeficiency virus-infected patients in Harare, Zimbabwe. *Clin Infect Dis* 32 : 1235-1236.
- Hidore MR, Nabavi N et al., (1991).** Murine natural killer cells are fungicidal to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 59(5): 1747-1754.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA and Ezekowitz RA, (1999).** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284: 1313-1318.
- Homa A-B, (2007).** Infections opportunistes chez le patient immunodéprimé. *Bulletin de la Division Française de l'AIP* n°46.
- Hoult JRS and Paya M, (1996).** Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol*, 27:713-722.
- Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM and Scherer S, (2003).** *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet*, 33: 451-459.
- Hull CM and Heitman J, (2002).** Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet*, 36: 557-615.

- Hull CM, Raisner RM and Johnson AD, (2000).** Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science (New York, NY)*, 289:307-310.
- Hung CC, Yang YL et al., (2005).** Colonization of human immunodeficiency virus-infected outpatients in Taiwan with *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 43:1600–1603.
- Hzounda FJB, (2010).** Potentiels antioxydant et antifongique des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) du Cameroun. *Mémoire de master en Biochimie. Université de Yaoundé I*, 78p.
- Ibata-Ombetta S, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D and Jouault T, (2003).** Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci*, 1010: 573-576.
- Idnurm A, Bahn YS et al., (2005).** Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*, 3(10): 753-764.
- Igreja RP, Dos Santos-Lazera M, Wanke B, Gutierrez-Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W, (2004).** Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian City, Rio de Janeiro. *Med Mycol*, 42:229-238.
- Ikeda R and Maeda T, (2004).** Structural studies of the capsular polysaccharide of a non-*neoformans* *Cryptococcus* species identified as *C. laurentii*, which was reclassified as *Cryptococcus flavescens*, from a patient with AIDS. *Carbohydr Res*, 339:503-509.
- Illnait-Zaragozí MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Hagen F, Boekhout T, Klaassen CHW, Meis JF, (2010).** Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. *BMC Infectious Diseases*; 10:289-295.
- Inui T, Wang Y, Deng S, Smith DC, Franzblau SG and Pauli GF, (2007).** Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. *J Chromatogr A*, 1151: 211–215.
- Irvine FR, (1961).** *Woody Plants of Ghana with special reference to their uses*. Oxford University Press, London, Pp:13-23.
- Isibor JO, Eghubare AE and Omoregie RS, (2005).** Germ Tube Formation in *Candida Albicans*: Evaluation of Human and Animal Sera and Incubation Atmosphere. *E-Med J*, 6(1).
- Iten F, Saller R, Abel G and Reichling J, (2009).** Additive antimicrobial effects of the Active components of the essential oil of *Thymus vulgaris*-chemotype carvacrol. *Planta Med*, 75:1–6.
- Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S and Vidotto V, (2007).** Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Mycoses*, 50: 277– 281.
- Jackson A and Hosseinipour MC, (2010).** Management of cryptococcal meningitis in sub-saharan Africa. *Curr HIV/AIDS Rep*, 7(3): 134-142.

- Jacobsen MD, Boekhout T and Odds FC, (2008).** Multilocus sequence typing confirms synonymy but highlights differences between *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. *FEMS Yeast Res*, 1–7 DOI:10.1111/j.15671364.2008.00392.x.
- Jacobson ES, (2000).** Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev*, 13(4): 708-717.
- Jain N and Fries BC, (2008).** Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia*, 166(4): 181-188.
- Jarvis JN, Dromer F et al., (2008).** Managing cryptococcosis in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis*, 21(6): 596-603.
- Jin Q, Olszewski MA and Williamson PR, (2013).** *Cryptococcus neoformans* Growth and Protection from Innate Immunity Are Dependent on Expression of a Virulence-Associated DEAD-Box Protein, Vad1. *Infect Immun*, 81(3): 777–788. doi: 10.1128/IAI.00821-12.
- Johansen FE and Brandtzaeg P, (2004).** Transcriptional regulation of the mucosal IgA system. *Trends Immunol*, 25: 150-157.
- Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR and Scully C, (1995).** Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother*, 35: 103–114.
- Johnson L and Lewis D, (2008).** The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in the genital tract: a symptomatic review and meta-analysis. *Sex transm Dis*, 35(11): 946-959.
- Jones T, Federspiel NA et al., (2004).** The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Nat Ac Sci USA*, 101: 7329-7334.
- Jong AY, Wu CH et al., (2007).** HIV-1 gp41 ectodomain enhances *Cryptococcus neoformans* binding to HBMEC. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(4): 899-905.
- Jongwutiwes U, Sungkanuparph S et al., (2008).** Comparison of clinical features and survival between cryptococcosis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *Jpn J Infect Dis*, 61(2): 111-115.
- Kabir MA and Hussain MA, (2009).** Human fungal pathogen *Candida albicans* in the postgenomic era: an overview. *Exp rev anti-infect ther*, 7: 121-134.
- Kalpanadevi V, Geethalakshmi S and Sumathi G, (2012).** A study on speciation and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates from HIV patients with oropharyngeal candidiasis and correlation with CD4 count. *BMC Infect Dis*, 12(1): P19.
- Kamoun P, Lavoine A and Verneuil H, (2003).** Biochimie Et Biologie Moléculaire. Flammarion Medecine-Science, France, ISBN 10: 2257101219 / ISBN 13: 9782257101211.
- Kantarcioglu AS and Yucel A, (2002).** Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains." *Mycoses*, 45 (5-6): 160-165.

- Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M and Kozik A, (2009).** Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochimica Polonica*, 56 :211-224.
- Kelly RM, Chen J et al., (2005).** Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 73(1): 592-598.
- Kenfack TIF, (2010).** Evaluation des activités antiradicalaire, antifongique et anti-inflammatoire des huiles essentielles des fruits de *Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica* et de *Xylopia parviflora*. *Mémoire de master en Biochimie. Université de Yaoundé I*. 67p.
- Khan AP, Malik A and Subhan Khan H, (2012).** Profile of candidiasis in HIV infected patients IRAN. *J Microbiol* 4 (4): 204-209.
- Kidd SE, Ling LM et al. (2009).** Molecular epidemiology of invasive aspergillosis: lessons learned from an outbreak investigation in an Australian hematology unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30(12): 1223-1226.
- Kindt TJ, Goldsby RA, et al. (2007).** Kuby immunology. New York, W.H. Freeman, 603p
- Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME and Pfaller MA, (1998).** Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Ant Agents Chemother*, 42:1207–1212.
- Kong BN, Harwell JI, Suos P, Lynen L, Mohiuddin S, Reinert S, Pugatch D, (2007).** Opportunistic infections and HIV clinical disease stage among patients presenting for care in Phnom Penh, Cambodia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 38(1):62-68
- Kreger-van Rij NJW, (1984).** The yeasts, a taxonomic study, third ed. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam. Pp: 45-104.
- Kronstad JW, Attarian R et al., (2011).** Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*, 9(3): 193-203.
- Kuete V and Efferth T, (2010).** Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Front Pharmacol*, 1:1-19.
- Kumamoto CA and Vines MD, (2005).** Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellul microbial*, 7: 1546-1554.
- Kuo-Ching W, I-Chen S, Jhe-Cyuan H, Sue-Tsai L, Tsung-Wei S, and Hsiu-Mei C (2011).** Inhibitory Effects of *Terminalia catappa* on UVB-Induced Photodamage in Fibroblast Cell Line. *Evidence-Based Complem Altern Med*, Article ID 904532, 9 pages.
- Kuriyama T et al., (2005).** *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*, 20(6):349-353.

- Kurtzman CP, (2003).** Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera. *FEMS Yeast Res*, 3: 417-432.
- Kwon-Chung KJ and Varma A, (2006).** Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 6(4): 574-587.
- Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, Bahn YS, (2014).** *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 4(7):a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760.
- Kwon-Chung KJ, Hill WB and Bennett JE, (1981).** New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *J Clin Microbiol*, 13:383-387.
- Lachke SA, Joly S, Daniels K and Soll DR, (2002).** Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiol*, 148(9): 2661-2674.
- Lachke SA, Srikantha T, Tsai LK, Daniels K and Soll DR, (2000).** Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infect Immun*, 68(2): 884-895.
- Lahuerta M, Ue F, Hoffman S et al., (2013).** The Problem of Late ART initiation in Sub-Saharan Africa: A Transient Aspect of Scale-up or a Long-term Phenomenon? *J Health Care Poor Underserved*; 24(1): 359–383. doi: 10.1353/hpu.2013.0014.
- Langfelder K, Streibel M et al., (2003).** Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*, 38(2): 143-158.
- Le Thomas A, (1969).** Flore du Gabon, Muséum National d'histoire naturelle. *Laboratoire de Phanérogamie, Paris*, 16: 22-343.
- Leal AL, Faganello J, et al. (2008).** Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil." *Mycopathologia*, 166(2): 71-75.
- Leberer E, Ziegelbauer K, Schmidt A, Marcus D, Dignard D, Ash J, Johnson L and Thomas DY, (1997).** Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p. *Curr Biol*, 7: 539-546.
- Lee KK , MacCallum DM, Jacobsen MD, Walker LA, Odds FC, Gow NAR and Munro CA, (2012).** Elevated Cell Wall Chitin in *Candida albicans* Confers Echinocandin Resistance *In Vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(1): 208–217.
- Lehman LG, Kangam L, Mbenoun ML, Zemo Nguépi E, Essomba N, Tonga C, Bilong Bilong CF, (2013).** Intestinal parasitic and candida infection associated with HIV infection in Cameroon. *J Infect Dev Ctries*, 7(2):137-143. doi: 10.3855/jidc.2757.
- Levitz SM, Nong SH, et al., (1999).** *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun*, 67(2): 885-890.

