



**HAL**  
open science

# Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire.

Kondo Kassi

► **To cite this version:**

Kondo Kassi. Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire.. Maladies infectieuses. Université Montpellier; Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2016. Français. NNT : 2016MONT3521 . tel-01628628

**HAL Id: tel-01628628**

**<https://theses.hal.science/tel-01628628>**

Submitted on 3 Nov 2017

**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**

**Délivré par l'Université de Montpellier**

**Préparée au sein de l'école doctorale Sciences  
Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)  
Et de l'unité de recherche UMI 233-IRD-UM-  
INSERM U1175**

**Spécialité : Sciences Chimiques et Biologiques  
pour la Santé, ED 168**

**Présentée par KASSI KONDO FULGENCE**

**Diversité génétique et sensibilité aux  
antifongiques d'isolats cliniques et  
environnementaux de *Cryptococcus* à  
Abidjan, Côte d'Ivoire**

**Soutenu le 15 décembre 2016 devant le jury composé de**

Mr Sébastien Bertout, Professeur, Université de Montpellier  
Mr Frédéric Dalle, Professeur, Université de Bourgogne  
Mme Michèle Mallié, Professeur, Université de Montpellier  
Mr Hervé Menan, Professeur, Université Félix Houphouët B.  
Mr Jacques Reynes, Professeur, Université de Montpellier  
Mr William Yavo, Professeur, Université Félix Houphouët B.

Directeur  
Rapporteur  
Examinateur  
Co-Directeur  
Examinateur  
Rapporteur



## Dédicaces .....

Je dédie cette thèse.....

A mon adorable épouse Perpétue Amandine Lakpa, qui a vécu cette thèse avec moi. Merci d'avoir tout supporté dans le silence et d'avoir créé une atmosphère propice à ma réussite. Ta présence, ton soutien et ton affection ont été un profond réconfort.

A mon fils Kassi Joseph-Marie Alvin qui me comble sans cesse de joie.

A mes parents Kotou Kassi Laurent et N'dja Essy Elisabeth, pour l'éducation reçue.

A mes frères et sœurs Silvère, Jocelyne, Jocelyn et Alida.

A tous les membres du Renouveau Charismatique Divine Grâce de la Riviera 2, Cocody.

Au Personnel de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan.

Aux enseignants du Département de parasitologie et de mycologie, de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët Boigny (FHB) pour le soutien.

Au personnel du Centre de Diagnostic et de Recherche sur le Sida et les autres maladies infectieuses (CeDReS).

Au Personnel du Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU de Treichville

Au personnel du laboratoire de parasitologie et de mycologie médicale de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Montpellier.

A tous les malades qui ont accepté de participer à ce travail.

« *Si le Seigneur ne bâtit la maison, les bâtisseurs travaillent en vain* ». **Psaumes 127, 1.**

## Remerciements

Cette thèse est le résultat de trois années de travail au cours desquelles, j'ai eu la grâce de pouvoir compter sur la participation et le soutien de nombreuses personnes et institutions que je ne pourrais pas manquer de remercier.

Mes encadrants,

- Pr Sébastien Bertout, cher Directeur de thèse, ce travail est le fruit de votre expérience dont vous avez su me faire profiter ainsi que du soutien et de la confiance que vous m'avez exprimé. C'est aussi grâce à vous que j'ai eu la grâce de travailler sur une thématique aussi passionnante. Tout cela a suscité en moi un vif intérêt pour les questions d'épidémiologie moléculaire. L'expérience acquise sous votre direction m'est inestimable. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.
- Pr MENAN Eby Ignace Hervé, vous avez d'abord été d'abord membre de mon Jury de thèse d'état de Docteur en Pharmacie, ensuite mon co-Directeur de mémoire dans le cadre du Master de recherche à l'Université FHB, et maintenant vous êtes mon co-Directeur de thèse de Doctorat. Au-delà de tout ceci, vous être mon responsable pédagogique et un père pour moi. Vous m'avez beaucoup appris sur le plan professionnel par votre disponibilité, votre rigueur scientifique et surtout vos qualités humaines exceptionnelles. Trouvez ici, l'expression de ma profonde reconnaissance. Que Dieu vous bénisse papa !
- Je garde à l'esprit que ce projet de thèse s'est construit sous l'impulsion du Professeur Michèle Mallié. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Les membres du jury,

- Pr Dalle Frédéric, je vous remercie d'avoir accepté spontanément de faire partie de ce jury en étant rapporteur de cette thèse. Votre présence ici, Professeur, m'honore. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.
- Pr Jacques Reynes, je vous remercie de participer au jury de cette thèse et de nous faire part de votre expertise. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.
- Pr Yavo William, c'est pour moi, un honneur de vous avoir comme rapporteur de thèse. C'est avec vous que j'ai fait mes premiers pas en biologie moléculaire dans le cadre de mon mémoire du Master de recherche à l'Université FHB. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Pr Éric Delaporte, en tant que responsable de l'unité, vous m'avez accueilli au sein de votre dynamique équipe. C'est un honneur pour moi d'avoir travaillé avec vous.

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

Gatchich François et Frédéric Roger pour les analyses informatiques pertinentes et l'aide à la mise point de la plateforme MLST,

Dominique Castel pour ta disponibilité largement mise à contribution et ton aide précieuse dans la préparation des milieux de culture,

Dominique Peyrin pour la sympathique collaboration qui a contribué à rendre ces années de thèse très agréables,

Sylvie Jouvret et Jean-Claude Lebecq pour leur encadrement,

Dr Bellet Virginie et Dr Drakulovski Pascal qui ont eu la patience et le courage de se lancer dans la relecture critique des articles scientifiques et du manuscrit de thèse,

Mme Catherine Crepin qui a facilité les premières procédures administratives au sein de l'UFR,

Tous les membres de l'Unité Mixte Internationale (UMI 233 – U 1175).

Les institutions qui ont facilité cette Thèse,

- Le Gouvernement Français à travers la bourse SCAC.
- L'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Montpellier.
- Le Centre Hospitalier Universitaire de Cocody, de Treichville et de Yopougon.
- Le Centre de Diagnostic et de Recherche sur le Sida et les autres maladies infectieuses.

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

## Table des matières

Dédicaces .....	i
Remerciements .....	ii
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des annexes .....	x
Liste des abréviations .....	xi
Introduction générale .....	1
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTERATURE .....	4
I. HISTORIQUE.....	5
II. TAXONOMIE .....	6
III. BIOTOPE.....	7
III.1. Niches écologiques .....	8
III.2. Reproduction.....	8
IV. ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES.....	11
IV.1. Mode de transmission.....	11
IV.2. Facteurs de virulence.....	11
IV.3. Pathogénèse de <i>Cryptococcus</i> .....	14
V. LES DIFFERENTES MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA CRYPTOCOCCOSE .....	15
VI. EPIDEMIOLOGIE DE LA CRYPTOCOCCOSE NEUROMENINGEE : CAS DE L'INFECTION A VIH.....	16
VII. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET TRAITEMENT .....	18
VII.1. Diagnostic biologique.....	18
VII.1.1. Diagnostic mycologique .....	18
VII.1.2. Diagnostic immunologique .....	20
VII.1.3. Diagnostic histopathologique .....	21
VII.2. Traitement .....	22
VII.2.1. Les antifongiques.....	22
VII.2.1.1. L'amphotéricine B .....	23
VII.2.1.2. Les triazolés.....	24
VII.2.1.3. La 5-fluorocytosine.....	27
VII.2.2. Traitement de la cryptococcose neuroméningée.....	28
VII.2.3. Les résistances aux antifongiques .....	29
VIII. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> .....	31

VIII.1. PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction) .....	31
VIII.2. Analyse du polymorphisme de longueur des régions microsatellites et minisatellites ou MLP (microsatellites Length Polymorphism) .....	32
VIII.3. Amplification sélective de fragments de restriction génomique (AFLP) .....	33
VIII.4. Typage par séquençage multi-locus (MLST).....	33
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES.....	36
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE .....	37
I. TYPE, DUREE, LIEU ET POPULATION D'ETUDE.....	39
II. ETUDE CLINIQUE .....	39
III. ETUDE ENVIRONNEMENTALE .....	42
IV. PROCEDURE D'ANALYSE DES SOUCHES CLINIQUES ET ENVIRONNEMENTALES ...	43
IV.1. Examen direct.....	44
IV.2. Détection des antigènes solubles de <i>Cryptococcus</i> .....	45
IV.3. Mise en culture .....	45
IV.4. Identification biochimique.....	46
IV.5. Identification phénotypique .....	47
V. ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE .....	47
V.1. Isolement des clones .....	47
V.2. Extraction de l'ADN .....	48
V.3. Diversité génétique des espèces du complexe <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> .....	48
V.3.1. Sérotypage par PCR multiplex .....	49
V.3.2. Typage moléculaire par PCR-RFLP du gène <i>URA5</i> .....	49
V.3.3. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA) <sub>4</sub> , (GTG) <sub>5</sub> et minisatellites M13 .....	50
V.3.4. Typage moléculaire par MLST .....	51
VI. SENSIBILITE DES ESPECES DU COMPLEXE <i>C. NEOFORMANS</i> / <i>C. GATTII</i> A DIFFERENTS ANTIFONGIQUES PAR LA METHODE DE DILUTION EN MILIEU LIQUIDE ...	54
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	57
I. EPIDEMIOLOGIE ET SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES DE 363 ISOLATS CLINIQUES DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> ISSUS DE PATIENTS VIH POSITIFS .....	58
I.1. Caractéristiques de la population étudiée.....	58
I.2. Etude de la diversité génétique des isolats de <i>Cryptococcus</i> .....	58
I.2.1. Sérotypage par PCR multiplex .....	58
I.2.2. Typage moléculaire par PCR-RFLP du gène <i>URA5</i> .....	59
I.2.3. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA) <sub>4</sub> , (GTG) <sub>5</sub> et minisatellite M13 .....	60

I.3. Sensibilité de <i>Cryptococcus</i> aux antifongiques.....	65
I.4. Cas particulier d'un patient infecté par deux espèces différentes .....	68
I.5. Discussion.....	69
I.6. Conclusion partielle 1 .....	74
II. ANALYSE COMPARATIVE DE 246 ISOLATS INITIAUX ET ISOLATS ISSUS DE SUIVI DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> .....	75
II.1. Caractéristiques de la population étudiée.....	75
II.2. Diversité génétique des isolats de <i>Cryptococcus</i> .....	75
II.2.1. Polymorphisme au sein d'un patient .....	78
II.2.2. Polymorphisme entre patients .....	82
II.3. Sensibilité aux antifongiques des isolats initiaux et des isolats de suivi de <i>Cryptococcus</i> ..	83
II.4. Discussion.....	88
I.5. Conclusion partielle 2 .....	92
III. COMPARAISON D'ISOLATS CLINIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> .....	93
III.1. Caractéristiques de la population étudiée.....	93
III.2. Sérotypage par PCR multiplex .....	94
III.3. Typage moléculaire par PCR-RFLP du gène <i>URA5</i> .....	94
III.4. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA) <sub>4</sub> , (GTG) <sub>5</sub> et minisatellite M13 .....	95
III.5. Comparaison des isolats cliniques et environnementaux .....	99
III.6. Sensibilité de <i>Cryptococcus</i> aux antifongiques .....	100
III.7. Discussion.....	101
III.8. Conclusion partielle 3 .....	104
Conclusion générale et perspectives.....	105
Références .....	107
Annexes .....	126



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Taxonomie de <i>Cryptococcus</i>	<b>6</b>
<b>Tableau 2 :</b>	Ancienne et nouvelle dénomination des espèces du complexe <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	<b>7</b>
<b>Tableau 3 :</b>	Marqueurs MLST utilisés pour le génotypage des souches du complexe <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	<b>34</b>
<b>Tableau 4 :</b>	Séquences des amorces utilisées pour le sérotypage par PCR multiplex	<b>49</b>
<b>Tableau 5 :</b>	Séquences et conditions d'amplification des 7 loci MLST	<b>52</b>
<b>Tableau 6 :</b>	Schéma du protocole expérimental utilisé pour la détermination des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) du fluconazole, de la flucytosine et de l'amphotéricine B	<b>55</b>
<b>Tableau 7 :</b>	Critères d'interprétation de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches du complexe <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> après 72 heures d'incubation	<b>56</b>
<b>Tableau 8 :</b>	Sérotypes, génotypes et principaux types moléculaires chez les 61 patients	<b>65</b>
<b>Tableau 9 :</b>	Sérotypes, génotypes, et valeurs des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des trois antifongiques testés pour les 363 isolats	<b>67</b>
<b>Tableau 10 :</b>	Diversité génétique globale des 246 isolats de <i>Cryptococcus</i> issus des 13 patients par PCR multiplex, PCR-RFLP du gène <i>URA5</i> et MLST	<b>76</b>
<b>Tableau 11 :</b>	Résultats obtenus chez 2 patients présentant des infections mixtes	<b>78</b>
<b>Tableau 12 :</b>	Répartition des ST au sein des 41 prélèvements de départ issus des 13 patients inclus dans l'étude	<b>80</b>
<b>Tableau 13 :</b>	Profil allélique et fréquence des ST retrouvés chez au moins 2 patients	<b>81</b>
<b>Tableau 14 :</b>	ST retrouvés au cours du temps chez un même patient	<b>82</b>
<b>Tableau 15 :</b>	Relation entre données biologiques, la résistance aux antifongiques et le séro-génotypage	<b>87</b>
<b>Tableau 16 :</b>	Fréquences des ST associés à la résistance au fluconazole et à la flucytosine	<b>88</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Reproduction sexuée et fructification monocaryotique chez <i>Cryptococcus</i>	<b>9</b>
<b>Figure 2 :</b>	Localisation schématique des enzymes impliquées dans la virulence chez <i>Cryptococcus</i>	<b>13</b>
<b>Figure 3 :</b>	Mécanismes de dissémination fongique à travers la barrière hémato-encéphalique	<b>14</b>
<b>Figure 4 :</b>	Financement et taux de mortalité calculés pour la cryptococcose, la tuberculose et le paludisme	<b>18</b>
<b>Figure 5 :</b>	Mode opératoire du test Crypto Ag Lateral Flow Assay	<b>21</b>
<b>Figure 6 :</b>	Mise en évidence des cryptocoques après coloration à l'hématoxyline-éosine-safran (A), au Gomori Grocott (B) et au bleu Alcian (C)	<b>22</b>
<b>Figure 7 :</b>	Mise en évidence des cryptocoques après coloration au mucicarmin (A), à l'acide périodique de Schiff (B) et à l'imprégnation argentique à la méthénamine selon Gomori (C)	<b>22</b>
<b>Figure 8 :</b>	Schéma des cibles de médicaments antifongiques chez <i>Cryptococcus</i>	<b>23</b>
<b>Figure 9 :</b>	Structure chimique de l'amphotéricine B	<b>23</b>
<b>Figure 10 :</b>	Interaction entre amphotéricine B et ergostérol dans la membrane de <i>Cryptococcus</i>	<b>24</b>
<b>Figure 11 :</b>	Structure chimique du fluconazole (A), du voriconazole (B), de l'itraconazole (C), et du posaconazole (D)	<b>25</b>
<b>Figure 12 :</b>	Voie de synthèse de l'ergostérol	<b>26</b>
<b>Figure 13 :</b>	Structure chimique de la flucytosine	<b>27</b>
<b>Figure 14 :</b>	Protocole expérimental de recueil des 363 isolats des patients sans suivi	<b>40</b>
<b>Figure 15 :</b>	Protocole expérimental de recueil des souches des patients suivis	<b>41</b>
<b>Figure 16 :</b>	Sites de recueil des prélèvements environnementaux à Abidjan, Côte d'Ivoire	<b>42</b>
<b>Figure 17 :</b>	<i>Mangifera indica</i> (A) et <i>Eucalyptus camaldulensis</i> (B)	<b>43</b>
<b>Figure 18 :</b>	Procédure d'analyse des souches cliniques et environnementales	<b>44</b>
<b>Figure 19 :</b>	Mise en évidence de la capsule du cryptocoque par l'encre de Chine	<b>45</b>
<b>Figure 20 :</b>	Colonies de <i>Cryptococcus</i> après culture sur milieu Sabouraud (A) et Niger (B)	<b>46</b>
<b>Figure 21 :</b>	Colonies de <i>Cryptococcus</i> après culture sur milieu CGB	<b>47</b>
<b>Figure 22 :</b>	Profils électrophorétiques obtenus par sérotypage par PCR multiplex à partir d'isolats de <i>Cryptococcus</i>	<b>59</b>
<b>Figure 23 :</b>	Profils électrophorétiques des quatre génotypes obtenus par PCR-RLFP du gène <i>URA5</i>	<b>59</b>
<b>Figure 24 :</b>	Exemples de profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GACA) <sub>4</sub> des isolats de <i>Cryptococcus</i> de 4 patients	<b>61</b>
<b>Figure 25 :</b>	Exemples de profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GTG) <sub>5</sub> des isolats de <i>Cryptococcus</i> de 4 patients	<b>62</b>
<b>Figure 26 :</b>	Exemples de profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences minisatellites M13 des isolats de <i>Cryptococcus</i> de 4 patients	<b>63</b>
<b>Figure 27 :</b>	Pourcentage des isolats de <i>Cryptococcus</i> sensibles à chaque CMI et pour	<b>66</b>

	chaque antifongique testé	
<b>Figure 28 :</b>	Profil PCR-RLFP du gène <i>URA5</i> de la souche ABM-58	<b>69</b>
<b>Figure 29 :</b>	Minimum Spanning Tree (MST) obtenu à partir du profil génétique des 13 patients	<b>79</b>
<b>Figure 30 :</b>	Evolution des CMI au fluconazole en fonction du temps pour les 13 patients inclus dans cette étude dont les souches sont suivies	<b>84</b>
<b>Figure 31 :</b>	Evolution des CMI à la flucytosine en fonction du temps pour les 13 patients dont les souches sont suivies	<b>85</b>
<b>Figure 32 :</b>	Evolution des CMI à l'amphotéricine B en fonction du temps pour les 13 patients dont les souches sont suivies	<b>86</b>
<b>Figure 33 :</b>	Distribution des communes de provenance des patients et de collecte des échantillons de l'environnement	<b>93</b>
<b>Figure 34 :</b>	Profils électrophorétiques des 12 isolats cliniques de <i>Cryptococcus</i> obtenus par PCR multiplex	<b>94</b>
<b>Figure 35 :</b>	Profils électrophorétiques des 12 isolats environnementaux de <i>Cryptococcus</i> obtenus par PCR multiplex	<b>94</b>
<b>Figure 36 :</b>	Profils électrophorétiques des trois génotypes obtenus par PCR-RLFP du gène <i>URA5</i> pour les 12 isolats cliniques	<b>95</b>
<b>Figure 37 :</b>	Profils électrophorétiques des 12 isolats environnementaux obtenus par PCR-RFLP du gène <i>URA5</i>	<b>95</b>
<b>Figure 38 :</b>	Profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GACA) <sub>4</sub> des isolats cliniques et environnementaux de <i>Cryptococcus</i>	<b>96</b>
<b>Figure 39 :</b>	Profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GTG) <sub>5</sub> des isolats cliniques et environnementaux de <i>Cryptococcus</i>	<b>97</b>
<b>Figure 40 :</b>	Profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences minisatellites M13 des isolats cliniques et environnementaux de <i>Cryptococcus</i>	<b>98</b>
<b>Figure 41 :</b>	Dendrogramme de la diversité génétique d'isolats cliniques et environnementaux de <i>Cryptococcus</i> obtenu par analyse des séquences mini et microsatellites et <i>URA5</i> -RFLP	<b>99</b>
<b>Figure 42 :</b>	Pourcentage des isolats cliniques de <i>Cryptococcus</i> sensibles à chaque CMI et pour chaque antifongique testé	<b>100</b>
<b>Figure 43 :</b>	Pourcentage des isolats environnementaux de <i>Cryptococcus</i> sensibles à chaque CMI et pour chaque antifongique testé	<b>101</b>

## Liste des annexes

<b>Annexe 1 :</b>	Résumés des publications	<b>i</b>
<b>Annexe 2 :</b>	Résumés des communications	<b>iii</b>
<b>Annexe 3 :</b>	Avis favorable du comité d'éthique	<b>v</b>
<b>Annexe 4 :</b>	Fiche d'enquête	<b>vi</b>
<b>Annexe 5 :</b>	Préparation du milieu aux graines de Niger ( <i>Guizotia abyssinica</i> )	<b>ix</b>
<b>Annexe 6 :</b>	Préparation du milieu L Canavanine glycine bleu de bromthymol	<b>x</b>
<b>Annexe 7 :</b>	Dendrogramme de la diversité génétique des 363 isolats de <i>Cryptococcus</i> obtenu par analyse des séquences mini et microsatellites et <i>URA5-RFLP</i>	<b>xi</b>
<b>Annexe 8 :</b>	Sérotypes, génotypes et valeurs des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des trois antifongiques testés pour les 363 isolats de <i>Cryptococcus</i>	<b>xv</b>
<b>Annexe 9 :</b>	Sérotypes, génotypes, séquences types, fréquences alléliques et valeurs des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des trois antifongiques testés pour les 246 isolats de suivi	<b>xix</b>
<b>Annexe 10:</b>	Sérotypes, génotypes et valeurs des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des trois antifongiques testés pour les 24 isolats cliniques et environnementaux de <i>Cryptococcus</i>	<b>xxii</b>
<b>Annexe 11 :</b>	Résumé de diffusion	<b>xxiii</b>

## Liste des abréviations

- ADNg : Acide Désoxyribonucléique génomique
- AFLP : Amplified Fragment-Length Polymorphism
- ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales
- ARN : Acide Ribonucléique
- ATP : Adénosine Triphosphate
- BET : Bromure d'Ethidium
- BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
- BNETD : Bureau National d'Etudes Techniques et de Développement
- CAP59 : Capsular Associated Protein 59
- CAP64 : Capsular Associated Protein 64
- CCs : Complexes Clonaux
- Cdc24 : Cell Division Cycle 24
- CD4 : Cluster of Differentiation 4
- CeDReS : Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA et les autres maladies infectieuses
- CGB : Canavanine-Glycine-Bromothymol bleu
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institute
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- CNM : Cryptococcose Neuroméningée
- DEPC : Diethyl Pyrocarbonate
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- dNTPs : Désoxyribonucléosides Triphosphates
- DPPC : Di-Palmitoyl-Phosphatidylcholine
- EDS : Enquête Démographique et de Santé
- EDTA : Ethylène Diamine Tetra Acetate
- ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- GPD1 : Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase
- GXM : Glucuronoxylomannanes
- HES : Hématoxyline-Eosine-Safran
- HTIC : Hypertension Intracrânienne
- IGS1* : Ribosomal RNA Intergenic Spacer
- IRIS : Syndrome de Restauration Immunitaire
- LAC1* : Laccase 1
- LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
- L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphenylalanine
- MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
- MAT : Locus du Mating Type
- MLP : Microsatellite Length Polymorphism
- MLST : Multilocus Sequence Typing
- MOPS : Acide 3-(N-morpholino) Propane Sulfonique
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PAS : Periodic Acid-Schiff
- Pb : Paire de bases
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PG : Phosphatidylglycérol

- PLB : Phospholipase B
- PVVIH : Personnes Vivant avec le VIH
- Ras : Rat Sarcoma
- RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
- ROS : Reactive Oxygen Species
- RPMI : Roswell Park Memorial Institute
- SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Humaine
- SMIT : Service des Maladies Infectieuses et Tropicales
- SNC : Système Nerveux Central
- SOD : Superoxide Dismutase
- STR : Short Tandem Repeats
- Taq* : *Thermophilus aquaticus*
- UFR : Unité de Formation et de Recherche
- UGPMA : Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean
- UMI : Unité Mixte Internationale
- URA5* : Orotidine Monophosphate Pyrophosphorylase
- μM : micromolaire (micromole / l)
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- WHO : World Health Organization
- WGST : Whole-Genome Sequence Typing
- YCB : Yeast Carbon Base

## Introduction générale

La cryptococcose neuroméningée (CNM) est une mycose opportuniste due à un champignon appartenant au complexe d'espèces *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*. Autrefois rarement rencontrée, cette infection a vu son incidence considérablement augmentée depuis les années 80 avec l'apparition de la pandémie de sida (**Park et al., 2009**). Sa gravité est liée au tropisme de la levure pour le système nerveux central. Dans les pays où les trithérapies sont insuffisamment utilisées, elle reste au 2ème rang des infections opportunistes fatales chez les personnes atteintes du sida. En Afrique subsaharienne, la mortalité annuelle liée à cette infection fongique est estimée à 600 000, ce qui en fait la 4ème cause de décès dues aux maladies infectieuses dans cette partie de l'Afrique (**Bicanic et al., 2009; Park et al., 2009**). Malgré la disponibilité des antirétroviraux (ARV), le taux de mortalité dans les dix premières semaines suivant le traitement antifongique varie de 20 à 50% en Afrique subsaharienne, atteignant 70% dans la pratique quotidienne (**Bicanic et al., 2009; Desalermos et al., 2012; Kambugu et al., 2008; Lessells et al., 2011**). Le champignon est présent dans l'environnement, et l'inhalation de la levure contenue dans les poussières infectantes conduit à une primo-infection pulmonaire souvent asymptomatique. Les champignons décrits comme responsables de pathologies chez l'homme appartiennent au complexe d'espèces *C. neoformans* / *C. gattii*. Traditionnellement, ce complexe d'espèces correspondait aux espèces *C. neoformans* et *C. gattii*, elles même regroupées en trois variétés: *C. neoformans* variété *grubii*, *C. neoformans* variété *neoformans* et *C. neoformans* variété *gattii*. Ces champignons peuvent être divisés en plusieurs groupes grâce au sérotypage. Traditionnellement, le sérotypage du pathogène était réalisé par des techniques immunologiques basées sur les différences des antigènes de capsules (**Franzot et al., 1999**). Actuellement, les techniques de biologie moléculaire basées sur l'amplification des gènes CAP64 et LAC1 qui codent respectivement pour la protéine de la capsule et la mélanine permettent de différencier 5 sérotypes (A, B, C, D et AD) (**Ito-Kwa et al., 2007**). Alors qu'il est communément admis que ce sont les souches de sérotype A qui sont responsables de la CNM en Afrique, les sérotypes B, C, D et AD sont également retrouvés (**Litvintseva et al., 2005; Nyazika et al., 2016**).

L'avènement des techniques de biologie moléculaire dans le domaine de la mycologie médicale a permis d'améliorer les connaissances sur la diversité génétique et l'épidémiologie du pathogène (**Hagen et al., 2015**). Parmi les différentes méthodes utilisées pour son typage, trois sont capables de produire des résultats comparables: la PCR fingerprinting, l'AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism) et la MLST (Multilocus sequence typing) (**Cogliati., 2013**). L'utilisation de ces techniques a permis récemment de faire éclater le complexe *C. neoformans* / *C. gattii* en 13 génotypes et la taxonomie est en cours de révision puisque 7 espèces différentes ont pu être décrites (**Hagen et al., 2015**). La diversité génétique de *Cryptococcus* est peu documentée en Afrique en particulier en Côte d'Ivoire. Pourtant, il est important de comprendre



l'épidémiologie de ce champignon mortel chez les sujets immunodéprimés. Cette connaissance de la variabilité génétique est essentielle à la connaissance de la structure de *Cryptococcus*. De plus, les infections mixtes par différents génotypes ou différentes espèces pourraient compliquer le traitement de la CNM (**Bertout et al., 2013; Desnos-Ollivier et al., 2010**). Des cas de réinfestations avec différentes souches de *Cryptococcus* ayant des différents profils de sensibilité aux antifongiques sont aussi décrits (**Illnait-Zaragozi et al., 2010a; Van Wyk et al., 2014**).

Sans traitement, la CNM est fatale. Le traitement de référence associe l'amphotéricine B (AMB) et la 5-fluorocytosine (5FC) suivi d'un relai par le fluconazole (FCZ) (**Perfect et al., 2010**). La toxicité, le respect de la chaîne du froid et le coût élevé de l'AMB limitent son utilisation en Côte d'Ivoire et la 5FC y est indisponible. Par conséquent, le traitement de la CNM se résume en une monothérapie au FCZ faisant craindre l'apparition de résistance à cet antifongique. La résistance au FCZ est une préoccupation émergente décrite à travers le monde (**Cheong and McCormack, 2013**). En Afrique, la résistance au FCZ a été décrite au Kenya et en Afrique du Sud (**Bii et al., 2007; Van Wyk et al., 2014**). D'autres études ont démontré que la résistance de *Cryptococcus* au FCZ variait en fonction du type moléculaire (**Chau et al., 2010; Chong et al., 2010; Chowdhary et al., 2011; Trilles et al., 2012**). D'autres travaux ont même montré que la résistance de *Cryptococcus* aux antifongiques ou la présence d'une infection mixte peuvent contribuer aux récurrences de la CNM chez les patients (**Govender et al., 2011; Van Wyk et al., 2014; Illnait-Zaragozi et al., 2010a**).

Classiquement, les principales sources environnementales de ce champignon sont les sols contaminés par les fientes de pigeons ou les arbres (**Cogliati., 2016; Colom al., 2012**). L'écologie de ce pathogène est bien documentée, y compris leur influence sur l'épidémiologie de la cryptococcose mais en Côte d'Ivoire, leur habitat n'a jamais été étudié.

Compte tenu de la forte mortalité associée à la CNM en Côte d'Ivoire (**Aoussi et al., 2012**), de la rareté des données sur l'épidémiologie moléculaire et le profil de sensibilité aux antifongiques des souches de *Cryptococcus*, une étude dans ce sens en Côte d'Ivoire a été initiée.

L'objectif général de cette étude est de caractériser génétiquement des isolats de *Cryptococcus* issus des PVVIH et d'étudier leur profil de sensibilité aux antifongiques de références utilisés pour son traitement.

Les objectifs spécifiques sont de :

- décrire la diversité génétique globale de *Cryptococcus* chez des PVVIH atteints de CNM.
- comparer la diversité génétique de *Cryptococcus* entre patients et chez un même patient au cours du suivi.



Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*  
à Abidjan, Côte d'Ivoire

- comparer la diversité génétique de *Cryptococcus* entre isolats environnementaux et cliniques.
- Rechercher une relation entre le profil génétique et la sensibilité aux antifongiques des souches isolées.

# **CHAPITRE 1**

## **REVUE DE LA LITTERATURE**

## I. HISTORIQUE

En 1894, Otto Busse isole un pathogène sur une lésion du tibia d'un patient ayant des ressemblances avec le genre *Saccharomyces*. Durant la même année, Francesco San Felice, isole du jus de pêches fermenté, une levure similaire qui, inoculée au cobaye, se révèle capable de provoquer une infection disséminée avec lésions cérébrales et lui donne le nom de *Saccharomyces neoformans* (**Sanfelice., 1894**). En 1895, Buschke rapporte un cas de maladie humaine due à des coccidies et Busse nome l'agent pathogène en cause *Saccharomyces hominis* (**Buschke, 1895; Busse, 1895**). En 1901, Jean-Paul Vuillemin renomme cette levure *Cryptococcus*, pour la distinguer des *Saccharomyces spp.*, puisqu'elle ne produit pas d'ascospores (**Vuillemin, 1901**). Le premier cas de méningite est diagnostiqué par Verse en 1914 (**Verses, 1914**). Jusqu'en 1949, ce champignon a été considéré comme une espèce anamorphe homogène (asexuée) (**Buschke, 1895; Sanfelice, 1894**). En 1935, Bernham identifie les variétés *neoformans* et *gattii* (**Bernham, 1935**). Dans les années 1950, Neil et Evans prouvent que la capsule de *C. neoformans* est sérologiquement réactive et décrivent 3 sérotypes (A, B et C) (**Neill et al., 1949, 1950; Evans et al., 1950, 1951; Evans et Theriault, 1953**). En 1968, Wilson décrit le sérotype D (**Wilson et al., 1968**). En 1975, Kwon-Chung décrit le genre *Filobasidiella*, correspondant à la forme parfaite (téléomorphe) de *C. neoformans*. Dans la même année, le cycle sexuel de *C. neoformans* est décrit après croisement de deux souches de sérotype D. Le téléomorphe (stade sexué) obtenu est appelé *Filobasidiella neoformans* (**Kwon-Chung, 1975**). Un an plus tard, le croisement de souches de sérotype B et C aboutit à un téléomorphe différent nommé *Filobasidiella bacillispora* (**Kwon-Chung, 1976**). Suite au croisement entre *C. neoformans* et *C. bacillisporus*, Kwon-Chung et al., proposent de dissocier ces deux espèces en deux variétés respectivement *C. neoformans* variété *neoformans* et *C. neoformans* variété *gattii* (**Kwon-Chung et al., 1982**). En 1999, une troisième variété, *grubii* est décrite sur la base d'analyses phénotypique et génotypique (**Franzot et al., 1999**).

Jusqu'en 2015, ce champignon existait sous forme de deux espèces (*C. neoformans* et *C. gattii*), de trois variétés et de cinq sérotypes:

- *C. neoformans* variété *grubii* correspond au sérotype A ;
- *C. neoformans* variété *neoformans* correspond au sérotype D ;
- *C. gattii* correspond aux sérotypes B et C ;  
et l'hybride AD des sérotypes A et D.

## II. TAXONOMIE

*Cryptococcus* appartient au règne des *Fungi*. Le tableau 1 décrit sa taxonomie.

**Tableau 1:** Taxonomie de *Cryptococcus* (Chen et al., 2015)

<b>REGNE</b>	Fungi
<b>Groupe</b>	Eucaryotes
<b>Sous-groupe</b>	Mycophytes
<b>Phylum</b>	Basidiomycota
<b>Sous-phylum</b>	Agaricomycotina
<b>Classe</b>	Tremellomycètes
<b>Ordre</b>	<i>Tremellales</i>
<b>Famille</b>	<i>Tremellaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Filobasidiella</i> / <i>Cryptococcus</i>

Plus de 80 espèces composent ce genre dont la grande majorité n'est pas pathogène (Chen et al., 2015). Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études phylogénétiques ont rapporté des différences phénotypiques et génotypiques au niveau de *Cryptococcus*. Les résultats de ces études remettent fortement en cause le concept de deux espèces précédemment admis. Depuis 2015, deux complexes d'espèces sont admis: le complexe d'espèces *C. neoformans* et le complexe d'espèces *C. gattii* comprenant 7 espèces et 13 génotypes (Hagen et al., 2015). La relation entre espèces et génotypes est présentée dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Ancienne et nouvelle dénomination des espèces du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* (Hagen *et al.*, 2015).

Ancienne dénomination	Génotypes PCR- RFLP / AFLP	Nouvelle dénomination
	VNI / AFLP1	
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNII / AFLP1A / VNB	<i>C. neoformans</i>
	VNII / AFLP1B	
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VNIV / AFLP2	<i>C. deneoformans</i>
Hybride inter variété de <i>C. neoformans</i>	VNIII / AFLP3	Hybride <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
	VGI / AFLP4	<i>C. gattii</i>
	VGIII / AFLP5	<i>C. bacillisporus</i>
<i>C. gattii</i>	VGII / AFLP6	<i>C. deuterogattii</i>
	VGIV / AFLP7	<i>C. tetragattii</i>
	VGIV / VGIIIc, AFLP10	<i>C. decagattii</i>
Hybride <i>C. neoformans</i> var <i>neoformans</i> x <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI	AFLP8	Hybride <i>C. deneoformans</i> x <i>C.gattii</i>
Hybride <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i> x <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI	AFLP9	Hybride <i>C. neoformans</i> x <i>C.gattii</i>
Hybride <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i> x <i>C. gattii</i> AFLP6/VGII	AFLP11	Hybride <i>C. neoformans</i> x <i>C. deuterogattii</i>

AFLP : Amplification sélective de fragments de restriction génomique.

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

En plus des 7 espèces et de l'hybride AD (VNIII), trois hybrides interspécifiques ont été décrits: *C. neoformans* var. *neoformans* x *C. gattii* (sérotypage BD, génotype AFLP8; **Bovers *et al.*, 2006**), *C. neoformans* var. *grubii* x *C. gattii* (sérotypage AB, génotype AFLP9; **Bovers *et al.*, 2008b**) et *C. neoformans* var. *grubii* x *C. gattii* (sérotypage AB, génotype AFLP11; **Aminnejad *et al.*, 2012**).

### III. BIOTOPE

Pour se reproduire et survivre, les cryptocoques ont des besoins particuliers qui déterminent leurs niches écologiques. De nombreuses études ont mis en évidence les principales sources environnementales et les moyens de dispersion de *Cryptococcus*, expliquant l'épidémiologie de la cryptococcose.