- Lewis RE, (2011).** Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin Proc*, 86(8): 805-817.
- Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, and Klepser ME, (2002).** Comparison of E-test, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*, 49:345–351.
- Li SS and Mody CH, (2010).** *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc* 7(3): 186-196.
- Li YY, Hu ZY, Lu CH, and Shen YM, (2010).** Four new terpenoids from *Xylaria* sp. 101. *Helvet Chimic Acta*, 93(4):796-802.
- Lin CY, Chen YC, Lo HJ, Chen KW and Li SY, (2007).** Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 45(8): 2452-2459.
- Lin TY, Yeh KM, Lin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY, (2009).** Cryptococcal disease in patients with or without human immunodeficiency virus: clinical presentation and monitoring of serum cryptococcal antigen titers. *J Microbiol Immunol Infect*; 42(3):220-226.
- Lin X, (2009).** *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol*, 9(4): 401-416.
- Lin X, Patel S, Litvintseva AP, Floyd A, Mitchell TG and Heitman J, (2009).** Diploids in the *Cryptococcus neoformans* serotype A population homozygous for the alpha mating type originate via unisexual mating. *PLoS Pathog* 5(1): e1000283.
- Linares MJ, Charriel GF, Sols and Casal M, (2004).** Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *J Clin Microbiol*, 42: 899-902.
- Litvintseva AP, Kestenbaum L et al., (2005).** Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 43(2): 556-564.
- Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, and Mitchell TG, (2006).** Multilocus Sequence Typing Reveals Three Genetic Subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), Including a Unique Population in Botswana *Genetics*; 172(4): 2223–2238. doi: 10.1534/genetics.105.046672
- Liu PY, Yang Y, et al., (2009).** Cryptococcal liver abscess: a case report of successful treatment with amphotericin-B and literature review. *Jpn J Infect Dis*, 62(1): 59-60.
- Liu XP, Fan SR, Bai FY, Li J, Liao QP, (2009).** Antifungal susceptibility and genotypes of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycos*, 52:24–28.
- Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D and Soll DR. (2003).** Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot cell*, 2:49-61.
- Lockhart SR, Joly S, Pujol C, Sobel JD, Pfaller MA and Soll DR, (1997).** Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. *Microbiol*, 143 (12): 3733-46.

- Loftus BJ, Fung E et al., (2005).** The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Sc*, 307: 1321-1324.
- Lohoué JP, Angwafo FF, Kechia FA, Noukeu ND, (2005).** Candiduria in HIV Infected Patients in Yaoundé, Cameroon. *Af J Urol*, 11(1): 61-65.
- Longdoh AN, Assob CN, Nsagha SD, Kanga LF, Ndellejong EC, Kwentí TE, (2013).** Oral and Urinary Colonisation of *Candida* Species in HIV/AIDS Patients in Cameroon. *B Sci Med*, 2(1): 1-8. doi: 10.5923/j.medicine.20130201.01.
- Lortholary O, Improvisi L et al., (2002).** Influence of gender and age on course of infection and cytokine responses in mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection. *Clin Microbiol Infect*, 8(1): 31-37.
- Lortholary O, Petrikos G et al., (2012).** ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. *Clin Microbiol Infect*, 18 (7): 68–77.
- Lortholary O, Poizat G, Zeller V, Neuville S, Boibieux A, Alvarez M, Dellamonica P, Botterel F, Dromer F and Chene G, (2006).** Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *Aids*, 20:2183-2191.
- Lortholary O, Sitbon K et al., (2005).** Evidence for human immunodeficiency virus and *Cryptococcus neoformans* interactions in the pro-inflammatory and anti-inflammatory responses in blood during AIDS-associated cryptococcosis. *Clin Microbiol Infect*, 11(4): 296-300.
- Luma NH, Temfack E et al., (2013).** Cryptococcal meningoencephalitis in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome in Douala Cameroon: a cross sectional study. *North Am J Med Sci*, 5(8):486-491.
- Lupo P, Chang YC et al., (2008).** The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infect Immun*, 76(4): 1581-1589.
- Lyon JP, Moraes KCM, Moreira LM, Aimbire F, Aparecida de Resende M, (2010).** *Candida albicans*: genotyping methods and clade related phenotypic characteristics. *Braz J Microbiol*, 41: 841-849.
- Ma LL, Spurrell JC et al., (2002).** CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *J Immunol*, 169(10): 5787-5795.
- Maenza JR and Merz WG, (1998).** *Candida albicans* and related species. In: S.L. Gorbach, J.G. Bartlett, N.R. Blacklow (eds) 2nd ed, Infectious diseases. Saunders, Philadelphia Pp 2313-2322.
- Magaldi S, Mata S, Hartung C, Verde G, Deibis L, Roldan Y and Marcano C, (2001).** *In vitro* susceptibility of 137 *Candida* sp. Isolates from HIV positive patients to several antifungal drugs. *Mycopathologia*, 149: 63–68.
- Magee BB, and Magee PT, (2000).** Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Sci*, 289: 310-313.

- Magee BB, Koltin Y, Gorman JA, Magee PT, (1988).** Assignment of cloned genes to the seven electrophoretically separated *Candida albicans* chromosomes. *Mol Cell Biol*, 8:4721–4726.
- Mahnss B, Stehr F, Schafer W, Neuber K, (2005).** Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*, 48 : 55-61.
- Manfredi R, Fulgaro C, Sabbatani S, Legnani G, and Fasulo G, (2006).** Emergence of amphotericin B resistant *Cryptococcus laurentii* meningo-encephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. *AIDS Patien Car STDS*, 20:227-32.
- Mannarelli BM and Kurtzman CP, (1998).** Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol*, 36(6): 1634-1641.
- Marjorie C, (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol*, 12: 564-582.
- Marot-Leblond A, Beucher B, David S, Nail-Billaud S, Robert R, (2006).** Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. *J Clin Microbiol*, 44: 138-42.
- Marr KJ, Jones GJ et al., (2006).** Contemplating the murine test tube: lessons from natural killer cells and *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 6(4): 543-557.
- Marr KJ, Jones GJ et al., (2009).** *Cryptococcus neoformans* directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity. *Infect Immun*, 77(6): 2436-2446.
- Martin SW, Douglas LM and Konopka JB, (2005).** Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryotic cell*, 4: 1191-1202.
- Martino R and Subira M, (2002).** Invasive fungal infections in hematology: new trends. *Ann Hematol*, 81: 233-243.
- Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH, (1997).** Point prevalence of oropharyngeal carriage of fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*, 25: 843-846.
- Maslin J, Morand JJ, Menard G, Camparo P, (2002).** Les Cryptococcoses. *Med Trop*, 62:480-484.
- Mbu RE, Mbopi-Keou FX, Tonye RN, Ako SN, Nana PN, Eteki NT, Leke RJI, (2007).** Répartition des pathologies gynécologiques parmi les femmes enceintes infectées par le VIH à Yaoundé, Cameroun. *Sidanet*, 4(1) : 972-975.
- Mbuagbaw JN, Biholong, Njamnshi AK, (2002).** La Cryptococcose Neuroméningée et l'infection au VIH dans le service de médecine du Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé, Cameroun. *Af J Neu Sc*, 25 (2): 98-103.

- McClelland EE, Hobbs LM, Rivera J, Casadevall A, Potts WK, Smith JM, Ory JJ, (2013).** The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. *PLoS One*, 8(5):e63632. doi: 10.1371/journal.pone.0063632.
- McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA, (1997).** Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol*, 37:417-421
- McGinnis M, Rinaldi MG, (1996).** Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, Md: The Williams & Wilkins Co. Pp:176–211.
- Mdodo R, Stephen A et al., (2011).** Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates from AIDS patients in Kenya. *Mycos*, 54: 438–442.
- Mednick AJ, Feldmesser M et al., (2003).** Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. *Eur J Immunol*, 33(6): 1744-1753.
- Merenstein D, Hu H et al., (2013).** Colonization by Candida Species of the Oral and Vaginal Mucosa in HIV-Infected and Noninfected Women. *Aids Res Hum Retrovir*, 29(1). Doi: 10.1089/aid.2012.0269
- Meyer W and Trilles L, (2010).** Genotyping of *C. neoformans/C. gattii* species complex. *Austral Biochemist*, 41 (10): 11-15.
- Meyer W, Castañeda A et al., (2003).** Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*, 9: 189-195.
- Meyer W, Castañeda A, et al., (2003).** Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerg infect dis*, 9(2): 189–195.
- Meyer W, Marszewska K et al., (1999).** Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophor*, 20: 1790-1799.
- Miller MG and Johnson AD, (2002).** White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by matingtype locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110: 293-302.
- Millogo A, Ki-Zerbo GA, Andonaba JB, Lankoandé D, Sawadogo A, Yaméogo I and Sawadogo AB, (2004).** La cryptococcose neuroméningée au cours de l'infection par le VIH au Centre hospitalier de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Bull Soc Pathol Exo*, 97(2): 119-121.
- Min KH, and Kwon-Chung KJ, (1986).** The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 261:471-480.
- Miranda LN, van der Heijden IM et al., (2009).** *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect*, 72(1): 9-16.

- Mirhendi H, Makimura K et al., (2005).** Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. *Jpn J Infect Dis*, 58 : 235-237.
- Mitchell TG and Perfect JR, (1995).** Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*, 8(4): 515-548.
- Molero G, Guillen MV et al., (2005).** The importance of the phagocytes' innate response in resolution of the infection induced by a low virulent *Candida albicans* mutant. *Scand J Immunol*, 62: 224-233.
- Molez JF, (1998).** La cryptococcose cérébro-méningée en Afrique centrale et ses rapports avec le SIDA, *Cah Sant*, 2: 270-272.
- Monod and Borg-von Zepelin M, (2002).** Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol*, 81: 114-128.
- Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, (2002).** Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens. In: Calderone RA. *Candida* and Candidiasis. 4th Edition (ASM Press, Washington, chap. 4, Pp:37-53.
- Morschhauser J, (2010).** Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*, 47(2): 94-106.
- Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, Al Mosaid A, Coleman DC, Ponton J, (2003).** Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 41: 1259-1262.
- Moulari B, (2005).** Propriétés antimicrobiennes in vitro d'extraits de deux plantes africaines Rôle de l'Astilbine potentialisation du pouvoir antibactérien par nano encapsulation. *Thèse Doctorat Univ. Franche-Comté (France)*, 209p.
- Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA and Ghannoum MA, (2005).** Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, 18:163–194.
- Murray PA, Koletar SL, Mallegol I, Wu J, Moskovitz BL, (1997).** Itraconazole oral solution versus clotrimazole troches for the treatment of oropharyngeal candidiasis in immunocompromised patients. *Clin Ther*, 19(3): 471-480.
- Myers KK, Fonzi WA, Sypherd PS, (1992).** Isolation and sequence analysis of the gene for translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*, 20:1705–1710.
- N'Guessan K, Fofie NBY, Zirihi GN, (2011).** Effect of aqueous extract of *Terminalia catappa* leaves on the glycaemia of rabbits. *J Appl Pharmaceut Sc*, 01(08): 59-64.
- Nadagir SD, Chunchanur SK, Halesh LH, Yasmeen K, Chandrasekhar MR, Patil BS, (2008).** Significance of isolation and drug susceptibility testing of non-*Candida albicans* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 39(3):492-495.