### III.1. Niches écologiques

*C. neoformans* a été isolé à partir du sol pour la première fois par Emmons en 1951 (Emmons *et al.*, 1951). Par la suite, plusieurs études ont révélé que la principale source environnementale du champignon est constituée par les excréments aviaires, en particulier de pigeons (Hagen *et al.*, 2015; Kangogo *et al.*, 2015). L'existence de cette niche écologique explique que ces champignons soient cosmopolites puisque le pathogène peut se disséminer rapidement dans l'environnement par l'intermédiaire des oiseaux migrateurs (Lin *et al.*, 2007). Ce phénomène est d'autant plus important que les pigeons sont des oiseaux vivant à proximité des maisons. Outre les fientes de pigeons, *C. neoformans* a également été isolé à partir du sol, de la poussière des maisons, des bois en décomposition ainsi qu'à partir de différentes espèces d'arbres (Boekhout *et al.*, 2001; Chowdhary *et al.*, 2011, Colom *et al.*, 2012; Illnait-Zaragozí *et al.*, 2012).

Historiquement, la première source environnementale du complexe d'espèces *C. gattii* a été déclarée dans les années 1990 en Australie. Deux espèces d'eucalyptus étaient incriminées: *E. camaldulensis* et *E. tereticornis* (Elliis and Pfeiffer, 1992). Ensuite, la plupart des enquêtes environnementales ont confirmé ce rapport, établissant une association préférentielle entre ce champignon et les eucalyptus (Montenegro *et al.*, 2000). En 2016, plus de 50 autres espèces d'arbres sont impliquées dans la transmission du pathogène: Combretaceae (*Terminalia catappa*), Fabaceae (*Acacia visca*, *A. nilotica*, *Cassia fistula*, *Ceratonia siliqua*, *Tipuana tipu*), Meliaceae (*Azadirachta indica*), Oleaceae (*Olea spec.*) et Pinaceae (*Pinus canariensis*) (Cogliati *et al.*, 2016; Galanis *et al.*, 2010; Springer *et al.*, 2010). Plus récemment encore, ces espèces ont également été isolées à partir du sol, de l'air, de l'eau douce, de l'eau de mer et une variété d'animaux (selles et sols contaminés par les selles de ces animaux), comme les chats, les chiens, les furets et les chèvres (Boekhout *et al.*, 2001; Colom *et al.*, 2012; Illnait-Zaragozi *et al.*, 2011; Kidd *et al.*, 2004; Morera *et al.*, 2014; Singer *et al.*, 2014).

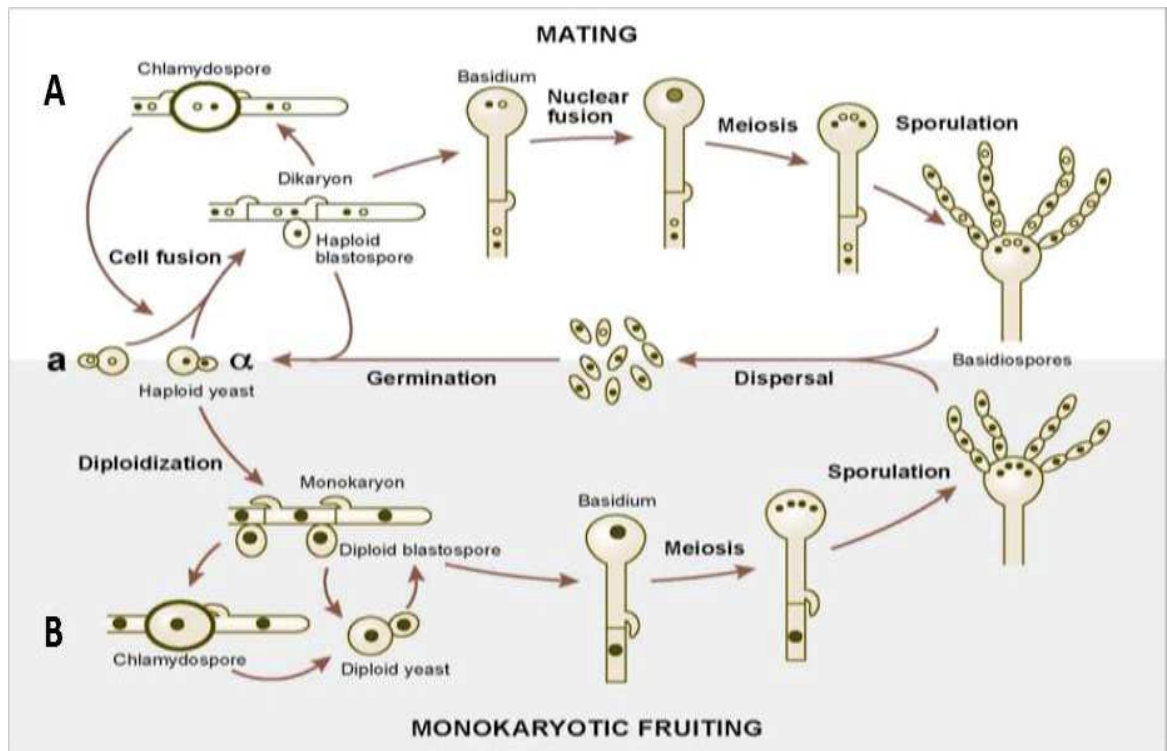
### III.2. Reproduction

Le cycle de vie chez *Cryptococcus* comprend deux états: l'un sexué et l'autre asexué.

- **Reproduction sexuée**

Le cycle sexuel est régi par un seul locus *MAT* (locus du mating type ou locus du signe sexuel) avec deux allèles idiomorphes,  $\underline{a}$  et alpha ( $\alpha$ ). Lorsque les conditions de croissance sont pauvres, une cellule de type  $\underline{a}$  fusionne avec une cellule  $\alpha$  pour produire des filaments dicaryotiques (Lin

and Heitman, 2006). Ces filaments conduisent finalement à la formation d'une baside dans laquelle la méiose produit quatre chaînes de basidiospores. Les basidiospores de *Cryptococcus* ne sont pas contenues dans des basides comme chez les autres basidiomycètes. Ainsi, les spores sont libres et facilement détachables et transportables dans l'air avant d'être inhalées par les individus (figure 1) (Hull and Heitman, 2002).



**Figure 1:** Reproduction sexuée et fructification monokaryotique chez *Cryptococcus* (Lin and Heitman, 2006).

La reproduction sexuée chez *Cryptococcus* n'a jamais été observée dans la nature ou chez un patient infecté (Idnurm et al., 2005; Kwon-Chung, 1976). Dans des conditions expérimentales, il semblerait que certains signaux environnementaux comme une carence en sources azotées, une faible température (25°C), la sécheresse, l'obscurité, et une diminution du pH stimulent la reproduction sexuée (Hull and Heitman, 2002). Chez les espèces du complexe *C. gattii*, la reproduction est principalement asexuée dans l'environnement et chez les hôtes humains et animaux (Fraser and Subaran., 2003). Enfin, quel que soit le champignon, la reproduction sexuée semble peu fréquente dans la nature, sans doute, du fait de la faible proportion de cellules de type a.

- **Fructification monocaryotique**

Ce mode de reproduction est une forme modifiée de la reproduction sexuée se produisant entre les souches du même type d'accouplement (figure 1B). Elle est induite lors de faibles conditions de survie et est contrôlé par le facteur de transcription STE12 $\alpha$  et la phéromone MF $\alpha$  (Hull and Heitman 2002; Lin *et al.*, 2005; McClelland *et al.*, 2004). Elle est principalement observée avec les souches de type  $\alpha$  ce qui pourrait expliquer leur abondance tant au niveau clinique qu'environnemental (Wickes *et al.*, 1996).

- **Ploïdie**

Chez *Cryptococcus*, la ploïdie semble très avantageuse dans l'évolution et permettrait une adaptation plus rapide en réponse aux pressions environnementales. Tout d'abord, alors que de nombreux champignons, en particulier, ascomycètes, existent dans un état haploïde ou diploïde, les souches de *Cryptococcus* sont généralement haploïdes. En effet, les souches diploïdes ne représentent que 8% des isolats cliniques et environnementaux (Lin and Heitman 2006). Sur le long terme, la combinaison d'états haploïde et diploïde peut permettre une plus grande adaptabilité du champignon à son hôte. Deuxièmement, la capacité de se reproduire sexuellement permet à ce champignon de subir la méiose à une fréquence élevée de recombinaison (Lin and Heitman, 2006; Marra *et al.*, 2004). Cette polyploïdie pourrait permettre de modifier rapidement la sensibilité aux antifongiques et la virulence, de réparer des erreurs dans le génome, d'augmenter la diversité génétique, et une adaptation plus rapide en réponse aux pressions environnementales. Troisièmement, bien qu'étant un champignon hétérothallique, il a la capacité de subir une reproduction sexuelle entre des cellules du même type d'accouplement à travers la fructification permettant sa survie dans des environnements difficiles (Lin and Heitman 2006). La plupart des souches diploïdes naturelles sont de sérotype A et tous les diploïdes naturels A sont de type  $\alpha$  (Lin *et al.*, 2009). Depuis 1996, la détermination de la ploïdie s'effectue par cytométrie en flux et plus récemment par hybridation génomique (CGH). Cette dernière technique permet aussi de déterminer les délétions chromiques et le nombre de copie de gènes (Tanaka *et al.*, 1996).

- **Hybrides**

La plupart des souches hybrides décrites sont de sérotype AD. En effet, les sérotypes A et D sont des souches cosmopolites qui occupent des niches écologiques similaires et sont responsables de la plupart des cas de cryptococcose (Desnos-Ollivier *et al.*, 2015).



## IV. ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES

### IV.1. Mode de transmission

La porte d'entrée dans l'organisme de *Cryptococcus* est pulmonaire par inhalation de la levure contenue dans les poussières infectantes. Une porte d'entrée cutanée a été décrite après inoculation post-traumatique ou accidentelle. Aucune transmission interhumaine ou de l'animal à l'homme n'a été décrite.

Pendant longtemps, les levures desséchées ont longtemps été considérées comme étant la forme infectante la plus probable. De récents travaux ont plutôt désigné la spore du fait de son aptitude à supporter les stress environnementaux (résistance au stress oxydant, aux températures élevées, à la dessiccation, aux attaques chimiques) (**Botts and Gilles, 2009**). L'inhalation de ces spores dans l'air ambiant constitue le point de départ de l'infection, avec une éventuelle progression vers le développement de la cryptococcose.

### IV.2. Facteurs de virulence

*Cryptococcus* possède plusieurs facteurs de virulence dont les trois principaux sont: la présence d'une capsule polysaccharidique, la capacité de croissance à 37°C et la synthèse de la mélanine.

- **La capsule**

La capsule polysaccharidique possède des propriétés anti phagocytaires en bloquant l'action des macrophages et toutes les réactions immunitaires qui en dépendent. La capsule inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, réduit la production d'anticorps, empêche la reconnaissance par le complément, aide à lutter contre l'effet des ROS (espèces réactives de l'oxygène) et du monoxyde d'azote et réduit la migration des leucocytes (**Almeida et al., 2001; Bose et al., 2003; Cordero et al., 2011; Lupo et al., 2008; Vecchiarelli et al., 2003**). Dans le cerveau, la capsule inhibe la réponse aux cytokines et chimiokines induites par les cellules microgliales (**Goldman et al., 2001**).

La structure et l'épaisseur de la capsule varient selon l'organe de localisation de la levure chez l'hôte. Par exemple, la capsule est plus mince lorsque la levure se multiplie dans le cerveau et plus épaisse lorsqu'elle se développe dans les poumons (**Garcia-Hermonso et al., 2004; Garcia-Rodas et al., 2011**). La plupart des mutants dépourvus de capsules ne sont pas virulents confirmant l'importance de la capsule dans la pathogénicité de *Cryptococcus* (**Chang et al., 1994**).

La capsule est synthétisée par l'expression de plus de 30 gènes, incluant le gène CAP64 (capsule associated gene) qui est utilisé pour le sérotypage par PCR multiplex (**Loftus et al., 2005**). Récemment, il a été montré que le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) a un effet positif sur l'expression des gènes CAP (CAP10, CAP59, CAP60 et CAP64) qui sont essentiels à la biosynthèse de la capsule (**Rathore et al., 2016**).

- **Croissance à 37°C**

Les espèces du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* sont capables de se développer à une température supérieure à 30°C, favorable au développement d'une infection, puisque la température corporelle de l'homme est de 37°C. Plus de 20 protéines ont été démontrées comme nécessaires à la croissance à 37°C (**Perfect, 2006**). On peut citer entre autres, les protéines Ras (rat sarcoma), le facteur d'échange de guanine Cdc24 (cell division cycle 24), la calcineurine et la phosphatase calcique (**Nichols et al., 2007; Vallim et al., 2005**).

- **Synthèse de la mélanine**

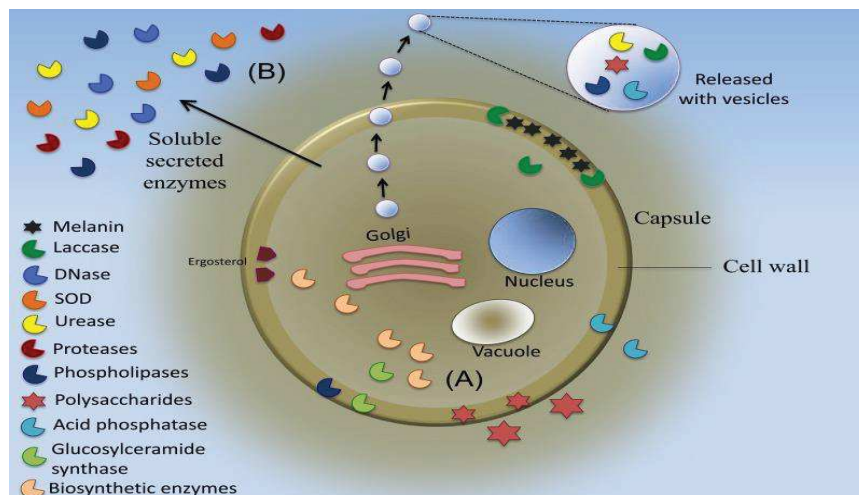
La mélanine est synthétisée par la laccase à partir des catécholamines (dopamine, épinéphrine et norépinéphrine) présentes dans le cerveau. Elle est localisée dans la membrane cellulaire et protège *Cryptococcus* contre les enzymes hydrolytiques, les rayons UV et le stress oxydatif (**Eisenman et al., 2007; Frases et al., 2007; Langfelder et al., 2003; Rosas and Casadevall, 2001**). Au cours de l'infection cérébrale, *Cryptococcus* utilise les catécholamines de l'hôte comme substrats, ce qui explique, en partie, le neurotropisme du pathogène (**Lin and Heitman, 2006; Nosanchuk et al., 2000**).

- **Autres facteurs de virulence**

La virulence de ce pathogène fongique varie selon le sérotype et le type sexuel ( $\alpha$  et  $\underline{a}$ ). En effet, les souches de sérotype A provoquent des infections plus sévères chez l'homme. Les souches de type sexuel  $\underline{a}$  sont peu ou pas virulentes alors que les souches  $\alpha$  ont une plus grande prédilection à infecter le système nerveux central (SNC) (**Barchiesi et al., 2005; Nielsen et al., 2005**).

*Cryptococcus* sécrète des enzymes extracellulaires (protéases, laccase, phospholipases et uréase) identifiées aussi comme facteur de virulence. En effet, seules les espèces du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* produisent la laccase, retrouvée dans le cytoplasme, la membrane cellulaire et la capsule (**Chan and Tay, 2010; Garcia-Rivera et al., 2005**). La phospholipase B (PLB) joue un rôle dans la biogénèse et le remodelage de la membrane de la levure et se lie au di-palmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC) et au phosphatidylglycérol (PG) des cellules épithéliales du poumon et hydrolyse 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., 1999). La phospholipase C est importante pour plusieurs phénotypes de virulence (production de mélanine, croissance à 37 °C et résistance aux médicaments antifongiques). Elle est également impliquée dans la régulation de l'homéostasie et l'intégrité de la paroi cellulaire (Chayakulkeeree et al., 2008; Lev et al., 2013). L'uréase est responsable de l'accumulation de cellules dendritiques immatures. La transmigration vers le cerveau est uréase-dépendante. L'uréase entraîne également la séquestration de *Cryptococcus* dans les micro-capillaires de la barrière hémato-encéphalique ou BHE (grâce à la synthèse d'ammonium dommageable pour l'endothélium), facilitant donc l'invasion du cerveau (Cox et al., 2000; Olszewski et al., 2004; Shi et al., 2010). 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 SNC est riche en inositol, ce qui pourrait expliquer le neurotropisme de cette levure (Reynolds, 2009). La localisation de ces enzymes au sein de la cellule fongique est présentée à la figure 2.



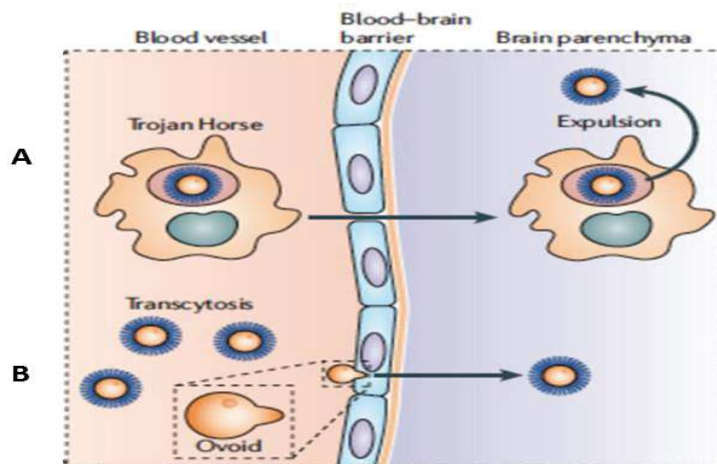
**Figure 2:** Localisation schématique des enzymes impliquées dans la virulence chez *Cryptococcus* (Almeida et al., 2015).

Ces enzymes sont des cibles potentielles pour de nouveaux médicaments antifongiques. (A) Certaines enzymes liées à la pathogenèse sont actives à l'intérieur de la cellule, tandis que d'autres sont sécrétées. Toutefois, la laccase est à la fois active à l'intérieur de la cellule et sécrétée. (B) Parmi celles qui sont libérées, certaines sont sécrétées en utilisant des systèmes de sécrétion traditionnels, tandis que d'autres sont incluses dans des vésicules extracellulaires.

### IV.3 Pathogénèse de *Cryptococcus*

Les levures ou les spores de *Cryptococcus* entrent dans les poumons par inhalation puis pénètrent les alvéoles pulmonaires, où elles peuvent adhérer aux cellules épithéliales pulmonaires afin d'être internalisées (Botts and Hull, 2010; Botts et al., 2009; Giles et al., 2009; Velagapudi et al., 2009). Les spores peuvent survivre dans les poumons tant que les macrophages ne sont pas encore activés, mais dès l'activation de ceux-ci, les spores sont phagocytées et rapidement détruites. La probabilité pour le patient de développer la cryptococcose dépend donc de la rapidité d'activation des macrophages. Chez les individus immunocompétents, l'activation des macrophages est suffisamment rapide pour permettre l'élimination de toutes les spores, alors que chez les personnes immunodéprimées, la rapidité et l'efficacité des cellules immunitaires ne sont pas suffisantes pour détruire les spores pendant la phase de germination. Cette hypothèse explique l'incidence du complexe d'espèces *C. gattii* chez les personnes immunocompétentes (Botts and Hull, 2010; Giles et al., 2009).

La dissémination cérébrale de *Cryptococcus* est due à plusieurs mécanismes. Le premier est d'utiliser les monocytes et les macrophages comme véhicule de transport à la manière d'un Cheval de Troie (figure 3A), ce qui permet l'entrée dans le cerveau en traversant la BHE (Casadevall, 2010; Charlier et al., 2009). En effet, monocytes et macrophages ont un récepteur pour le glucuronoxylomannanes (GXM), le composant capsulaire majeur de *Cryptococcus* (Merkel et al., 1997). Le second mécanisme est de traverser la BHE par transcytose (figure 3B). Ce processus permet la migration directe de levures à travers l'endothélium des capillaires corticaux après rupture mécanique et chimique des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Casadevall, 2010; Charlier et al., 2009). La figure 3 illustre ces deux théories.



**Figure 3:** Mécanismes de dissémination fongique à travers la barrière hémato-encéphalique (Kronstad et al., 2011).

## V. LES DIFFERENTES MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA CRYPTOCOCCOSE

Le tableau clinique diffère selon le statut immunitaire de l'hôte et l'espèce cryptococcique associée à l'infection. En cas d'immunodépression, l'atteinte est le plus souvent disséminée et les lésions inaugurales concernent volontiers les méninges ou les poumons.

- *Manifestations pulmonaires :*

L'atteinte pulmonaire est souvent asymptomatique et de découverte fortuite. Chez le sujet immunodéprimé, elle se traduit habituellement par une toux ou une dyspnée fébrile; la pneumopathie interstitielle bilatérale (pouvant faire évoquer une pneumocystose) est la plus typique. Chez le sujet très immunodéprimé ( $CD4 < 200/mm^3$ ), l'atteinte pulmonaire entraîne parfois un syndrome de détresse respiratoire aiguë (**Maslin et al., 2002**).

- *Manifestations méningo-encéphaliques :*

L'atteinte neuroméningée est la plus fréquente et la plus grave. Elle survient dans un contexte d'immunodépression sévère ( $CD4 < 200/mm^3$ ). Tous les signes cliniques ne sont pas toujours apparents. Cependant, le syndrome méningé caractérisé par des céphalées, de la fièvre, des vomissements et une raideur de la nuque sont les plus décrits (**Kronstad et al., 2011; Leal et al., 2008; Li and Mody, 2010; Shirley and Baddley, 2009**). Lorsque ces signes cliniques ne sont pas rapidement corrigés, des complications apparaissent: hydrocéphalie, augmentation de la pression intracrânienne pouvant provoquer une perte de l'ouïe ou de la vue, un état mental altéré, un coma et à terme, la mort. Dans le cas spécifique des espèces du complexe *C. gattii*, la fièvre, les céphalées, parfois accompagnées de vomissements et la raideur de la nuque sont les présentations neurologiques communes (**Chen et al., 2012; Galanis et al., 2010**).

- *Manifestations cutanées :*

Les atteintes cutanées (peau et tissus mous) sont rares (10%). La lésion typique est une papule qui grossit en pustule finissant par s'ulcérer, et formant des masses sous cutanées ou des ulcérations à bords irréguliers. Ces lésions siègent au niveau du visage et des zones découvertes (**Lin et al., 2009**).

- *Manifestations osseuses :*

Elles résultent d'une dissémination métastatique de l'infection. L'os est lysé avec formation d'un abcès pouvant s'extérioriser par une ulcération cutanée (**Lin et al., 2009**).

- *Manifestations systémiques* :

Des cas de dissémination du champignon à tout l'organisme ont été décrits avec une atteinte de plusieurs organes : atteintes oculaires (choriorétinite, endophtalmie) et viscérales (sinusiennes, médullaires, ganglionnaires, spléniques, prostatiques, digestives, uro-génitales) (**Lin et al., 2009**).

## **VI. EPIDEMIOLOGIE DE LA CRYPTOCOCCOSE NEUROMENINGEE : CAS DE L'INFECTION A VIH**

Depuis le début de l'épidémie à VIH/SIDA, dans les années 1980, environ 80 millions de personnes ont été infectées par le VIH et 40,2 millions de personnes sont décédées d'infections opportunistes liées au SIDA (**ONUSIDA, 2015**). Le VIH/SIDA est la première cause de mortalité en Afrique australe, orientale et centrale, en Thaïlande et certains pays des Caraïbes (**Ortblad et al., 2013**). L'Afrique subsaharienne héberge 16% de la population mondiale mais elle concentre près de 70% des personnes infectées par le VIH, et environ la même proportion des décès liés à cette infection. Dans cette zone de l'Afrique, la prévalence de l'infection à VIH est la plus élevée dans le monde (4,8%) (**ONUSIDA, 2015**). En Côte d'Ivoire, l'épidémie est généralisée et la prévalence est stable (3,4% en 2009 et 3,5% en 2015). Le nombre de PVVIH est également constant, 450 000 en 2009 contre 490 000 en 2015 (**ONUSIDA, 2015**). Selon l'Enquête Démographique et de Santé réalisée en 2012, les femmes sont beaucoup plus touchées que les hommes avec une séroprévalence de 4,6% contre 2,7%. La prévalence du VIH semble plus élevée en milieu urbain (4%) qu'en milieu rural (3%) avec une répartition géographique inégale sur l'ensemble du territoire (**INS, 2012**).

Les infections opportunistes sont très fréquentes au cours de l'infection à VIH/SIDA. Ces infections sont bactériennes (tuberculose, pyodermites, syphilis, angiomatoses bacillaires, folliculite bactérienne), virales (causées par Herpès simplex virus, virus de la varicelle et du zona, cytomégalovirus, papillomavirus), parasitaires (cryptosporidiose, toxoplasmose cérébrale) ou fongiques (candidose, cryptococcose neuroméningée) (**Kong et al., 2007**).

Les premiers cas de cryptococcose neuroméningée (CNM) ont été décrits dès 1894, mais l'émergence du virus du SIDA dans les années 1980 a augmenté de façon spectaculaire, l'incidence et la prévalence de la maladie. En 2009, on estimait à un million, le nombre de cas annuel de cryptococcose et 624 700 décès, principalement en Afrique subsaharienne (**Park et al., 2009**). Actuellement, alors que l'incidence de la maladie a diminué dans les pays occidentaux avec l'ère de la trithérapie, la CNM reste une cause majeure de méningite en Afrique subsaharienne où elle représente la quatrième cause de décès dus aux maladies infectieuses (**Luma et al., 2013**).

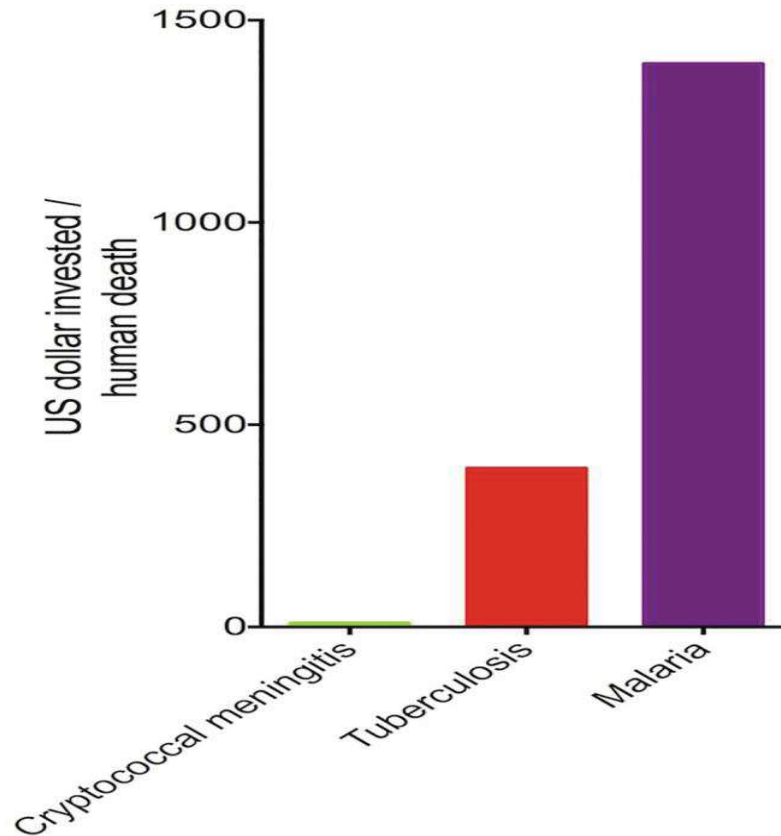


En Côte d'Ivoire, entre 1969 et 1980, la maladie était une curiosité clinique avec seulement 4 cas notifiés à Abidjan (**Odehouri et al., 1991**). Mais depuis 1985, le nombre d'observation de cette mycose chez l'adulte augmente, en relation avec la recrudescence de l'épidémie du VIH. Aujourd'hui, malgré la disponibilité du traitement antirétroviral (ARV) en Côte d'Ivoire, la CNM reste fréquente et sévère (taux de mortalité de 41,2%) chez les patients infectés par le VIH (**Aoussi et al., 2012**).

- **Cryptococcose: une maladie négligée**

Selon les dernières estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), 214 millions de cas de paludisme ont été enregistrés en 2015 dont 438.000 décès (**WHO, 2015**). En 2014, 1,1 million de personnes sont mortes de la tuberculose primaire, en plus des 390 000 personnes qui sont mortes de la tuberculose associée au VIH (**WHO, 2014**). Les taux de mortalité du paludisme sont similaires à ceux estimés par la CDC pour la cryptococcose humaine, avec plus de 500.000 personnes par an dans le monde entier (**Park et al., 2009**).

Sur un montant total de 3, 377 milliards de dollars (\$) US alloués à la lutte contre 35 maladies, le G-FINDER (financement mondial pour l'innovation des maladies négligées) a révélé un taux d'investissement de 0,5% (5,8 millions \$ US) pour la cryptococcose contre 50,7% (589 millions \$ US) pour la tuberculose et 52,6% (610 millions \$ US) pour le paludisme. L'importance de la lutte contre le paludisme, la tuberculose et d'autres maladies pour la santé mondiale est incontestable, de même que la nécessité d'investir dans la recherche, le développement et l'innovation dans ces domaines. Toutefois, les estimations calculées par le G-FINDER et résumées dans la figure 4 ci-dessous indiquent clairement un déséquilibre entre les taux de financement et la mortalité en ce qui concerne cryptococcose neuroméningée.



**Figure 4 :** Financement et taux de mortalité calculés pour la cryptococcose, la tuberculose et le paludisme (Rodrigues *et al.*, 2016).

Les données ont été obtenues sur la base des valeurs moyennes des taux de mortalité de l'OMS (paludisme et tuberculose) et le CDC (cryptococcose) et des estimations du financement fourni par le G-FINDER. Les valeurs ont révélé un investissement très réduit pour la cryptococcose en comparaison à la tuberculose et le paludisme.

## VII. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET TRAITEMENT

### VII.1. Diagnostic biologique

Le diagnostic s'effectue sur différents types de prélèvements en fonction de la localisation de l'infection: liquide céphalo-rachidien (LCR), liquide de lavage broncho-alvéolaire, urines, hémocultures ou biopsie. Le diagnostic est mycologique, immunologique ou histopathologique (Dromer et Lortholary, 2004; Perfect and Bicanic, 2015).

#### VII.1.1. Diagnostic mycologique

Un examen direct au microscope optique après coloration à l'encre de chine et une mise en culture sont généralement pratiqués.



- **Examen direct à l'encre de Chine (EDEC)**

La coloration à l'encre de chine du culot des liquides biologiques permet de visualiser facilement la capsule au microscope. La mise en évidence de levures capsulées (sphériques à ovoïdes, de taille variable de 3 à 10 µm) à l'EDEC est un élément majeur du diagnostic. En effet, les pigments de l'encre ne pénètrent pas la capsule polysaccharidique, ce qui se manifeste par une zone plus claire appelée halo qui entoure la levure. 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**).

- **Examen mycologique**

La mise en culture des échantillons est indispensable pour permettre l'identification de l'espèce. Elle consiste à faire un ensemencement sur milieu Sabouraud chloramphénicol et la culture est incubée à 37°C. *Cryptococcus* pousse sur tous les milieux de culture, exceptés ceux qui contiennent la cycloheximide. Les colonies apparaissent après environ 48 heures de culture mais ce délai peut être allongé si le patient a été traité par des antifongiques ou si la charge fongique est faible, ce qui justifie de conserver les cultures au moins 4 semaines (**Bose et al., 2003; Perfect, 2006**). Les colonies sont, en général, blanc crémeux, d'aspect brillant, coulant et se colorant en ocre plus ou moins foncé avec le temps.

Le diagnostic différentiel avec d'autres champignons notamment du genre *Candida* impose l'utilisation de milieux sélectifs. Ainsi, la capacité de synthèse de la mélanine par les espèces du complexe *C. neoformans* / *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 norépinéphrine (**Shaw et Kapica, 1972**) ainsi que le milieu aux graines de Niger (*Guizotia abyssinica*) (**Paliwal et Randhawa, 1978a; Staib et al., 1987**). Sur ces milieux, les colonies de cryptococques deviennent rapidement marron, ce qui permet de les distinguer des autres espèces, dont les colonies restent blanches/beiges. C'est le cas de *C. laurentii* parfois décrit au cours d'infections en association avec *C. neoformans* (**Manfredi et al., 2006**) et des levures de type *Candida* parfois majoritaires dans la plupart des prélèvements de type expectoration (**Suwantararat et al., 2014**).

Les espèces de *Cryptococcus* peuvent également être distinguées par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF (**Posteraro et al., 2012**). La technique utilise 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). Le MALDI-TOF est une alternative possible à la mycologie conventionnelle et les méthodes basées sur l'ADN.

Les critères biochimiques et phénotypiques participent au diagnostic. La sécrétion d'uréase sur milieu indole est déterminée en quelques heures grâce à des kits commercialisés. Les caractéristiques biochimiques des levures sur la galerie *API 32C* confirment la présence de levures du genre *Cryptococcus*. Cet auxanogramme caractérise l'aptitude à la croissance du champignon en milieu synthétique supplémenté avec différents substrats (acides aminés, sucres, lipides et vitamines), qui représentent alors la source unique de carbone et d'énergie (**Barnett et al., 1983; Kreger-van Rij, 1984**).

Pour différencier phénotypiquement les espèces du complexe *C. neoformans* et *C. gattii*, il existe deux milieux :

- Le milieu Canavanine-Glycine-Bromothymol bleu (CGB): il permet la détection de la résistance à la canavanine et l'hydrolyse de la glycine. Les souches du complexe *C. gattii* sont résistantes à la canavanine et hydrolysent la glycine ce qui augmente le pH du milieu et l'indicateur coloré, le bromothymol vire au bleu. La majorité des souches du complexe *C. neoformans* n'hydrolyse pas la glycine mais celles qui peuvent le faire sont sensibles à la canavanine, le milieu reste vert (**Kreger-van Rij., 1984; Min et Kwon-Chung, 1986; Staib et al., 1987**).

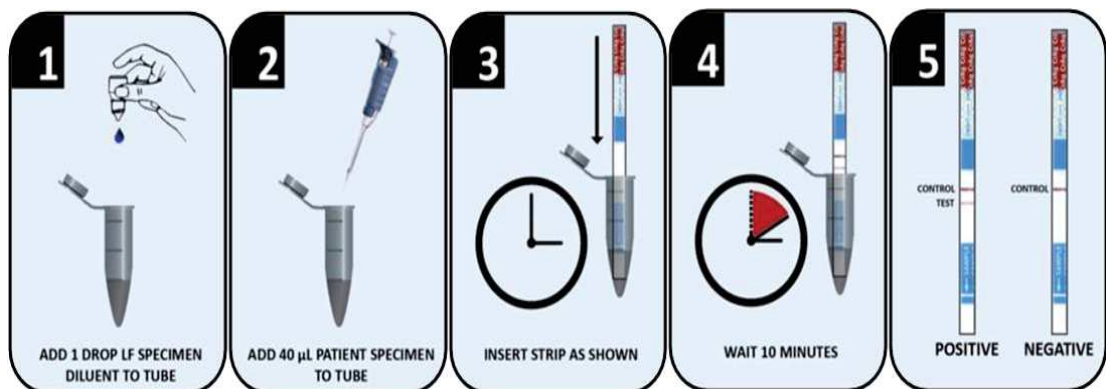
- Le milieu YCB (Yeast Carbon Base) + D-Proline (**Dufait et al., 1987**): les espèces du complexe *C. gattii* sont capables d'utiliser la D-Proline comme source azotée contrairement aux espèces du complexe *C. neoformans*.

### VII.1.2. Diagnostic immunologique

Il consiste à rechercher l'antigène capsulaire polysidique du cryptocoque avec des trousse commerciales qui ont une excellente spécificité et sensibilité (> 95% pour les trousse utilisant la pronase pour le prétraitement des échantillons). Le taux de faux positifs est inférieur à 1%, généralement expliqué par la présence d'autres pathogènes dans le prélèvement comme des antigènes provenant du genre *Trichosporon*. Les faux négatifs sont observés lors des infections précoces et souvent avant l'apparition de colonies cryptococciques en culture (**Perfect and Bicanic, 2015**). Ces tests possèdent deux avantages importants pour le suivi biologique de la cryptococcose: un titre antigénique élevé (> 1: 1024) dans le sérum et/ou le LCR au moment du diagnostic est corrélé à un moins bon pronostic (échec mycologique de la thérapie antifongique avec rechute dans les 10 semaines suivant le diagnostic), hypertension intracrânienne (HTIC), et lésions spécifiques à l'imagerie cérébrale (**Jarvis et al., 2014; Perfect and Bicanic, 2015**). Le stockage de l'antigène dans certaines cellules (macrophages, cellules tubulaires rénales, prostate) et sa lenteur de dégradation rendent inutile la répétition trop fréquente des titrages lors du suivi. En effet, l'augmentation des titres dans le LCR serait un argument en faveur d'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 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**).

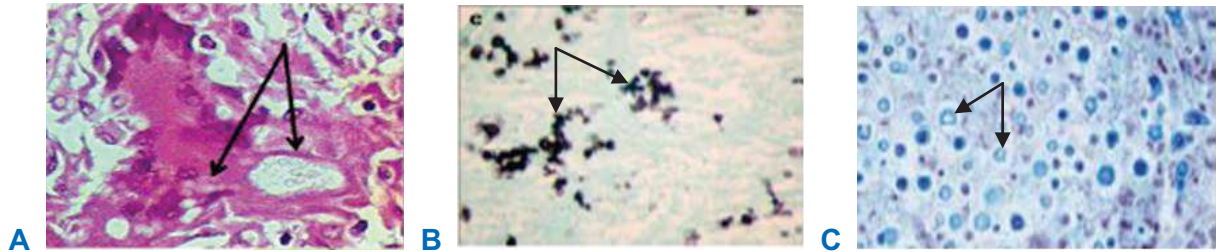
En 2009, un test immunochromatographique (LFA ou Lateral Flow Assay) pour la détection de l'antigène cryptococcique dans le sérum, le plasma ou le LCR a été développé. La technique est rapide et peu coûteuse (1.25 à 2.50 \$ US par test, selon le pays et le volume d'achat). La technique LFA a été comparée à celle d'agglutination au latex, à l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) et à la culture avec une excellente concordance (coefficient Kappa de 0.959 avec l'EIA) (**Lindsley et al., 2011**). Ce test est maintenant utilisé dans la pratique clinique comme un test «au lit du malade» pour l'administration préventive d'antifongiques dans les milieux à ressources limitées avec une incidence élevée du VIH et de la CNM (Figure 5) (**Perfect and Bicanic, 2015**).



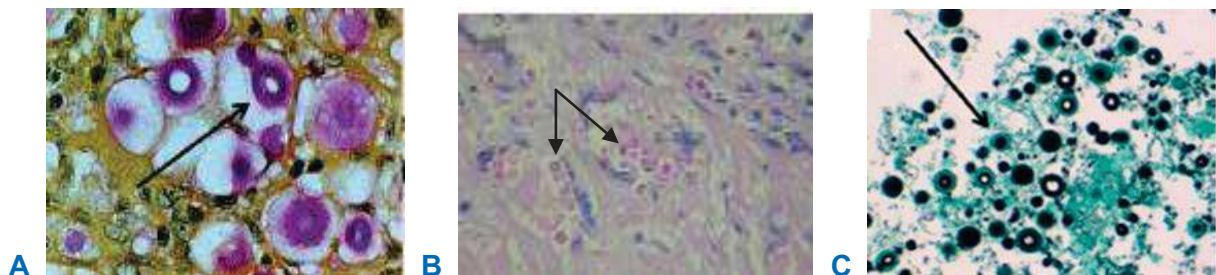
**Figure 5:** Mode opératoire du test Crypto Ag Lateral Flow Assay (**Lindsley et al., 2011**).

### VII.1.3. Diagnostic histopathologique

Cette méthode de diagnostic utilise des techniques classiques d'immunohistochimie. L'hématoxyline-éosine-safran (HES) permet une coloration bleue du noyau et rouge du cytoplasme mais est peu spécifique (figure 6A). La coloration argentique de Gomori-Grocott colore la paroi des champignons en brun-noir (figure 6B). Certains réactifs sont plus spécifiques. Par exemple, le bleu Alcian colore la capsule en bleu (figure 6C). Le mucicarmin colore les structures polysaccharides en noir alors que l'acide périodique de Schiff (PAS) les colore en rose fushia (figure 7A et 7B). L'imprégnation argentique à la méthénamine selon Gomori met en évidence la paroi cellulaire et ses bourgeonnements (figure 7C) (**Gazzoni et al., 2009**). La coloration de Fontana-Masson qui colore la mélanine en brun-noir semble être une méthode assez spécifique pour distinguer phénotypiquement ces espèces fongiques des autres champignons levuriformes dans les tissus (**Kwon-Chung et al., 1981**). De plus, elle peut être une méthode alternative pour diagnostiquer les formes non capsulées.



**Figure 6 :** Mise en évidence des cryptocoques après coloration à l'hématoxyline-éosine-safran (A), au Gomori Grocott (B) et au bleu Alcian (C) (Gazzoni *et al.*, 2009).



**Figure 7 :** Mise en évidence des cryptocoques après coloration au mucicarmin (A), à l'acide périodique de Schiff (B) et à l'imprégnation argentique à la méthénamine selon Gomori (C) (Gazzoni *et al.*, 2009).

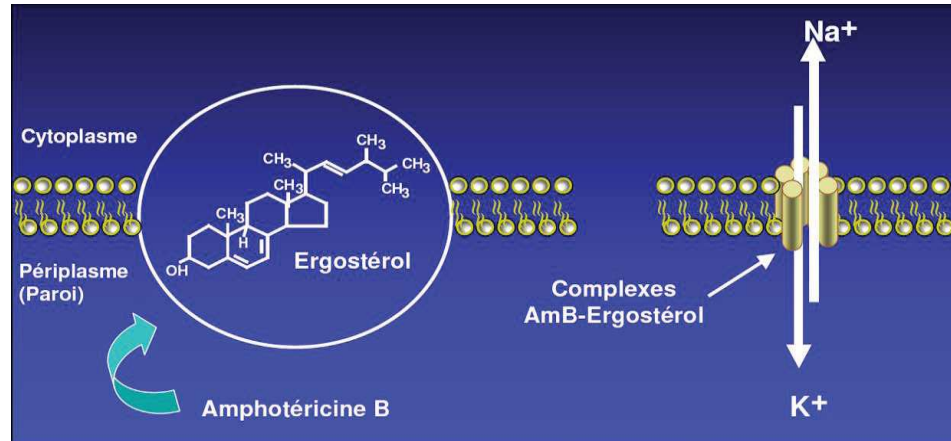
## VII.2. Traitement

### VII.2.1. Les antifongiques

Malgré la recherche permanente de nouvelles molécules et de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections cryptococciques est relativement limité. Les options thérapeutiques actuelles sont limitées à l'amphotéricine B (polyènes), les azolés et la flucytosine (analogue de la pyrimidine). En effet, trois classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique. Les polyènes ont une action directe sur la membrane plasmique fongique tandis que les dérivés azolés agissent au niveau de la synthèse des stérols et donc sur l'intégrité de la membrane plasmique fongique. La flucytosine inhibe la synthèse d'acides nucléiques (Cannon *et al.*, 2007; Georgopapadakou and Walsh, 1996; Ghannoum and Rice, 1999). Il existe 6 cibles potentielles pour les médicaments antifongiques chez *Cryptococcus* mais les molécules disponibles sur le marché n'agissent que sur 3 cibles (figure 8).







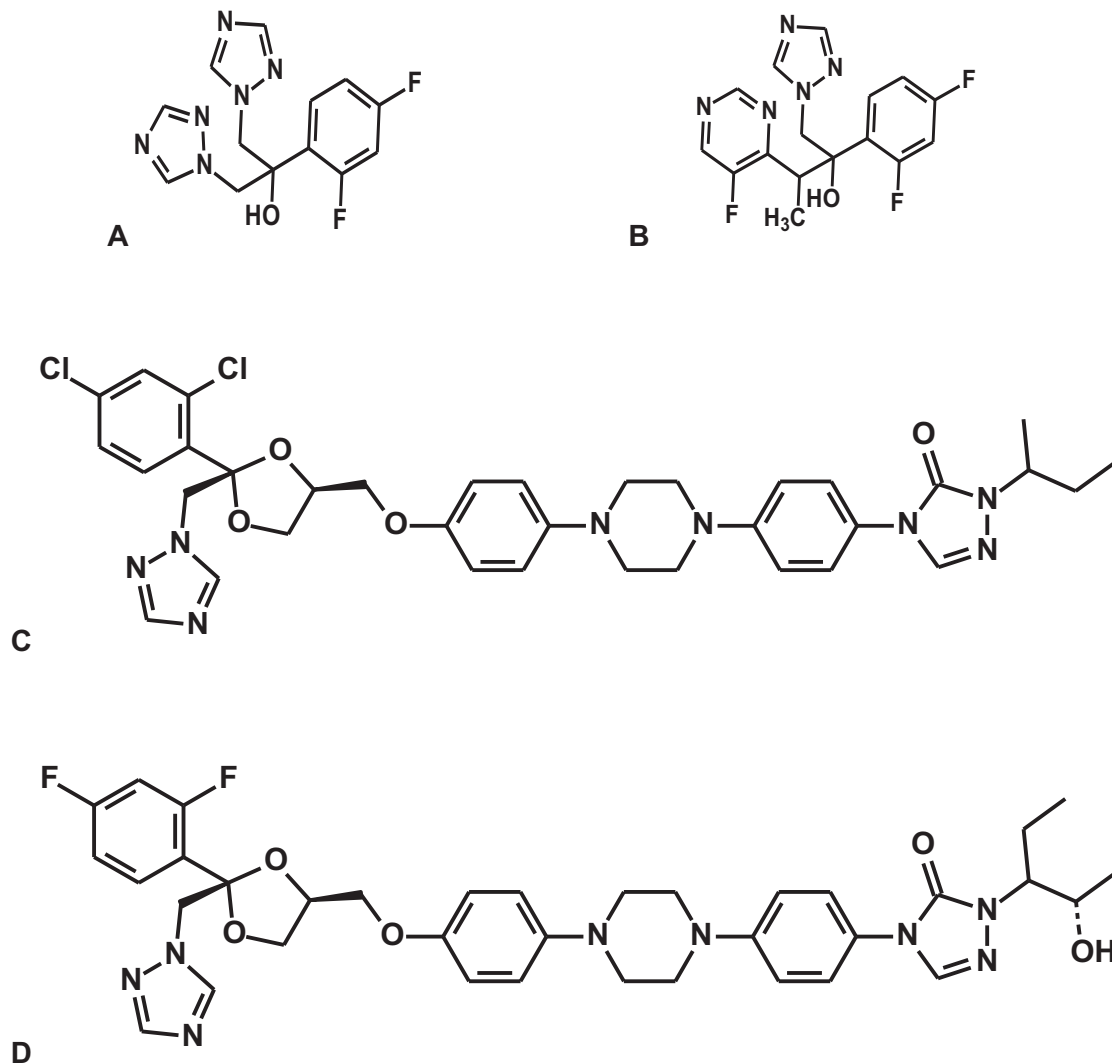
**Figure 10:** Interaction entre amphotéricine B et ergostérol dans la membrane de *Cryptococcus* (Ghannoum and Rice, 1999).

L'amphotéricine B (AMB) présente une excellente activité sur *Cryptococcus*, la résistance à cet antifongique est rare.

L'AMB a une mauvaise absorption intestinale et une faible diffusion tissulaire et liquidienne. Elle est responsable d'une néphrotoxicité due à la similitude de structure entre l'ergostérol des levures et le cholestérol des membranes cellulaires humaines. En raison de cette mauvaise tolérance, des formulations lipidiques d'AMB ont été développées: en complexe lipidique (Abelcet®), incorporé dans des liposomes (Ambisome®), en dispersion colloïdale et émulsion lipidique d'AMB et d'Intralipide® à 20%. En pratique, seule l'Ambisome® a obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la CNM chez le PVVIH à la posologie de 3 mg/kg/jour. A cause de cet effet secondaire majeur, il faut contrôler régulièrement la fonction rénale et l'équilibre électrolytique. L'AMB peut être utilisée par voie orale mais on constate une mauvaise absorption intestinale ou par voie intraveineuse. Cette dernière forme, qui est la plus stable est préconisée pour le traitement de la CNM. Il existe des interactions médicamenteuses néfastes entre l'AMB et les antiarythmiques cardiaques, les digitaliques, les hypokaliémiants.

### VII.2.1.2. Les triazolés

Le fluconazole, l'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole sont les seuls triazolés utilisés pour traiter la CNM (figure 11) (Georgopadakou and Walsh, 1996).



**Figure 11:** Structure chimique du fluconazole (A), du voriconazole (B), de l'itraconazole (C), et du posaconazole (D) (Warrilow *et al.*, 2010).

Ils inhibent la lanostérol-14- $\alpha$ -déméthylase (codée par le gène ERG11) de la levure qui catalyse une étape primordiale de la biosynthèse de l'ergostérol (figure 12). Ce mécanisme mène à l'accumulation de stérols intermédiaires dont les stérols 14 $\alpha$ -méthylés toxiques pour la cellule. Ce mécanisme d'action aboutit également à la formation d'une membrane plasmique avec une structure et des fonctions altérées rendant ainsi cette dernière plus fragile (Cannon *et al.*, 2007; Georgopapadakou and Walsh, 1996; Ghannoum and Rice, 1999). Cette enzyme n'est pas présente chez l'homme, ce qui explique la spécificité des azolés (Cannon *et al.*, 2007; Georgopapadakou and Walsh, 1996).

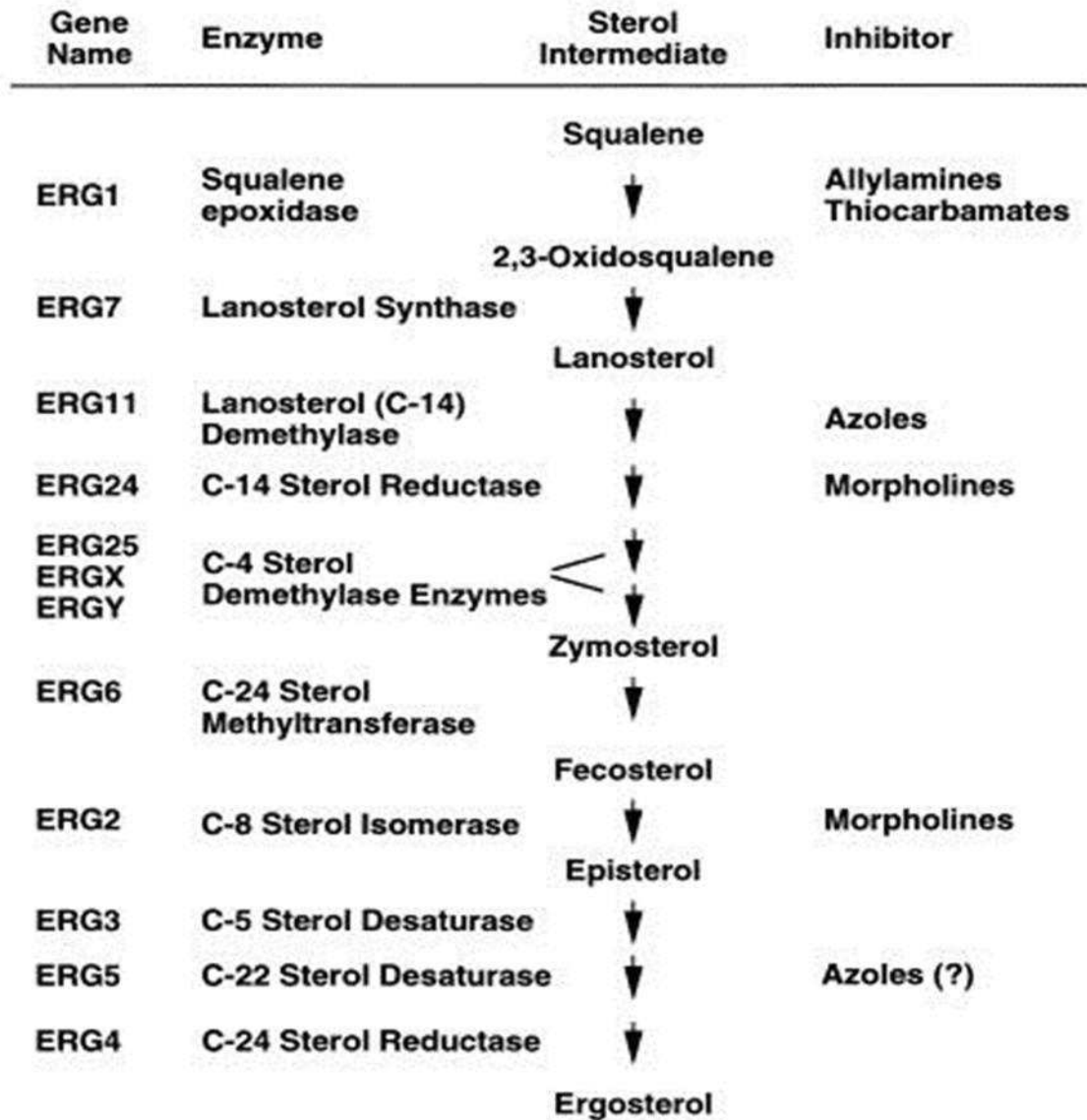


Figure 12: Voie de synthèse de l'ergostérol (Ghannoum and Rice, 1999).

L'efficacité du fluconazole a été démontrée dans la prise en charge de la CNM. L'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole ne seront jamais utilisés en première intention dans la prise en charge de la CNM, mais en cas de résistance ou de rechute (Perfect et al., 2006). Chacune de ces molécules s'utilise à des posologies différentes et se présente sous des formes galéniques variées, offrant des voies d'administration adaptées aux besoins du patient. Le fluconazole, Triflucan® est disponible sous forme de gélule, suspension, injectable ou poudre orale. L'itraconazole, Sporanox® existe sous forme de suspension buvable et gélule. Le posaconazole, Noxafil® existe en suspension buvable mais est réservé à l'usage hospitalier. Enfin, le voriconazole, Vfend® se présente sous forme de comprimés, poudre injectable, poudre orale et suspension buvable.

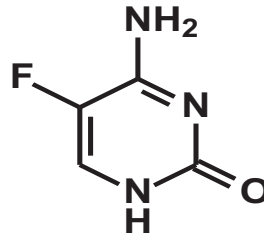


Plusieurs études ont démontré que le voriconazole et le posaconazole sont plus actifs *in vitro* contre les espèces du complexe *C. gattii* que le fluconazole, et par conséquent, ils peuvent représenter des alternatives au traitement de première intention (**Hagen et al., 2010; Iqbal et al., 2010; Lockhart et al., 2012; Tay et al., 2006; Trilles et al., 2012**).

Le voriconazole est l'azolé qui engendre le plus d'effets secondaires tels que les œdèmes périphériques, l'hypotension et les phlébites. C'est un inhibiteur puissant du cytochrome P450. Il est déconseillé de le prendre avec un inhibiteur de protéase comme le ritonavir. Cela provoque une baisse très importante des concentrations de l'antifongique par une augmentation de son métabolisme, avec risque d'échec du traitement.

### VII.2.1.3. La 5-fluorocytosine

La 5-fluorocytosine (flucytosine ou 5FC) est un analogue de la pyrimidine (figure 13). Pour être efficace, cette prodrogue a besoin d'une transformation. Elle pénètre dans la cellule fongique grâce à une cytosine perméase où elle est ensuite métabolisée en 5-fluorouracile (5-FU) par la cytosine désaminase, puis en 5-FU monophosphate par l'uridine phosphoribosyl-transférase (UPRT) (**Polak and Scholer., 1975; Vermes et al., 2000**).



**Figure 13:** Structure chimique de la flucytosine (**Cannon et al., 2007**).

Son action antifongique s'exerce en inhibant la synthèse protéique par incorporation à l'ARN et par inhibition de la thymidilate synthétase, enzyme essentielle de la biosynthèse de l'ADN (**Vermes et al., 2000**). Elle présente une très bonne diffusion tissulaire avec une élimination rénale (90%) mais elle possède un spectre d'activité limité à cause d'une forte résistance innée. Cependant, son association à l'amphotéricine B est synergique, justifiant les stratégies thérapeutiques combinant leur usage simultané pour le traitement de la CNM (**Cannon et al., 2007; Georgopapadakou and Walsh, 1996; Ghannoum and Rice, 1999; Perfect and Bicanic, 2015; Perfect et al., 2010; Vermes et al., 2000**).

## VII.2.2. Traitement de la cryptococcose neuroméningée

Les personnes qui développent une cryptococcose peuvent être regroupées en trois catégories: celles qui ont une infection à VIH, celles qui ont des transplantations d'organes impliquant un traitement immunosuppresseur, et enfin, les patients non transplantés et non-VIH sans trouble immunitaire évident. Bien que la gestion clinique et la thérapie antifongique de tous les groupes soient similaires, l'approche thérapeutique est adaptée à chaque cas. Le protocole thérapeutique publié en 2010 pour la CNM chez les PVVIH repose sur une thérapie d'induction avec AMB déoxycholate (0,7-1 mg/kg/jour) et 5FC (100 mg/kg/jour) pendant deux semaines, suivie d'un traitement de consolidation de 8 semaines avec le FCZ (400 mg/jour), puis 200 mg/jour de FCZ jusqu'à la restauration de l'immunité de l'hôte (**Perfect et al., 2010**). Le traitement est identique en cas d'infection par les espèces du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* (**Perfect et al., 2010**).

Bien que la thérapie combinée soit la plus efficace contre *Cryptococcus* chez les PVVIH, l'AMB et la 5FC sont rarement disponibles en Afrique subsaharienne (**Jackson and Hosseinipour, 2010; Jarvis et al., 2008**). Les patients sont donc généralement traités en monothérapie à l'aide du FCZ, pouvant laisser craindre l'apparition de résistance.

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 SNC (**Gomez-Lopez et al., 2008**). L'interféron gamma est utilisé comme thérapie adjuvante chez les patients en échec au traitement antifongique à un stade avancé du VIH (**Perfect and Bicanic, 2015**). Chez les patients immunocompétents ayant une infection due aux espèces du complexe *C. gattii*, les corticostéroïdes sont utilisés avec succès pour contrôler les symptômes et réduire la taille des lésions inflammatoires surtout dues à la restauration immunitaire (**Chen et al., 1997; Seaton et al., 1997**).

La prise en charge de la CNM comprend également des mesures prophylactiques dirigées contre les complications pouvant survenir au cours de l'infection. En effet, malgré l'existence d'antifongiques efficaces et de protocoles adaptés et validés, l'infection peut se compliquer, ce qui nécessite des mesures thérapeutiques supplémentaires. Les complications les plus souvent rencontrées sont la persistance ou les rechutes, l'élévation de la pression du LCR et la réaction du syndrome de restauration immunitaire (IRIS).

La persistance ou la cryptococcose réfractaire sont définies comme une infection persistante confirmée par l'isolement du cryptocoque dans le LCR après 8 semaines de traitement antifongique à dose efficace et correctement conduit selon les recommandations en vigueur. La rechute est définie comme la réactivation de l'infection confirmée par la prolifération de levures viables au niveau d'un site stérile après une période de cultures négatives (**Nascimento et al.,**

**2016**). La prise en charge des rechutes commencera par vérifier que les mesures adéquates ont été prises pour améliorer le statut immunitaire du patient (traitement ARV et diminution des immunosuppresseurs). En cas de résistance médicamenteuse avérée, certains auteurs suggèrent d'utiliser le voriconazole (400 mg/j per os) ou le posaconazole (800 mg/j per os) (**Perfect et al., 2010**).

L'hyperpression intracrânienne ou HTIC (> 20 cm d'H<sub>2</sub>O) est une complication extrêmement fréquente associée à une perte visuelle et auditive parfois profonde et irréversible. En dehors des facteurs liés à l'hôte, une combinaison de charge fongique élevée et une infection par des souches hautement capsulées obstruant la sortie du LCR peuvent expliquer une HTIC (**Bicanic et al., 2007; Perfect and Bicanic, 2015**). Les conjugués fongiques et les effets inflammatoires sont responsables des troubles cérébraux fréquemment observés dans la CNM. La prise en charge des HTIC passe par des ponctions lombaires déplétives voire des drains lombaires percutanés temporaires qui sont fortement favorables à la survie du patient (**Perfect et al., 2010**).

Le syndrome de restauration immunitaire est l'ensemble des manifestations cliniques de nature inflammatoire survenant quelques semaines après la mise en route d'un traitement ARV chez un PVVIH très immunodéprimé. L'IRIS se manifeste suite à la restauration du nombre de lymphocytes CD4 (**Perfect and Bicanic, 2015**). Pour la prise en charge de l'IRIS, le traitement antifongique ne devra pas être remis en cause et aucune prise en charge médicamenteuse ne sera réalisée si les symptômes sont mineurs, étant donné que ceux-ci disparaîtront spontanément en quelques semaines. Pour les inflammations majeures telles que celles du SNC avec augmentation de la pression intracrânienne, on a recours aux corticoïdes: 0,5 à 1 mg/kg/j de prednisone ou dexaméthasone pendant 2 à 6 semaines. Malgré l'usage de médicaments antifongiques efficaces et l'emploi de stratégies thérapeutiques adaptées, on remarque l'émergence de résistance aux antifongiques.

### VII.2.3. Les résistances aux antifongiques

La résistance peut être définie comme une diminution de la sensibilité à un antifongique mesurée *in vitro* par une méthode standardisée. On mesure le plus souvent la concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme la plus petite concentration d'antifongique qui donne une réduction visible de la croissance de l'inoculum par rapport au témoin de culture sans antifongique. Il existe deux types de résistances chez les levures: les résistances secondaires ou acquises qui se développent en réponse à une exposition à l'antifongique et la résistance naturelle qui caractérise tout microorganisme résistant avant même d'être confronté à l'antifongique (**White et al., 1998**).

Les échinocandines (caspofungine, anidulafungine et micafungine), qui ciblent la  $\beta$ -(1-3)-glucane synthase, sont fongicides contre un certain nombre d'agents pathogènes fongiques telles que les espèces de *Candida* mais sont inefficaces contre *Cryptococcus* (**Thompson et al., 1999**). En dépit de la sensibilité de la cible enzymatique à la drogue, les raisons de la résistance innée de *Cryptococcus* aux échinocandines étaient inconnues. Récemment, il a été démontré que la mutation du gène CDC50, qui code pour une sous-unité de la membrane lipidique jouerait un rôle important dans la résistance innée de *Cryptococcus* aux échinocandines (**Huang et al., 2016**).

Chez les azolés, de nombreux mécanismes moléculaires permettant à *Cryptococcus* de résister aux antifongiques ont été décrits:

- **Les pompes à efflux**

Au niveau des membranes cellulaires (fongiques, bactériennes et animales), il existe des transporteurs très ubiquitaires qui ont pour rôle de rejeter en dehors des cellules, une grande variété de substances, dont les médicaments. Ces transporteurs sont appelés «pompes» ou «protéines d'efflux». Chez *Cryptococcus*, les pompes de type ABC (ATP-Binding Cassette) utilisant l'ATP comme source d'énergie pour le transfert sont impliquées dans la résistance aux antifongiques azolés. S'il y a surexpression de ces protéines d'efflux, il y aura par conséquent une diminution de la concentration intracellulaire d'antifongique et donc une moindre efficacité. Par exemple, la surexpression du gène MDR1, qui a été initialement cloné par **Thornewell et al.**, en 1997 dans une souche hyper sensible de *Saccharomyces cerevisiae* a donné lieu à une résistance accrue au fluconazole et à l'itraconazole. Dans un second temps, les connaissances acquises à partir de l'étude de cet organisme modèle ont servi pour *Cryptococcus*. Ces résultats révèlent que les pompes à efflux codées par les gènes MDR chez *Cryptococcus* lui confèrent une résistance aux azolés (**Morschhauser, 2010; Niimi et al., 2006; Thornewell et al., 1997**). De même, les pompes à efflux de type AFR1 chez *Cryptococcus* lui confèrent une certaine résistance aux azolés (**Posteraro et al., 2003, Sanguinetti et al., 2006**).

- **Altérations de la cible des médicaments**

La 14 $\alpha$ -déméthylase codée par le gène ERG11 est la cible des azolés. *C. neoformans* et *C. deneoformans* s'adaptent aux concentrations élevées de fluconazole en dupliquant les chromosomes sur lesquels est situé le gène ERG11 codant pour la 14 $\alpha$ -déméthylase (**Sionov et al., 2010**).

Des cas de souches résistantes à l'amphotéricine B présentant une activité stérol delta 8-7 isomérase défectueuses ont été décrites (**Kelly et al., 1994**).

- **L'hétéro-résistance**

Un autre phénomène de résistance, appelé hétéro-résistance a été décrit chez *Cryptococcus*. Ce mécanisme permet à une seule cellule de donner une progéniture hétérogène constituée de phénotypes variés dont certains sont extrêmement résistants au fluconazole ou au voriconazole. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la sélection des clones hétéro-résistants suite à une exposition antérieure au fluconazole (**Yamazumi et al., 2003**).

De nombreux auteurs ont décrit des cas de résistance à l'amphotéricine B suite à une modification de la biosynthèse de l'ergostérol, mais cela ne semble pas être le seul mécanisme de résistance (**Kelly et al., 1994**). En effet, un autre mécanisme qui conduit à une résistance croisée à la fois aux polyènes et aux azolés a été décrit, sans rapport avec les changements dans la biosynthèse des stérols, comme précédemment identifié chez *S. cerevisiae*. La fréquence avec laquelle la résistance croisée a lieu ( $10^{-8}$ ) a suggéré qu'une simple mutation était responsable de la résistance à la fois aux azolés et aux polyènes (**Joseph-Horne et al., 1995**).

## **VIII. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE *CRYPTOCOCCUS***

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses méthodes de typage moléculaire ont été développées pour étudier la diversité génétique des cryptocoques.

### **VIII.1. PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction)**

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 varient en fonction des individus du fait de la variabilité du gène cible choisi. Le polymorphisme entre individus d'une même espèce est visualisé grâce au polymorphisme de leur ADN. Cette technique permet aussi de montrer les relations génétiques qui peuvent exister entre individus. Elle est très utilisée pour le typage moléculaire du complexe d'espèces *C. neoformans* / *C. gattii* après amplification du gène *URA5* (orotidine monophosphate pyrophosphorylase) (**Boekhout et al., 2001; Cogliati et al., 2013; Everett and Andersen, 1999**). Elle présente l'avantage d'utiliser de faibles quantités d'ADN par rapport à la RFLP par Southern blot. Par contre, le pouvoir discriminant de cette méthode dépend du locus amplifié et de sa variabilité.

## VIII.2. Analyse du polymorphisme de longueur des régions microsatellites et minisatellites ou MLP (Microsatellites Length Polymorphism)

Dès que l'ADN des organismes supérieurs a pu être analysé, il est apparu que la séquence d'un locus donné pouvait varier d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce. Ces variations sont stables, et sont le support moléculaire de la diversité phénotypique intra-spécifique des individus. Les premiers polymorphismes génotypiques mis en évidence furent les RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), qui sont des variations ponctuelles de séquence, touchant un site de restriction. Les minisatellites furent par la suite découverts. Ils appartiennent à la catégorie de «polymorphisme de répétition». Ils sont dus à des différences dans le nombre de copies de séquences répétées en tandem. Dans le cas des minisatellites, les séquences répétées ont un motif de base de longueur supérieure à 10 nucléotides. En 1989, la technique de PCR a permis de révéler l'existence d'une deuxième catégorie de polymorphisme de répétition, où le motif de base est plus court : de 1 à 6 nucléotides : ce sont les microsatellites (ou STR : *Short Tandem Repeats*).

Le nombre de répétitions du motif de base chez les microsatellites varie en général de dix à soixante. Les microsatellites avec un motif de base de 2 nucléotides sont les plus fréquents et les plus étudiés. Notons que plus le microsatellite est long, plus le nombre d'allèles observé est grand. Les mécanismes pouvant expliquer la grande variabilité individuelle des répétitions au sein des microsatellites sont le glissement de l'ADN polymérase au cours de la réplication et la recombinaison entre deux motifs en positions différentes. Comme chaque microsatellite (défini par sa localisation en un site chromosomique précis) présente, d'un individu à l'autre, des variations du nombre de motifs qui le constituent, ils représentent de bons marqueurs génétiques moléculaires.

Par ailleurs, plusieurs caractéristiques des microsatellites en font des marqueurs idéaux :

- ils sont très nombreux dans le génome humain, le plus souvent multi-alléliques c'est-à-dire très informatifs;
- méthodologiquement, leur emploi est plus simple que celui des autres marqueurs, car la PCR rend leur analyse automatisable.

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 (**Richard et al., 2008**). La technique a été appliquée pour la première fois à *Cryptococcus* en 1993, montrant une forte corrélation entre les génotypes et sérotypes (**Meyer et al., 1993**). Cette méthode a démontré un haut pouvoir discriminant lors de l'étude de souches de *Cryptococcus* (**Bertout et al., 2013; Escadon et al., 2006; Illnait-Zaragozi et al., 2010b; Meyer et al., 1993; Sorell et al., 1996**).



### VIII.3. Amplification sélective de fragments de restriction génomique (AFLP)

L'AFLP permet l'amplification d'un grand nombre de marqueurs moléculaires répartis au sein des génomes procaryotes et eucaryotes (**Bovers et al., 2008b**). Elle consiste: 1) au clivage de l'ADN génomique avec des enzymes de restriction; 2) la ligature d'adaptateurs spécifiques aux extrémités cohésives des fragments génomiques clivés; 3) l'amplification d'une partie des segments générés par PCR avec des amorces spécifiques des adaptateurs; 4) la séparation des fragments amplifiés par électrophorèse sur gel à haute résolution. L'AFLP est plus efficace que la PCR-RFLP et combine une spécificité élevée et une haute résolution. Cette technique permet d'attribuer un profil unique pour chaque souche et l'étude de gènes de virulence (**Byrnes et al., 2009; Kidd et al., 2004; Litvintseva et Mitchell, 2009**). En revanche, la procédure est longue et nécessite de nombreux appareillages (**Mueller and Wolfenbarger 1999**).

### VIII.4. Typage par séquençage multi-locus (MLST)

Son principe repose sur l'identification de la variation allélique au sein du génome de l'espèce à étudier, le plus souvent sur des gènes «de ménage» ne subissant pas de pression de sélection. En pratique, on réalise une PCR suivie d'un séquençage d'ADN génomique (ADNg). A chaque allèle est attribué un numéro dans la base de données spécialisée (<http://www.mycolab.net>). La combinaison des numéros d'allèles pour chaque isolat définit une séquence type (ST). Les résultats peuvent ensuite être comparés à la population globale pour chaque espèce ou à des sous-populations selon les indications accompagnant les souches déposées dans les banques (origine, génotype, résistance, etc.). L'analyse génétique des séquences obtenues lors des typages de MLST permet de réaliser des études de phylogénie et de génétique de populations, ce qui présente un intérêt majeur par rapport aux techniques précédentes. Le schéma MLST utilisé pour *Cryptococcus* a été entièrement normalisé en 2009 et concerne les loci *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* et *IGS1* (**Meyer et al., 2009**). Cependant, la MLST révèle des informations sur quelques gènes mais ne donne pas un aperçu du génome entier comme c'est le cas avec la whole-genome Sequence Typing (WGST), une variante de la MLST. Son utilisation est limitée par des coûts élevés et des exigences bio-informatiques (**Gillece et al., 2011**).

A cause de la nécessité d'une technique standardisée, le groupe de travail sur la cryptococcose de l'International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) a analysé toutes les techniques de typage appliquées à *Cryptococcus*. Ce groupe a reconnu que les méthodes MLST, AFLP et PCR-RFLP fingerprinting sont capables de produire des résultats comparables conduisant aux différents génotypes observés chez *Cryptococcus*. Ce groupe a



sélectionné la MLST comme méthode de choix pour le typage des souches à cause de son pouvoir discriminant élevé ainsi que sa reproductibilité entre différents laboratoires (**Meyer et al., 2009**). Le schéma MLST inclus six gènes (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*) dont trois gènes codent pour des facteurs de virulence cryptococciques (la capsule polysaccharidique, *CAP59*; la synthèse de la mélanine, *LAC1* et l'invasion cellulaire, *PLB1*), et l'espace intergénique, *IGS1*, qui a été choisi pour sa diversité allélique élevée (tableau 3).

**Tableau 3:** Marqueurs MLST utilisés pour le génotypage des souches du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* (**Meyer et al., 2009**).