- Narani N, Epstein JB, (2001).** Classifications of oral lesions in HIV infection. *J Clin Periodontol*, 28(2) :137-45.
- NCCLS, (2003)** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria, 6th edition. Wayne: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Ncube B, Finnie JF, Van Staden J, (2012).** In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. *J Ethnopharmacol*, 139(1):81-89.
- Ndoye FC, (2001).** Étude chimique et évaluation des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des huiles essentielles d'espèces aromatiques tropicales en provenance de la province EST du Cameroun. *Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier II*. Pp :123-128.
- Nébavi F, Ayala F J, Renaud F, Bertout S, et al., (2006).** Clonal population structure and genetic diversity of *Candida albicans* in AIDS patients from Abidjan (Côte d'Ivoire). *Proc Natl Acad Sci USA*; 103(10): 3663–3668.
- Nedjma A, Marc B, Jérôme L, (2005).** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique Elsevier Masson, 705p.
- Neilson M, (1965).** Introduction to flowering plants of West Africa. *University of London Press Ltd, London*. Pp. 90-105.
- Nelesh G, (2007).** HIV-associated opportunistic fungal infections: a guide to using the clinical microbiology laboratory. *The S Af J HIV med*, 1:18-23.
- Nema R, jain P, Khare S, Pradhan A, Gupta A, Singh D, (2012).** Antibacterial and antifungal activity of *Terminalia Arjuna* leaves extract with special reference to Flavonoids. *B Res J Med Clin Sc*, 1(5):63-65.
- Neppelenbroek KH, Campanha NH, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Seo RS, Pavarina AC, (2006).** Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Oral Dis*, 12 : 242-53.
- Ngouana KT, (2008).** Etude de l'activité antifongique de l'écorce de *Croton zambesicus* sur quelques champignons responsables des mycoses humaines. *Mémoire du Diplôme d'Etude Approfondie en Biochimie. Université de Yaoundé I*. 65p.
- Ngouana V, Ngouana KT, Tsouh PV, Donkeng VF, Fekam BF, Amvam-Zollo PH, (2011).** Antifungal Activity and Acute Toxicity of the Methanolic Crude Extract and Fractions of *Croton zambesicus* Muell. Arg. (*Euphorbiaceae*). *Int J Biomed Pharmaceut Sc*, 5(1) :64-67.
- Nguemnang MLC, (2012).** Composition chimique et potentiel antifongique de quelques huiles essentielles sur les champignons associés à la pourriture post-récolte de *Dioscorea rotundata*. *Mémoire de master en Biochimie. Université de Yaoundé I*. 63p.

- Nichols CB, Perfect ZH, et al., (2007).** A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 63(4): 1118-1130.
- Nielsen K, Cox GM, et al., (2005).** *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect Immun*, 73(8): 4922-4933.
- Nielsen K, De Obaldia AL et al., (2007).** *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot Cell*, 6(6): 949-959.
- Nigam C, Gahlot R, et al., (2012).** Central Nervous System Cryptococcosis among a Cohort of HIV Infected Patients from a University Hospital of North India. *Clin Diagn Res*, 6(8): 1385–1387.
- Nishikawa H, Yamada E, et al., (2010).** Uptake of T-2307, a novel arylamidine, in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*, 5(8):1681-1687.
- Njamnshi AK, Nguefack S et al., (1999).** Les méningites dans le Service de la Réanimation Médicale à l'Hôpital Centrale de Yaoundé. *Cmr J Med*, Abstract.
- Njoku OU, Ibe CU, et al, (2005).** Investigation on *Monodora tenuifolia* seed oil (*Annonaceae*). *Bio-Res* 3 (2): 56-58.
- Njoku UO, (2007).** Antioxidant Activity of Seed Extract and Fractions of *Monodora tenuifolia* (*Annonaceae*), doctorates thesis university of Nigeria.
- Nnadi N, Orazio E, et al. (2012a).** Genotyping and fluconazole susceptibility of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis in Jos, Nigeria. *Asian Pacif JTropic Dis*, 2(1): 48-50.
- Nnadi NE, Ayanbimpe MG, et al., (2012b).** Isolation and molecular characterization of *Candida africana* from Jos, Nigeria. *Med Myc*, DOI: 10.3109/13693786.2012.662598.
- Noble SM and ohnson A, (2007).** Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet*, 41 :193-211.
- Nosanchuk JD, Rosas AL et al. (2000).** Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet*, 355(9220): 2049-2050.
- Nwodo UU, Ngene AA and Iroegbu CU, (2010).** Effects of Fractionation on Antibacterial Activity of Crude Extracts of *Tamarindus indica*. *Af J Biotech*, 9:7108-7113.
- Nwosu C, Nwosu N, Mba I, Opara C, Nwajuaku R, (2001).** Genital ulcer and sexual transmitted diseases in rural Nigeria. *J med Invest Pract*, 2 : 28-33.
- Odds FC, Bougnoux ME et al., (2007).** Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 6(6): 1041-1052.

- Odds FC, Brown AJ and Gow NA, (2004).** *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome biology*, 5: 230.
- Odds FC, Rinaldi MG et al., (1997).** *Candida and Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol*, 35(1):313-316.
- Odebeyi OO and Sofowara EA, (1978).** Phytochemical screening : Nigeria medical plants. *L. coydia*, 41: 234-325.
- O'Grady NP, Alexander M et al., (2002).** Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*, 9 (51)(RR-10):1-29.
- Oguntimein B, Ekundayo O, Laakso I, And Hiltunen R, (1989).** Constituents of the essential oil of *Monodora tenuifolia* (Benth) W. Ash root. *Flav Fragr J*, 4: 193-195.
- Oliveira P, Mascarenhas R et al., (2011).** *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV infected women in Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis*, 15 (3) :2 239-44.
- Olszewski MA, Noverr MC et al., (2004).** Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol*, 164(5): 1761-1771.
- O'Meara TR, Holmer SM, and Alspaugh JA, (2013).** *Cryptococcus neoformans* Is Associated with Cell Wall Remodelling and Evasion of the Host Immune Responses. *mBio*, 4(1): e00522-12.
- OMS, 2000.** Revue des affections tropicales. Genève-Suisse.
- OMS, 2006.** Traitement antirétroviral de l'infection à VIH chez l'adulte et l'adolescent en situation de ressources limitées : vers un accès universel Genève- Suisse.
- ONUSIDA, (2012).** Diapositives clés sur les données épidémiologiques. www.unaids.org.
- ONUSIDA, (2013).** Rapport mondial : Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de sida 2013 ; ISBN 978-92-92503-033-4.
- Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M and Heitman J, (2003).** Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Become Fungicidal when Combined with Calcineurin Inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(3) :956–964.
- Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J and the WHO-UNAIDS, (2002).** Network for HIV Isolation and Characterization. *Estimated Global Distribution and Regional Spread of HIV-1 Genetic subtypes in the year 2000*, 1^{er} journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.
- Osterholzer JJ, Surana R et al., (2009).** Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am J Pathol*, 174(3): 932-943.

- Oumar AA, Dao S et al., (2008).** Prévalence des infections opportunistes au cours du Sida en milieu hospitalier de Bamako, Mali. *Bull Soc Pathol Exot*, 127 (1): 12-17.
- Owotade FJ, Patel M, (2014).** Virulence of oral Candida isolated from HIV-positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*; 118(4):455-460.
- Paliwal DK, and Randhawa HS, (1978a).** Evaluation of a simplified Guizotia abyssinica seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 7:346-348.
- Paliwal DK, and Randhawa HS, (1978b).** A rapid pigmentation test for identification of *Cryptococcus neoformans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 44:243-246.
- Pappas PG, (2010).** Cryptococcosis in the developing world: an elephant in the parlor. *Clin Infect Dis*, 50(3):345-346. doi: 10.1086/649862.
- Park BJ, Wannemuehler KA et al., (2009).** Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4): 525-530.
- Patted SV, Halkati PC, Yavagal ST and Patil R, (2009).** *Candida krusei* infection presenting as a right ventricular mass in a two month old Infant. *Ann Pediatr Cardiol*, 2(2): 170–172.
- Patton LL, (2008).** Oropharyngeal Candidiasis in HIV-infected Patients: a Forgotten Problem?. *J Invasive Fungal Infect*, 2(3):82-88.
- Paugam A, Dupouy-Camet J et al., (1994).** Increased fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. *Clin Infect Dis*, 19:975–976.
- Perfect JR, (2006).** *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res*, 6:463-468.
- Perlroth J, Choi B and Spellberg B, (2007).** Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*, 45: 321-346.
- Petkovic L, Arsenijevic VA et al., (2010).** Anticryptococcal cytotoxicity of murine nonadherent cells is perforin and nonperforin mediated. *Mycologia*, 102(3): 552-559.
- Pfaller MA and Diekema DJ, (2012).** Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution. *J Clin Microbiol*; 5(9): 2846 – 2856
- Pfaller MA and Diekema DJ, (2010b).** Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*, 36(1): 1-53.
- Pfaller MA et al., (2004).** Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnos Microbiol Infect Dis*, 50 :113-117.