Locus	Produit du gène	Localisation sur le chromosome	Nombre d'allèles décrits	Taille de la séquence analysée (bp)
<i>CAP59</i>	Protéine associée à la Capsule	1	12	559
<i>GPD1</i>	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	7	13	543
<i>LAC1</i>	Laccase	8	21	469
<i>PLB1</i>	Phospholipase	12	12	532
<i>SOD1</i>	Superoxyde dismutase	5	14	700
<i>URA5</i>	Orotidine monophosphate pyrophosphorylase	8	14	601
<i>IGS1</i>	Région intergénique du gène codant l'ARN ribosomal	2	10	723

L'étude du génome chez *Cryptococcus* permet ainsi de comprendre l'adaptation de ces champignons à leur environnement. C'est en 2005 que le premier génome de *C. neoformans* a été entièrement séquencé (**Loftus et al., 2005**). Il a une taille approximative de 19Mb organisé en 14 chromosomes de 762Kb à 2,3Mb. Il contient environ 6500 gènes. Il contient 65% de séquences homologues conservées, alors que 10% lui sont uniques et 25% ne correspondent pas à des séquences de basidiomycètes. Environ 5% du génome est constitué de transposons. La richesse en transposons serait responsable de l'instabilité du caryotype et de la génération de polymorphisme. Cette richesse en éléments répétés est inhabituel pour un micro-organisme et plus typique des eucaryotes supérieurs (**Loftus et al., 2005**). Par exemple, deux transposons actifs dans des souches de sérotype D se sont révélés être associés à des mutations spontanées conduisant à une résistance aux médicaments antifongiques (**Cruz et al., 1999**). L'analyse comparative du génome de *C. neoformans* VNI d'une part avec *C. gattii* (VGI) et d'autre part avec *C. deuterogattii* (VGII) a révélé une identité respective de 87% et 85,6% (**D'Souza et al., 2011**). Le

séquençage complet du génome, les récents progrès dans la biologie moléculaire et l'étude de l'interaction *Cryptococcus*-hôte ont considérablement fait progresser notre compréhension de cette levure pathogène.

# **CHAPITRE 2**

## **MATERIEL ET METHODES**

## PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

La cryptococcose méningée (CNM) est la deuxième infection opportuniste la plus fréquente et la mycose systémique la plus dangereuse au cours de l'infection à VIH. Sa gravité est liée au tropisme de la levure pour le système nerveux central. A l'échelle mondiale, 1 million de cas annuel sont recensés dont 624 700 décès survenant dans les trois premiers mois après l'infection. Alors que la disponibilité de la thérapie antirétrovirale (ARV) dans les pays développés a contribué à réduire les infections cryptococciques, la CNM est encore un problème majeur dans les pays en développement. En Afrique subsaharienne, la CNM est la cause la plus fréquente de méningite chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH). En Côte d'Ivoire, malgré la disponibilité des ARV, la CNM demeure une infection opportuniste fréquente et sévère chez les PVVIH. L'identification moléculaire de ou des espèces en cause tout comme l'analyse de leur profil de sensibilité aux antifongiques de référence n'ont pas encore été documentées. De plus, le réservoir environnemental de cette infection fongique n'a jamais été étudié. Les relations épidémiologiques entre les réservoirs humains et environnementaux restent mal établies alors qu'elles conditionnent l'évaluation du risque infectieux et la prévention.

Pour cela, nous nous sommes proposés de répondre à plusieurs questions très importantes en mycologie médicale:

- i) Quelle est l'épidémiologie moléculaire globale de la CNM chez le PVVIH ?
- ii) Quelle est la diversité génétique du cryptocoque entre patients et chez un même patient au cours du suivi?
- iii) Existe-t-il une corrélation entre souches cliniques et environnementales?
- iv) Quelles est la sensibilité aux antifongiques de référence des souches isolées? Existe-t-il une corrélation entre la sensibilité et le profil génétique des souches isolées?

Pour proposer des réponses à ces interrogations et améliorer notre compréhension de l'épidémiologie moléculaire de cette infection fongique en Côte d'Ivoire, nous avons récolté et analysé des échantillons d'origines cliniques et environnementales et nous nous sommes proposés d'atteindre différents objectifs (1, 2 et 3).

- **Objectif 1 : Etudier la diversité génétique globale et la sensibilité aux antifongiques de *Cryptococcus* chez des PVVIH atteints de la CNM.**

Pour décrire la diversité génétique du cryptocoque de manière globale chez le patient atteint de CNM à Abidjan, nous avons analysé le LCR de 61 PVVIH présentant un

syndrome méningé. Pour chaque culture positive, nous avons analysé l'isolat de départ et 3 à 5 colonies isolées (363 isolats au total) par une combinaison de techniques classiques de typage moléculaire (PCR-RFLP du gène *URA5*, M13, (GACA)<sub>4</sub> et (GTG)<sub>5</sub>). En parallèle, nous avons testé le profil de sensibilité aux trois antifongiques de références utilisés dans le traitement de la CNM.

- **Objectif 2 : Comparer la diversité génétique et la sensibilité aux antifongiques de *Cryptococcus* entre patients et chez un même patient au cours du suivi.**

A travers cet objectif, nous avons voulu savoir quelle était la diversité génétique et la sensibilité aux antifongiques au cours du suivi chez un même patient et entre patients afin d'estimer la proportion de rechutes dues à des infections persistantes, nouvelles ou à une résistance aux antifongiques. Nous avons utilisé 41 prélèvements issus de 13 patients chez lesquels, au moins 2 cultures positives à *Cryptococcus* ont été obtenues. Comme précédemment décrit dans l'objectif 1, la culture initiale et 5 colonies isolées (246 isolats au total) ont été analysées par PCR multiplex, PCR-RFLP du gène *URA5* et MLST sur 7 gènes. Parallèlement, la sensibilité aux antifongiques de référence (FCZ, 5FC et AMB) par la méthode de microdilution du CLSI a été déterminée pour tous les isolats.

- **Objectif 3 : Comparer la diversité génétique et la sensibilité aux antifongiques de *Cryptococcus* entre isolats cliniques et environnementaux.**

Afin de déterminer la source éventuelle et le mode de contamination de nos patients, nous avons poursuivi la collecte de prélèvements à partir de biotopes naturels (518 fientes de pigeons et 149 issus d'arbres) dans l'environnement proche des patients. Contrairement aux deux précédentes études, seuls les isolats initiaux sont testés. Douze isolats issus de l'environnement et 12 d'origine humaine sont analysés puis comparés par la combinaison de plusieurs techniques de typage moléculaire (PCR multiplex, PCR-RFLP du gène *URA5*, mini (M13) et microsatellites (GACA)<sub>4</sub> et (GTG)<sub>5</sub>). Parallèlement, l'étude de la sensibilité aux antifongiques de référence est étudiée par la méthode de microdilution du CLSI.

Cette étude s'est déroulée tout d'abord au Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA et les autres maladies infectieuses (CeDReS), situé au sein du CHU de Treichville, Abidjan, Côte d'Ivoire. Ce centre a une triple activité: le diagnostic des maladies infectieuses et plus particulièrement le VIH, la recherche opérationnelle et la recherche fondamentale. Le centre est doté d'un plateau technique performant et inscrit dans une démarche qualité pour l'accréditation OMS. Nous avons d'abord effectué le recueil des prélèvements puis le diagnostic à partir du LCR des patients infectés par le VIH. Il est dirigé par le Professeur Hervé Menan. Afin de permettre la réalisation de l'étude dans le centre, une clairance administrative a été obtenue auprès de la Direction du CeDReS, puis une clairance éthique auprès du Comité National d'Ethique (annexe 3).

Dans un second temps, l'étude de l'épidémiologie moléculaire et du profil de sensibilité aux antifongiques de référence a été réalisé au laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale de l'UFR de Pharmacie de Montpellier, équipe «Recherche clinique, Infections parasitaires et fongiques» de l'UMI 233, INSERM U1175. Ce laboratoire est dirigé par le Professeur Sébastien Bertout.

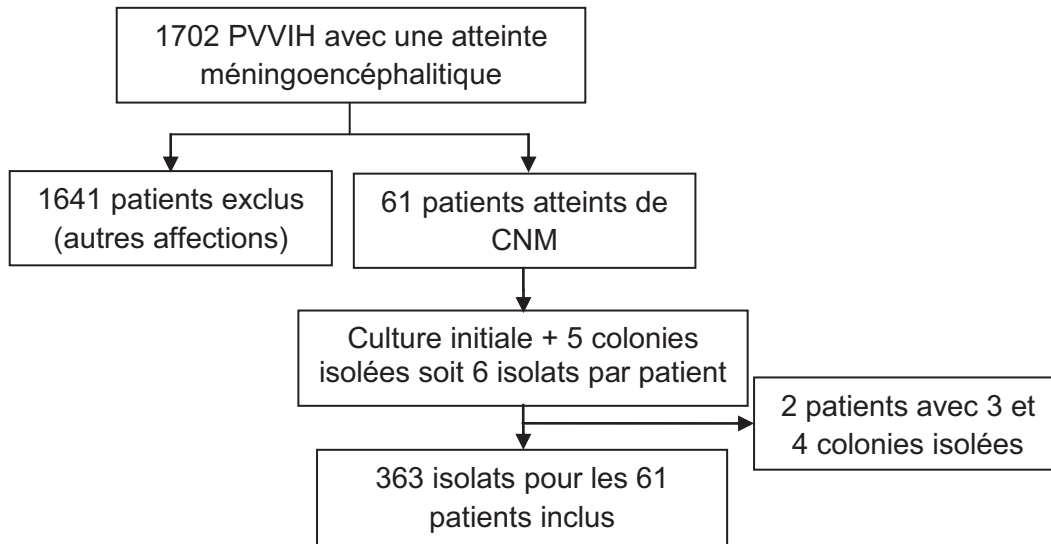
## **I. TYPE, DUREE, LIEU ET POPULATION D'ETUDE**

Notre travail est une étude prospective, descriptive de la cryptococcose neuroméningée. Nous avons recruté de façon exhaustive, tous les patients présentant un syndrome méningo-encéphalitique fébrile ou non durant la période de mai 2012 à septembre 2015 à Abidjan. En parallèle, nous avons recueilli des prélèvements dans l'environnement proche des patients.

## **II. ETUDE CLINIQUE**

De mai 2012 à septembre 2014, nous avons recruté 1702 PVVIH présentant une méningoencéphalite dans les trois centres hospitaliers universitaires (CHU) de la ville d'Abidjan. Les patients sont inclus dans l'étude si leur examen clinique révèle un syndrome méningé fébrile ou non, indiquant la réalisation d'une ponction lombaire et si la présence de cryptocoque est mise en évidence après examen biologique du LCR. Sont exclus de l'étude, les patientes enceintes, les patients VIH négatif ou ayant déjà été traités au fluconazole. La culture initiale et 3 à 5 colonies isolées (4 à 6 isolats) ont été analysées pour 61 patients par PCR multiplex et une combinaison de plusieurs techniques de typage moléculaire (PCR-RFLP du gène *URA5*, mini (M13) et microsatellites ( $(GACA)_4$  et  $(GTG)_5$ ). Parallèlement, la sensibilité aux antifongiques de référence (FCZ, 5FC et AMB) par la méthode de microdilution du CLSI a été déterminée pour tous les isolats.

Le protocole expérimental de recueil des 363 isolats des patients sans suivi est présenté à la figure 14.

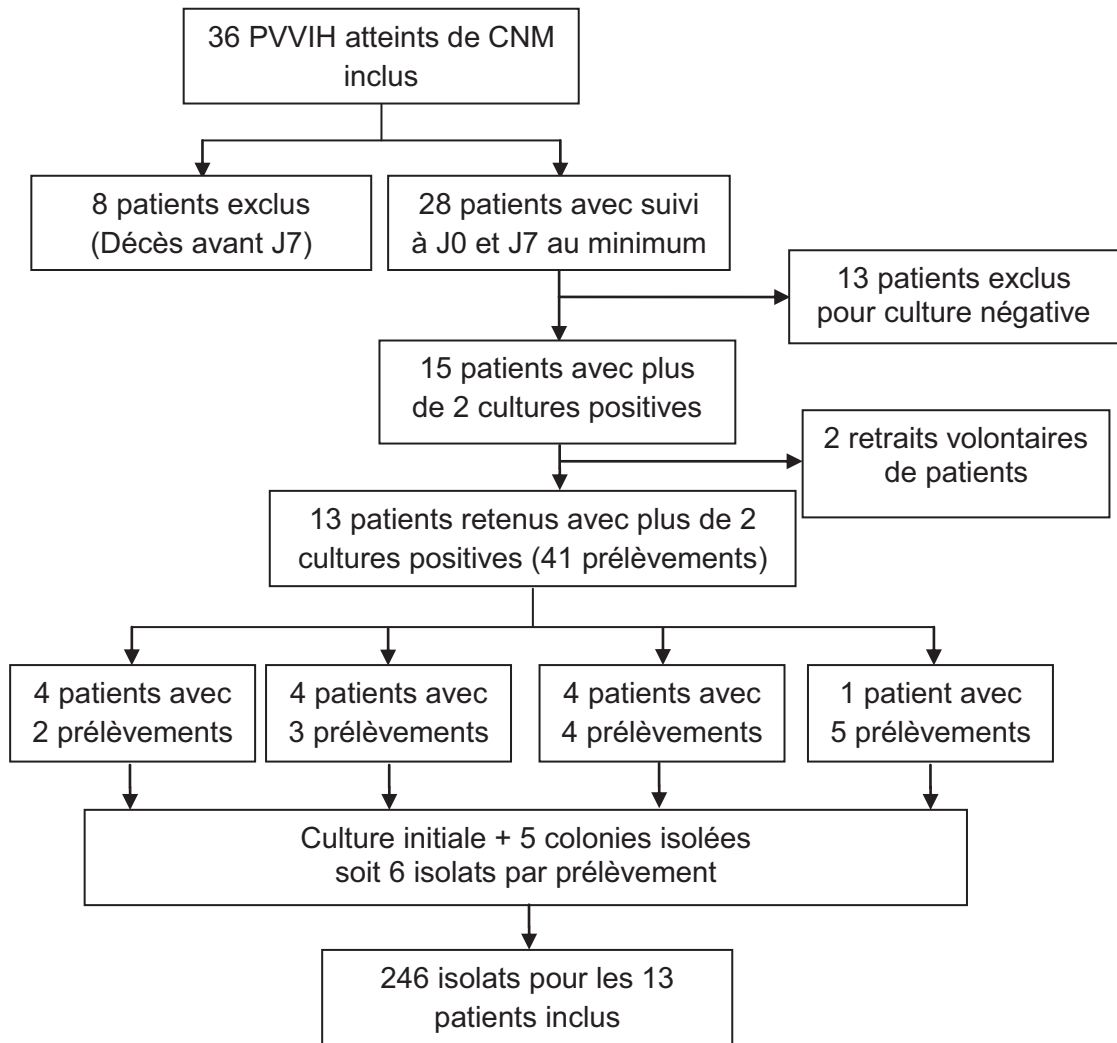


**Figure 14:** Protocole expérimental de recueil des 363 isolats des patients sans suivi.

De mai 2014 à septembre 2015, nous avons inclus une cohorte de 36 PVVIH atteints de CNM pour lesquels un suivi longitudinal a été réalisé uniquement au service des maladies infectieuses et tropicales (SMIT) du CHU de Treichville à travers l'essai 12257 de l'ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales). Ces patients n'ont reçu ni de traitement ARV ni de traitement antifongique avant l'inclusion. La CNM est traitée chez ces patients (uniquement dans le cadre de cet essai ANRS) avec du FCZ à forte dose (1600 mg/j) associé à la 5FC (100 mg/kg/j) pendant deux semaines, suivi d'un traitement de consolidation de 8 semaines avec le FCZ (800 mg/jour), puis 200 mg/jour de FCZ jusqu'à la restauration de l'immunité. Nous disposons pour chaque patient de plusieurs prélèvements réalisés à intervalles réguliers (J0, J7, J14, J28, S10, S20, S24) (J = jour, S= semaine) sauf si le patient décède avant la fin de son suivi. Nous avons récolté 41 prélèvements espacés d'au moins 7 jours pour 13 patients chez lesquels, au moins 2 cultures positives à *Cryptococcus* ont été obtenues. La méthode d'obtention et d'analyse des isolats est décrite dans la figure 15. La culture initiale et 5 colonies isolées (6 isolats) ont été analysées par PCR multiplex, PCR-RFLP du gène *URA5* et MLST. Parallèlement, la sensibilité aux antifongiques de référence (FCZ, 5FC et AMB) par la méthode de microdilution du CLSI a été déterminée pour tous les isolats.



Le recueil de données est réalisé à l'aide d'une fiche individuelle d'enquête (annexe 4) qui comprend les données démographiques, cliniques, biologiques, le traitement et l'évolution clinique des patients.

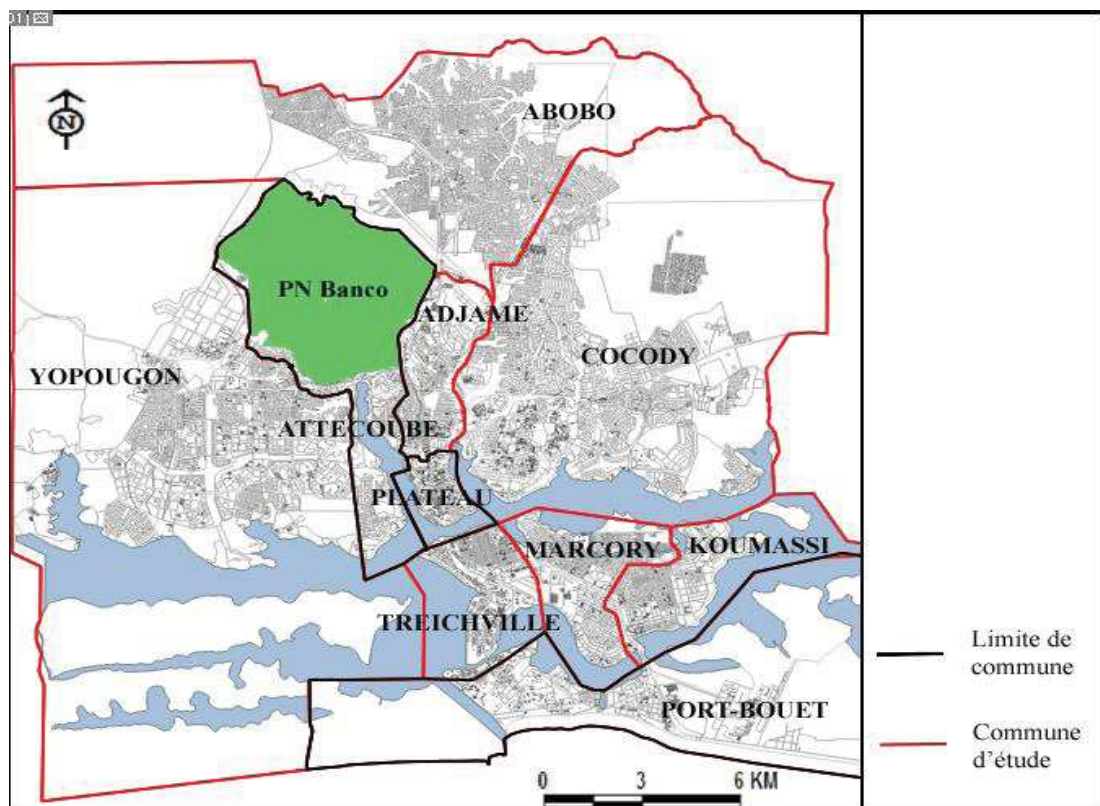


**Figure 15:** Protocole expérimental de recueil des souches des patients suivis.

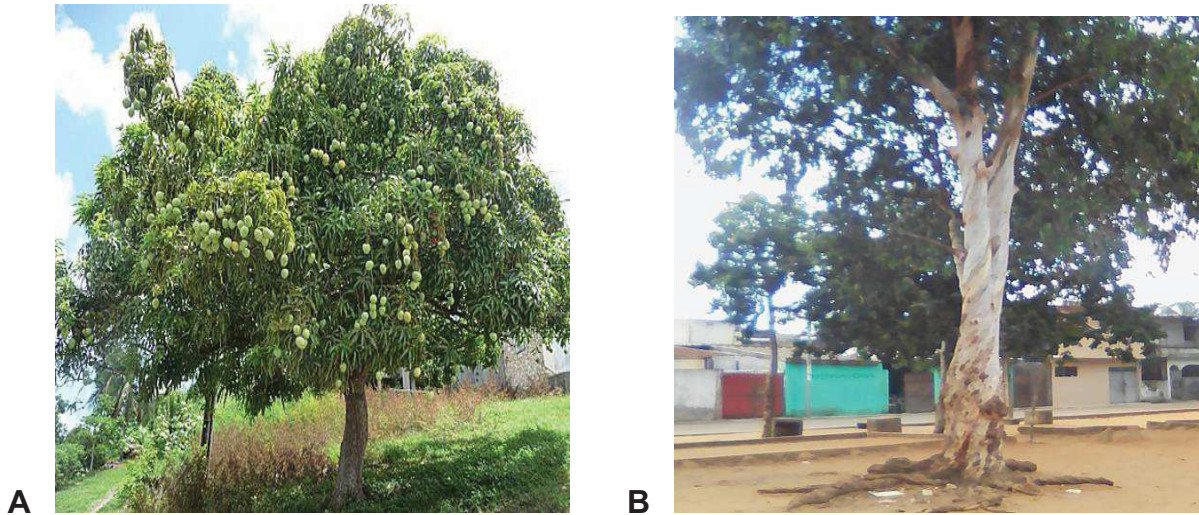
A partir de la cohorte ANRS, nous avons récupéré 12 isolats. Ces 12 isolats sont issus de patients atteints de CNM mais qui n'ont pas de suivi dans le temps (décès du patient avant J7 ou culture mycologique négative à partir de J7). Ces patients sont issus de 7 communes sur les 10 que compte la ville d'Abidjan. Parallèlement, nous avons effectué des prélèvements dans l'environnement proche de ces patients. La méthode d'étude de ces isolats est différente de celle présentée dans la première partie de notre travail. En effet, pour avoir une vision d'ensemble, seuls les isolats cliniques de départ (J0) sont analysés.

### III. ETUDE ENVIRONNEMENTALE

Parallèlement à l'étude clinique, nous avons effectué des prélèvements environnementaux dans plusieurs communes (Abobo, Adjamé, Cocody, Koumassi, Marcory, Treichville et Yopougon) de la ville d'Abidjan (figure 16). Ces sept communes sont les lieux de résidence des patients sans suivi de la cohorte ANRS que nous avons retenus. Ces prélèvements environnementaux ont été collectés à partir de fientes de pigeons (n=518) et des creux d'arbres (n=149) (intérieur des cavités ou fissures) d'*Eucalyptus camaldulensis* (figure 17A) et de *Mangifera indica* (figure 17B) avec un écouvillon stérile. Cet écouvillon a été préalablement humidifié dans 3 ml d'une solution saline stérile (0,85% de NaCl) supplémentée avec du chloramphénicol (10 mg / ml).



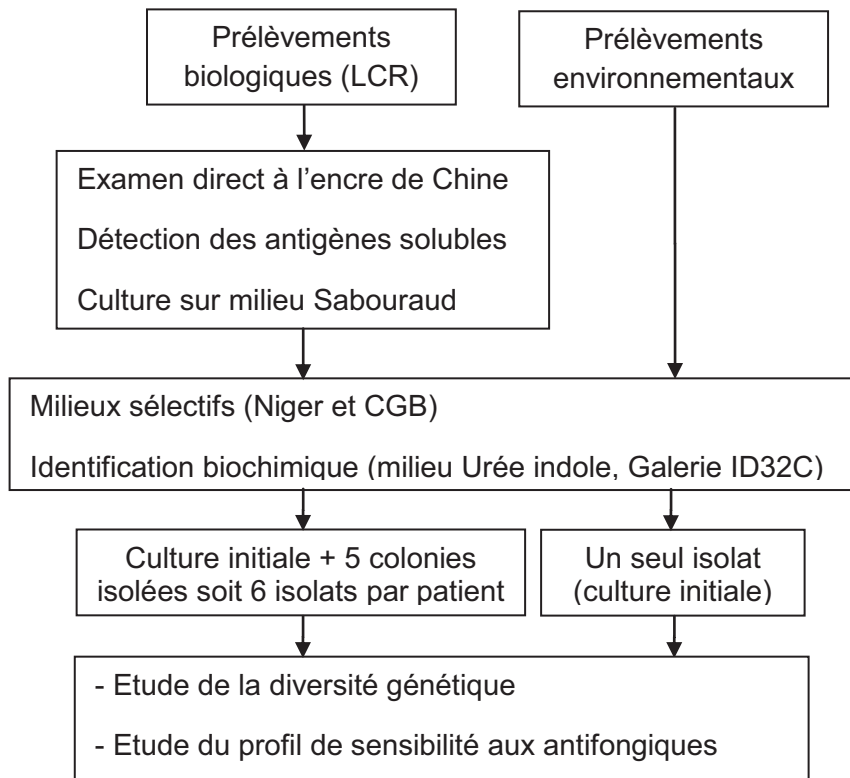
**Figure 16:** Sites de recueil des prélèvements environnementaux à Abidjan, Côte d'Ivoire (source : BNETD, Côte d'Ivoire).



**Figure 17** : *Mangifera indica* (A) et *Eucalyptus camaldulensis* (B) (Photo personnelle, Kassi, 2015).

#### **IV. PROCEDURE D'ANALYSE DES SOUCHES CLINIQUES ET ENVIRONNEMENTALES**

A partir du LCR ou des prélèvements environnementaux, un protocole d'analyse a été utilisé tel que décrit dans la figure 18. Il se compose de quatre grandes phases: le diagnostic biologique, l'identification phénotypique, l'étude de la diversité génétique et le profil de sensibilité aux antifongiques.



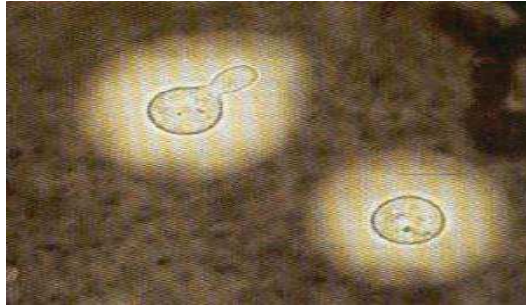
**Figure 18:** Procédure d'analyse des souches cliniques et environnementales.

#### IV.1. Examen direct

Au laboratoire, les prélèvements sont conservés à température ambiante et traités, dès la réception. En cas d'impossibilité, le prélèvement est stocké quelques heures entre +2 et +8°C.

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

**Examen direct à l'encre de Chine (EDEC):** Le culot de centrifugation du LCR est examiné entre lame et lamelle après contre coloration à l'encre de Chine diluée au 1/3. En effet, les particules de l'encre sont repoussées par la capsule, ce qui entraîne l'apparition d'un halo clair autour de la levure. La mise en évidence de levures capsulées (sphériques à ovoïdes, de taille variable de 3 à 10  $\mu\text{m}$ ) est un élément majeur du diagnostic (figure 19).



**Figure 19** : Mise en évidence de la capsule du cryptocoque par l'encre de Chine (x1000) ([www.anofel.net](http://www.anofel.net)).

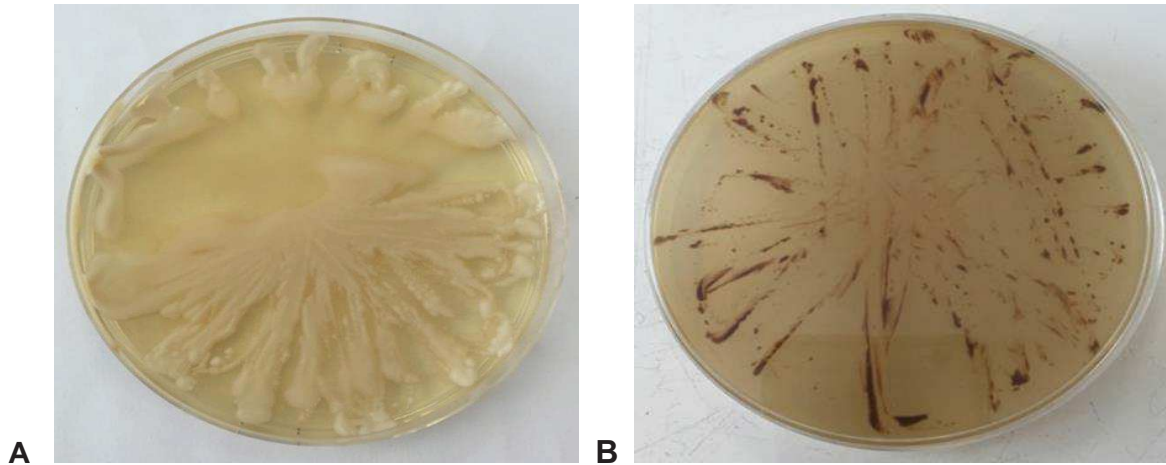
#### **IV.2. Détection des antigènes solubles de *Cryptococcus***

Le test est basé sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées par un anticorps anti-cryptocoque avec les antigènes capsulaires polysaccharidiques de *Cryptococcus* contenus dans l'échantillon biologique (**Dromer et al., 1987**). Le protocole est réalisé suivant les recommandations du fabricant du kit Pastorex<sup>™</sup> Crypto Plus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

#### **IV.3. Mise en culture**

Le culot de centrifugation (3000 tours par minute pendant 10 minutes) du LCR est ensemencé (par stries) sur du milieu Sabouraud Chloramphénicol (SC) et incubé à 37°C. Si la culture est positive, des colonies muqueuses beiges apparaissent dans les 3 premiers jours, puis elles deviennent brunâtres au bout d'une semaine (figure 20A).





**Figure 20:** Colonies de *Cryptococcus* après culture sur milieu Sabouraud (A) et Niger (B) (Photo personnelle, Kassi, 2015).

Pour le diagnostic différentiel avec d'autres levures, le milieu aux graines de Niger (*Guizotia abyssinica*) est utilisé (figure 20B). Le protocole de préparation du milieu est réalisé comme précédemment décrit par **Staub et al., 1987** (annexe 5). Brièvement, la culture fraîche sur Sabouraud est repiquée sur le milieu Niger, et incubée à 37°C pendant 3 à 5 jours. Les colonies de cryptocoques deviennent marron sur le milieu Niger.

Pour les prélèvements environnementaux, après agitation au vortex, 10 µl du prélèvement sont déposés sur le milieu aux graines de Niger et incubés à 37°C. Les boîtes sont observées quotidiennement pendant 2 semaines. Les colonies de couleur marron sont isolées et repiquées sur ce milieu jusqu'à obtention d'une culture pure.

*NB : Les souches de cryptocoques obtenues et soigneusement conservées (-20°C) en cryobilles ont été acheminées à Montpellier. Les prélèvements environnementaux ont été acheminés dans des cryotubes à température ambiante.*

#### IV.4. Identification biochimique

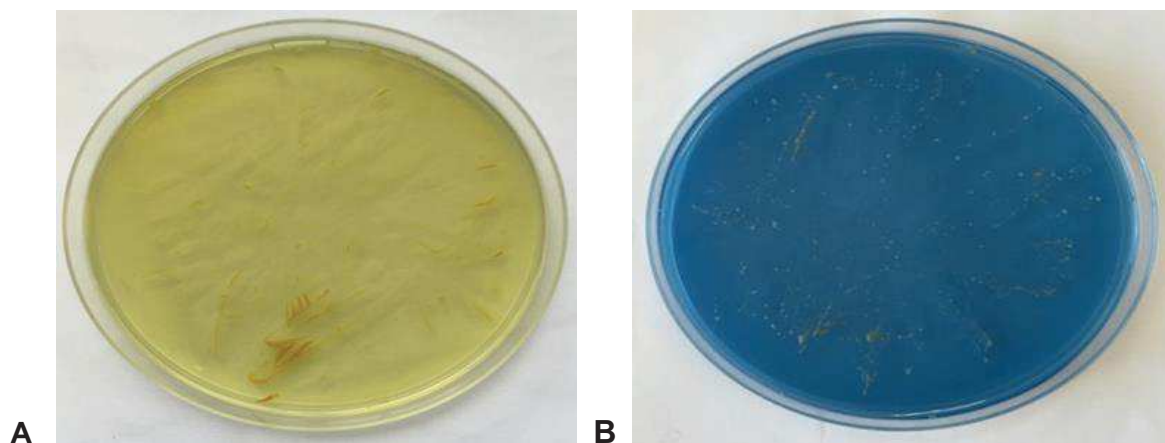
**Test de sécrétion d'uréase:** Les levures du complexe d'espèces *C. neoformans* / *C. gattii* sécrètent une uréase qui dégrade l'urée en ion ammonium et gaz carbonique. Cette hydrolyse dans le milieu urée indole s'accompagne d'une alcalinisation du milieu qui provoque le virage du rouge de phénol au violet (**Cox et al., 2000**). Quelques colonies sont introduites dans un tube contenant 1ml d'urée indole, homogénéisées et incubées à 37°C pendant 3 heures. Le virage de l'indicateur coloré au violet indique que les colonies possèdent une uréase (**Cox et al., 2000**).

**Test d'assimilation des sucres:** L'auxanogramme permet d'identifier les levures du genre *Cryptococcus*. Le test est réalisé par ensemencement de galeries commercialisées en suivant les

recommandations du fabricant (Biomérieux®, Marcy-L'étoile, France). Brièvement, 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 liquide. Les levures poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture se fait par comparaison aux témoins de croissance après 48 heures d'incubation à 30°C. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique fourni par le fabricant.

#### IV.5. Identification phénotypique

Elle est réalisée avec le milieu CGB (figure 21). Son protocole de préparation est réalisé comme précédemment décrit par **Klein et al., 2009; McTaggart et al., 2011; Staib et al., 1987** (annexe 6). Le milieu CGB est ensemencé à partir des colonies présentes sur Sabouraud et l'incubation est réalisée à 37°C pendant 1 semaine. Seules, les espèces du complexe *C. gattii* vont pousser et faire virer le milieu en bleu (figure 21B).



**Figure 21:** Colonies de *Cryptococcus* après culture sur milieu CGB (Photo personnelle, Kassi, 2015).

(B) La couleur bleue du milieu CGB est due à l'hydrolyse de la glycine par les espèces du complexe *C. gattii* alors que les espèces du complexe *C. neoformans* ne parviennent pas à hydrolyser la glycine, la couleur du milieu reste verte (A).

### V. ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE

#### V.1. Isolement des clones

Après la caractérisation biochimique et phénotypique de la souche de cryptocoque isolée à partir du LCR, un repiquage est effectué sur milieu Sabouraud chloramphénicol. Un



ensemencement par cadran est réalisé pour obtenir des colonies isolées en boîte de Pétri et incubé 48 heures à 37°C. Cinq colonies prises au hasard sont récupérées sur des boîtes individuelles qui sont à nouveau incubées 48 heures à 37°C. Au terme de cette étape, on dispose pour chaque prélèvement de LCR, de 5 colonies et de la culture issue du prélèvement initial soit 6 isolats. Cette étape d'isolement des clones n'a pas été réalisée pour les souches environnementales.

## V.2. Extraction de l'ADN

L'ADN génomique (ADNg) est extrait par le principe de lyse alcaline (fixation sur membrane de silice à l'aide des sels chaotropiques) à l'aide du kit d'extraction NucleoSpin blood quick (Macherey-Nagel Gmb et Co. KG, Duren, Allemagne) avec quelques modifications. A cause de la présence de la capsule, une étape préalable est ajoutée. La culture de 48 heures est introduite dans un tube contenant des billes de verre (Glasperlen Braun Biotech International) et 350 µl de tampon de lyse (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA). Les cellules subissent 5 cycles de broyage (broyeur cellulaire MagnaLyser (Roche)) à 6000 vibrations par minutes pendant 40 secondes. Entre chaque passage, les tubes sont refroidis à 4°C pendant 30 secondes. Cette opération permet de casser les capsules, les parois et les membranes pour libérer le contenu intracellulaire. Après cette étape de broyage, le lysat est traité par le kit d'extraction. L'ADNg est dosé à l'aide du biophotomètre (Eppendorf). Brièvement, l'ADNg 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 en présence de faible force ionique à pH alcalin (**Nedjma et al., 2005**).

## V.3. Diversité génétique des espèces du complexe *C. neoformans* / *C. gattii*

Les étapes de PCR ont été réalisées dans deux appareils différents: Primus 96 (Clemens GMBH Dachdeckerstr, 5 97297 Waldbuettelbrunn) et Techne TC-5000 (Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA). Toutes les amorces, les dNTPs et l'eau contenant du Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) ont été fournies par Sigma Aldrich, St Louis, USA.

### V.3.1 Sérotypage par PCR multiplex

Le sérotypage des espèces du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* a utilisé simultanément 6 amorces pour amplifier les gènes de l'antigène capsulaire CAP64 et de la laccase LAC1. En effet, l'amplification des gènes de la laccase LAC1 permet de différencier les sérotypes A, B, C, et D mais ne différencie pas le sérotype D de l'hybride AD, ce qui est possible par amplification du gène CAP64. Les séquences d'amorces utilisées sont présentées dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Séquences des amorces utilisées pour le sérotypage par PCR multiplex (Ito-Kuwa *et al.*, 2007).