- Pfaller MA, Diekema DJ et al., (2008).** Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, to 2005. *J Clin Microbiol*, 46(3): 842–849.
- Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D, Testing TCSfA, (2010a).** Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat*, 13: 180–195.
- Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN, (2011).** Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 71(3):252-259.
- Pfaller MA, Diekema DJ et al., (2008).** Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance of *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol*, 46(2): 515–521.
- Pfaller MA, Espinel-Ingroff A and Jones RN, (2004).** Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *J Clin Microbiol*, 42: 4577-4580.
- Pfaller MA, Messer SA and Bolmström A, (1998).** Evaluation of Etest for determining *in vitro* susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diag Microbiol Infect Dis*, 32:223-227.
- Pfaller MA, Messer SA et al., (2001).** Evaluation of Etest Method for Determining Posaconazole MICs for 314 Clinical Isolates of *Candida* Species. *J Clin Microbiol*, 39(11): 3952-3954.
- Pfaller MA, Messer SA et al., (2005).** Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol*, 43: 2163–2167.
- Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN and Castanheira M, (2011).** *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(2):561-566.
- Phillips P, Chapman K et al., (2009).** Dexamethasone in *Cryptococcus gattii* central nervous system infection. *Clin Infect Dis*, 49(4): 591-595.
- Pietrella D, Fries B et al., (2003).** Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* can influence the outcome of the human immune response. *Cell Microbiol*, 5(8): 513-522.
- Pietrella D, Kozel TR et al., (2001).** Interleukin-12 counterbalances the deleterious effect of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 on the immune response to *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis*, 183:18351-18358.

- Pincus DH, Coleman DC et al., (1999).** Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol*, 37: 3533-3539.
- Pinjon E, Moran GP, Coleman DC and Sullivan DJ, (2005).** Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochem Soc Trans*, 33(5): 1210-1214.
- Pirotta MV and Garland SM, (2006).** Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J Clin Microbiol*, 44(9): 3213-3220.
- Prasad KN, Agarwal J et al., (2003).** Cryptococcal infection in patients with clinically diagnosed meningitis in a tertiary care center. *Neurol Ind*, 51: 364-366.
- Pukkila-Worley R and Mylonakis E, (2008).** Epidemiology and management of cryptococcal meningitis: developments and challenges. *Expert Opin Pharmacother*, 9(4): 551-560.
- Pyrgos V, Seitz AE, Steiner CA, Prevots DR, Williamson PR, (2013).** Epidemiology of Cryptococcal Meningitis in the US: 1997–2009. *PLoS One*; 8(2): e56269.doi:10.1371/journal.pone.0056269
- Radford DR, Challacombe SJ and Walter JD, (1994).** A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. *J. medic microbial*, 40: 416-423.
- Raquel FE, (2007).** Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds. *Biochim Biophys Acta*, 1768(10):2500-2509
- Reiss E, Kaufman L, Kovacs J and Lindsley M, (2002).** Clinical Immunomycology. In N. Rose, R. Hamilton, and B. Detrick (eds.), *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. ASM Press, Washington DC. Pp559 -583.
- Rex JH, Rinaldi MG and Pfaller MA, (1995).** Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 1-8.
- Reynolds TB, (2009).** Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. *Microbiol*, 155(5): 1386-1396.
- Ribeiro MA and Ngamskulrungronj P, (2008).** Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 50(6):315-320.
- Ribeiro MA, Dietze R et al., (2001).** Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Mycopathologia*, 151(1): 5-10.
- Richard G, Kerrest A and Dujon B, (2008).** Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(4): 686-727.
- Rispail P, (2008).** Bases et principes du diagnostic biologique des mycoses. Cours de mycologie PCEM1, Paris 5.

- Ritter M and Goldman DL, (2009).** Pharmacotherapy of cryptococcosis. *Expert Opin Pharmacother*, 10(15): 2433-2443.
- Rodrigues AR, Heise N et al., (2005).** B cell response during infection with the MAT a and MAT alpha mating types of *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect*, 7(1): 118-125.
- Rodrigues ML, Nakayasu ES et al., (2008).** Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell*, 7(1): 58-67.
- Roman E, Arana DM, Nombela C, Alonso-Monge R and Pla J, (2007).** MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends in microbiology*, 15: 181-190.
- Romeo O and Criseo G, (2008).** First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 62: 230–33.
- Romeo O and Criseo G, (2009).** Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. *J Clin Microbiol*, 47: 212–214.
- Romeo O and Criseo G, (2009).** Morphological, biochemical and molecular characterisation of the first Italian *Candida africana* isolate. *Mycoses*, 52: 454–457.
- Romeo O and Criseo G, (2010).** *Candida africana* and its closest relatives. *Mycoses*, 54:475–486. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01939.
- Romeo O, De Leo F, Criseo G, (2011).** Adherence ability of *Candida africana*: a comparative study with *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*, 54(4):57-61. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01833.x.
- Rosario I, Hermoso M, de Mendoza et al., (2005).** Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses*, 48(6): 421-424.
- Rosas AL and Casadevall A, (2001).** Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. *Mycopathologia*, 151(2): 53-56.
- Rosas AL, MacGill RS et al., (2002).** Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(1): 144-148.
- Rotstein D, Parodo J, Taneja R and Marshall JC, (2000).** Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock*, 14: 278-283.
- Ruhnke M and Maschmeyer G, (2002).** Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer review of the literature. *Eur J med res*, 7: 227-235.
- Ruiz A, Poblet M, Mas A, Guillamón JM, (2000).** Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50(6):1981-1987.

- Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R, (2006).** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*, 6(1):14-29.
- Rustchenko E, (2007).** Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS yeast research*, 7:2-11.
- Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F and Hicks JB, (1990).** Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J bacterial*, 172: 1276-1283.
- Sahand IH, Moragues MD, Robert R, Quindos G, Ponton J (2006).** Evaluation of Bichro-Dubli Fumouze(R) to distinguish *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 55: 165-172.
- Samaranayake YH, Samaranayake LP, (1994).** *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol*, 41(5):295-310.
- Samaranayake YH, Ye J, Yau JY, Cheung BP, Samaranayake LP, (2005).** *In vitro* method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. *J Clin Microbiol*, 43(2):818-825.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T, (1989).** *In vitro* Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 14.
- Sampaio P, Santos M, Correia A, Amaral FE, Chave'z-Galarza J, et al., (2010).** Virulence Attenuation of *Candida albicans* Genetic Variants Isolated from a Patient with a Recurrent Bloodstream Infection. *PLoS ONE*, 5(4): e10155. doi:10.1371/journal.pone.0010155.
- Sanglard and Odds FC, (2002).** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Infect Des*, (2): 73-85.
- Santangelo RT, Nouri-Sorkhabi MH, et al., (1999).** Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *J Med Microbiol*, 48(8): 731-740.
- Satabié B, (1983).** Flore du Cameroun. *Délégation générale à la recherche scientifique et technique (DGRST)*. Pp 3-79
- Sati SC et Joshi S, (2011).** Aspects of antifungal potential of ethnobotanical known medicinal plants. *Res j Med plants* 5 (4): 377-391
- Sawyer PR, Brogden RN, Pinder RM, Speight TM, (1975).** Avery GS. Miconazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs*, 9(6):406-423.
- Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, and Birgit Willinger B, (2007).** Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens *J Clin Microbiol*, 45(3): 906–914.

- Schaller M, Borelli C, Korting, HC and Hube B, (2005).** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48: 365-377.
- Segal E, (2005).** *Candida*, still number one--what do we know and where are we going from there? *Mycoses*, 48(1):3-11.
- Seider K, Heyken A, et al., (2010).** Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol*, 13(4): 392-400.
- Selguetia YBYE, (2012).** Composition chimique et propriétés antilevuriques de trois huiles essentielles extraites des plantes aromatiques camerounaises du genre *Ocimum* (Lamiaceae). *Mémoire de master en Biochimie. Université de Yaoundé I.* 65p.
- Severo CB, Gazzoni AF et al., (2009a).** Chapter 3--pulmonary cryptococcosis. *J Bras Pneumol*, 35(11): 1136-1144.
- Severo CB, Xavier MO et al., (2009b).** Cryptococcosis in children. *Paediatr Respir Rev*, 10(4): 166-171.
- Sharma C, Muralidhar S, Xu J, Meis JF and Chowdhary A, (2014).** Multilocus sequence typing of *Candida africana* from patients with vulvovaginal candidiasis in New Delhi, India *Mycoses*, 57(9):544-552. doi: 10.1111/myc.12193.
- Shaw CE, and Kapica L, (1972).** Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Appl Microbiol*, 24:824-830.
- Shi M, Li SS et al., (2010).** Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest*, 120(5): 1683-1693.
- Shimada T, (2006).** Salivary proteins as a defence against dietary tannins. *J Chem Ecol*, 32 (6):1149-1163.
- Shirley R M and Baddley JW, (2009).** Cryptococcal lung disease. *Curr Opin Pulm Med*; 15(3): 254-260.
- Shirotori S, Murai N, Inoue S, Matsukura M, Abe S, Yoshimatsu K, Asada M, (2011).** Efficacy of oral E1210, a new broad-spectrum antifungal with a novel mechanism of action, in murine models of candidiasis, aspergillosis, and fusariosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(10):4543-4551.
- Shivaswamy U, Neelambike SM, (2014).** A study of candidiasis in HIV reactive patients in a tertiary care hospital, Mysore - South India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*; 80:278
- Silva-Rocha WP, Lemos VLB, Svidizinski TIE, Milan EP and Chaves GM, (2014).** *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. *BMC Oral Health*, 14:20. doi:10.1186/1472-6831-14-20
- Sionov E, Lee H et al., (2010).** *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS Pathog*, 6(4): e1000848.

- Sivasangeetha K, Harish BN, Sujatha S, Parija SC, Dutta TK, (2007).** Cryptococcal meningoencephalitis diagnosed by blood culture. *Ind J Med Microbiol*, 25:282-284.
- Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M and Soll DR, (1987).** White-opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J bacterial*, 169:189-197.
- Smith PB, Steinbach WJ, Benjamin DK, (2005).** Neonatal candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 19:603.
- Sobel J, (2007).** Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, 369(9) : 1961-1971.
- Sobel JD, Fisher JF, Kauffman CA, and Newman CA, (2011).** *Candida* Urinary Tract Infections—Epidemiology. *Clin Infect Dis*; 52(S6):S433–S436
- Sofowara A, (1993).** Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. 2nd ed. *Spectrum Books Limited, Ibadan, Nigeria*, Pp:97-145.
- Sonneborn A, Bockmühl DP and Ernst JF, (1999).** Chlamydospore Formation in *Candida albicans* Requires the Efg1p Morphogenetic Regulator. *Infect Immun*, 67(10): 5514–5517.
- Sorrell TC and Ellis DH, (1997).** Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol*, 14(2): 42-43.
- Sorrell TC, (2001).** *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*, 39(2): 155-168.
- Soumaré M, Seydi M, Ndour CT, Dieng Y, Diouf AM, Diop BM, (2005).** Aspects actuels de la cryptococcose neuro-meningée à Dakar, *Med Trop*, 65 : 559-562.
- Staib F, (1963).** Membrane Filtration and *Guizotia Abyssinica* Culture Media for the Demonstration of *Cryptococcus Neoformans* (Brown Color Effect). *Z Hyg Infektionskr*, 149:329-336.
- Staib P and Morschhauser J, (2007).** Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50: 1-12.
- Stano P, Williams V et al., (2009).** App1: an antiphagocytic protein that binds to complement receptors 3 and 2. *J Immunol*, 182(1): 84-91.
- Sudbery P, Gow N and Berman J, (2004).** The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends microbial*, 12:317-324.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC, (1995).** *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol*, 141: 1507–1521.
- Sullivan D and Coleman D, (1998).** *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol*, 36 : 329-334.
- Sylvie C, (2003),** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel. Mc Gill, Canada*.

- Symms J, (2007).** How to diagnose and relieve *Candida albicans*; intestinal yeast. <http://ezinearticles.Com>.
- Taffou, (2008).** Evaluation de l'activité antifongique des extraits de deux plantes camerounaises de la famille des *Verbenacées*: *Vitex grandifolia* et *Vitex rivularis*. *Mémoire Diplôme d'Etude Approfondie en Biochimie. Université de Yaoundé I*, 66p.
- Talalaji SJ, (1965).** Essential oil from *Monodora myristica* grown in Ghana. *West Afr Pharm*, 4: 64-65.
- Thiombiano A, Schmidt M, Kreft H et Guinko S, (2006).** Influence du gradient climatique sur la distribution des espèces de *Combretaceae* au Burkina Faso. *J inter bot syst*. 61(1):189-213.
- Thompson GR, Patel PK et al., (2010).** Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 109(4):488-495.
- Thompson III G R, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL and Patterson TF, (2008).** Antifungal Susceptibilities among Different Serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(1):309. DOI: 10.1128/AAC.01216-08.
- Tintelnot K, Haase G, Seibold M et al., (2000).** Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*, 38 : 1599-1608.
- Toghueo KRM, (2012).** Potentialisation de l'activité antifongique des extraits de trois plantes et de deux médicaments commercialisés. *Mémoire de master en Biochimie. Université de Yaoundé I*. 78p.
- Tortorano AM et al., (2004).** Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23:317-322.
- Trease GE and Evans WC, (1989).** *Pharmacognosy*. 13th edn. Bailliere Tindall, London, pp. 683-684.
- Trilles L, Lazéra MS et al., (2008).** Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000500008>
- Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J and Lazéra M, (2012).** Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol*, 50(3): 328-332.
- Tsai H and Bobek LA, (1998).** Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9(4): 480-497.
- Tumbarello M, Tacconelli E et al., (1997).** Fluconazole resistant oral candidiasis in HIV infected patient. *Oral Dis*, 3 (1): S110–S112.

- Vallim MA, Nichols CB et al., (2005).** A Rac homolog functions downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 4(6): 1066-1078.
- van Asbeck EC, Clemons KV, Markham AN and Stevens DA, (2009).** Correlation of restriction fragment length polymorphism genotyping with internal transcribed spacer sequence, randomly amplified polymorphic DNA and multilocus sequence groupings for *Candida parapsilosis*. *Mycoses*, 52(6): 493-498.
- van Belkum A, Tassios PT et al., (2007).** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 13(3): 1-46.
- van Marle-Köster E and L.H. Nel (2003).** Genetic markers and their application in livestock breeding in South Africa: A review. *S Afr J Anim Sces*; 33(1):1-10.
- van Vuuren S and Viljoen A, (2011).** Plant-Based Antimicrobial Studies Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. *Planta Med*, 77:1168–1182.
- Vargas K, Srikantha R, Holke A, Sifri T, Morris R and Joly S, (2004).** *Candida albicans* switch phenotypes display differential levels of fitness. *Med Sci Monit*, 10:198-206.
- Vazquez JA, (2007).** Role of posaconazole in the management of oropharyngeal and esophageal candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*, 3(4):533-542.
- Vazquez JA, (2010).** Optimal management of oropharyngeal and oesophageal candidiasis in patients living with HIV infection HIV/AIDS. *Res Pal Care*, 2: 89–101
- Vazquez JA, Beckley A, Donabedian S, Sobel JD and Zervos MJ, (1993).** Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Torulopsis glabrata* and *Candida* species other than *C. albicans*. *J Clin Microbiol*, 31(8): 2021-2030.
- Vazquez JA, Dembry LM, Sanchez V, Vazquez MA, Sobel JD, Dmuchowski C and Zervos MJ, (1998).** Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. *J Clin Microbiol*, 36(2): 421-426.
- Vecchiarelli A, Pietrella D et al., (2003).** The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *J Leukoc Biol*, 74(3): 370-378.
- Velagapudi RY, Hsueh P et al., (2009).** Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77(10): 4345-4355.
- Velez JD, Allendoerfer R, Luther M, Rinaldi MG, Graybill JR, (1993).** Correlation of *in vitro* azole susceptibility with *in vivo* response in a murine model of cryptococcal meningitis. *J Infect Dis*, 168: 508–510.
- Venkateswarlu K, Taylor M, Manning NJ, Rinaldi MG, Kelly SL, (1997).** Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41:748–751.

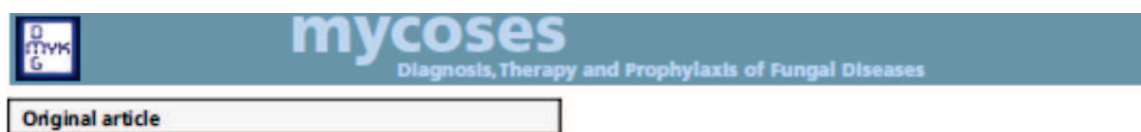
- Viard JP, Hennequin C, Fortineau N, Pertuiset N, Rothschild C, Zylberberg H, (1995).** Fulminant cryptococcal infections in HIV-infected patients on oral fluconazole. *Lancet*, 346:118.
- Viudes A, Pemán J, Cantón E, Salavert M, Ubeda P, López-Ribot JL and Gobernado M, (2002).** Two cases of fungemia due to *Candida lusitanae* and a literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 21: 294.
- Walker SS, Xu Y et al., (2011).** Discovery of a novel class of orally active antifungal beta-1,3-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(11):5099-5106.
- Warrilow AG, Martel CM et al., (2010).** Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14-alpha demethylase (CaCYP51). *Antimicrob Agents Chemother*, 54(10):4235-4245.
- Watanabe N, Kamei S et al., (1986).** Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem*, 32 : 1551-1554.
- White TC et al., (1995).** Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 11(2):382-402.
- Whiteway M and Bachewich C, (2007).** Morphogenesis in *Candida albicans*. *Ann Rev Microbiol*, 61:529-553.
- Williamson EM, (2001).** Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8: 401–409.
- Wozniak KL and Levitz SM, (2008).** *Cryptococcus neoformans* enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. *Infect Immun*, 76(10): 4764-4771.
- Yang XQ, Zhang Q et al., (2012).** Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol*, 57:1048-1053.
- Yang Y-L, Hung C-C et al., (2010).** Oropharyngeal Colonization of HIV-Infected Outpatients in Taiwan by Yeast Pathogens. *J Clin Microbiol*, 48(7): 2609–2612.
- Yang YL, Lo HJ, Hung CC and Li Y, (2006).** Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. *BMC Infect Dis*, 6:8.
- Yapi GY, Adou KMK, Ackah JAAB et Djaman AJ, (2011).** Evaluation de l'activité antifongique et essai de purification des principes actifs des extraits de *Terminalia mantaly* (H. Perrier), une *Combrétacée*, sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Bull Soc Roy Sci Liège*, 80 : 953-964.
- Yassibanda S, Kamalo CG et al., (2002).** Les infections neuro-méningées de l'adulte en milieu hospitalier à Bangui : aspects étiologiques, cliniques et évolutifs. *Med Afr Noir*, 49 : 299-303.
- Yazdanpanah A, Khaithir TM, (2014).** Issues in identifying germ tube positive yeasts by conventional methods. *J Clin Lab Anal*, 28(1):1-9. doi: 10.1002/jcla.21635.

- Yongabi KA, Mbacham WF, Nubia KK, and singh RM, (2009).** Yeast strains isolated from hiv-seropositive patients in Cameroon and their sensibility to extract of eight medicinal plants. *Af J Microbial Res*, 3(4): 133-136.
- Zablotowicz RM, Hoagland RE and Wagner SC, (1996).** Effect of saponins on the growth and activity of rhizosphere bacteria. *Adv Exp Med Biol*, 405:83-95.
- Zeuko'o ME, Hounda FJ-B et al., (2012).** Antifungal and Antioxidant Activities of *Piptostigma calophyllum*, *Uvariadendron calophyllum* and *Uvariadendron molundense* growing in Cameroon. *JBAPN*, 2(2): 110 – 118.
- Zirihi GN, N'guessan K, Kassy NJ, Coulibaly K and Djaman AJ, (2012).** Evaluation and comparison of antifungal activities of *Terminalia catappa* and *Terminalia mantaly* (Combretaceae) on the *in vitro* growth of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Plants Res*, 6(12): 2299- 2308.
- Zore GB, Hakre AD, Jadhav S, and Karuppayil SM, (2011).** Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*, 18(13):1181–1190.

Annexes

Annexe 1: Résumés des publications

Ngouana Kammalac Thierry, Krasteva Donika, Drakulovski Pascal, Toghueo Kuipou Rufin, Kouanfack Charles, Ambe Akaba, Reynes Jacques, Delaporte Eric, Boyom Fekam Fabrice, Mallié Michèle, Bertout Sébastien, (2014). Investigation of minor species *Candida africana*, *Candida stellatoidea*, and *Candida dubliniensis* in the *Candida albicans* complex among Yaoundé (Cameroon) HIV-infected patients. *Mycoses*, doi: 10.1111/myc.12266.