Amorces	Séquences
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 ont été décrites par Ito-Kuwa *et al.*, 2007. Les conditions expérimentales de la PCR sont les suivantes: 10 ng d'ADNg, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de chaque amorce LAC1, 0,05 µM de chaque amorce CAP64, H<sub>2</sub>O DEPC (qsp 50 µL) et 2,5 u de *Taq* polymérase (Promega Co, Road·Madison, USA) dans du tampon approprié 1X. Les conditions d'amplification sont les suivantes: dénaturation initiale 94°C, 3 minutes; pour chaque cycle: dénaturation 94°C, 30 secondes; hybridation 47°C, 60 secondes; extension 72°C, 1,5 minutes pendant 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% en présence de bromure d'éthidium (BET, 5 µg/ml) et du marqueur de poids moléculaire (Ladder 100 pb, Promega) avec une visualisation sous lumière UV.

### V.3.2. Typage moléculaire par PCR-RFLP du gène *URA5*

Le gène de l'orotidine monophosphate pyrophosphorylase (*URA5*) est utilisé pour étudier le polymorphisme génétique des espèces du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* et permet de les classer en huit types moléculaires VNI, VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII et VGIV (Meyer *et al.*,

**2003**). Les endonucléases *HhaI* 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**. Le mélange réactionnel contient 50 ng d'ADNg, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de chaque amorce URA5 et SJO1, H<sub>2</sub>O DEPC (qsp 50 µL) et 0,5 u de *Taq* polymérase (Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France) dans du tampon approprié 1X (**Bertout et al., 2013**). Les conditions d'amplification sont les suivantes: dénaturation initiale 94°C, 2 minutes; pour chaque cycle: dénaturation 94°C, 45 secondes; hybridation 61°C, 60 secondes; extension 72°C, 2 minutes pendant 35 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 10 minutes (**Meyer et al., 2003**).

Les fragments de PCR sont digérés à l'aide de 15 u d'enzymes de restriction *Sau96I* et *HhaI* (Thermo scientific, USA).

*Sau96I* reconnaît le site de coupure suivant:



*HhaI* reconnaît le site de coupure suivant:



Le mélange réactionnel de digestion contient 10 µL de produit PCR, 15 u de chaque enzyme *Sau96I* et *HhaI* et H<sub>2</sub>O DEPC (qsp 33 µL) dans du tampon approprié 0,6X. Après incubation à 37°C pendant 5 heures, les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en présence de BET et du marqueur de poids moléculaire (Ladder 100 pb) (**Meyer et al., 2003**).

### V.3.3. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> et minisatellite M13.

Les microsatellites (GACA)<sub>4</sub> (5' GACAGACAGACAGACA 3') et (GTG)<sub>5</sub> (5'GTGGTGGTGGTGGTG 3') ainsi que le minisatellite du phage M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-

3') sont utilisés pour l'étude de la diversité génétique chez les espèces du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* (**Meyer et al., 2003**).

Les conditions de réalisation des PCR ont été décrites par **Meyer et al., 2003**. Le mélange réactionnel (M13) contient 50 ng d'ADNg, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 μM de l'amorce M13, H<sub>2</sub>O DEPC (qsp 50 μL) et 0,5 u de *Taq* polymérase (Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France) dans du tampon approprié 1X. Le mélange réactionnel (GACA)<sub>4</sub> ou (GTG)<sub>5</sub> est identique à celui de l'amorce M13. Cependant, la quantité en MgCl<sub>2</sub> est de 1,5 mM. Les conditions d'amplification de M13 et (GTG)<sub>5</sub> sont les suivantes: dénaturation initiale 94°C, 3 minutes; pour chaque cycle: dénaturation 94°C, 30 secondes; hybridation 50°C, 60 secondes; extension 72°C, 1,5 minutes pendant 40 cycles avec une extension finale à 72°C pendant 6 minutes (**Meyer et al., 2003**). Les conditions d'amplification de (GACA)<sub>4</sub> sont les suivantes: dénaturation initiale 94°C, 3 minutes; pour chaque cycle: dénaturation 94°C, 30 secondes; hybridation 40°C, 60 secondes; extension 72°C, 1,5 minutes pendant 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, Germany) à 120V pendant 1h 45 minutes. Ces gels haute résolution permettent la séparation à 2 bases près, des fragments d'ADN de hauts poids moléculaires (jusqu'à 2000 pb). Les profils obtenus sont traités à l'aide du logiciel Gene Tools (Syngene) puis enregistrés dans une base de données dédiée du logiciel Gene Directory (Syngene). Gene Directory permet d'obtenir la génération d'un dendrogramme à partir de cette base de données par comparaison des profils de migration soit en expérience simple (profils obtenus à partir d'une seule amorce) soit en expérience croisée (ensemble des profils obtenus pour l'ensemble des amorces).

#### V.3.4. Typage moléculaire par MLST

Sept gènes de ménage sont analysés par MLST selon le schéma décrit par l'ISHAM. Il s'agit des loci *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* et la région *IGS1*. A partir de l'ADNg de chaque isolat, une réaction d'amplification pour chaque locus est réalisée. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 5.

Le mélange réactionnel contient 20 ng d'ADNg, 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,6 μM de chaque amorce (sens et anti sens), H<sub>2</sub>O DEPC (qsp 50 μL) et 0,025 u de *Taq* polymérase (Promega Co, Road·Madison, USA) dans du tampon approprié 1X. Les conditions d'amplification sont basées sur le schéma MLST de consensus avec quelques modifications (tableau 5).

**Tableau 5:** Séquences et conditions d'amplification des 7 loci MLST (Meyer *et al.*, 2009)

Locus	Produit du gène	Séquence (5'→3')	Conditions d'amplification
<i>CAP59</i>	Gène impliqué dans la synthèse de la capsule	CTCTACGTCGA GCAAGTCAAG	95°C 2min; <b>30 cycles:</b> 95°C 30s, 52°C 30s, 72°C 2min; 72°C 5min
<i>GPD1</i>	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	CCACCGAACCC TTCTAGGATA	95°C 3min; <b>35 cycles:</b> 95°C 45s, 51°C 1min, 72°C 2min; 72°C 5min
<i>LAC1</i>	Laccase	CTCTACGTCGAGCAAG TCAAG	95°C 3min; <b>35 cycles:</b> 95°C 1min, 52°C 1min30, 72°C 2min; 72°C 5min
<i>PLB1</i>	Phospholipase	CTTCAGGCGGA GAGAGGTTT	95°C 2min; <b>30 cycles:</b> 95°C 30s, 52°C 30s, 72°C 2min; 72°C 5min
<i>SOD1</i>	Superoxyde dismutase	AAGCCTCT CATCCATATCTT	95°C 2min; <b>30 cycles:</b> 95°C 30s, 48°C 30s, 72°C 2min; 72°C 5min
<i>URA5</i>	Orotidine monophosphate pyrophosphorylase	ATGTCCTCCCA AGCCCTCGAC	95°C 3min; <b>35 cycles:</b> 95°C 45s, 56°C 1min, 72°C 2min; 72°C 5min
<i>IGS1</i>	Région inter génique du gène codant pour l'ARN ribosomal	ATCCTTTGCAGA CGACTTGA	95°C 2min; <b>30 cycles:</b> 95°C 30s, 50°C 30s, 72°C 2min; 72°C 5min

Après avoir vérifié la qualité de la PCR par migration sur gel d'agarose à 1,5% en présence de BET, les produits de PCR sont séquencés avec l'amorce sens du locus correspondant par Beckmann Coulter Genomics, Angleterre.

**Analyse des séquences:** La qualité des séquences a été contrôlée par examen visuel des chromatogrammes et analysée en utilisant le logiciel BioEdit. Les extrémités 5' et 3' ont été retirées de l'analyse des séquences afin d'éliminer les portions correspondant aux pics mal définis et/ou de faible hauteur sur le chromatogramme. Les séquences ont été ensuite alignées avec le génome de référence dans la base de données MLST disponible sur internet (<http://www.mycolab.net>). Pour chaque loci, un allèle différent est assigné à un nombre aléatoire en utilisant le programme de base de données non redondante (<http://www.mycolab.net>). Chaque souche est alors définie par une séquence type (ST) sur la base de son profil allélique (7 allèles correspondant aux 7 loci). Cette étape a généré un fichier d'alignement qui constitue le premier fichier d'entrée pour le logiciel Phyloviz (Francisco *et al.*, 2012). Ce logiciel a permis l'étude des liens génétiques entre les ST des isolats en utilisant l'algorithme goeBURST implémenté dans le logiciel Phyloviz (Francisco *et al.*, 2012). Phyloviz a aussi permis de visualiser la partition ST selon les résultats des PCR et certaines données des patients.

**Arbres phylogénétiques:** Les méthodes les plus largement utilisées pour représenter une relation de parenté entre différents organismes sont le maximum de parcimonie et l'arbre de recouvrement minimum ou Minimum Spanning Tree (MST). Les arbres générés par ces deux méthodes sont différents. La méthode parcimonie suppose que deux échantillons ont évolué à partir d'un ancêtre commun ce qui donne un arbre dichotomique. En revanche, le MST choisit comme nœud (ou racine), l'échantillon qui a le plus grand nombre d'échantillons liés et déduit les autres à partir de ce nœud. Les arbres MST ne tiennent pas compte des séquences nucléotidiques mais uniquement des numéros d'allèles attribués pour chaque locus et du nombre de loci ayant des allèles différents. Chaque cercle correspond à un génotype. La taille du cercle est proportionnelle au nombre de souches de chaque type. Les relations phylogénétiques entre les différents ST ont été observées grâce à un arbre phylogénétique des séquences concaténées générées par le logiciel Phylovis. Afin de déterminer s'il y avait un lien entre les ST et un paramètre particulier, nous avons utilisé un test exact de Fisher et le test d'indépendance de khi-2 pour un risque  $\alpha$  de 5%. L'interprétation statistique utilisant la probabilité  $p$  se fait comme suit: si  $p \geq 0,05$ , alors la différence observée n'est pas significative; il n'existe pas de relation entre le ST et la variable étudiée au risque  $\alpha$  égal à 5%. Si  $p < 0,05$ , alors la différence observée est significative; il existe une relation entre le ST et la variable étudiée au risque  $\alpha$  égal à 5%. Ce test statistique a été réalisé grâce au logiciel SPSS.

Dans notre étude nous avons défini un clone comme étant l'unité minimale de diversité qui varie selon la méthode utilisée. Les complexes clonaux (CCs) sont définis comme des ensembles de souches apparentées qui diffèrent par 2 ou moins de 2 loci. Les singletons sont définis comme des ST différents par au moins 3 des 7 loci.

Le pouvoir discriminant d'une technique de typage est mesuré par l'indice de diversité de Simpson (1-D). Cet indice correspond à la probabilité que deux individus choisis au hasard dans une communauté appartiennent à deux espèces différentes.

$$D = \sum Ni (Ni-1)/N (N-1)$$

D : Indice de Simpson

Ni : nombre d'individus de l'espèce donnée.

N : nombre total d'individus.

L'indice 1-D variera entre 0 et 1. Plus il se rapproche de 1, plus les chances d'obtenir des individus d'espèces différentes sont élevées (Hunter and Gaston., 1988).

## VI. SENSIBILITE DES ESPECES DU COMPLEXE *C. NEOFORMANS* / *C. GATTII* A DIFFERENTS ANTIFONGIQUES PAR LA METHODE DE DILUTION EN MILIEU LIQUIDE

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).

### □ Préparation des dilutions des antifongiques et de l'inoculum

Les antifongiques testés sont le fluconazole (Pfizer Central Research, Sandwich, Kent, United Kingdom), la flucytosine (Valeant Pharmaceuticals, Zoetermeer, Pays-Bas) et l'amphotéricine B (Bristol Myers Squibb, Woerden, Pays-Bas). La quantité nécessaire pour la réalisation des solutions stock d'antifongiques est calculée de la manière suivante:

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

L'activité spécifique (nombre de micromoles de l'antifongique contenues dans la masse de poudre) est de 99,6% pour le FCZ, de 100% pour la 5FC et de 80% pour l'AMB. Le FCZ et la 5FC sont dissouts dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de tampon MOPS (acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique) tandis que l'amphotéricine B est dissoute dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Les concentrations testées sont les suivantes: de 0,125 à 64  $\mu\text{g/ml}$  pour le fluconazole et la flucytosine; de 0,03 à 16  $\mu\text{g/ml}$  pour l'amphotéricine B.

La préparation des solutions stock d'antifongiques et leurs dilutions ont été réalisées telles que décrites par le CLSI, 2008. Les concentrations finales sont ensuite réparties dans une plaque de 96 puits à raison de 100  $\mu\text{l}$  par puits, de la colonne 10 (plus faible concentration) à la colonne 1 (plus forte concentration). Les colonnes 11 et 12 reçoivent 100  $\mu\text{l}$  de milieu sans antifongique mais contenant du DMSO dilué à 1/50 pour l'amphotéricine B et du milieu RPMI 1640 pour le fluconazole et flucytosine.

### □ Préparation de l'inoculum et ensemencement des plaques

La solution de cryptocoque est préparée dans de l'eau distillée stérile (NaCl, 0,85%) à partir d'une culture de levure de 24 heures. Elle correspond à la concentration 1 de l'étalon de McFarland. Cet inoculum est ensuite dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du milieu RPMI. Ensuite, 100  $\mu\text{l}$  sont répartis dans chaque puits de la plaque excepté la colonne 11 (contrôle de stérilité) (tableau 6). Les plaques sont incubées à 37°C pendant 72 heures. Deux souches de référence, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 et *Candida krusei* ATCC 6258 sont utilisées dans chaque test comme contrôle qualité de la



conformité de la CMI obtenue avec celle publiée pour ces 2 souches. Tous les tests sont réalisés en double pour chacun des isolats.

**Tableau 6:** Schéma du protocole expérimental utilisé pour la détermination des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) du fluconazole, de la flucytosine et de l'amphotéricine B (CLSI, 2008).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

FCZ/5FC ( $\mu\text{g/ml}$ )	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0	0
AMB ( $\mu\text{g/ml}$ )	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0	0

Colonne 11 : Milieu sans antifongique et sans levures  
 Colonne 12 : Milieu sans antifongique mais avec levure

#### □ Lecture et interprétation

La CMI est mesurée après 48 heures et 72 heures d'incubation à 37°C. La croissance des levures est visualisée à l'aide d'un miroir de lecture incliné présentant le dessous des puits. La culture dans chaque puit est comparée à celle de la culture sans antifongique (colonne 12) ou du milieu RPMI seul (colonne 11). Un score numérique de 0 à 4 est attribué à chaque puit en utilisant l'échelle suivante:

- o **Score 4:** pas de réduction d'opacité par rapport à la culture sans antifongique (colonne 12).
- o **Score 3:** légère réduction d'opacité ( $\pm 25\%$  d'inhibition de pousse par rapport au témoin).
- o **Score 2:** forte réduction d'opacité (environ 50% d'inhibition de pousse par rapport au témoin).
- o **Score 1:** léger trouble (environ 75% d'inhibition de pousse par rapport au témoin).
- o **Score 0:** absence de culture.

La CMI pour l'amphotéricine B est définie comme la concentration la plus faible pour laquelle on observe un score égal à 0. Pour les azolés et la flucytosine, la CMI est définie comme la concentration la plus faible pour laquelle on observe un score égal à 2.

Pour catégoriser les souches de cryptocoques en résistant, intermédiaire ou sensible, le CLSI n'a pas encore publié de catégories de sensibilités comme c'est le cas pour le genre *Candida*. Certains auteurs ont défini des 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**). Les critères d'interprétation des résultats sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Critères d'interprétation de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* après 72 heures d'incubation (**Espinel Ingroff et al., 2012a et b; Pfaller et al., 2011**).

Antifongiques	Souche sensible ( $\mu\text{g/ml}$ )	Souche résistante ( $\mu\text{g/ml}$ )
Fluconazole	$\leq 8$	$\geq 16$
Flucytosine	$\leq 8$	$\geq 16$
Amphotéricine B	$\leq 1$	$\geq 1$

# **CHAPITRE 3**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## I. EPIDEMIOLOGIE ET SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES DE 363 ISOLATS CLINIQUES DE *CRYPTOCOCCUS* ISSUS DE PATIENTS VIH POSITIFS

### I.1. Caractéristiques de la population étudiée

Parmi les 1702 patients préinclus avec un syndrome méningé, la cryptococcose a été confirmée chez 3,6% (61/1702). Les femmes sont plus infectées (55,7%) que les hommes (44,3%). L'âge moyen des patients est de 39,7 ( $\pm$  8,7) ans. Près de la moitié (49,2%) ont un âge compris entre 30 et 40 ans. Les principaux motifs de consultation sont les céphalées (88,7%), la fièvre (67,2%), les troubles de la conscience (40%) et les convulsions (19%). Tous les patients sont infectés par le VIH 1. La numération des CD4 est réalisée chez 44 patients. Parmi eux, 72,7% ont des CD4  $<100/\text{mm}^3$ , 20,5% ont des CD4 compris entre 100 et  $200/\text{mm}^3$  et 6,8% ont des CD4  $>200/\text{mm}^3$ . Tous les malades sont traités par le FCZ dès la découverte de la CNM à la dose de 1200 mg/j. Le taux de mortalité est de 45,1%, 15 jours après le début du traitement antifongique.

Le LCR est majoritairement clair (75,4%), quelquefois trouble (16,4%). La glycorachie moyenne est de  $0,58 \pm 0,57$  g/l (0,04 à 3,72 g/l) et la protéinorachie moyenne de  $0,75 \pm 0,65$  g/l (0,02 à 4,05 g/l).

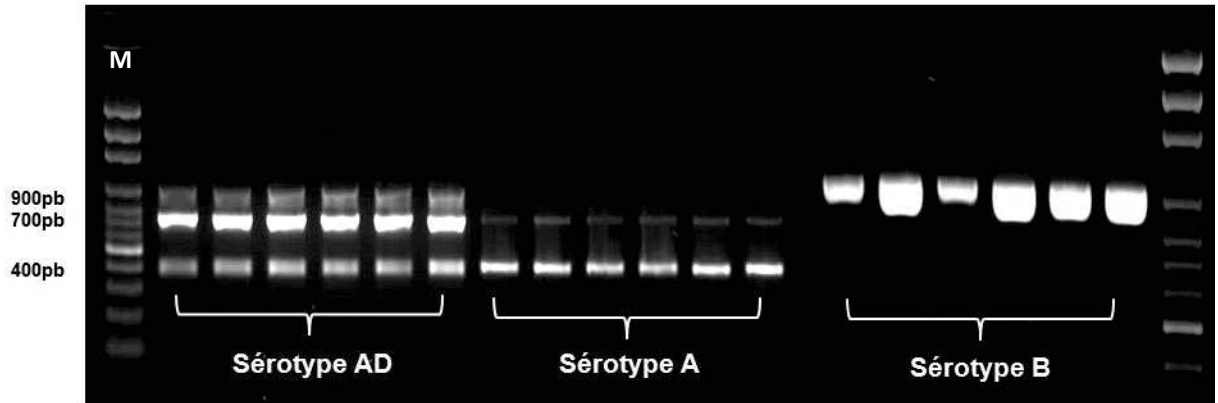
### I.2. Etude de la diversité génétique des isolats de *Cryptococcus*

Pour les 61 patients inclus, l'isolat de départ et 5 colonies prises au hasard après isolement ont été étudiés soit 6 isolats par patient à l'exception de 2 patients pour lesquels nous n'avons isolé que 3 et 4 colonies respectivement soit un total de 363 isolats.

Dans cette première partie, la diversité génétique des 363 isolats de *Cryptococcus* a été recherchée par une combinaison de plusieurs techniques de typage moléculaire : PCR-RFLP du gène *URA5*, mini (M13) et microsatellites  $(\text{GACA})_4$  et  $(\text{GTG})_5$ .

#### I.2.1. Sérotypage par PCR multiplex

Le sérotypage des souches a révélé que 318/363 (87,6%) sont de sérotype A, 40/363 (11%) sont de sérotype AD et 5/363 (1,4%) sont de sérotype B. La figure 22 montre le profil électrophorétique de chacun des trois sérotypes obtenus.



**Figure 22:** Profils électrophorétiques obtenus par sérotypage par PCR multiplex à partir d'isolats de *Cryptococcus*.

*M* est le marqueur de poids moléculaire. Les bandes obtenues sont à 400, 700 et 900 pb pour le sérotype AD, à 400 et 700 pb pour le sérotype A, et 900 pb pour le sérotype B.

### I.2.2. Typage moléculaire par PCR-RFLP du gène *URA5*

Après digestion des amplicons du gène *URA5* par les endonucléases *HhaI* et *Sau96I*, nous obtenons 4 types moléculaires: 312 VNI, 6 VNII, 40 VNIII, 4 VGII et 1 VGII/VNI dans notre échantillon. La figure 23 montre les 4 profils de migration obtenus après analyse de notre population.



**Figure 23:** Profils électrophorétiques des quatre génotypes obtenus par PCR-RLFP du gène *URA5*.

**Piste 1:** *M* (Echelle de poids moléculaire, 100 pb); **Pistes 2-3:** VNII (*C. neoformans*);

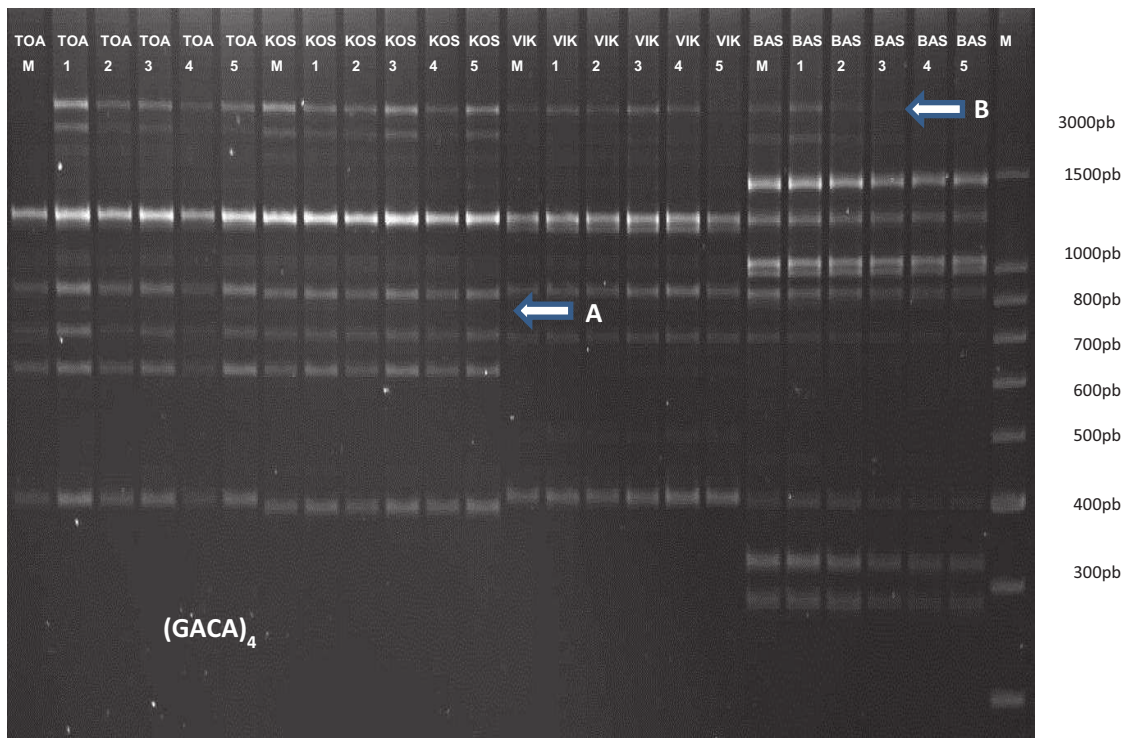
**Pistes 4-5:** VNIII (*C. neoformans* x *C. deneoformans*);

**Pistes 6-7:** VNI (*C. neoformans*); **Pistes 8-9:** VGII (*C. deuterogattii*).

### **I.2.3. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> et minisatellite M13**

Les 363 isolats issus de notre population sont répartis en 3 sérotypes (3 profils), eux-mêmes subdivisés en 4 génotypes. L'analyse des profils de migration de chaque séquence amplifiée a permis d'observer des polymorphismes de séquences (figures 24, 25, 26).

○ **Microsatellites (GACA)<sub>4</sub>**

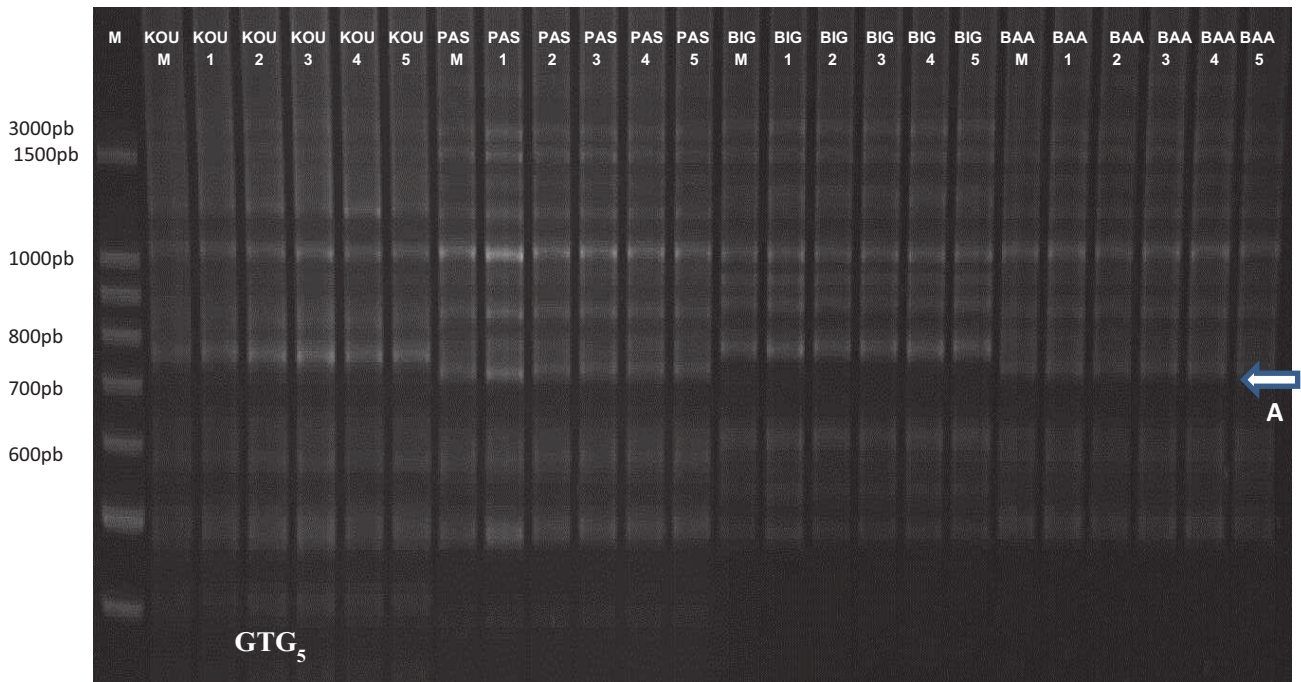


**Figure 24:** Exemples de profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub> des isolats de *Cryptococcus* de 4 patients.

Ces profils de migration concernent 4 patients (TOA, KOS, VIK et BAS). Les 6 isolats des patients TOA, KOS et VIK sont de sérotype A. Par amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub>, puis migration sur gel haute résolution, nous n'observons pas le même profil pour chaque patient. De même, au sein des isolats de sérotype A du patient BAS, la culture initiale (M) et les isolats 1 et 2 ont des profils différents. Chaque profil différent correspond à un génotype particulier (tableau 8 et annexe 7).



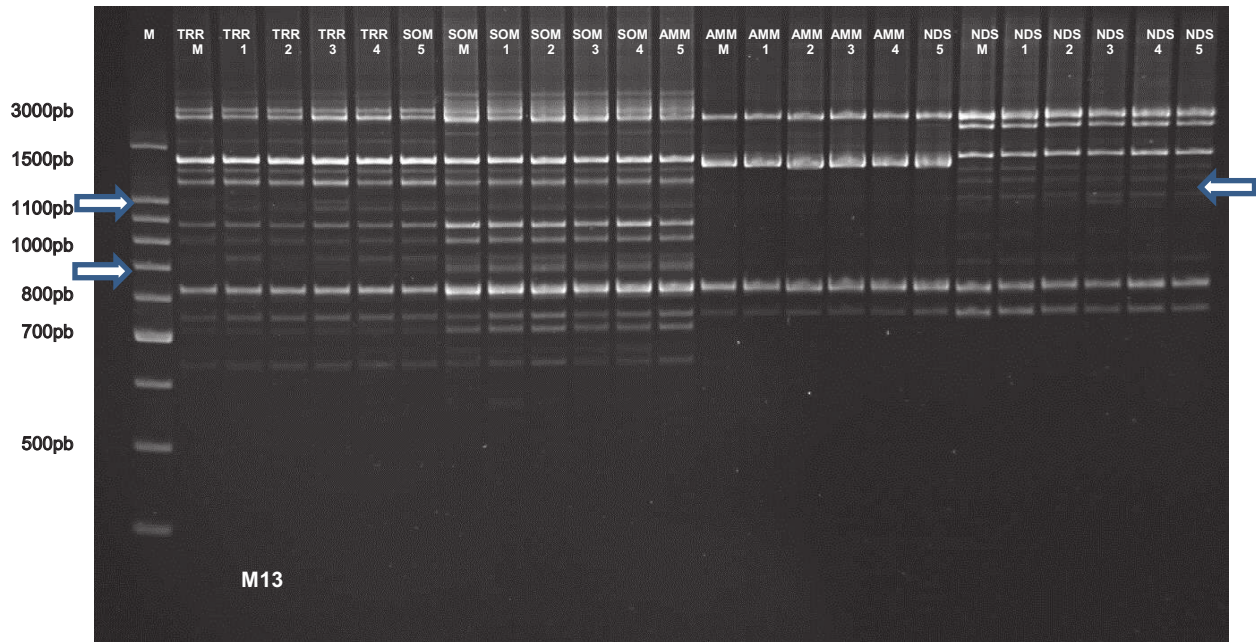
○ **Microsatellites (GTG)<sub>5</sub>**



**Figure 25:** Exemples de profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GTG)<sub>5</sub> des isolats de *Cryptococcus* de 4 patients.

Ces profils de migration concernent 4 autres patients (KOU, PAS, BIG et BAA). Les 6 isolats des patients PAS, BIG et BAA sont de sérotype A. Par amplification des séquences microsatellites (GTG)<sub>5</sub>, puis migration sur gel haute résolution, nous n'observons pas le même profil pour chaque patient. Cependant, les isolats de sérotype AD du patient BAA ont des profils identiques. Chaque profil différent correspond à un génotype particulier (tableau 8 et annexe 7).

○ **Minisatellites M13**



**Figure 26:** Exemples de profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences minisatellites M13 des isolats de *Cryptococcus* de 4 patients.

Ces profils de migration concernent 4 patients (TRR, SOM, AMM et NDS). Les 6 isolats des patients TRR et SOM sont de sérotype AD. Par amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub>, puis migration sur gel haute résolution, nous n'observons pas le même profil pour chaque patient. De même, au sein des isolats de sérotype A des patients AMM et NDS, les profils sont différents. Chaque profil différent correspond à un génotype particulier (tableau 8 et annexe 7).

Nous avons vérifié au préalable, l'efficacité de chaque méthode en calculant le pouvoir discriminant ou l'indice de diversité de Simpson (D). Cet indice a été calculé pour chacune des méthodes de génotypage et pour la combinaison des méthodes. Cet indice est de 0,2493 pour la PCR-RFLP du gène *URA5*, 0,9332 pour (GTG)<sub>5</sub>, 0,9414 pour M13, 0,9445 pour (GACA)<sub>4</sub> et 0,9721 pour la combinaison des trois méthodes. La combinaison des trois méthodes a augmenté la diversité génétique par rapport aux techniques individuelles. La diversité globale sur l'ensemble des patients est présentée dans le tableau 8.

Les profils moléculaires obtenus par amplification des séquences micro et minisatellite pour les 363 isolats ont été analysés en fonction de la présence ou l'absence de bandes facilement apparentes et bien définies. Nous avons généré un dendrogramme combinant tous les résultats obtenus par ces quatre méthodes de typage [PCR-RFLP du gène *URA5*, (GTG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub>] et M13] en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean). Le dendrogramme a été construit avec un pourcentage de similitude de 95% (annexe 7). Il permet de montrer que dans notre population, nous avons 140 types moléculaires différents groupés en 56 types moléculaires majeurs. De plus, nous constatons que 24 (39,3%) patients (SOM, AMM, NGV, MOC, BAP, DIO, DOT, TID, ANE, SAM, BAD, KOK, KOY, YOD, KOU, BIG, BAA, ADJ, OUE, OUL, ABM, DOR, BOK, NIF) sont infectés par *Cryptococcus* avec 2, 3 ou 4 types moléculaires différents (tableau 8 et annexe 7).

**Tableau 8:** Sérotypes, géotypes et principaux types moléculaires chez les 61 patients.

	Types		
	Sérotypes	Géotypes	moléculaires <sup>b</sup>
<b>Patients<sup>a</sup></b>			
TRR-1	AD	VN III	46
SOM-2	AD	VN III	45, 46
AMM-3	A	VN I	1,4
NDS-4	A	VN I	4
KOA-5	A	VN I	6
LEB-6	A	VN I	7
BOB-7	A	VN I	7
BOP-8	A	VN I	5
TOA-9	A	VN I	20
KOS-10	A	VN I	20
VIK-11	A	VN I	5
BAS-12	AD	VN III	33
OBM-13	A	VN I	19
NGV-14	A	VN I	1,18
DID-15	A	VN I	20
MOC-16	A	VN I	17, 18
TOO-17	A	VN I	2
SYL-18	A	VN I	2
CID-19	AD	VN III	43
DJM-20	A	VN I	3
BAP-21	A	VN I	18, 55
KOE-22	A	VN I	23
DIO-23	A	VN I	22, 46
DIA-24	A	VN I	23
DJB-25	A	VN II	52
KOR-26	A	VN I	51
BOA-27	A	VN I	51
DIM-28	A	VN I	51
DOT-29	A	VN I	13,53
TID-30	A	VN I	8, 12, 13
SEG-31	A	VN I	13
ANE-32	A	VN I	13, 14, 54
SAM-33	A	VN I	24, 32, 56
BAD-34	A	VN I	32,39
KOK-35	A	VN I	27,38
DJD-36	A	VN I	25
SOC-37	A	VN I	27
KOY-38	A	VN I	25, 26
OUA-39	A	VN I	27
BEL-40	A	VN I	24
ZOF-41	A	VN I	16
YOD-42	A	VN I	16,32
KAS-43	A	VN I	16
KAI-44	A	VN I	15
KOU-45	AD	VN III	35, 44, 45
PAS-46	A	VN I	30
BIG-47	A	VN I	41,42
BAA-48	A	VN I	32,4
BAM-49	A	VN I	34
BAK-50	A	VN I	29
ADJ-51	A	VN I	9, 10, 11, 43
OUE-52	AD	VN III	35, 36, 37, 38
KON-53	A	VN I	30
OUL-54	A	VN I	30,32
YOB-55	A	VN I	32
AGO-56	A	VN I	31
GAT-57	A	VN I	29
ABM-58	A, B	VN I, VG II	47,48
DOR-59	A	VN I	28,39
BOK-60	A	VN I	21,23
NIF-61	A, AD	VN I, VN III	5, 49

<sup>a</sup>: Isolat de départ + 5 colonies. Le patient (KON-53) a 5 isolats et le patient (GAT-57) a 4 isolats soit 363 isolat au total.