Investigation of minor species *Candida africana*, *Candida stellatoidea* and *Candida dubliniensis* in the *Candida albicans* complex among Yaoundé (Cameroon) HIV-infected patients

Thierry K. Ngouana,^{1,2,3} Donika Krasteva,² Pascal Drakulovski,² Rufin K. Toghueo,³ Charles Kouanfack,¹ Akaba Ambe,¹ Jacques Reynes,⁴ Eric Delaporte,² Fabrice F. Boyom,³ Michèle Mallié² and Sébastien Bertout²

¹Clinical Biology Laboratory, Yaoundé Central Hospital, Yaoundé, Cameroon, ²Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale UFR Pharmacie, UMI 233 UMI-IRD-UCAD-UYT «TransVIHMI», Université de Montpellier 1, Montpellier, France, ³Antimicrobial Agents Unit (AMAU), Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon and ⁴Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Gui de Chauliac, UMI 233 UMI-IRD-UCAD-UYT, Montpellier, France

Summary

Minor species of the *Candida albicans* complex may cause overestimation of the epidemiology of *C. albicans*, and misidentifications could mask their implication in human pathology. Authors determined the occurrence of minor species of the *C. albicans* complex (*C. africana*, *C. dubliniensis* and *C. stellatoidea*) among Yaoundé HIV-infected patients, Cameroon. Stool, vaginal discharge, urine and oropharyngeal samples were analysed by mycological diagnosis. Isolates were identified by conventional methods and mass spectrometry (MS; carried out by the matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight MS protocol). *Candida albicans* isolates were thereafter submitted to the PCR amplification of the *Hwp1* gene. The susceptibility of isolates to antifungal drugs was tested using the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3 protocol. From 115 *C. albicans* obtained isolates, neither *C. dubliniensis* nor *C. stellatoidea* was observed; two strains of *C. africana* (422PV and 448PV) were identified by PCR electrophoretic profiles at 700 bp. These two *C. africana* strains were vaginal isolates. The isolate 448PV was resistant to ketoconazole at the minimal inhibitory concentration of 2 µg ml⁻¹, and showed reduced susceptibility to amphotericin B at 1 µg ml⁻¹. This first report on *C. africana* occurrence in Cameroon brings clues for the understanding of the global epidemiology of this yeast as well as that of minor species of the *C. albicans* complex.

Key words: *Candida africana*, Cameroon, HIV infection, antifungal, *Hwp1* gene, matrix-assisted laser desorption-ionisation time of flight.

Bertout S., Drakulovski P., C. Kouanfack, Krasteva D., Ngouana T., Dunyach-Remy, Dongtsa J., Aghokeng A., Delaporte E., Koulla-Shiro S., Reynes J., and Mallie M., (2012). Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients. *Clin Microbiol Infect*, 19(8):763-769, DOI: 10.1111/1469-0691.12019.

ORIGINAL ARTICLE

10.1111/1469-0691.12019

Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients

S. Bertout¹, P. Drakulovski¹, C. Kouanfack², D. Krasteva¹, T. Ngouana², C. Dunyach-Rémy¹, J. Dongtsa², A. Aghokeng³, E. Delaporte⁴, S. Koulla-Shiro², J. Reynes⁴ and M. Mallié¹

1) Laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale UFR Pharmacie, UMI 233 UM I-IRD-UCAD-UYI, Montpellier, France, 2) Hôpital Central, UMI 233 UM I-IRD-UCAD-UYI, Yaoundé, Cameroun, 3) IMPM/IRD, UMI 233 UM I-IRD-UCAD-UYI, Yaoundé, Cameroun and 4) Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Gui de Chauliac, UMI 233 UM I-IRD-UCAD-UYI, Montpellier, France

Abstract

Cryptococcus neoformans is the most common cause of meningitis amongst adult Africans with HIV/AIDS. The widespread use of fluconazole may lead to the emergence of isolates with reduced susceptibility. We studied *C. neoformans* isolates from HIV-infected patients with cryptococcal meningitis. Genotyping and antifungal testing were performed to assess the genetic diversity, occurrence of mixed infections and *in vitro* activity of antifungal agents. Isolates were recovered from cerebrospinal fluid prior to systemic antifungal treatment. Six isolates were studied for each sample (a total of 114 isolates from 19 patients). Serotyping was performed via LAC 1 and CAP 64 gene amplification and genotyping was performed using phage M13 core, (GACA)₄ and (GTG)₃ primers and restriction polymorphism analysis of the URA5 gene. Susceptibilities for amphotericin B, flucytosine, fluconazole, voriconazole and posaconazole were tested by the Sensititre YeastOne® method. All strains were identified as *C. neoformans* var. *grubii* serotype A. We identified nine major genotypes. Up to two genotypes were identified in the same sample. None of the isolates were resistant to the studied drugs. However, 13 of 114 strains exhibited a reduced susceptibility to fluconazole and 13 of 114 strains exhibited a reduced susceptibility to flucytosine. No correlation was found between the genotype and susceptibility. This study confirms the prevalence of *C. neoformans* serotype A in Cameroon. Two genotypes may be responsible for a single episode of cryptococcosis. The possibility of mixed infection and diminished susceptibility to fluconazole or flucytosine must be considered for the management of cryptococcosis.

Keywords: AIDS, antifungal, cryptococcosis, genetic diversity, genotyping

Original Submission: 4 May 2012; **Revised Submission:** 31 July 2012; **Accepted:** 31 July 2012

Editor: E. Bottieau

Clin Microbiol Infect

Journal de Mycologie Médicale : manuscrit N° MYCMED-D-14-00052R1, accepté.

Cryptococcal meningitis in Yaoundé (Cameroon) HIV infected patients: Diagnosis, frequency and *Cryptococcus neoformans* isolates susceptibility study to fluconazole.



ORIGINAL ARTICLE/ARTICLE ORIGINAL

Cryptococcal meningitis in Yaoundé (Cameroon) HIV infected patients: Diagnosis, frequency and *Cryptococcus neoformans* isolates susceptibility study to fluconazole

Méningites à cryptocoques à Yaoundé (Cameroun) chez les patients infectés par le VIH : diagnostic, fréquence et sensibilité des isolats au fluconazole

T. Kammalac Ngouana^{a,c,d,*}, J. Dongtsa^a, C. Kouanfack^{a,c}, C. Tonfack^a, S. Fomena^b, M. Mallié^c, E. Delaporte^c, F.-Fekam Boyom^d, S. Bertout^c

^aClinical Biology Laboratory, Yaoundé Central Hospital, Cameroon

^bNational Institute of Statistics, Yaoundé, Cameroon

^cUMI 233 UMI-IRD-UCAD-UYY – TEND/INM – laboratoire de parasitologie et mycologie médicale UFR pharmacie, université de Montpellier 1, 34093 Montpellier, France

^dAntimicrobial Agents Unit (ANAU), Laboratory for Phytochemistry and Medicinal Plants Study, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Cameroon

Received 23 June 2014; received in revised form 25 September 2014; accepted 20 October 2014

KEYWORDS

Cryptococcus;
HIV infection;
Diagnosis;
Frequency;
Fluconazole

Summary Cryptococcal meningitis is a mycosis encountered especially in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome and is fatal in the absence of treatment. Information on epidemiology, diagnosis and susceptibility profile to antifungal drugs, are scarce in Cameroon. Authors evaluated the diagnosis possibilities of the cryptococcal meningitis in Cameroon, and studied the antifungal susceptibility of isolated strains to fluconazole, used as first line treatment of the disease in Cameroon. Between December 2009 and July 2011, 146 cerebrospinal fluids obtained from HIV patients with suspicion of meningitis were analysed. The diagnosis procedure involved macroscopic and cyto-chemical analysis, India ink test, culture on Sabouraud

* Corresponding author. Laboratoire de parasitologie et mycologie médicale, UFR de pharmacie, 15, avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 05, France.

E-mail address: ngouanet@yahoo.com (T. Kammalac Ngouana).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.10.016>

1156-5233/© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Kammalac T, et al. Cryptococcal meningitis in Yaoundé (Cameroon) HIV infected patients: Diagnosis, frequency and *Cryptococcus neoformans* isolates susceptibility study to fluconazole. Journal De Mycologie Médicale (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.10.016>

Soumis à BMC Complementary and Alternative Medicine : en révision, manuscrit N° 1547649985139531

Extracts combinations from *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Monodora tenuifolia* synergistically exert antifungal activity against *Candida species* and *Cryptococcus neoformans*.

Thierry Kammalac Ngouana^{1,2,3}, Cedric Mbouna Jiatsa¹, Rufin Marie Kuipou Toghueo¹, Marthe Aimée Tchente Tchuenmogne⁴, Elisabeth Menkem Zeuko'o¹, Vincent Ngouana¹, Michèle Mallié³, Sebastien Bertout³, Fabrice Fekam Boyom^{1*}

¹Antimicrobial Agents Unit, Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Cameroon

²Clinical Biology Laboratory, Yaoundé Central Hospital, Cameroon

³UMI233 UM1-IRD-UCAD-UY1 « TransVIHMI » Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, UFR Pharmacie, Université de Montpellier 1, France

⁴Laboratory of Natural Products and Organic Synthesis, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Cameroon

*Address for Correspondence:

Prof. Fabrice Fekam Boyom, Antimicrobial Agents Unit, LPMPS, P.O. Box: 812, Yaoundé-Cameroon;

Email: fabrice.boyom@fulbrightmail.org

Tel.: +237-7727-6585

Abstract

Background: Fungal infections caused by *Candida* and *Cryptococcus* species, associated to the advent of antifungal drug resistance have emerged as major problems among immunocompetent and immunocompromised persons. Therefore, improved control measures and innovative therapies should be developed if the burden associated with these infections is to be relieved. A credible approach to search for new antifungal drugs is to explore medicinal plants. Within this framework, the present paper describes results from the screening of bio-

guided fractionated extracts and combinations from *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Monodora tenuifolia* against some *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*.