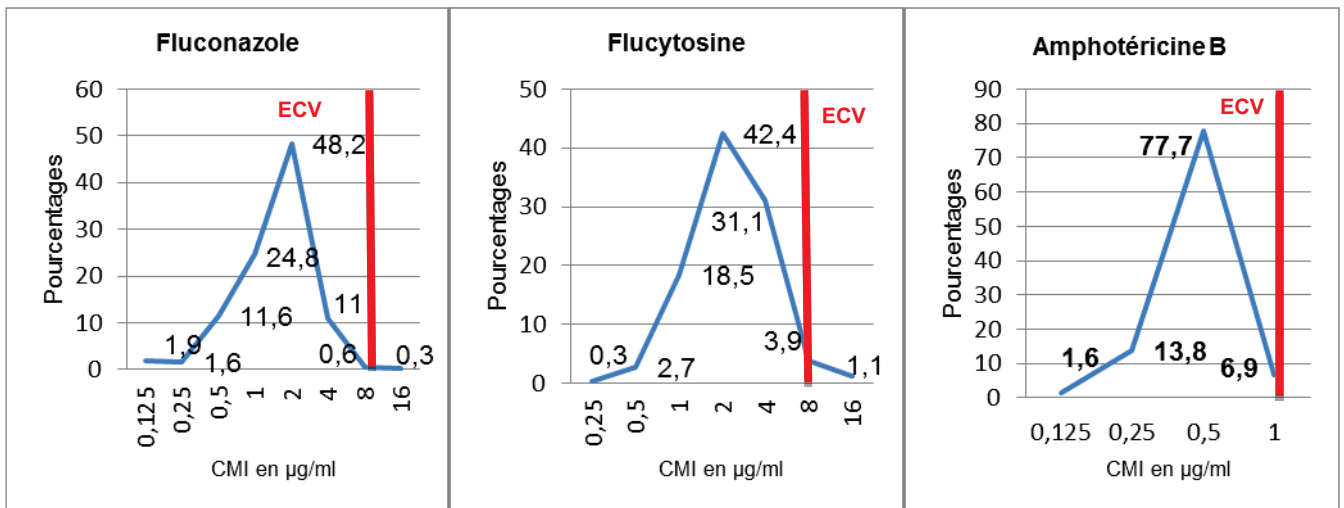
<sup>b</sup>: Répartition des 56 types moléculaires majeurs pour les 363 isolats étudiés. Vingt-quatre patients (2, 3, 14, 16, 21, 23, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 38, 42, 45, 47,48, 51, 52, 54, 58, 59, 60, 61) présentaient les espèces de *Cryptococcus* avec 2 à 4 types différents types moléculaires majeurs dans le même échantillon.

### I.3. Sensibilité de *Cryptococcus* aux antifongiques

Dans notre population, un seul isolat est résistant au FCZ (CMI = 16 µg/ml). Il s'agit du patient MOC-16 pour lequel un seul isolat est résistant alors que les 5 autres isolats sont sensibles.

Quatre isolats issus de trois patients sont résistants à la 5FC (CMI = 16 µg/ml). Chez deux patients (DIM-34 et NIF-61), nous observons un seul isolat résistant alors que les 5 autres isolats sont sensibles. Par contre, chez le patient CID-24, 2 isolats sur 6 ont des CMI =16 µg/ml.

Tous les isolats sont sensibles à l'AMB (CMI ≤ 1 µg/ml). La figure 27 représente le pourcentage d'isolats sensibles en fonction des CMI pour un antifongique donné.



**Figure 27:** Pourcentage des isolats de *Cryptococcus* sensibles à chaque CMI et pour chaque antifongique testé.

Les limites figurées en rouge représentent les cut-off épidémiologiques (ECVs) publiés pour ces antifongiques (**Espinel Ingroff et al., 2012a et b; Pfaller et al., 2011**).

Le tableau 9 présente les intervalles de CMI de chaque prélèvement initial et ses 3, 4 ou 5 isolats dérivés.



**Tableau 9:** Sérotypes, génotypes, et valeurs des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des trois antifongiques testés pour les 363 isolats.

Patients <sup>a</sup>	Fluconazole	Flucytosine	Amphotéricine B	Sérotypes	Génotypes
	(μg/ml)				
TRR-1	0,5-4	0,5-4	0,25-1	AD	VN III
SOM-2	2-4	0,25-4	0,25-0,5	AD	VN III
AMM-3	1-2	1-4	0,25-0,5	A	VN I
NDS-4	0,125-4	1-4	0,25-0,5	A	VN I
KOA-5	1-4	2-4	0,25-0,5	A	VN I
LEB-6	1-8	4-8	0,25-0,5	A	VN I
BOB-7	0,25-8	2-8	0,25-1	A	VN I
BOP-8	0,25-4	2-4	0,5-1	A	VN I
TOA-9	0,5-1	1-8	0,5-1	A	VN I
KOS-10	2-4	2-4	0,5	A	VN I
VIK-11	0,5-2	4-8	0,25-0,5	A	VN I
BAS-12	0,5-1	1-4	0,5	AD	VN III
OBM-13	0,5-4	1-4	0,5-1	A	VN I
NGV-14	1-4	0,5-2	0,5	A	VN I
DID-15	0,125-2	0,5-2	0,5-1	A	VN I
MOC-16	0,25-16	1-4	0,25-1	A	VN I
TOO-17	0,25-4	1-2	0,25-1	A	VN I
SYL-18	1-2	1-4	0,5	A	VN I
CID-19	1-4	2-16	0,25-1	AD	VN III
DJM-20	1-4	1-2	0,125-0,5	A	VN I
BAP-21	2-4	1-2	0,5	A	VN I
KOE-22	1-2	1-2	0,5	A	VN I
DIO-23	0,125-4	0,5-4	1	A	VN I
DIA-24	1-4	1-2	0,5	A	VN I
DJB-25	0,5-1	0,5-1	0,125-0,25	A	VN II
KOR-26	2-4	1-4	0,25	A	VN I
BOA-27	0,25-2	1-2	0,25-0,5	A	VN I
DIM-28	0,125-4	4-16	0,125-0,5	A	VN I
DOT-29	1-2	2-4	0,5	A	VN I
TID-30	2-4	2	0,5	A	VN I
SEG-31	2	4	0,5	A	VN I
ANE-32	2	4	0,5	A	VN I
SAM-33	1	2	0,5	A	VN I
BAD-34	2	2-4	0,5	A	VN I
KOK-35	2	2-4	0,5	A	VN I
DJD-36	1	2-4	0,5	A	VN I
SOC-37	0,5	2-4	0,5	A	VN I
KOY-38	2	4	0,5	A	VN I
OUA-39	2	4	0,5-1	A	VN I
BEL-40	2	2-4	0,5	A	VN I
ZOF-41	2	2-4	0,5	A	VN I
YOD-42	2	2-4	0,25-0,5	A	VN I
KAS-43	2	1	0,5	A	VN I
KAI-44	0,5-1	2	0,5	A	VN I
KOU-45	1-2	4	0,25-0,5	AD	VN III
PAS-46	1-2	2	0,5	A	VN I
BIG-47	0,5-1	1-2	0,5	A	VN I
BAA-48	2	4	0,5	A	VN I
BAM-49	2	2	0,5	A	VN I
BAK-50	1-2	2-4	0,5	A	VN I
ADJ-51	0,5-4	4	0,5	A	VN I
OUE-52	0,5-1	4-8	0,5	AD	VN III
KON-53	2-4	4-8	0,5	A	VN I
OUL-54	1-4	2-8	0,5	A	VN I
YOB-55	0,5-2	1-2	0,5	A	VN I
AGO-56	1-2	2	0,5	A	VN I
GAT-57	1-4	2-4	0,5	A	VN I
ABM-58	4	2	0,5	A, B	VN I, VG II
DOR-59	2-4	1-4	0,25-0,5	A	VN I
BOK-60	1-4	2-4	0,25-0,5	A	VN I
NIF-61	2-4	1-16	0,5	A, AD	VN I, VN III

<sup>a</sup>: Isolats de départ + 5 colonies. Le patient (KON-53) a 5 isolats et le patient (GAT-57) a 4 isolats soit 363 isolats au total.

<sup>b</sup>: En gras, les patients dont les isolats présentent des sensibilités avec des écarts de CMI qui varient de 3 à 6 dilutions pour le FCZ et/ou la 5FC.

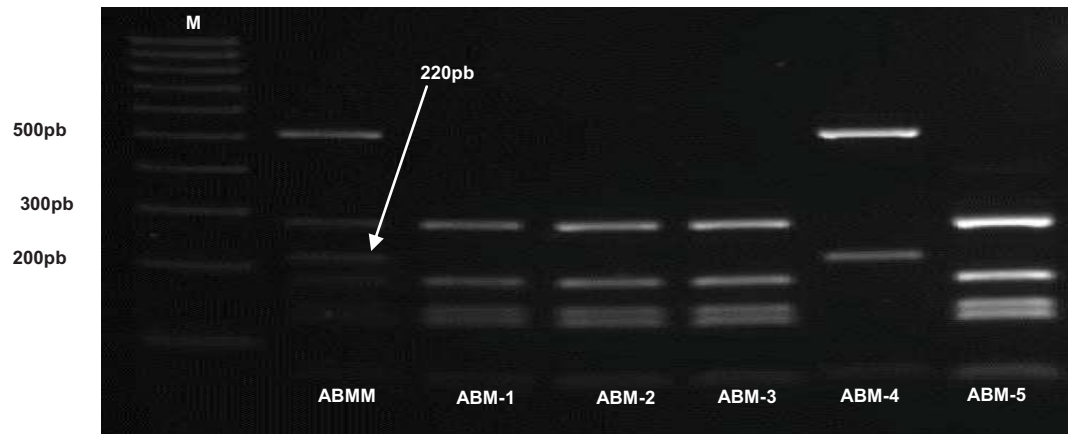
<sup>b</sup>: Le patient 19 est infecté avec deux isolats dont les CMI pour la 5FC sont de 16 µg/ml.

Nous démontrons que les isolats présentent des sensibilités aux antifongiques avec des décalages de CMI qui varient de 1 à 2 dilutions (AMB) ou de 3 à 6 dilutions (FCZ et 5FC). La différence la plus importante est observée pour les isolats du patient MOC21 vis-à-vis du FCZ (6 dilutions). Ces écarts de dilution entre isolats concernent 13/61 patients pour le FCZ et 6/61 patients pour la 5FC. Ces variations de CMI semblent concerner les souches de sérotype A (12/13 patients; NDS, LEB, BOB, BOP, OBM, DID, MOC, TOO, DIO, BOA, DIM, ADJ) pour le FCZ et les souches de sérotype AD (4/6 patients; TRR, SOM, CID, NIF) pour la 5FC. Aucun isolat n'est à la fois résistant au FCZ et à la 5FC. Nous n'avons pas observé de corrélation entre sensibilité aux antifongiques, sérotypes ( $p=0,26$ ), âge ( $p=0,91$ ) ou sexe ( $p=0,7$ ) des patients.

#### **I.4. Cas particulier d'un patient infecté par deux espèces différentes**

Parmi les patients étudiés, un patient est infecté à la fois par *C. neoformans* et *C. deuterogattii*. Ce patient a fait l'objet d'une publication sous forme de cas clinique. Il s'agit d'un ivoirien de 41 ans, VIH-1 positif et inobservant au traitement antirétroviral et à la prophylaxie par le cotrimoxazole. Des céphalées intenses et des troubles de la vigilance motivent son hospitalisation au SMIT du CHU de Treichville. Ses analyses sanguines révèlent un taux de CD4 bas ( $7/\text{mm}^3$ ) et une charge virale élevée (704 275 copies/ml). Une ponction lombaire révèle une pression élevée à l'ouverture. La culture issue du prélèvement initial ainsi que 5 colonies sont typées par PCR multiplex, PCR-RFLP du gène *URA5* avec étude du polymorphisme de séquences microsatellites  $(\text{GACA})_4$ ,  $(\text{GTG})_5$  et minisatellites M13. Puis, le profil de sensibilité des 6 isolats aux antifongiques est déterminé par la méthode de dilution en milieu liquide (CLSI M27-A3). Les profils des PCR-RFLP du gène *URA5* (figure 28) ont montré que la culture initiale contenait des souches de types moléculaires différents (VNI et VGII). Afin de savoir si la présence des génotypes est due à un hybride ou une contamination mixte par deux espèces différentes de *Cryptococcus*, nous avons étudié des colonies isolées. La PCR-RFLP du gène *URA5* (figure 28) a confirmé qu'une colonie est *C. neoformans* (VNI) et les quatre autres comme *C. deuterogattii* (VGII). Les infections mixtes existent mais la contamination par ces deux espèces n'a jamais été mise en évidence chez un même patient. Les six isolats issus de ce patient sont sensibles au FCZ (CMI=4 µg/ml), à la 5FC (CMI=2 µg/ml) et à l'AMB (CMI=0,5 µg/ml). Le patient est décédé après 17 jours de traitement par du FCZ (1200 mg/j).





**Figure 28:** Profils électrophorétiques de la souche ABM-58 obtenus par PCR-RLFP du gène *URA5*.

**Piste 1:** *M* est le marqueur de poids moléculaire. Les **pistes 3, 4, 5 et 7** (colonies isolées *ABM1*, *ABM2*, *ABM3* et *ABM5*) correspondent au type moléculaire *VGII* (*C. deuterogattii*) et la **piste 6** (colonie isolée *ABM4*), au type moléculaire *VNI* (*C. neoformans*).

## I.5. Discussion

*Cryptococcus* est décrit comme le principal agent causal (87,5%) des méningites lymphocytaires non virales chez les patients infectés par le VIH à Abidjan (**Eholié et al., 2000**). Dans notre travail, la fréquence de survenue de la CNM est de 3,6%. Deux études rétrospectives réalisées entre 1997-2001 et 2005-2008 avaient décrit des prévalences respectives de 1,1% et 2,8% (**Aoussi et al., 2012; Kadjo et al., 2007**). En quinze ans, la fréquence de cette maladie a continué d'augmenter. Malgré la disponibilité des ARV en Côte d'Ivoire, la CNM reste une infection opportuniste fréquente chez les PVVIH. La plupart des isolats a été récupérée à partir de patients de sexe féminin (55,7%). En effet, cette féminisation de la CNM reflète un contexte épidémiologique ivoirien caractérisé par une prévalence du VIH plus importante chez les femmes (60%) (**ONUSIDA, 2015**). Le jeune âge des patients noté dans notre étude confirme les données de la littérature (**Bamba et al., 2012; Eholié et al., 2000; Kadjo et al., 2007**).

Au niveau biochimique, l'hyperprotéinorachie est liée à la rupture de la barrière hémato-méningée qui est présente lors de tout processus inflammatoire méningé. L'hypoglycorachie est liée soit à une consommation de glucose par les cellules inflammatoires et la levure, soit à une altération des systèmes de transport au travers de la barrière hémato méningée. La biochimie du LCR traduit le fait que la CNM fait partie intégrante des méningites lymphocytaires à liquide clair (**Eholié et al.,**

**2000; Maslin et al., 2002; Park et al., 2009**). Dans notre étude nous avons aussi constaté ces anomalies chez nos patients.

La CNM survient dans 80 % des cas, chez des personnes présentant une immunodépression cellulaire très sévère ( $CD4 < 100/mm^3$ ) (**Park et al., 2009**). Dans notre étude, 66,7% des patients ont des taux de  $CD4 < 100/mm^3$ . Cependant, 6,8% des patients ont des lymphocytes  $CD4$  supérieurs à  $200/mm^3$ . Cela suggère que la CNM peut aussi se développer même à des stades modérés d'immunodépression. De précédentes études ont démontré que la CNM peut survenir chez un patient immunocompétent (**Favalessa et al., 2014; Trilles et al., 2008**). Le taux de mortalité de 45,1% dans notre étude est similaire à celui rapporté en 2012 en Côte d'Ivoire qui était de 41,2% (**Aoussi et al., 2012**). Des taux de mortalité plus élevés ont déjà été rapportés en Afrique (70 à 80%) (**Bicanic et al., 2009; Desalermos et al., 2012; Kambugu et al., 2008; Lessells et al., 2011**).

Le sérotypage de *C. neoformans* a pendant longtemps été réalisé par des techniques sérologiques (kit Crypto Check) ou par la combinaison du milieu CGB et la technique d'immunofluorescence indirecte avec une Immunoglobuline G1 monoclonale murine spécifique du polysaccharide capsulaire (**Carvalho et al., 2007; Dromer et al., 1993**). 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 utiliser d'autres méthodes de sérotypage. Plusieurs approches moléculaires ont été proposées, parmi lesquelles la PCR multiplex amplifiant les gènes LAC1 et CAP64 qui codent pour la synthèse de la laccase et de la capsule respectivement. Cette approche permet de différencier dans une PCR unique les 5 sérotypes (A, D, AD, B et C) du complexe *C. neoformans* / *C. gattii* (**Ito-Kuwa et al., 2007**). Dans notre étude, elle a permis de décrire pour la première fois, l'existence de contamination par des souches de sérotype B (1,1%) et AD (11%) en Côte-d'Ivoire. Dans ce travail, 87,6% des patients sont infectés par des souches de sérotype A. Plusieurs rapports de la littérature au niveau mondial confirment la prédominance du sérotype A, y compris l'unique rapport en provenance de la Côte d'Ivoire (**Adoubryn et al., 2006; Hagen et al., 2015; Nyazika et al., 2016**).

Le typage moléculaire par PCR-RFLP du gène *URA5* révèle que 85,9% des isolats sont de type moléculaire VNI (tableau 8). Ce résultat est en accord avec ceux publiés dans de précédentes études qui démontrent que ce génotype est majoritaire sur le continent Africain (**Bertout et al., 2013; Cogliati et al., 2013; Litvintseva et al., 2006; Meyer et al., 1999, 2003**). Nous avons montré l'existence du génotype VNII avec un taux de 1,6%. En Afrique, seulement trois études, l'une en Afrique du Sud, l'autre en Ouganda et une autre encore au Kenya ont rapporté ce génotype avec des fréquences en dessous de 3% (**Cogliati et al., 2013; Kangogo et al., 2015**). Certains de nos isolats (11%) sont de type moléculaire VNIII, décrits pour la première fois en Côte-

d'Ivoire. Le génotype VNIII est commun en Europe (3,4 à 45%) mais est rarement retrouvé ailleurs (1,8% en Thaïlande, 1,3 à 5,9% en Amérique) (**Cogliati et al., 2013; Desnos-Ollivier et al., 2015; Viviani et al., 2006**).

L'analyse des séquences mini et microsatellites a permis dans un premier temps de grouper les souches de *Cryptococcus* dans les principaux types moléculaires connus VN et VG (**Cogliati et al., 2013; Escandon et al., 2006; Illnait-Zaragozi et al., 2010b; Meyer et al., 2003**). Dans un second temps, l'important pouvoir de discrimination de ces techniques, surtout lorsqu'elles sont combinées a été utilisé pour étudier la diversité génétique globale de *Cryptococcus*, parfois au sein des isolats issus d'un même patient (**Bertout et al., 2013; Igreja al., 2004; Illnait-Zaragozi et al., 2010b; Meyer et al., 2003; Sorrell et al., 1996**). Ces études ont donc démontré l'intérêt de typer des souches avec plusieurs techniques combinées. Ainsi, **Illnait-Zaragozi et al., (2010b)** ont typé 190 isolats de *Cryptococcus* cubains par une combinaison de 9 marqueurs microsatellites et décrit un meilleur pouvoir discriminant (indice de diversité = 0,993) lorsque tous les marqueurs sont combinés (**Illnait-Zaragozi et al., 2010b**). Ils ont ainsi prouvé que le degré de différenciation des isolats était beaucoup plus important lorsque les marqueurs étaient utilisés ensemble plutôt que seuls. L'utilisation de ce même panel de 9 marqueurs microsatellites ((CT)<sub>n</sub>, (TG)<sub>n</sub>, (TA)<sub>n</sub>, (CTA)<sub>n</sub>, (TCT)<sub>n</sub>, (CCA)<sub>n</sub>, (TTAT)<sub>n</sub>, (ATCC)<sub>n</sub> and (TATT)<sub>n</sub>) leur a ainsi permis de prouver que les rechutes de la CNM chez 7 patients cubains étaient imputables à une reinfestation par différentes souches et à des microévolutions (**Illnait-Zaragozi et al., 2010a**). D'autres auteurs sont parvenus à la même conclusion selon laquelle l'utilisation combinée des séquences mini et microsatellites permet une meilleure comparaison des isolats qu'une analyse individuelle (**Igreja al., 2004**). Tout comme ces auteurs, l'indice de diversité de Simpson calculé dans la présente étude, a révélé que la combinaison des trois méthodes permet une meilleure discrimination des isolats (indice de diversité = 0.9721) par rapport aux méthodes individuelles. Nous avons donc généré un dendrogramme basé sur les données génotypiques de la PCR- RFLP du gène *URA5* et les séquences mini et microsatellites. En effet, 140 types moléculaires différents regroupés en 56 sous-types moléculaires majeurs pour les 363 isolats étudiés ont été obtenus. Cet important polymorphisme génétique des séquences mini et microsatellites a déjà été obtenu à partir de 114 isolats camerounais et a également été démontré comme existant chez *Candida* (**Adachi et al., 2009; Bertout et al., 2013**).

L'analyse de la diversité génétique au sein d'un même patient montre que vingt-quatre patients sont infectés par des souches de *Cryptococcus* de sous-types moléculaires différents (tableau 8). Comme nous avons analysé six isolats par échantillon, (culture initiale et cinq colonies isolées), la détection des infections mixtes a été beaucoup plus aisée. A ce jour, nous sommes le seul laboratoire qui applique cette procédure. Récemment, en 2010 et 2012, des infections mixtes ont été décrites dans la littérature. Ces études ont décrit respectivement que 20% et 42% des patients

étaient infectés par de multiples variants génétiques (**Bertout et al., 2013; Desnos-Ollivier et al., 2010**). Cette variabilité génétique intra-individuelle serait due à des microévolutions de la souche originale ou à une infection chez le même patient par des souches différentes (**Desnos-Ollivier et al., 2010; Franzot et al., 1998; Fries et al., 1999**).

La diminution de la sensibilité de *Cryptococcus* au FCZ en Afrique est une grande préoccupation car il est l'unique antifongique utilisé pour le traitement de la CNM. De précédentes études en Afrique subsaharienne ont démontré une baisse de la sensibilité de *Cryptococcus* et même l'apparition de résistance à cet antifongique (**Bertout et al., 2013; Bii et al., 2007; Mdodo et al., 2011**). Comme il n'existe pas de valeurs limites de CMI pour les souches de *Cryptococcus*, le rôle de la sensibilité de l'isolat initial comme un facteur prédictif de l'échec clinique à la fois précoce et tardif du traitement reste controversé (**Aller et al., 2000; Dannaoui et al., 2006**). Toutefois, il a été démontré qu'un patient infecté par une souche de *Cryptococcus* dont la CMI au FCZ est  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$  répond mieux au traitement qu'un patient infecté par une souche pour laquelle la CMI est  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$  (**Aller et al., 2000**). **Lee et al. (2012)** ont également établi que la CMI des souches par rapport au FCZ, déterminée par la méthode standard du CLSI au moment du diagnostic de la CNM, peut être un paramètre prédictif de l'efficacité thérapeutique. En se basant sur ces données, nous décrivons un seul isolat (1/363) résistant au FCZ (CMI=16  $\mu\text{g/ml}$ ). Nos résultats sont surprenants car le FCZ est largement utilisé en monothérapie dans les hôpitaux en Côte d'Ivoire à la dose quotidienne de 800 à 1200 mg (phase d'induction). Une précédente étude a rapporté qu'une dose de charge de FCZ à 1200 mg/jour en deux prises pendant 14 jours, suivie d'un relais à 400 mg, 2 fois/jour diminuerait le taux de mortalité, en raison de la diminution rapide de l'inoculum fongique dans le LCR (**Brouwer et al., 2004**). Néanmoins, le traitement le plus efficace repose sur la combinaison AMB et 5FC pour la phase d'induction, suivie du FCZ (**Perfect et al., 2010**). Globalement, les cryptocoques isolés chez nos patients sont sensibles aux antifongiques. Au Kenya, dans le même contexte d'utilisation du FCZ et par la même méthode standard du CLSI, seulement 2 souches sur 65 testées étaient résistantes (**Mdodo et al., 2011**). Malgré ces résultats prometteurs, il serait important de prendre des mesures pour l'utilisation rationnelle de ce médicament pour améliorer la gestion de la CNM en Côte d'Ivoire.

Quatre isolats résistants à la 5FC ont été décrits (CMI = 16  $\mu\text{g/ml}$ ). Cette molécule n'est pas disponible en Côte-d'Ivoire, mais la connaissance de son profil de sensibilité par rapport à l'AMB et au FCZ est utile pour guider le traitement antifongique. 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 (**David et William, 2010**). Enfin, tous les isolats testés étaient sensibles à l'AMB (CMI  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ), cette observation est en accord avec les données de la littérature (**Mdodo et al., 2011; Pfaller et al., 2005**).

Nous avons essayé de corrélérer la sensibilité aux antifongiques avec le sérotype, l'âge et le sexe des patients mais nous n'avons observé aucune relation entre ces données. Cependant, une précédente étude en France avait démontré que les isolats de sérotype A étaient beaucoup moins sensibles au FCZ que ceux de sérotype AD (**Dannaoui et al., 2006**).

Nos résultats montrent la présence d'isolats de différents niveaux de sensibilité dans un même échantillon donné (tableau 9 et annexe 8). Dans le cas du FCZ, la majorité des patients (12/13) concernés par ces écarts de dilution entre isolats hébergent des souches de sérotype A. Ce résultat a déjà été rapporté pour 5/19 patients camerounais (**Bertout et al., 2013**). Au contraire, avec la 5FC, ces patients hébergent préférentiellement des souches de sérotype AD (4/6 patients). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle un même échantillon peut contenir des isolats de niveaux de sensibilité différents, soulignant l'importance de l'étude systématique de la culture initiale et de cinq colonies dans toutes les études de notre laboratoire (**Bertout et al., 2013; Ngouana et al., 2016**). Cette pratique a permis de démontrer qu'au sein d'une même souche sensible à un antifongique donné, des variations importantes de CMI peuvent exister même si le patient n'a pas été en contact antérieurement avec l'antifongique.

Le concept d'une souche unique responsable d'une infection est admis pour la majorité des maladies infectieuses. Dans les années 2000, des infections mixtes ont été décrites mais sont restées extrêmement controversées, probablement à cause des techniques utilisées (**Blasi et al., 2001; Casadevall et al., 1993; Pfaller et al., 1998; Spitzer et al., 1993; Sullivan et al., 1996**). Durant la dernière décennie, ces infections mixtes ont été à nouveau décrites et approuvées (**Bertout et al., 2013; Desnos-Ollivier et al., 2010; Illnait-Zaragozí et al., 2010a**). En effet, dans la majorité des études épidémiologiques, une seule colonie isolée à partir d'un site anatomique unique a été typée, ce qui rendait la découverte d'infections mixtes improbable (**Desnos-Ollivier et al., 2010**). En effet, *Cryptococcus* présente la capacité de subir des microévolutions (changements phénotypiques et génotypiques) dans l'organisme ou en culture. De façon inhabituelle, différents sérotypes ou espèces de *Cryptococcus* ont été identifiés pendant le même épisode de CNM chez un patient (**Desnos-Ollivier et al., 2010**). Nos données confirment cette possibilité chez le patient ABM-58. La PCR-RFLP du gène *URA5* a identifié deux types moléculaires différents (VNI et VGII) au sein de l'isolat initial. L'analyse des cinq colonies isolées à partir de l'échantillon d'origine a révélé la présence de deux génotypes différents. Quatre colonies ont été identifiées comme *C. deuterogattii* et une comme *C. neoformans* VNI. Notre étude est le premier rapport décrivant l'apparition d'une infection mixte à *C. deuterogattii* et *C. neoformans* VNI chez un patient infecté par le VIH. En revanche, certains auteurs ont montré l'existence d'une souche hybride entre *C. deuterogattii* et *C. neoformans* chez quatre patients VIH négatifs originaires du Brésil, de la Colombie et de l'Inde (**Aminnejad et al., 2012**). La détermination de cette diversité génétique trouverait son application dans une éventuelle différence de sensibilité

aux antifongiques entre les différents isolats chez le même patient. Dans notre cas, les 6 isolats étaient sensibles à la fois au FCZ, à la 5FC et à l'AMB.

## **I.6. Conclusion partielle 1**

Dans cette première partie, nous avons étudié l'épidémiologie et la sensibilité aux antifongiques de 363 isolats de *Cryptococcus* issus de patients ivoiriens infectés par le VIH. Nous démontrons une fréquence de 3,6% pour la CNM chez les PVVIH à Abidjan avec une prévalence plus élevée chez les femmes (55,7%). Les souches isolées sont principalement *C. neoformans* génotype VNI, décrit comme le plus virulent. Nous avons démontré pour la première fois, une infection mixte à *C. deuterogattii* et *C. neoformans* VNI. Nous avons mis en évidence une grande variabilité génétique au sein de notre échantillon et les techniques combinées sont plus discriminantes que prises individuellement. En effet, 56 types moléculaires majeurs ont été obtenus à partir des 363 isolats testés et la fréquence des infections mixtes est de 39,3%. L'étude de la sensibilité aux antifongiques a montré que 99,7% des souches sont sensibles aux FCZ malgré son utilisation en monothérapie en Côte d'Ivoire. De même, une différence de sensibilité au FCZ et à la 5FC au sein des isolats issus d'un même patient est observée.

Cette première étude a montré une grande diversité génétique chez un même patient dans une population ivoirienne de PVVIH en utilisant une combinaison de méthode de typage moléculaire (PCR-RFLP du gène *URA5*, M13, (GACA)<sub>4</sub> et (GTG)<sub>5</sub>). Dans une seconde étude, nous rechercherons la diversité génétique au cours du temps chez des patients avec un suivi mais avec la technique de référence de typage de *Cryptococcus*, la MLST.



## **II. ANALYSE COMPARATIVE DE 246 ISOLATS INITIAUX ET ISOLATS ISSUS DE SUIVI DE *CRYPTOCOCCUS***

### **II.1. Caractéristiques de la population étudiée**

De mai 2014 à décembre 2015, 36 PVVIH atteints de CNM, chez lesquels un suivi longitudinal a été réalisé, ont été inclus dans l'essai ANRS 12257. Parmi eux, au moins 2 cultures positives à *Cryptococcus* espacées d'au moins 7 jours ont été obtenues chez 13 patients soit 41 prélèvements. A l'inclusion, 53,9% des patients sont des femmes. Leur âge moyen est de 43,2 ( $\pm$  7,2) ans. Ils sont infectés par le VIH 1 et un seul patient est co-infecté par le VIH1 et le VIH2. Dix patients ont des CD4  $<100/\text{mm}^3$  et pour 2 patients, ce taux est compris entre 100 et  $200/\text{mm}^3$ .

### **II.2. Diversité génétique des isolats de *Cryptococcus***

Nous avons analysé la diversité génétique globale des 246 isolats de *Cryptococcus* issus des 13 patients par PCR multiplex, PCR-RFLP du gène *URA5* et MLST. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.



**Tableau 10** : Diversité génétique globale des 246 isolats de *Cryptococcus* issus des 13 patients par PCR multiplex, PCR-RFLP du gène *URA5* et MLST.

Patients	Prélèvements	Sérotypes <sup>a</sup>	Génotypes <sup>b</sup>	Génotypes <sup>c</sup>	ST	Nombre de ST par patient	Patients	Prélèvements	Sérotypes <sup>a</sup>	Génotypes <sup>b</sup>	Génotypes <sup>c</sup>	ST	Nombre de ST par patient	
6.10	J0M	AD	VN III	VN III	255	10	6.21	J7M	B	VG II	VG II	173	10	
	J0M1	AD	VN III	VN III	366			J7M1	B	VG II	VG II	173		
	J0M2	AD	VN III	VN III	354			J7M2	B	VG II	VG II	173		
	J0M3	AD	VN III	VN III	354			J7M3	B	VG II	VG II	173		
	J0M4	AD	VN III	VN III	260			J7M4	B	VG II	VG II	173		
	J0M5	AD	VN III	VN III	326			J7M5	B	VG II	VG II	173		
	J7M	AD	VN III	VN III	366			J14M	B	VG II	VG II	173		
	J7M1	A	VN I	VN I	93			J14M1	AD	VN III	VN III	365		
	J7M2	A	VN I	VN I	32			J14M2	AD	VN III	VN III	362		
	J7M3	AD	VN III	VN III	255			J14M3	AD	VN III	VN III	362		
	J7M4	AD	VN III	VN III	256			J14M4	AD	VN III	VN III	362		
	J7M5	AD	VN III	VN III	255			J14M5	B	VG II	VG II	173		
	S10M	A	VN I	VN I	250			J28M	B	VG II	VG II	173		
	S10M1	A	VN I	VN I	23			J28M1	B	VG II	VG II	173		
	S10M2	A	VN I	VN I	250			J28M2	B	VG II	VG II	173		
S10M3	A	VN I	VN I	250	J28M3	B	VG II	VG II	173					
S10M4	A	VN I	VN I	250	J28M4	B	VG II	VG II	173					
S10M5	A	VN I	VN I	250	J28M5	B	VG II	VG II	340					
6.17	J0M	A	VN I	VN I	360	8	S10M	B	VG II	VG II	173	4		
	J0M1	A	VN I	VN I	79		S10M1	AD	VN III	VN III	255			
	J0M2	A	VN I	VN I	360		S10M2	A	VN I	VN I	79			
	J0M3	A	VN I	VN I	5		S10M3	A	VN I	VN I	360			
	J0M4	A	VN I	VN I	186		S10M4	B	VG II	VG II	173			
	J0M5	A	VN I	VN I	360		S10M5	B	VG II	VG II	173			
	J7M	A	VN I	VN I	15		J0M	A	VN II	VN II	244		6.22	4
	J7M1	A	VN I	VN I	186		J0M1	A	VN II	VN II	244			
	J7M2	A	VN I	VN I	15		J0M2	A	VN II	VN II	43			
	J7M3	A	VN I	VN I	79		J0M3	A	VN II	VN II	100			
	J7M4	A	VN I	VN I	5		J0M4	A	VN II	VN II	40			
	J7M5	A	VN I	VN I	360		J0M5	A	VN II	VN II	100			
	J14M	A	VN I	VN I	360		J7M	A	VN II	VN II	100			
	J14M1	A	VN I	VN I	59		J7M1	A	VN II	VN II	40			
	J14M2	A	VN I	VN I	188		J7M2	A	VN II	VN II	244			
J14M3	A	VN I	VN I	79	J7M3	A	VN II	VN II	244					
J14M4	A	VN I	VN I	5	J7M4	A	VN II	VN II	244					
J14M5	A	VN I	VN I	5	J7M5	A	VN II	VN II	244					
J28M	A	VN I	VN I	5	J0M	A	VN I	VN I	359	6.23	12			
J28M1	A	VN I	VN I	79	J0M1	A	VN I	VN I	360					
J28M2	A	VN I	VN I	360	J0M2	A	VN I	VN I	79					
J28M3	A	VN I	VN I	329	J0M3	A	VN I	VN I	5					
J28M4	A	VN I	VN I	360	<b>J0M4</b>	<b>A</b>	<b>VN I</b>	<b>VN B</b>	<b>29</b>					
J28M5	A	VN I	VN I	5	J0M5	A	VN I	VN I	76					
6.19	J0M	A	VN I	VN I	79	J7M	A	VN I	VN I			372	6.20	7
	J0M1	A	VN I	VN I	359	J7M1	A	VN I	VN I			360		
	J0M2	A	VN I	VN I	5	J7M2	A	VN I	VN I			79		
	J0M3	A	VN I	VN I	5	J7M3	A	VN I	VN I			360		
	J0M4	A	VN I	VN I	5	J7M4	A	VN I	VN I			175		
	J0M5	A	VN I	VN I	79	J7M5	A	VN I	VN I			5		
	J28M	A	VN I	VN I	193	J14M	A	VN I	VN I			360		
	J28M1	A	VN I	VN I	79	J14M1	A	VN I	VN I			5		
	J28M2	A	VN I	VN I	5	J14M2	A	VN I	VN I			204		
	J28M3	A	VN I	VN I	298	J14M3	A	VN I	VN I	359				
	J28M4	A	VN I	VN I	359	J14M4	A	VN I	VN I	81				
	J28M5	A	VN I	VN I	81	J14M5	A	VN I	VN I	234				
	S20M	A	VN I	VN I	360	J28M	A	VN I	VN I	79				
	S20M1	A	VN I	VN I	15	J28M1	A	VN I	VN I	174				
	S20M2	A	VN I	VN I	79	J28M2	A	VN I	VN I	79				
S20M3	A	VN I	VN I	360	J28M3	A	VN I	VN I	5					
S20M4	A	VN I	VN I	76	J28M4	A	VN I	VN I	360					
S20M5	A	VN I	VN I	5	J28M5	A	VN I	VN I	81					
6.20	J0M	A	VN I	VN I	23	6.25	J0M	AD	VN III	VN III	256	12		
	J0M1	A	VN I	VN I	250		J0M1	AD	VN III	VN III	113			
	J0M2	A	VN I	VN I	68		J0M2	AD	VN III	VN III	255			
	J0M3	A	VN I	VN I	250		J0M3	AD	VN III	VN III	165			
	J0M4	A	VN I	VN I	23		J0M4	AD	VN III	VN III	362			
	J0M5	A	VN I	VN I	68		J0M5	AD	VN III	VN III	358			
	<b>J7M</b>	<b>A</b>	<b>VN I</b>	<b>VN B</b>	<b>446</b>		J7M	AD	VN III	VN III	255			
	J7M1	A	VN I	VN I	23		J7M1	AD	VN III	VN III	453			
	J7M2	A	VN I	VN I	307		J7M2	AD	VN III	VN III	362			
	J7M3	A	VN I	VN I	23		J7M3	AD	VN III	VN III	255			
	J7M4	A	VN I	VN I	103		J7M4	AD	VN III	VN III	326			
	J7M5	A	VN I	VN I	250		J7M5	AD	VN III	VN III	366			
	J14M	A	VN I	VN I	250		J14M	AD	VN III	VN III	255			
	J14M1	A	VN I	VN I	250		J14M1	AD	VN III	VN III	366			
	J14M2	A	VN I	VN I	75		J14M2	AD	VN III	VN III	231			
J14M3	A	VN I	VN I	68	J14M3	AD	VN III	VN III	362					
J14M4	A	VN I	VN I	307	J14M4	AD	VN III	VN III	260					
J14M5	A	VN I	VN I	23	J14M5	AD	VN III	VN III	362					
6.21	J0M	B	VG II	VG II	173	J28M	AD	VN III	VN III	362	6.21	12		
	J0M1	A	VN I	VN I	5	J28M1	AD	VN III	VN III	267				
	J0M2	A	VN I	VN I	79	J28M2	AD	VN III	VN III	255				
	J0M3	A	VN I	VN I	186	J28M3	AD	VN III	VN III	362				
	J0M4	A	VN I	VN I	174	J28M4	AD	VN III	VN III	326				
	J0M5	A	VN I	VN I	360	J28M5	AD	VN III	VN III	260				

Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire

Patients	Prélèvements	Sérotypes <sup>a</sup>	Génotypes <sup>b</sup>	Génotypes <sup>c</sup>	ST	Nombre de ST par patient
6.26	J0M	B	VG II	VG II	173	4
	J0M1	B	VG II	VG II	173	
	J0M2	B	VG II	VG II	173	
	J0M3	B	VG II	VG II	173	
	J0M4	B	VG II	VG II	340	
	J0M5	B	VG II	VG II	114	
	J7M	B	VG II	VG II	340	
	J7M1	B	VG II	VG II	173	
	J7M2	B	VG II	VG II	173	
	J7M3	B	VG II	VG II	173	
	J7M4	B	VG II	VG II	173	
	J7M5	B	VG II	VG II	173	
	J14M	B	VG II	VG II	173	
	J14M1	B	VG II	VG II	173	
	J14M2	B	VG II	VG II	173	
J14M3	B	VG II	VG II	173		
J14M4	B	VG II	VG II	340		
J14M5	B	VG II	VG II	88		
6.27	J0M	A	VN I	VN I	188	7
	J0M1	A	VN I	VN I	137	
	J0M2	A	VN I	VN I	6	
	J0M3	A	VN I	VN I	6	
	J0M4	A	VN I	VN I	6	
	J0M5	A	VN I	VN I	76	
	J7M	B	VG II	VG II	173	
	J7M1	B	VG II	VG II	173	
	J7M2	B	VG II	VG II	173	
	J7M3	B	VG II	VG II	173	
	J7M4	B	VG II	VG II	88	
J7M5	B	VG II	VG II	167		
6.29	JoM	A	VN I	VN I	359	11
	JoM1	A	VN I	VN I	174	
	JoM2	A	VN I	VN I	53	
	JoM3	A	VN I	VN I	337	
	JoM4	A	VN I	VN I	5	
	JoM5	A	VN I	VN I	79	
	J7M	A	VN I	VN I	337	
	J7M1	A	VN I	VN I	337	
	J7M2	A	VN I	VN I	5	
	J7M3	A	VN I	VN I	5	
	J7M4	A	VN I	VN I	75	
	J7M5	A	VN I	VN I	337	
	J14M	A	VN I	VN I	5	
	J14M1	A	VN I	VN I	79	
	J14M2	A	VN I	VN I	337	
	J14M3	A	VN I	VN I	337	
	J14M4	A	VN I	VN I	337	
	J14M5	A	VN I	VN I	5	
	S10M	A	VN I	VN I	79	
	S10M1	A	VN I	VN I	360	
S10M2	A	VN I	VN I	59		
S10M3	A	VN I	VN I	298		
S10M4	A	VN I	VN I	337		
S10M5	A	VN I	VN I	192		
6.30	J0M	A	VN I	VN I	259	8
	J0M1	A	VN I	VN I	79	
	J0M2	A	VN I	VN I	337	
	J0M3	A	VN I	VN I	59	
	J0M4	A	VN I	VN I	360	
	J0M5	A	VN I	VN I	360	
	J7M	A	VN I	VN I	79	
	J7M1	A	VN I	VN I	360	
	J7M2	A	VN I	VN I	206	
	J7M3	A	VN I	VN I	79	
	J7M4	A	VN I	VN I	53	
J7M5	A	VN I	VN I	175		
6.34	J0M	A	VN I	VN I	68	9
	J0M1	A	VN I	VN I	66	
	J0M2	A	VN I	VN I	75	
	J0M3	A	VN I	VN I	213	
	J0M4	A	VN I	VN I	213	
	J0M5	A	VN I	VN I	65	
	J7M	A	VN I	VN I	311	
	<b>J7M1</b>	<b>A</b>	<b>VN I</b>	<b>VN B</b>	<b>434</b>	
	J7M2	A	VN I	VN B	213	
	<b>J7M3</b>	<b>A</b>	<b>VN I</b>	<b>VN B</b>	<b>29</b>	
J7M4	A	VN I	VN I	23		
J7M5	A	VN I	VN I	311		

<sup>a</sup>: Le sérotypage a été réalisé par PCR multiplex. <sup>b</sup>: Le génotypage a été réalisé par PCR-RFLP du gène *URA5*.

<sup>c</sup>: Génotypes obtenus après analyse des séquences MLST. <sup>d</sup>: *En gras, les génotypes discordants entre PCR-RFLP du gène *URA5* et MLST.*

Sur l'ensemble des 246 isolats testés, 3 sérotypes [A (n=165), AD (n=39) et B (n=42)] sont mis en évidence par la PCR multiplex. Ces 3 sérotypes sont subdivisés en 4 génotypes (153 VNI, 12 VNII, 39 VNIII et 42 VGII) par la PCR-RFLP du gène *URA5* et 63 ST par la MLST.

## II.2.1 Polymorphisme au sein d'un patient

### ○ Dans le même prélèvement

En comparant le génotype de l'isolat de départ à ceux des colonies isolées, nous démontrons que deux patients sont infectés par des isolats de génotypes différents (tableau 11) voire de ST différents (tableau 10) dans un même échantillon.

**Tableau 11:** Résultats obtenus chez 2 patients présentant des infections mixtes

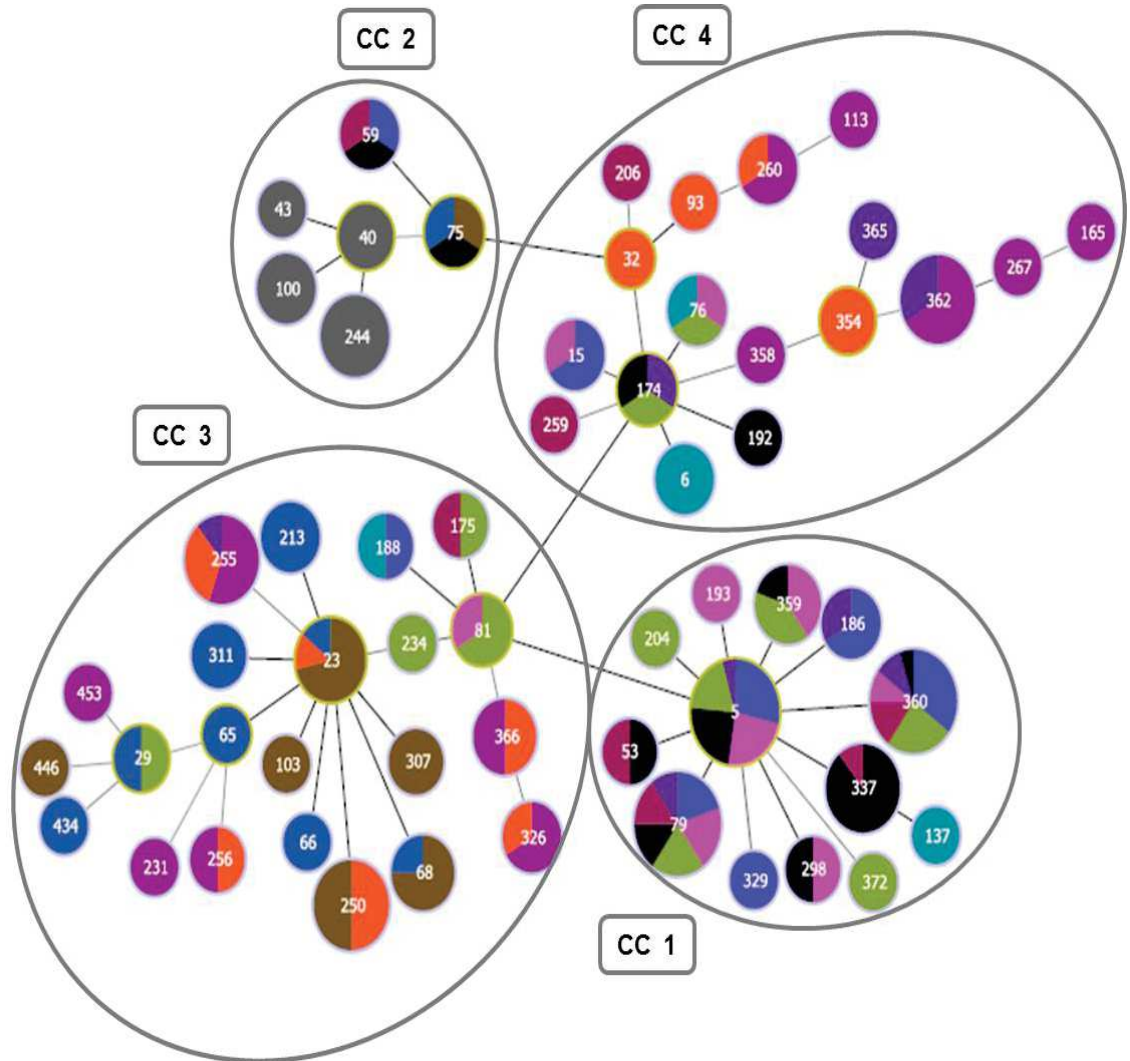
Patients	Age (ans) / Sexe	Prélèvements	Génotypes	
			Isolats de départ	Colonies isolées
6.10 <sup>a</sup>	39 / M	J0		VNIII
		J7	VNIII	VNI+VNIII
		S10	VNI	VNI
6.23 <sup>b</sup>	35 / F	J0		VNI
		J7		VGII
		J14	VGII	VGII+VNIII
		J28		VGII
		S10		VGII+VNI+VNIII

<sup>a</sup>: Chez le patient 6.10 à J7, l'isolat de départ est de génotype VNIII alors que les colonies isolées sont de génotype VNI et VNIII.

<sup>b</sup>: Chez le patient 6.23, l'isolat de départ est de génotype VGII quel que soit le prélèvement. A J14, les colonies isolées sont de génotype VGII et VNIII. Par contre, à S10, trois génotypes sont obtenus (VGII, VNI et VNIII).

### ○ Au cours du suivi

Nous avons recherché la distribution des ST issus d'un patient au sein de l'ensemble des 63 ST. Les résultats sont présentés à la figure 29.



**Figure 29:** Minimum Spanning Tree (MST) obtenu à partir du profil génétique des 13 patients.

L'arbre de recouvrement minimum montre la relation génétique entre les 63 ST obtenus à partir des 246 isolats de *Cryptococcus*. Chaque ST est représenté par un cercle et son diamètre est proportionnel au nombre d'isolats appartenant à ce ST. Les traits pleins indiquent que les ST diffèrent par un ou deux loci MLST. Une ligne grise indique que les ST diffèrent par au moins 3 loci. Les couleurs des ST sont uniques pour chacun des 13 patients. La distance entre les cercles dans le diagramme ne reflète aucune relation.

6.10	6.17	6.19	6.20	6.21
6.22	6.23	6.25	6.26	6.27
6.29	6.30	6.34		

Les 63 ST sont regroupés en 4 complexes clonaux (CCs). Sur les 13 patients suivis, 12 patients sont infectés par des isolats de *Cryptococcus* dont les ST sont retrouvés dans 2, 3 ou 4 complexes clonaux. Par contre, un seul patient (6.22) est infecté par des isolats de *Cryptococcus* dont les ST sont retrouvés uniquement dans un seul complexe clonal.

Nous avons également comparé au cours du suivi, les ST des isolats de départ et ceux des colonies isolées chez les 13 patients. Les résultats sont présentés dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Répartition des ST au sein des 41 prélèvements de départ issus des 13 patients inclus dans l'étude.

Patients	Prélèvements	ST	Patients	Prélèvements	ST	Patients	Prélèvements	ST
6.10	JOM	255	6.21	J7M	173	6.26	JOM	173
	JOM1	366		J7M1	173		JOM1	173
	JOM2	354		J7M2	173		JOM2	173
	JOM3	354		J7M3	173		JOM3	173
	JOM4	260		J7M4	173		JOM4	340
	JOM5	326		J7M5	173		JOM5	114
	J7M	366		J14M	173		J7M	340
	J7M1	93		J14M1	365		J7M1	173
	J7M2	32		J14M2	362		J7M2	173
	J7M3	255		J14M3	362		J7M3	173
	J7M4	256		J14M4	362		J7M4	173
	J7M5	255		J14M5	173		J7M5	173
	S10M	250		J28M	173		J14M	173
	S10M1	23		J28M1	173		J14M1	173
	S10M2	250		J28M2	173		J14M2	173
	S10M3	250		J28M3	173		J14M3	173
	S10M4	250		J28M4	173		J14M4	340
S10M5	250	J28M5	340	J14M5	88			
6.17	JOM	360	6.22	S10M	173	6.27	JOM	188
	JOM1	79		S10M1	255		JOM1	137
	JOM2	360		S10M2	79		JOM2	6
	JOM3	5		S10M3	360		JOM3	6
	JOM4	186		S10M4	173		JOM4	6
	JOM5	360		S10M5	173		JOM5	76
	J7M	15		JOM	244		J7M	173
	J7M1	186		JOM1	244		J7M1	173
	J7M2	15		JOM2	43		J7M2	173
	J7M3	79		JOM3	100		J7M3	173
	J7M4	5		JOM4	40		J7M4	88
	J7M5	360		JOM5	100		J7M5	167
	J14M	360		J7M	100		JoM	359
	J14M1	59		J7M1	40		JoM1	174
	J14M2	188		J7M2	244		JoM2	53
	J14M3	79		J7M3	244		JoM3	337
	J14M4	5		J7M4	244		JoM4	5
J14M5	5	J7M5	244	JoM5	79			
J28M	5	JOM	359	J7M	337			
J28M1	79	JOM1	360	J7M1	337			
J28M2	360	JOM2	79	J7M2	5			
J28M3	329	JOM3	5	J7M3	5			
J28M4	360	JOM4	29	J7M4	75			
J28M5	5	JOM5	76	J7M5	337			
6.19	JOM	79	6.23	J7M	372	6.29	J14M	5
	JOM1	359		J7M1	360		J14M1	79
	JOM2	5		J7M2	79		J14M2	337
	JOM3	5		J7M3	360		J14M3	337
	JOM4	5		J7M4	175		J14M4	337
	JOM5	79		J7M5	5		J14M5	5
	J28M	193		J14M	360		S10M	79
	J28M1	79		J14M1	5		S10M1	360
	J28M2	5		J14M2	204		S10M2	59
	J28M3	298		J14M3	359		S10M3	298
	J28M4	359		J14M4	81		S10M4	337
	J28M5	81		J14M5	234		S10M5	192
	S20M	360		J28M	79		JOM	259
	S20M1	15		J28M1	174		JOM1	79
	S20M2	79		J28M2	79		JOM2	337
	S20M3	360		J28M3	5		JOM3	59
	S20M4	76		J28M4	360		JOM4	360
S20M5	5	J28M5	81	JOM5	360			
6.20	JOM	23	6.25	JOM	256	6.30	J7M	79
	JOM1	250		JOM1	113		J7M1	360
	JOM2	68		JOM2	255		J7M2	206
	JOM3	250		JOM3	165		J7M3	79
	JOM4	23		JOM4	362		J7M4	53
	JOM5	68		JOM5	358		J7M5	175
	J7M	446		J7M	255		JOM	68
	J7M1	23		J7M1	453		JOM1	66
	J7M2	307		J7M2	362		JOM2	75
	J7M3	23		J7M3	255		JOM3	213
	J7M4	103		J7M4	326		JOM4	213
	J7M5	250		J7M5	366		JOM5	65
	J14M	250		J14M	255		J7M	311
	J14M1	250		J14M1	366		J7M1	434
	J14M2	75		J14M2	231		J7M2	213
	J14M3	68		J14M3	362		J7M3	29
	J14M4	307		J14M4	260		J7M4	23
J14M5	23	J14M5	362	J7M5	311			
6.21	JOM	173	6.25	J28M	362	6.34	JOM	68
	JOM1	5		J28M1	267		JOM1	66
	JOM2	79		J28M2	255		JOM2	75
	JOM3	186		J28M3	362		JOM3	213
	JOM4	174		J28M4	326		JOM4	213
	JOM5	360		J28M5	260		JOM5	65

Les ST du patient infecté par des isolats génétiquement proches sont en rouge.

Globalement, 12 patients sont infectés par des isolats de *Cryptococcus* dont les ST diffèrent par 4 à 7 loci. Ces isolats appartiennent à plusieurs complexes clonaux, ils sont génétiquement différents. Par contre, le patient 6.22 est infecté par des isolats dont les ST diffèrent par 3 loci. Ces isolats appartiennent à un même complexe clonal (CC1) donc sont génétiquement proches (figure 29).

Nous avons, au cours de notre étude, comparé les ST retrouvés au cours du temps chez un même patient. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

**Tableau 13** : ST retrouvés au cours du temps chez un même patient.

Patients	Prélèvements	ST obtenus											
6.10	J0	-	-	-	-	255	-	260	326	354	366		
	J7	-	32	93	-	255	256	-	-	-	366		
	S10	23	-	-	250	-	-	-	-	-	-		
6.17	J0	<b>5</b>	-	-	<b>79</b>	186	-	-	<b>360</b>				
	J7	<b>5</b>	15	-	<b>79</b>	186	-	-	<b>360</b>				
	J14	<b>5</b>	-	59	<b>79</b>	-	188	-	<b>360</b>				
	J28	<b>5</b>	-	-	<b>79</b>	-	-	329	<b>360</b>				
6.19	J0	<b>5</b>	-	-	<b>79</b>	-	-	-	359	-			
	J28	<b>5</b>	-	-	<b>79</b>	81	193	298	359	-			
	S20	<b>5</b>	15	76	<b>79</b>	-	-	-	-	360			
6.20	J0	<b>23</b>	68	-	-	<b>250</b>	-	-					
	J7	<b>23</b>	-	-	103	<b>250</b>	307	446					
	J14	<b>23</b>	68	75	-	<b>250</b>	307	-					
6.21	J0	5	79	<b>173</b>	174	186	-	-	360	-	-		
	J7	-	-	<b>173</b>	-	-	-	-	-	-	-		
	J14	-	-	<b>173</b>	-	-	-	-	-	362	365		
	J28	-	-	<b>173</b>	-	-	-	340	-	-	-		
	S10	-	79	<b>173</b>	-	-	255	-	360	-	-		
6.22	J0	<b>40</b>	43	<b>100</b>	<b>244</b>								
	J7	<b>40</b>	-	<b>100</b>	<b>244</b>								
6.23	J0	<b>5</b>	29	76	79	-	-	-	-	-	359	<b>360</b>	-
	J7	<b>5</b>	-	-	79	-	-	175	-	-	-	<b>360</b>	372
	J14	<b>5</b>	-	-	-	81	-	-	204	234	359	<b>360</b>	-
	J28	<b>5</b>	-	-	79	81	174	-	-	-	-	<b>360</b>	-
6.25	J0	113	165	-	<b>255</b>	256	-	-	-	358	<b>362</b>	-	-
	J7	-	-	-	<b>255</b>	-	-	-	326	-	<b>362</b>	366	453
	J14	-	-	231	<b>255</b>	-	260	-	-	-	<b>362</b>	366	-
	J28	-	-	-	<b>255</b>	-	260	267	326	-	<b>362</b>	-	-
6.26	J0	-	114	<b>173</b>	<b>340</b>								
	J7	-	-	<b>173</b>	<b>340</b>								
	J14	88	-	<b>173</b>	<b>340</b>								
6.27	J0	6	76	-	137	-	-	188					
	J7	-	-	88	-	167	173	-					
6.29	J0	5	53	-	-	79	174	-	-	<b>337</b>	359	-	
	J7	5	-	-	75	-	-	-	-	<b>337</b>	-	-	
	J14	5	-	-	-	79	-	-	-	<b>337</b>	-	-	
	J28	-	-	59	-	79	-	192	298	<b>337</b>	-	360	
6.30	J0	-	59	<b>79</b>	-	-	259	337	<b>360</b>				
	J7	53	-	<b>79</b>	175	206	-	-	<b>360</b>				
6.34	J0	-	-	65	66	68	75	<b>213</b>	-	-			
	J7	23	29	-	-	-	-	<b>213</b>	311	434			

<sup>a</sup>: En gras, les ST, retrouvés de manière permanente au cours du suivi chez un même patient.

Sur les 13 patients suivis, 11 patients possèdent 1 à 3 ST issus des isolats de départ, qui sont retrouvés au cours du temps.

## II.2.2. Polymorphisme entre patients

Nous avons comparé les ST communs aux 13 patients. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

**Tableau 14:** Profil allélique et fréquence des ST retrouvés chez au moins 2 patients.

ST	CAP59	GDP1	IGS1	LAC1	PLB1	SOD1	URA5	Isolats <sup>a</sup>	Patients <sup>b</sup>	Sérotypes	Génotypes
79	1	3	46	5	2	1	1	20	6	A	VNI
360	1	3	1	5	2	1	45	20	6	A	VNI
<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>21</b>	<b>5</b>	<b>A</b>	<b>VN I</b>
174	1	1	1	3	2	1	1	3	4	A	VNI
23	7	1	1	2	1	1	2	7	3	A	VN I
59	1	3	14	3	4	1	1	3	3	A	VNI
75	1	1	14	3	4	1	1	3	3	A	VNI
76	1	1	20	3	2	1	1	3	3	A	VNI
<b>173</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>93</b>	<b>2</b>	<b>34</b>	<b>3</b>	<b>B</b>	<b>VGII</b>
255	16	1	53	2	14	1	20	9	3	AD	VNIII
359	1	25	1	5	2	1	1	5	3	A	VNI
15	1	2	6	3	2	1	1	3	2	A	VN I
29	6	13	12	6	9	8	13	2	2	A	VN I
53	1	3	1	3	2	1	1	2	2	A	VNI
68	7	3	1	2	1	1	2	4	2	A	VNI
81	1	1	1	5	2	1	1	3	2	A	VNI
88	6	6	15	4	1	15	2	2	2	B	VGII
175	1	1	1	4	2	1	1	2	2	A	VNI
186	1	26	1	5	2	1	1	3	2	A	VNI
188	1	1	1	5	2	1	5	2	2	A	VNI
250	7	1	1	2	1	38	2	10	2	A	VNI
256	17	1	28	6	14	1	16	2	2	AD	VNIII
260	16	23	24	3	4	1	19	3	2	AD	VNIII
298	1	3	34	5	2	1	1	2	2	A	VNI
326	26	23	60	23	16	1	40	3	2	AD	VNIII
337	1	3	1	4	2	1	1	9	2	A	VNI
340	8	21	22	4	2	58	2	3	2	B	VGII
362	5	22	24	19	10	1	18	9	2	AD	VNIII
366	29	1	60	23	16	1	1	4	2	AD	VNIII

<sup>a</sup>: Nombre d'isolat correspondant à un ST donné.

<sup>b</sup>: Nombre de patient correspondant à un ST donné.

<sup>b</sup>: En gras, les ST majoritaires.

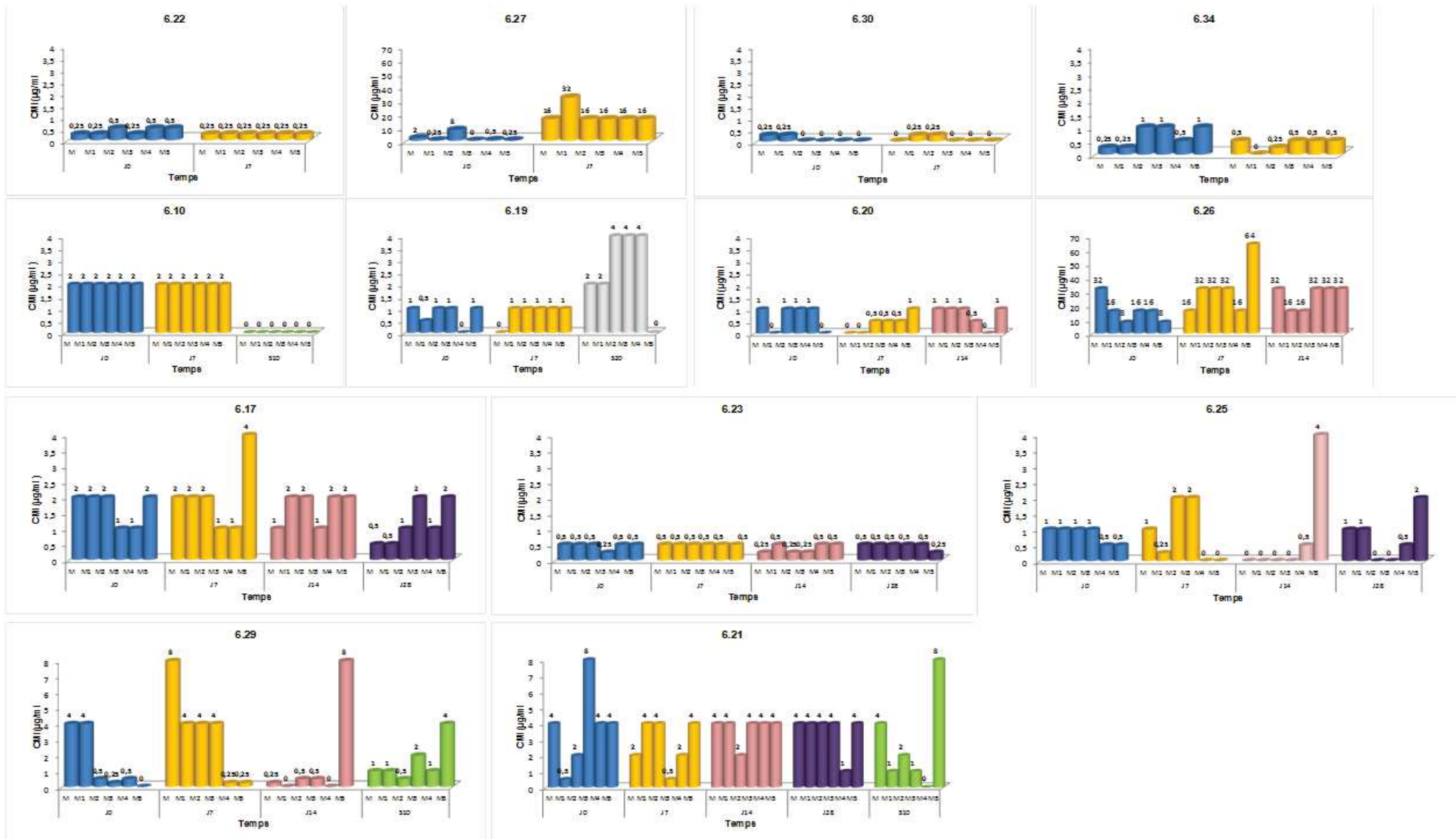


Dans la population générale étudiée, les ST majoritaires sont les ST173 (n=34 isolats) et ST5 (n=21 isolats). 29 ST sont retrouvés chez au moins 2 patients différents.

### **II.3. Sensibilité aux antifongiques des isolats initiaux et des isolats de suivi de *Cryptococcus***

Parmi les 246 isolats, 22 (8,9%) sont résistants au fluconazole (FCZ) alors que seulement 11 (4,4%) sont résistants à la flucytosine (5FC) ( $16 < \text{CMI} < 64 \mu\text{g/ml}$ ). En revanche, tous les isolats sont sensibles à l'amphotéricine B (AMB) ( $\text{CMI} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ ). Aucun cas de résistance croisée au FCZ et à la 5FC n'est observé. Les figures 30, 31 et 32 représentent les concentrations minimales inhibitrices des isolats de tous les patients en fonction du temps pour chaque antifongique testé.

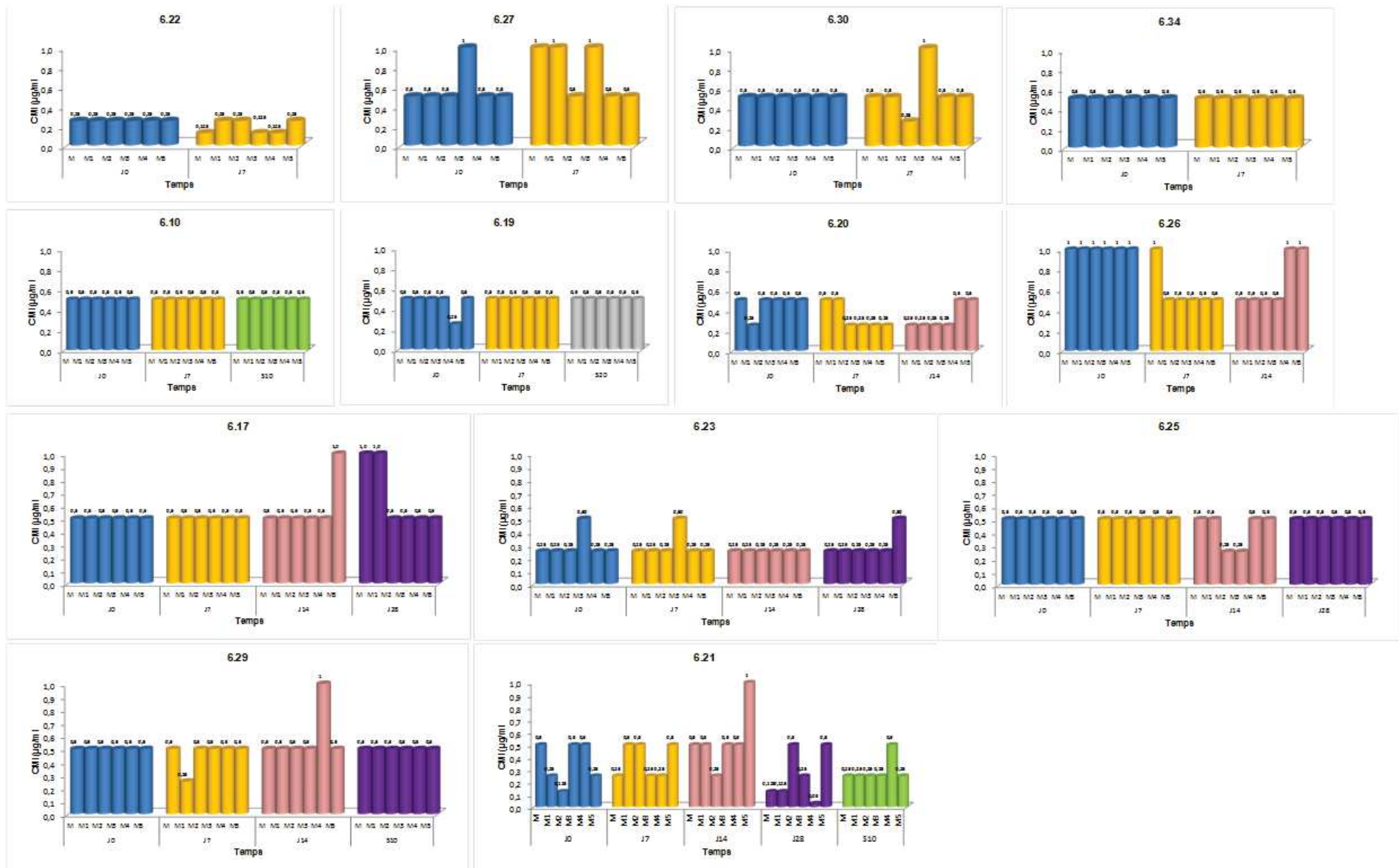
Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire



**Figure 30 :** Evolution des CMI au fluconazole en fonction du temps pour les 13 patients inclus dans cette étude dont les souches sont suivies.  
 Le graphique montre que pour le FCZ, les isolats acquièrent une résistance de J7 à J14 chez le patient 6.27 tandis qu'ils sont résistants avant l'initiation du traitement chez le patient 6.26.



Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire



**Figure 32 :** Evolution des CMI à l'amphotéricine B en fonction du temps pour les 13 patients dont les souches sont suivies. Le graphique montre que pour l'AMB, aucun des isolats n'est résistant avant et après le traitement antifongique.

Les 22 isolats résistants au FCZ sont de sérotype B et issus de 2 patients. Par contre, la résistance à la 5FC est observée quel que soit le sérotype A, B ou AD. Nous constatons chez 8 patients, une augmentation progressive des CMI pour le FCZ et la 5FC au cours du suivi. Le tableau 15 présente la relation entre des marqueurs de l'intensité de l'infection, la résistance aux antifongiques et le séro-génotypage.

**Tableau 15:** Relation entre données biologiques, la résistance aux antifongiques et le séro-génotypage.

Patients	Données biologiques			Résistance aux antifongiques				Séro-génotypage	
	Décès < S10	CFU/ml (J0)	Titres d'antigènes	Isolats FCZ résistants	Isolats 5FC résistants	Périodes concernées	CMI (µg/ml)	Sérotypes	Infection mixte
6.10		55 040	1/1 000 <sup>e</sup>		(n=1)	J7	16	AD	A-AD
6.17		104 960	1/10 000 <sup>e</sup>					A	
6.19		430 080	1/10 000 <sup>e</sup>					A	
6.20	X	3 360	1/1 000 <sup>e</sup>					A	
6.21	X	76 800	1/10 000 <sup>e</sup>		(n=6)	J14	>64	AD (n=4) B (n=2)	AD-B
6.22		6 400	1/10 000 <sup>e</sup>					A	
6.23		291 840	1/10 000 <sup>e</sup>					A	
6.25		11 520	1/10 000 <sup>e</sup>					AD	
6.26		2 640	1/1 000 <sup>e</sup>	(n=16)		J0 (n=4) J7 (n=6) J14 (n=6)	16-32 16-64 16-32	B	
6.27		13 440	1/1000 <sup>e</sup>	(n=6)		J7	16-32	B	
6.29		52 480	1/10 000 <sup>e</sup>		(n=3)	J14	64	A	
6.30	X	64 000	1/10000 <sup>e</sup>		(n=1)	J7	16	A	
6.34	X	70 400	1/10000 <sup>e</sup>					A	

CFU: La culture quantitative du LCR est exprimée en unité formant des colonies (CFU/ml de LCR)

Ce tableau permet de comparer la charge fongique et le titre antigénique chez les 13 patients. Nous constatons que les patients décédés avant d'atteindre la dixième semaine de traitement antifongique sont au nombre de quatre. Ils hébergeaient des isolats de *Cryptococcus* de sérotype A. Mais, il n'y avait pas de lien entre la résistance et la charge fongique, le titre antigénique ou le décès des patients.

Nous avons évalué les relations entre résistance aux antifongiques, sérotypes et génotypes ST chez *Cryptococcus*. Le tableau 16 présente les fréquences des ST associés à la résistance au FCZ et à la 5FC en fonction du sérotype.

**Tableau 16:** Fréquences des ST associés à la résistance au fluconazole et à la flucytosine.

Sérotypes	Nombre d'isolats / 246	Isolats FCZ résistants (%)	CMI (µg/ml)	Isolats 5FC résistants (%)	CMI (µg/ml)
ST5	21	0		1 (4,7)	64
ST79	20	0		1 (5)	16
ST337	9	0		2 (22,2)	64
ST88	2	2 (100)	16-32	0	
ST167	1	1 (100)	16	0	
ST173	34	16 (47)	16-64	2	> 64
ST340	4	3 (75)	16-32	0	
ST362	9	0		3 (33,33)	> 64
ST365	1	0		1 (100)	> 64
ST366	4	0		1 (25)	16
Total	105	22 (20,9)		11 (10,4)	

Sur l'ensemble des ST (n=10) associés à une résistance aux antifongiques, 4 ST (88, 167, 173 et 340) concernent le FCZ et 6 (5, 79, 337, 362, 365 et 366) concernent la 5FC.