Methods: Extracts were obtained by maceration in 95% ethanol, water:ethanol (30:70), and water. Crude extracts, bio-guided fractions and purified compounds were screened for antifungal activity against isolates of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* and the reference strain *Candida albicans* ATCC P37037. Minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined according to the CLSI M27-A3 protocol. Combinations were also tested, and the time kill kinetics evaluated. **Results:** Extracts from *T. mantaly* stem bark were the most active, from which one of the hydroethanolic sub-fractions (C26: Te MSbH₂O/EthOH Fr H₂O sFr CH₃OH) showed the most potent activity with MIC values ranging from 0.04mg/ml to 0.16mg/ml. Importantly, synergistic interactions were mainly observed for combinations of sub-fractions from *M. tenuifolia*, *T. mantaly* and *T. catappa* (C36: Mo TL EthOH Fr CH₂Cl₂ sFr CH₃OH/C2: Te C L H₂O/EthOH Fr H₂O sFr CH₃OH, and C36/C12: Te ML H₂O Fr CH₂Cl₂ sFr CH₃OH). Overall, the best activity profile was obtained with a combination of subfractions from *M. tenuifolia* and *T. mantaly* (C36/C12) which showed synergistic interaction and cidal effect against 4 out of 5 yeasts tested. Finally, the combinations C36/C12 and C36/C2 showed the fastest cidal effect (6 hours) against *C. albicans* isolate. **Conclusion:** The results achieved from this work are promising, and support further detailed investigation of extracts and combinations from the studied Cameroonian medicinal plants species as starting points for the development of alternative antifungal therapy.

Keywords: *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly*, *Monodora tenuifolia*, antifungal activity, bio-guided fractionation, combinations.

Cryptococcal meningitis in Yaoundé (Cameroon) HIV infected patients: Diagnosis, frequency and susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to fluconazole

^{1,3,4}Ngouana Kammalac Thierry, ¹Dongtsa Jacqueline, ^{1,3}Kouanfack Charles, ¹Tonfack Clément, ²Foména Stévin, ³Krasteva Donika, ³Drakulovski Pascal, ³Aghokeng Avelin, ³Mallié Michèle, ³Delaporte Eric, ⁴Fabrice Fekam Boyom, ³Bertout Sebastien.

¹ Clinical Biology Laboratory, Yaoundé Central Hospital, Cameroon

² National Institute of Statistics, Yaoundé, Cameroon

³ UMI 233 UM1-IRD-UCAD-UY1 « TransVIHMI » Laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale UFR Pharmacie, Université de Montpellier 1, France

⁴ Antimicrobial Agents Unit (AMAU), Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Cameroon

Introduction

Cryptococcal meningitis is a life threatening mycosis encountered mainly in patients with AIDS and is fatal in absence of treatment. Whereas Cameroon is in the endemic area, informations on the epidemiology, diagnosis and susceptibility profile to fluconazole are scarce.

This study describes the diagnosis of cryptococcal meningitis in Cameroon, and the susceptibility of isolated *Cryptococcus neoformans* strains to fluconazole used as first line treatment in this country.

Material and methods

Between December 2009 and July 2011, 146 cerebrospinal fluids (CSF) obtained from HIV patients with suspicion of meningitis were diagnosed. The diagnosis procedure involved macroscopic and cyto-chemical analysis, india ink test, culture on Sabouraud chloramphenicol medium without actidione during 2 to 14 days at 37°C, and latex agglutination test for the searching of a specific cryptococcal antigen using the CRYPTO-LA II FUMOUSE Kit (Crypto La-test Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France).

Urease secretion and melanine production by isolated strains were investigated by the urea-indole test and culture on Niger seeds agar medium respectively.

Specificity of a test was calculated by the ratio between number of negative results detected by the test on the number confirmed by culture, taken as reference test. Sensitivity of a test was the ratio between the number of positive results detected by the test and the number confirmed by culture. Antifungal susceptibility testing of isolated strains to fluconazole was done by the E-test® method (E-test® strip, bioMérieux, Inc. ref 510890; 100 Rodolphe Street, Durham, NC 27712, U.S.A.).

Table 1: Sensitivity and specificity of india ink test and agglutination test.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)
India ink test	94.44	96.08
Latex agglutination test	97.22	95.10

Conclusion

Cryptococcal meningitis remains a real problem among HIV infected patients in Yaoundé. This is more worrying due to the emergence of fluconazole reduced susceptible strains. Nevertheless, efficacy of rapid detection tests of *C. neoformans* is interesting because this will help in the rapid diagnosis and treatment of patients.

References

- Bertout S., Drakulovski P., Kouanfack, Krasteva D., Ngouana T., Dunyach-Remy, Dongtsa J., Aghokeng A., ... and Mallié M., (2012). *Clin. Microbiol. Inf.*, DOI: 10.1111/1469-0691.12019
- Millogo A., Ki-Zerbo G.-A., Andonaba J. B., (2004). *Bull. Soc. Pathol. Exo.*, 97(2) : 119-121.
- Oumar A., Dao S., Diallo S., Kaba M.K., Ciss I.A., Tounkara A., (2008). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 127 (1) : 12-17.
- Soumaré M., Seydi M., Ndour C.T., Dieng Y., Diouf A.M., Diop B.M., (2005). *Med. Trop.*, 65 : 559-562.
- Aller A. I., Martin-Mazuelos E., Lozano, (2000). *Antimicrob. Ag. Chemother.* 44(6) : 1544-1548

Results

The frequency of cryptococcal meningitis was 28.08%.

80% of patients with cryptococcosis were at stages III and IV and 20% at stage I of the HIV infection.

Macroscopic analysis showed clear, cloudy, xanthochromic CSFs without correlation with the presence of *C. neoformans*. An average of 5 leucocytes/mm³ (<20 leucocytes/mm³) was present in CSFs, implying a weak cellular reaction during the infection by *C. neoformans*.

CSFs glucose levels were low, with high protein levels and normal chloride levels (average values of 0.43g/l, 0.84g/l, and 111.91mEq/l respectively).

Rapid detection tests (india ink test and agglutination test) exhibited elevated sensitivities and specificities (table1).

Fluconazole antifungal susceptibility testing gave low MICs to 95.13% of isolated *C. neoformans* strains (MIC <32µg/ml), and elevated MICs (MIC ≥ 32µg/ml) to 4.87% of isolates (figure 1).

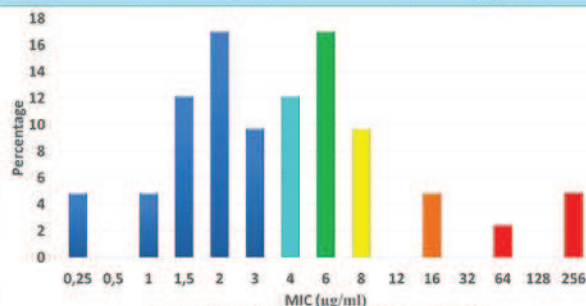


Figure 1: Percentages of strains at different MICs

Discussion

Stages III and IV in the previous WHO classification correspond to CD4+ count below 200/mm³. At this level of CD4+ count, cryptococcosis is a major indicator of the AIDS state.

Accuracy of India ink test is higher than what Soumaré *et al.* (2005) have previously obtained. The specificity and sensitivity of the agglutination test is comparable to previous findings. Nevertheless, False-positive results can occur due to secondary infection with *Trichosporon beigelii*, which cross-reacts with the antigen. In addition, false-negative results can occur due to residual disinfectant on laboratory test slides.

Strains with low sensitivity could be correlated to therapeutic failure. It might therefore be important to really evaluate the emerging *C. neoformans* strains resistance to fluconazole in Cameroon as well as confirming these results by the CLSI M27-A3 protocol.

Acknowledgment

This study was supported by SIDACTION AI 19-01-396.

We Thank the staff of the Yaoundé Central Hospital and the CNPS Hospital for their help and collaboration.

We thank Dominique Castel for its technical help

Annexe 2 : Considérations éthiques

1. Clairance administrative

REPUBLIC OF CAMEROUN
Peace – Work – Fatherland

MINISTRE DE LA SANTE PUBLIQUE

SECRETRARIAT GENERAL

DIRECTION DE L'HOPITAL CENTRAL DE YAOUNDE.

CONSEILLER MEDICAL

N° 2 HCY/CM

HOPITAL CENTRAL DE YAOUNDE

REPUBLIC OF CAMEROUN
Peace – Work – Fatherland

MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

SECRETARY GENERAL'S OFFICE

DIRECTORATE OF CENTRAL HOSPITAL

MEDICAL'S COUNCILER

Yaoundé, le, 12 SEP. 2011.

AUTORISATION DE RECHERCHE

Je soussigné **Pr Pierre MASSO MISSE** certifie qu'une autorisation administrative de mener une recherche à l'hôpital Central de Yaoundé, service laboratoire, est accordée à **MR NGOUANA KAMALAC THIERRY** étudiant à la faculté des sciences de Yaoundé I. L'étude porte sur « caractérisation génétique des isolats de levures et étude de leur profil de sensibilité aux molécules antifongiques disponibles et à celles isolées des extraits de plantes. »

L'éthique et la confidentialité sont à respecter

Au terme de ce Travail, une copie sera déposée à la bibliothèque de l'HCY.

Copie :

- Directeur HCY
- service laboratoire

Le Conseiller Médical

Professeur Masso Missé

2. Clairance éthique



**COMITÉ NATIONAL D'ETHIQUE
NATIONAL ETHICS COMMITTEE**

- N° d'enregistrement : FWA IRB00001954 BP 1937, Yaoundé. Tel: (237) 22 21 12 84
- Arrêté N° 079 /A/MSP/DS du 22 octobre 1987 portant création et organisation d'un Comité d'Ethique de la Recherche (CER) impliquant les êtres humains



Yaoundé, le 28 janvier 2009

AUTORISATION N° 117/CNE/DNM/08

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Ethique du Cameroun a évalué ce 26 janvier 2008, le protocole de recherche intitulé **«CRYPTOCOCCOSE NEUROMENINGEE CHEZ LE PATIENT VIH POSITIF»**, soumise par KOUANFACK Charles et collaborateurs.

Ce projet présente une valeur sociale certaine. Sa mise en œuvre serait une contribution significative à la prise en charge de la Cryptococcose méningée chez le sujet VIH positif au Cameroun. La procédure de recherche présentée présume un projet scientifiquement valide. Elle prévoit le prélèvement et l'analyse des échantillons biologiques chez les participants. Ce qui expose au risque de rupture de confidentialité sur les données personnelles, de dommage psychologique, physique et de contamination lors des prélèvements. Les procédures décrites de consentement éclairé, de préservation de la confidentialité des données et protection contre les risques permettraient de minimiser la probabilité de survenue des dommages suscités lors de la mise en œuvre du protocole. Les CVs des investigateurs les décrivent capables de mettre en œuvre le protocole. Le dossier de soumission est complet. Le projet est ainsi en ligne avec la réglementation de la recherche sur les sujets humains au Cameroun, et les principes éthiques protégeant les droits et la dignité des potentiels participants à la recherche. De ce fait, le comité a approuvé pour une période d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole

L'investigateur principal est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devra y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il sans avis favorable du comité national d'éthique. Il devra informer au premier cas et le plus tôt possible le Comité National d'Ethique, l'autorité sanitaire du Cameroun, et le promoteur du présent projet, de la survenue de tout incident inattendu lors de la mise en œuvre du protocole. Il devra prendre toutes dispositions nécessaires pour que seuls les co-investigateurs présentés dans ce protocole et dont les CVs sont joints, en soient impliqués à la mise en œuvre. Il devra admettre toutes descentes du comité national pour suivi de la mise en œuvre dudit protocole. Le rapport final du projet devra être soumise au comité d'éthique, à la fin de l'étude.

La mise en œuvre du projet peut être suspendue en cas de non respect de la réglementation en vigueur et survenu d'évènement grave.





Le Président
Pr. Lazare KAPTUE

PROTOCOLE CANDIDA

FORMULAIRE D'INFORMATION

Madame, Monsieur,

Nous vous proposons d'être inclus(e) dans une étude de recherche, nommée « *Incidences des candidoses chez le patient HIV+ à Yaoundé* ».

Le but de cette notice d'information est de vous donner toutes les informations dont vous avez besoin pour décider si vous souhaitez ou non participer à cette étude. Merci de la lire attentivement. Elle vous permettra de poser toutes les questions que vous souhaitez sur le but de l'étude, ses risques éventuels et ses bénéfices, vos droits ou tout autre point à préciser. Vous pourrez alors décider de participer ou non à cette étude.

Pourquoi cette étude ?

Comme vous le savez, la présence du VIH entraîne avec le temps une dégradation progressive du système immunitaire (défense du corps contre les maladies) et pourra conduire au SIDA si vous n'êtes pas bien suivi. SIDA (Syndrome Immuno Déficitaire acquis) ce syndrome se manifeste par les maladies que l'on appelle infections opportunistes. Pour que le malade vive longtemps même s'il est sous traitement antirétroviral, il faut que l'on recherche ces infections et qu'on les traite efficacement, car ce sont ces infections qui entraînent la mort de la personne qui est infectée par le VIH.

La candidose est une mycose que l'on retrouve partout dans le monde, elle est causée par un microorganisme appelé **Candida**, et se retrouve normalement dans l'environnement. Il donne la maladie chez le sujet dont les défenses immunitaires sont diminuées parmi lesquelles les patients infectés par le VIH. Cette infection conduit à la mort en l'absence de traitement.

Ainsi le projet « *Incidences des candidoses chez le patient HIV+* » vise à identifier les microbes qui causent cette candidose et à tester leur sensibilité aux médicaments, en vue d'améliorer dans l'avenir la prise en charge des patients VIH positif en général et de ceux présentant les candidoses en particulier.

Que vous sera-t-il demandé et que vous sera-t-il fait ?

Si vous acceptez de participer, vous serez inclus dans cette étude. Pendant l'une de vos visites un personnel de santé vous posera des questions sur votre état de santé et il vous fera des prélèvements de selles, d'urine, de bouche, de peau, du vagin (si vous êtes une femme).

Diagnostic et médicaments de cette étude :

Chaque fois que l'on vous fera un examen mycologique (recherche des levures du genre Candida), le diagnostic sera gratuit. Si vous avez une candidose, vous vous prendrez vous-même en charge, cette étude ne bénéficiant pas d'une subvention permettant d'assumer le suivi thérapeutique des patients.

Durée de l'étude

- L'étude durera un (01) an, mais votre participation ne sera prise en compte que dans le mois qui suivra votre réception dans l'étude.

Bénéfices liés à votre participation à l'étude

Pendant l'étude vous avez le bilan de recherche des candidoses gratuit.

Comment se fait le partage des informations que nous obtiendrons.

- Les centres et les personnes qui participent à cette étude s'engagent à strictement respecter l'anonymat des informations (c'est-à-dire, votre nom ou tout autre moyen d'identification, comme votre adresse, téléphone ne seront pas connus des centres impliqués dans l'étude et votre nom sera remplacé par un numéro) tout au long de l'étude et lors de la communication des résultats.
- Les données vous concernant seront enregistrées dans un fichier informatique. Le comité d'éthique, les autorités de santé Camerounaise ou l'investigateur de l'étude pourront avoir accès à ces données afin de vérifier que l'étude est menée en accord avec les lois et règlements en vigueur. Si vous retirez votre consentement de l'étude, les données collectées avant le traitement, pourront toujours être utilisées. Vous avez le droit d'accéder à l'information médicale vous concernant. Nous orienterons votre suivi vers les services compétents.

Coût

- Votre participation à l'étude est entièrement gratuite

Si vous avez des questions sur l'étude, veuillez contacter à tout moment et pendant la durée de l'étude l'investigateur principal : NGOUANA K. Thierry => tel : 99 74 92 47 / 76 16 33 53

PROTOCOLE CANDIDA

CONSENTEMENT DE PARTICIPATION

Je soussigné(e) :(noms et prénoms)

Certifie avoir lu et compris le document d'information qui m'a été remis et avoir eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais à :

.....

Je comprends les objectifs, les contraintes, les risques et les bénéfices potentiels liés à ma participation à cette étude.

J'ai eu l'assurance que les décisions qui s'imposent pour ma santé seront prises à tout moment, conformément à l'état des connaissances sur la prise en charge de l'infection à **VIH**.

J'accepte qu'une partie de mes produits biologiques qui me seront prélevés soit utilisée dans l'étude. Ces échantillons seront utilisés pour isoler certains microorganismes et vérifier éventuellement certaines données de l'étude, réaliser des tests plus sensibles et effectuer, si cela paraît souhaitable, des recherches biologiques complémentaires. J'ai la possibilité de demander que mon prélèvement soit détruit à tout moment.

J'accepte que les données anonymisées enregistrées à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement informatisé. J'ai bien noté que je pourrai avoir accès à ces données à tout moment en m'adressant à (au) et exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de ce dernier.

J'accepte que tout médecin ou scientifique impliqué dans le déroulement de cette recherche, ainsi que les Représentants des autorités de santé aient accès à l'information dans le respect le plus strict de la confidentialité.

J'accepte librement de participer à cette étude dans les conditions précisées dans la notice d'information. Je pourrais à tout moment si je le désire, interrompre ma participation sans avoir à justifier ma décision mais, je ferai mon possible pour en informer

Cette interruption ne remettra pas en cause la qualité des soins ultérieurs.

Fait à **le**

Noms et prénoms.....

Signature

Je soussigné(e), certifie avoir communiqué toute information utile concernant cette étude. Je m'engage à faire respecter les termes de cette note de consentement, conciliant le respect des droits et des libertés individuelles et les exigences d'un travail scientifique.

Fait à **Le**

Nom de l'enquêteur

Fiche numéro :

Protocole Candida

Code patient :

Fiche des patients

(À remplir par l'enquêteur au moment de l'enquête ; cette fiche doit systématiquement accompagner les prélèvements, elle tient lieu de bulletin d'examen).

Date :

Nom de l'enquêteur :

Service :

Sexe : Age :

Taille : Poids :

Profession :

Contact :

Signes cliniques d'infection à *Candida* :

.....

.....

Antécédents cliniques ou thérapeutiques (antibiotiques, antifongiques, corticoïdes, infection fongiques) :

.....

.....

Type de VIH : Stade OMS de l'infection à VIH :

CD4* : Sous traitement ARV ?

Si oui quels médicaments ?

NFS* (surtout les neutrophiles):

Cocher les prélèvements à effectuer :

Selles ☐

Urines ☐

PV ☐

Bouche ☐

(*) S'il n'y a pas de données, demander l'examen

Signature de l'enquêteur:

Résumé de diffusion

Cryptococcus neoformans et les levures du genre *Candida* sont impliquées dans des infections opportunistes chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH). L'objectif de ce travail est d'isoler et de caractériser génétiquement des isolats de *Cryptococcus* et de *Candida* issus de PVVIH à Yaoundé (Cameroun), d'étudier leur sensibilité à des antifongiques et à des extraits de plantes. Le génotypage des isolats de *C. neoformans* a montré que le même patient peut être infecté par deux souches différentes. L'étude des isolats de *C. albicans* a donné 65 types moléculaires différents et le génotype H a été décrit pour la première fois. *C. africana*, est isolée pour la première fois au Cameroun. Les isolats de *C. neoformans* chez un patient peuvent présenter des sensibilités variées à un même antifongique. Les isolats de *C. albicans* présentent une sensibilité réduite aux antifongiques. Les extraits de certaines plantes médicinales présentent une activité antifongique. Ce travail apporte de nouvelles données sur l'épidémiologie et la sensibilité de cryptocoque et de *Candida* au Cameroun.

Diffusion abstract

Title: Genetic diversity of *Cryptococcus* and *Candida* isolates from Yaoundé HIV positive patients and study of their antifungal susceptibility against antifungal drugs and plant extracts.

Cryptococcus neoformans and *Candida* species are causative agents of certain opportunistic infections among HIV infected persons in Cameroon. The objective of this work was to study the genetic diversity and the antifungal susceptibility against some antifungal drugs and plant extracts of *C. neoformans* and *Candida* isolates from Yaoundé HIV patients. The genotyping of *C. neoformans* isolates showed that the same patient might be infected by to genetically different strains. The study of *C. albicans* isolates provided 65 molecular types and the first description of the H-typing. A newly described *Candida* species, *C. africana* was identified for the first time in Cameroon. In some cases, *C. neoformans* isolates from the same patients exhibited different susceptibility profiles against an antifungal drug. *C. albicans* isolates showed reduced susceptibility to antifungal drugs. Tested plant extracts exerted antifungal activities. This work brought new information on epidemiology and susceptibility of *Cryptococcus and candida* in Cameroon.