Le ST173 est majoritaire (48,5%) parmi les souches résistantes aux deux antifongiques. Ce même ST173 est associé à une résistance aussi bien pour le FCZ que pour la 5FC mais il n'y a pas de résistance croisée.

La globalité des résultats de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques de référence des 246 isolats de suivi est présentée en annexe 9.

## II.4. Discussion

Les patients atteints de méningite à *Cryptococcus* en Afrique subsaharienne rechutent souvent malgré le traitement. Ces récives peuvent être dues au développement de la résistance aux antifongiques, à une persistance de la souche initiale ou à des réinfestations par une souche génétiquement différente. Pour cela, dans un premier temps, nous avons déterminé et comparé par MLST les génotypes des isolats initiaux et des isolats de suivi de 13 patients afin de comprendre leur évolution au cours du temps. Dans un second temps, nous avons testé puis



comparé leur sensibilité aux antifongiques. Les patients de l'étude sont en majorité des femmes (53,9%), en raison de leur forte représentation dans la population de PVVIH en Côte d'Ivoire, (**Aoussi et al., 2012**). Cependant, ces patients sont plus âgés (54% ont un âge supérieur à 40 ans) que les patients de notre première cohorte.

L'acquisition de souches multiples par l'homme est possible étant donné la diversité des souches présentes dans l'environnement. Nous rapportons ici, des infections mixtes chez deux patients. L'analyse génétique des isolats de la culture initiale et de cinq colonies isolées est systématiquement réalisée dans notre laboratoire, ce qui permet la mise en évidence de ces infections mixtes (**Bertout et al., 2013; Ngouana et al., 2016**). Cette pratique, encore inhabituelle dans les laboratoires d'épidémiologie moléculaire, nous a permis de démontrer qu'au sein d'un même isolat de départ, une diversité génétique importante peut exister même en présence d'un traitement antifongique. Les infections mixtes sont à prendre en compte dans la prise en charge des patients car il a déjà été démontré que des patients avec des infections mixtes avaient 4 à 5 fois plus d'échec mycologique après deux semaines de traitement (**Desnos-Ollivier et al., 2015**). Sur des modèles animaux, il a été aussi montré que des différences génétiques entre isolats séquentiels de *Cryptococcus* influencent la virulence et la persistance d'une infection à *Cryptococcus* (**Fries & Casadevall, 1998**). Pour comprendre et expliquer la récurrence de la maladie, nous avons initié cette étude et avons analysé des isolats de suivi de 13 patients sur 10 ou 20 semaines lorsque cela a été possible. A notre connaissance, ce type d'étude est rare, et peu réalisée par MLST.

Chez un seul patient (6.22), le ST de la souche infectante est très proche de ceux observés au cours du suivi, ne variant que par 3 loci. Ces souches appartiennent à un même complexe clonal et sont donc génétiquement liées. Cette observation laisse penser à une microévolution de *Cryptococcus* au cours de l'infection. Ce procédé peut permettre à la population fongique de changer de génotypes, de ploïdie et d'échapper à l'éradication par le système immunitaire, et ainsi provoquer des infections chroniques comme suggéré par Jain *et al.* (**Jain et al., 2005, 2006**). A l'inverse, chez les douze autres patients, le ST de la souche infectante est différent de ceux observés au cours du suivi, variant par 4 à 7 loci. De plus, ces souches appartiennent à différents complexe clonaux (figure 29). Ces isolats ne sont donc pas génétiquement liés. Comme la majorité (n=12; 92,3%) de ce panel de patients héberge plusieurs souches différentes au cours du suivi, nous pensons que la récurrence de la CNM serait plutôt due à une réinfestation par des souches multiples au cours du temps. D'autres auteurs ont étudié la relation moléculaire entre les isolats de *Cryptococcus* obtenus à partir du même prélèvement ou lors d'infection récurrente avec différentes techniques (**Illnait-Zaragozi et al., 2010a; Sullivan et al., 1996; Van Wyk et al., 2014**). Ces auteurs suggèrent que la récurrence de l'infection est causée par une rechute de l'isolat de départ



au lieu d'une réinfestation et/ou une microévolution (**Litvinsteva et al., 2005; Sullivan et al., 1996; Van Wyk et al., 2014**). Dans ces travaux, une seule colonie était étudiée. De plus, nous avons choisi de faire ce travail de suivi en utilisant une technique plus innovante et discriminante qu'est la MLST, ce qui a permis la mise en évidence d'une forte variabilité génétique au sein de notre population.

L'utilisation de la MLST a permis d'isoler le génotype VNB. En effet, par les techniques classiques, 4 isolats sont VNI alors qu'ils sont identifiés VNB en MLST. L'utilisation de la MLST a permis une meilleure discrimination des isolats. Le génotype VNB est spécifique du continent africain et serait issu d'une contamination par des prélèvements issus d'arbres plutôt qu'à des souches d'origine aviaire (**Litvintseva et al., 2006**). Ce génotype a été isolé au Botswana, en Afrique du sud, au Rwanda, au Malawi et en République démocratique du Congo dans un premier temps. Des études plus récentes l'ont découvert en Italie, au Portugal, au Brésil et au Venezuela et très récemment en Chine (**Bovers et al., 2008a; Cogliati et al., 2013; Dou et al., 2015; Litvintseva et al., 2006**). La MLST nous a permis de mettre en évidence 63 ST au sein des 246 isolats initiaux et de suivi. Notre travail va incrémenter la base de données des génotypes déjà existants avec des souches cliniques ivoiriennes. Nous rapportons une forte prévalence du ST5 (12,7%) parmi les isolats VNI, décrits comme le plus virulent. Le ST5 a été à l'origine retrouvé au sein de souches japonaises, chinoises, préférentiellement dans les pays asiatiques (**Dou et al., 2015; Khayhan et al., 2013; Mihara et al., 2013**). Par exemple, en 2014 puis 2015, Park a mis en évidence ce ST sur des souches originaires de Corée du sud au sein d'isolats cliniques (44/46, 95,7%) et environnementaux (7/10, 70%) (**Park et al., 2014, 2015**). Plus récemment, il a été mis en évidence en Afrique (Afrique du sud, Uganda), en Europe (Italie), Amérique du sud (Brésil) et en Australie (**Beale et al., 2015; Danesi et al., 2014; Souto et al., 2016**). La dispersion des lignées clonales des souches portant ce ST peut probablement s'expliquer par la migration des personnes infectées par le VIH, des oiseaux ainsi que par le commerce international des produits horticoles et agricoles (**Carbone et al., 1999; Kronstad et al., 2011**).

Nos résultats montrent que 22 isolats sont résistants au FCZ et 11 isolats sont résistants à la 5FC (CMI = 16-64 µg/ml). Alors que le taux d'isolats résistants était faible dans notre première cohorte (5/363, 1,4%), il est élevé (33/246, 13,4%) dans cette seconde étude. Ce taux de résistance pourrait s'expliquer par le fait que pour cette étude uniquement, les patients ont reçu du FCZ à forte dose (1600 mg/j) et de la 5FC (100mg/kg/j). Le FCZ a une bonne pénétration dans le SNC avec des effets secondaires minimes. Pour cette raison, il est couramment utilisé dans le traitement de la cryptococcose, principalement chez les patients immunodéprimés (**Brandt et al., 2001**). Cependant, avec certaines souches, une exposition répétée ou un traitement prolongé avec des azolés peut conduire au développement de la résistance (**Sanglard, 2002; Bicanic et al.,**

**2009; Fera et al., 2009**). De plus, dans les pays en développement comme la Côte d'Ivoire, l'accessibilité à l'AMB liposomale et la 5FC est difficile et l'alternative thérapeutique repose sur le FCZ à fortes doses (**Perfect et al., 2010; WHO 2016**). Il est connu que la croissance *in vitro* de *Cryptococcus* en présence de fortes concentrations de FCZ induit la sélection de colonies résistantes à CMI élevées (**Sionov et al., 2009; Xu et al., 2001**), et ceci a été montré *in vivo* chez des souris infectées traitées avec du FCZ (**Sionov et al., 2013**). Beaucoup d'études ont démontré que la résistance de *Cryptococcus* aux antifongiques peut contribuer aux récurrences de la CNM chez les patients (**Govender et al., 2011; Van Wyk et al., 2014; Illnait-Zaragozi et al., 2010**). Nous constatons que l'augmentation des CMI des isolats de *Cryptococcus* chez 8 patients au fil du temps conduit à la résistance au FCZ et à la 5FC chez 6 d'entre eux. Ces résultats indiquent que les changements des niveaux de sensibilité peuvent se produire lors de l'infection chronique, et l'émergence de souches résistantes peut parfois contribuer à une rechute de la maladie (**Brandt et al., 2005**). Dans une étude de 2014 réalisée en Afrique du sud, sur des isolats de *Cryptococcus* issus de prélèvement espacés de 110 jours, les auteurs ont mis en évidence que 15% des patients (11/85) hébergeaient des isolats qui sont devenus 4 fois plus résistants au FCZ que les souches isolées au moment du diagnostic (**Van Wyk et al., 2014**).

Les mécanismes de résistance chez *Cryptococcus* ne sont pas bien connus, contrairement au genre *Candida* et peu d'études s'y intéressent. Néanmoins, plusieurs mécanismes sont suggérés. Le développement de la résistance aux azolés chez *Cryptococcus* peut se produire par l'acquisition de mutations ponctuelles (mutation G1855A par exemple) du gène *ERG11* codant pour la 14- $\alpha$  déméthylase, cible principale des azolés (**Sionov et al., 2012; Borgeat et al., 2016**) et/ou par une surexpression des protéines de la membrane plasmique qui pompe le médicament hors des cellules (**Ngamskulrunroj et al., 2012; Posteraro et al., 2003; Sanglard et al., 2009**). Récemment, il a été démontré que les pompes à efflux codées par les gènes *PDR11* confèrent une résistance au FCZ chez *C. deuterogattii* VGII (**Yang et al., 2016**).

De façon surprenante, ce sont les isolats de sérotype B qui sont résistants au FCZ, parfois même au moment du diagnostic de la CNM. Dans ce dernier cas, il pourrait s'agir d'une résistance naturelle car les patients n'ont pas reçu de traitement antifongique avant leur inclusion. Le type moléculaire VGII a connu un grand intérêt ces dernières années en raison de l'apparition de plusieurs sous-types, VGIIa, VGIIb et VGIIc (**Byrnes et al., 2010; Chong et al., 2010**) et la sensibilité au FCZ varie en fonction du type moléculaire. En effet, Il a été démontré que *C. neoformans* est plus sensible au FCZ par rapport à *C. gattii* (**Chowdhary et al., 2011**) et *C. deuterogattii* (**Trilles et al., 2012**), mais moins sensible à la 5FC et l'AMB par rapport à *C. gattii* (**Chau et al., 2010**). Il a été également démontré qu'un titre élevé (>1:1024) de l'antigène polysaccharidique dans le sérum ou le LCR, tout comme une forte charge fongique (>100 000 ou

10<sup>5</sup> CFU/ml) sont des facteurs prédictifs d'un échec de la thérapie antifongique (**Day et al., 2013; Jarvis et al., 2014**). Nous retrouvons chez la plupart de nos patients, ces mêmes marqueurs de gravité de l'infection mais nous n'avons mis en évidence ni de corrélation entre la charge fongique et la résistance aux antifongiques ni de résistance croisée au sein de notre cohorte. Si nous nous intéressons aux patients décédés avant la dixième semaine de traitement antifongique (S10), nous remarquons qu'ils hébergent des isolats de sérotype A décrit comme le plus virulent (**Dromer et al., 2007**). Par ailleurs, cinq autres patients qui hébergeaient des isolats de sérotype A ont vécu au-delà de S10.

## II.5. Conclusion partielle 2

Dans cette deuxième partie, nous avons comparé par PCR multiplex, PCR-RFLP du gène *URA5*, MLST et le profil de sensibilité aux antifongiques, 246 isolats initiaux et de suivi de *Cryptococcus*. Nous rapportons une grande diversité génétique de *Cryptococcus* entre patients et au sein d'un même patient au cours du suivi. La technique MLST nous a permis de mettre en évidence 63 ST au sein des 246 isolats dont 29 ST retrouvés entre patients. Nous rapportons une prévalence élevée du ST5 parmi les isolats VNI. Nous rapportons des cas d'infection mixte et les premiers cas d'isolats de génotype VNB en Côte d'Ivoire. La MLST permet donc une meilleure discrimination des isolats. La récurrence de la CNM dans cet échantillon de patients serait plutôt due à la réinfestation plutôt qu'à une rechute due à la persistance de la souche de départ ou à des microévolutions. L'étude de la sensibilité aux antifongiques a montré que 22 isolats de sérotype B, issus de 2 patients sont résistants au FCZ. La résistance à la 5FC concerne 11 isolats. Elle est observée quel que soit le sérotype A, B ou AD, chez 4 patients. En revanche, tous les isolats sont sensibles à l'AMB (CMI < 1µg/ml). L'augmentation des CMI de *Cryptococcus* au fil du temps chez 8 patients conduit à la résistance au FCZ et à la 5FC chez 6 d'entre eux. Certes, il n'y a pas de résistance croisée au sein de notre cohorte mais le ST173 est associé à la résistance au FCZ et à la 5FC. Malgré la diversité très marquée de *Cryptococcus*, il n'existe aucune relation entre les souches typées, la charge fongique, le titre antigénique, la résistance et le décès à la dixième semaine de traitement antifongique (S10). Ce résultat mérite d'être confirmé par des études plus poussées.

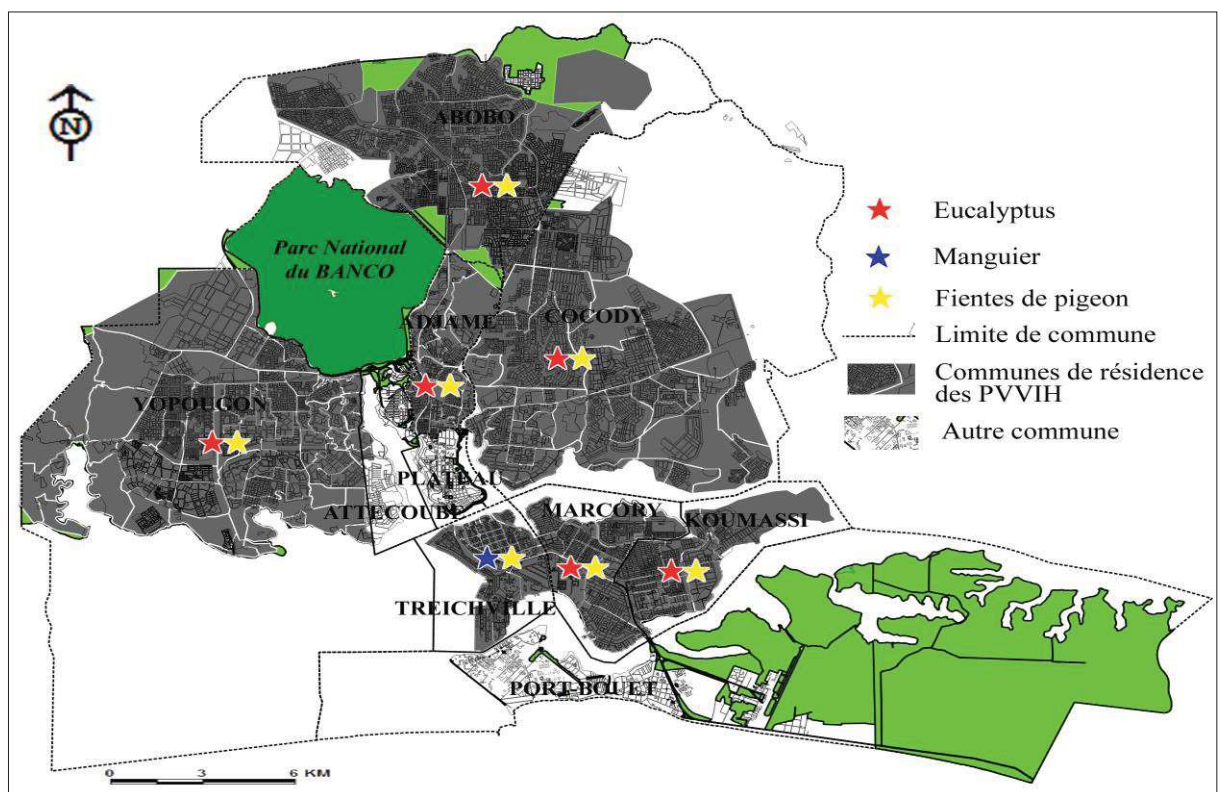
Cette deuxième étude a montré que la récurrence de la CNM chez les PVVIH ivoiriens est due à des reinfestations par des souches de génotypes distincts, acquises simultanément ou non dans l'environnement. Classiquement, les principales sources environnementales comprennent les sols contaminés par les fientes de pigeons et les arbres. Dans une troisième étude, nous avons comparé les types moléculaires et le profil de sensibilité aux antifongiques d'isolats de *Cryptococcus* à partir de prélèvements environnementaux et cliniques.

### III. COMPARAISON D'ISOLATS CLINIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX DE *CRYPTOCOCCUS*

#### III.1. Caractéristiques de la population étudiée

Les patients inclus dans cette étude sont les patients de la cohorte ANRS qui n'ont pas eu de suivi. Un total de 12 souches a été isolé.

Un total de 667 (518 fientes de pigeons et 149 issus d'arbres) échantillons environnementaux a été prélevé dans les communes suivantes: Abobo, Adjamé, Cocody, Koumassi, Marcory, Treichville et Yopougon. Nous avons récupéré et isolé *Cryptococcus* uniquement à partir de 12 échantillons de fientes de pigeons donnant un taux de positivité de 2,3% (12/518). Ces 12 échantillons de fientes de pigeon ont été récoltés dans la seule commune d'Adjamé, dans un site d'élevage domestique de pigeons. Ces 12 isolats environnementaux sont comparés aux 12 isolats issus de patients dans cette étude. La figure 33 présente les communes de provenance des patients et la collecte des échantillons de l'environnement.

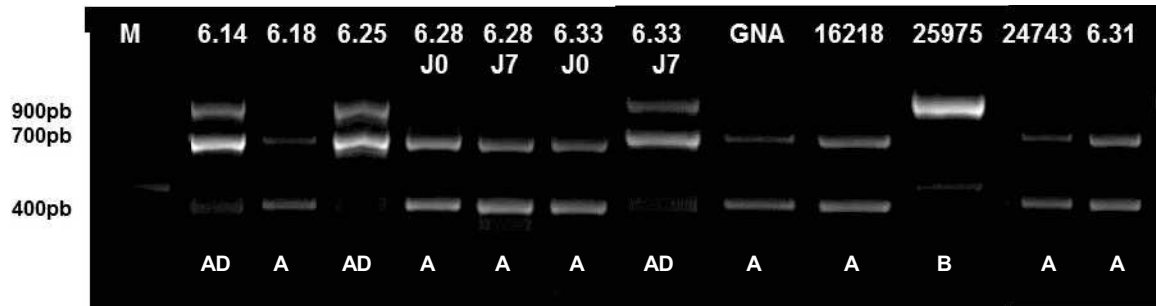


**Figure 33:** Distribution des communes de provenance des patients et de collecte des échantillons de l'environnement.

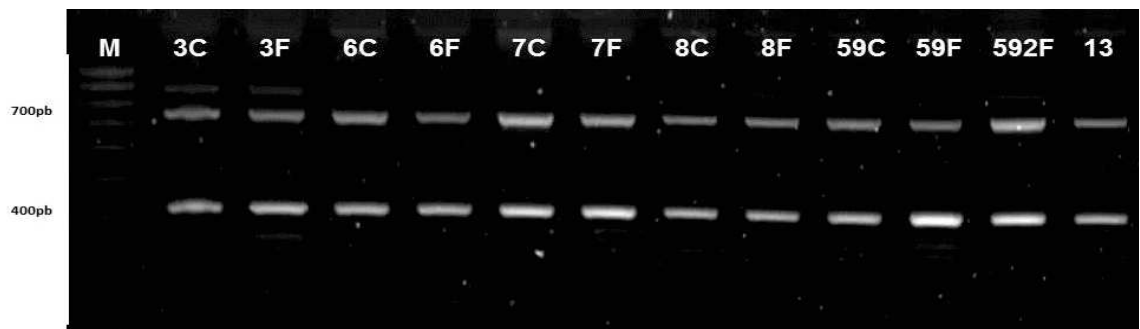
*En l'absence d'eucalyptus dans la commune de Treichville, les prélèvements ont été réalisés à partir de manguiers.*

### III.2. Sérotypage par PCR multiplex

Le sérotypage des 12 isolats cliniques a été réalisé comme précédemment décrit dans le matériel et méthodes (V.3.1.). Il révèle que 8 isolats (66,7%) sont de sérotype A, 3 isolats (25%) sont de sérotype AD, et un isolat (8,3%) est de sérotype B (patient 25975) (figure 34). Nous retrouvons les mêmes sérotypes que lors des deux précédentes études cliniques. Cependant, les 12 isolats issus de l'environnement sont de sérotype A (figure 35).



**Figure 34:** Profils électrophorétiques des 12 isolats cliniques de *Cryptococcus* obtenus par PCR multiplex.

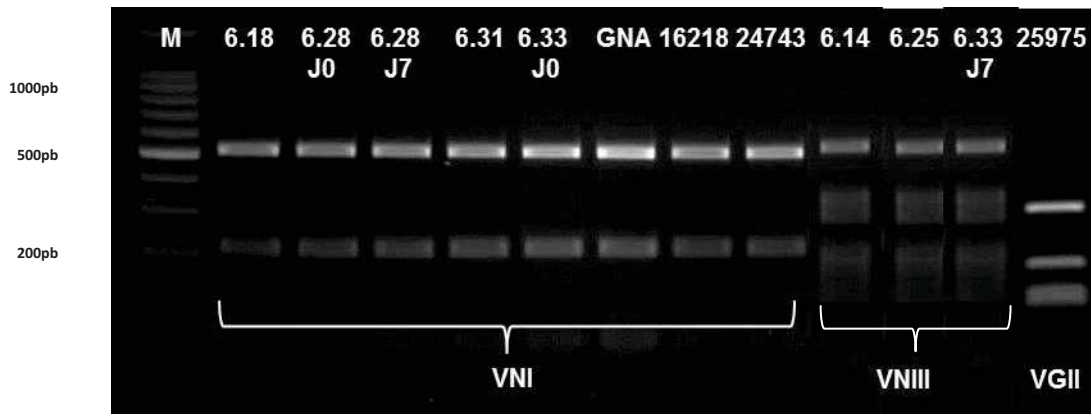


**Figure 35:** Profils électrophorétiques des 12 isolats environnementaux de *Cryptococcus* obtenus par PCR multiplex.

### III.3. Typage moléculaire par PCR-RFLP du gène *URA5*

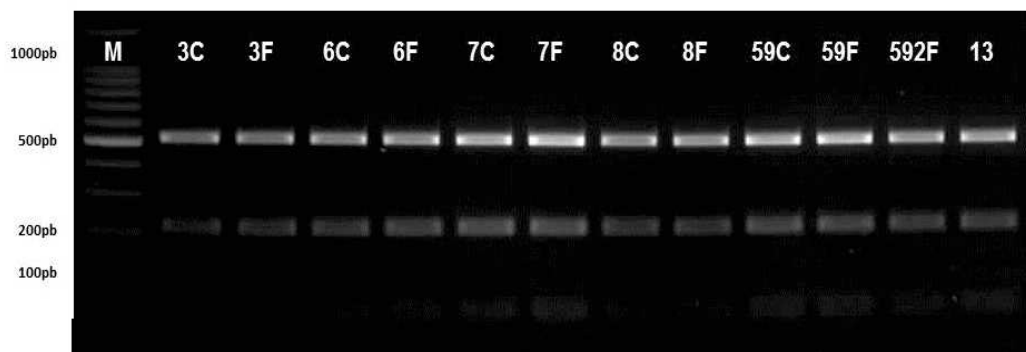
Après digestion des amplicons du gène *URA5* par les endonucléases *Hha1* et *Sau96*, nous obtenons 3 types moléculaires au sein des 12 isolats cliniques: 8 VNI, 3 VNIII et 1 VGII. La figure 36 montre les 3 profils de migration obtenus après analyse de notre population.





**Figure 36:** Profils électrophorétiques des trois génotypes obtenus par PCR-RLFP du gène *URA5* pour les 12 isolats cliniques.

Après digestion des amplicons du gène *URA5* par les endonucléases *Hha1* et *Sau96*, nous obtenons un profil électrophorétique identique pour les douze isolats issus de l'environnement. Il s'agit du type moléculaire VNI. La figure 37 montre l'unique profil de migration obtenu après analyse de notre population.



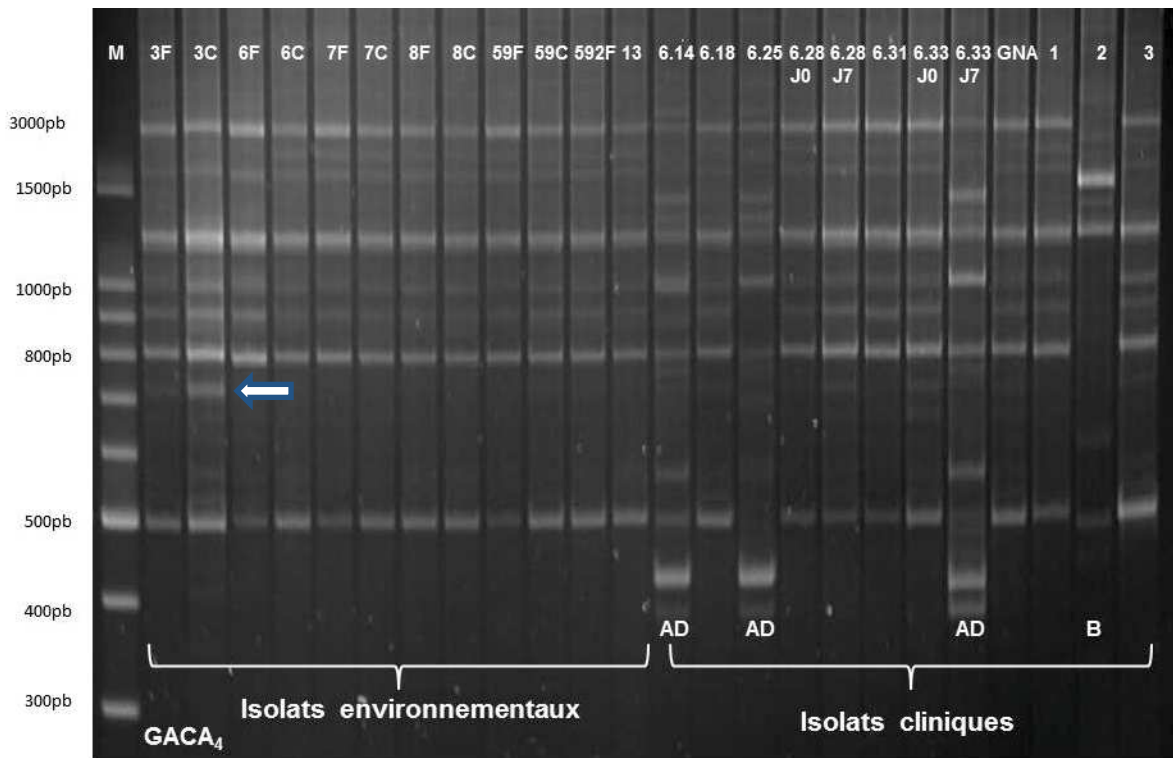
**Figure 37:** Profils électrophorétiques des 12 isolats environnementaux obtenus par PCR-RFLP du gène *URA5*.

Les bandes majeures obtenues pour le génotype VNI sont à 220 et à 500pb.

#### III.4. Typage moléculaire par amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> et minisatellite M13

Les isolats cliniques et environnementaux sont groupés en 3 sérotypes (A, AD et B), correspondant à 3 génotypes (VNI, VNIII et VGII). L'analyse des profils de migration de chaque micro ou minisatellite a permis d'observer de la diversité génétique au sein des 24 isolats (figure 38, 39 et 40).

○ **Microsatellites (GACA)<sub>4</sub>**



**Figure 38:** Profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub> des isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*.

Les échantillons 1, 2 et 3 correspondent aux échantillons 16218, 25975 et 24743.

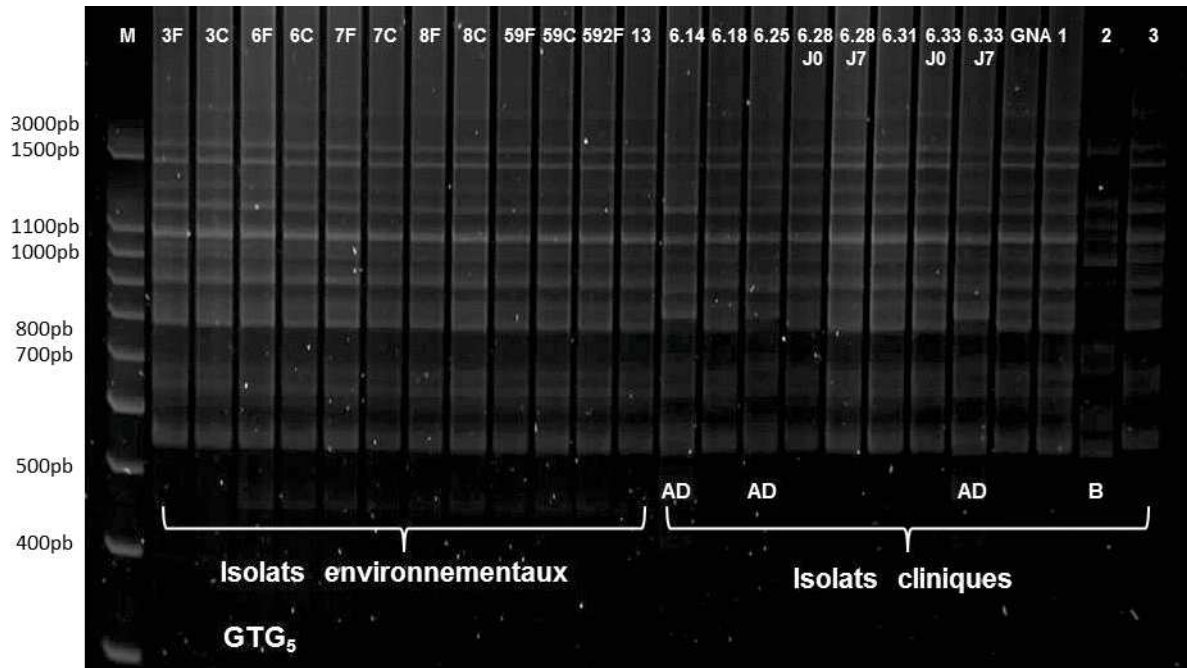
Les 12 isolats issus de l'environnement sont de sérotype A et de génotype VNI. Par amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub>, puis migration sur gel haute résolution, nous observons deux profils différents. Pour 10 des 12 isolats étudiés, le profil électrophorétique est identique. Par contre, chez les isolats 3F et 3C, les profils électrophorétiques se différencient de ceux des dix autres isolats par la présence d'une bande supplémentaire à 700 pb.

Les 12 isolats d'origine clinique sont de sérotype A, AD et B, et de génotype VNI, VNIII et VGII respectivement. Par amplification des séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub>, puis migration sur gel haute résolution, nous observons trois profils différents correspondant au trois sérotypes (A, AD et B). De façon surprenante, les isolats d'origine clinique et environnementale (exceptés 3F et 3C) de sérotype A ont des profils similaires.

Les profils de migration de l'ensemble des isolats (figure 38) montrent, que pour ce pool d'échantillon, à un sérotype donné, correspond un profil électrophorétique différent indépendamment de l'origine des isolats.



○ **Microsatellites (GTG)<sub>5</sub>**



**Figure 39:** Profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences microsatellites (GTG)<sub>5</sub> des isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*.

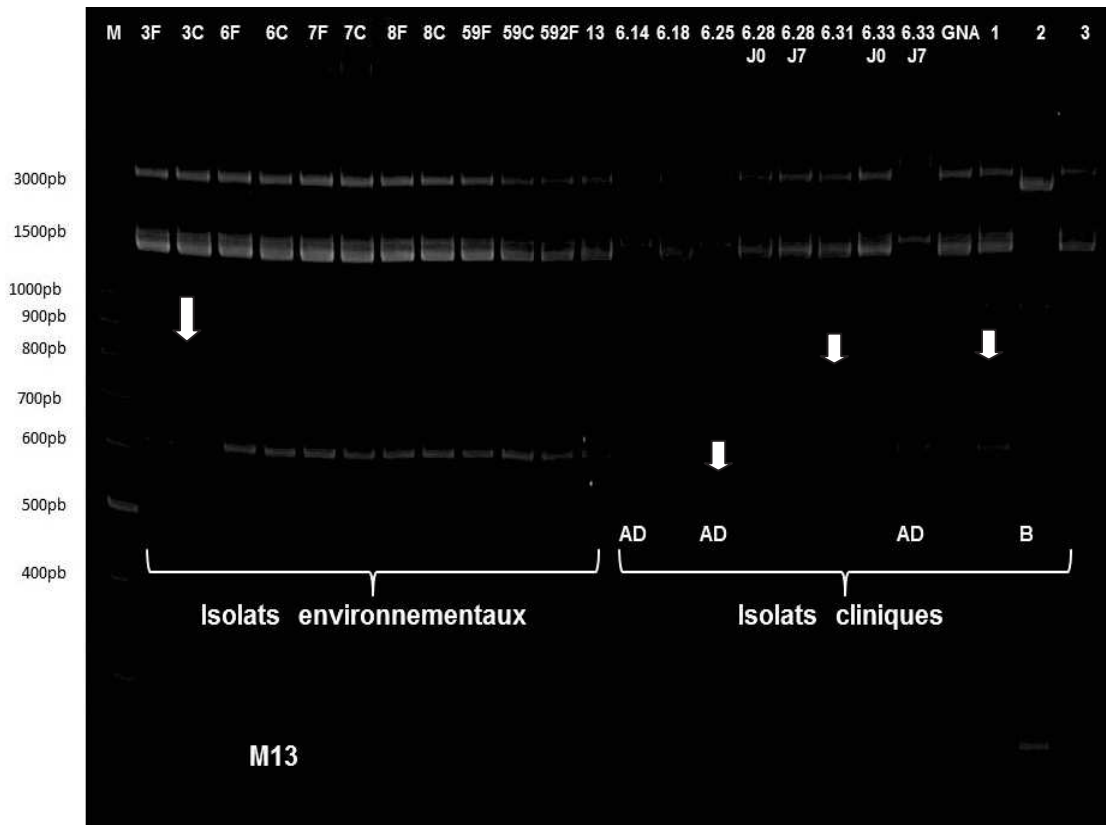
Les échantillons 1, 2 et 3 correspondent aux échantillons 16218, 25975 et 24743.

Par amplification des séquences microsatellites (GTG)<sub>5</sub>, puis migration sur gel haute résolution, nous observons un profil identique pour les 12 isolats issus de l'environnement.

Les 12 isolats d'origine clinique sont de sérotype A, AD et B, et de génotype VNI, VNIII et VGII respectivement. Par amplification des séquences microsatellites (GTG)<sub>5</sub>, puis migration sur gel haute résolution, nous observons trois profils différents correspondant au trois sérotypes (A, AD et B). Contrairement aux séquences microsatellites (GACA)<sub>4</sub>, tous les isolats d'origine clinique et environnementale de sérotype A ont des profils similaires.

Les profils de migration de ce pool d'isolats (figure 39) montrent qu'à un sérotype donné, correspond un profil électrophorétique identique indépendamment de l'origine des isolats.

o **Minisatellites M13**



**Figure 40:** Profils de migration sur gel haute résolution après amplification des séquences minisatellites M13 des isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*.

Les échantillons 1, 2 et 3 correspondent aux échantillons 16218, 25975 et 24743.

Par amplification des séquences minisatellites M13, puis migration sur gel haute résolution, nous observons deux profils différents pour les 12 isolats issus de l'environnement. Pour 10 des 12 isolats étudiés, le profil électrophorétique est identique. Chez les isolats 3F et 3C, les profils électrophorétiques se différencient de celui des dix autres isolats par la présence d'une bande supplémentaire à 800 pb.

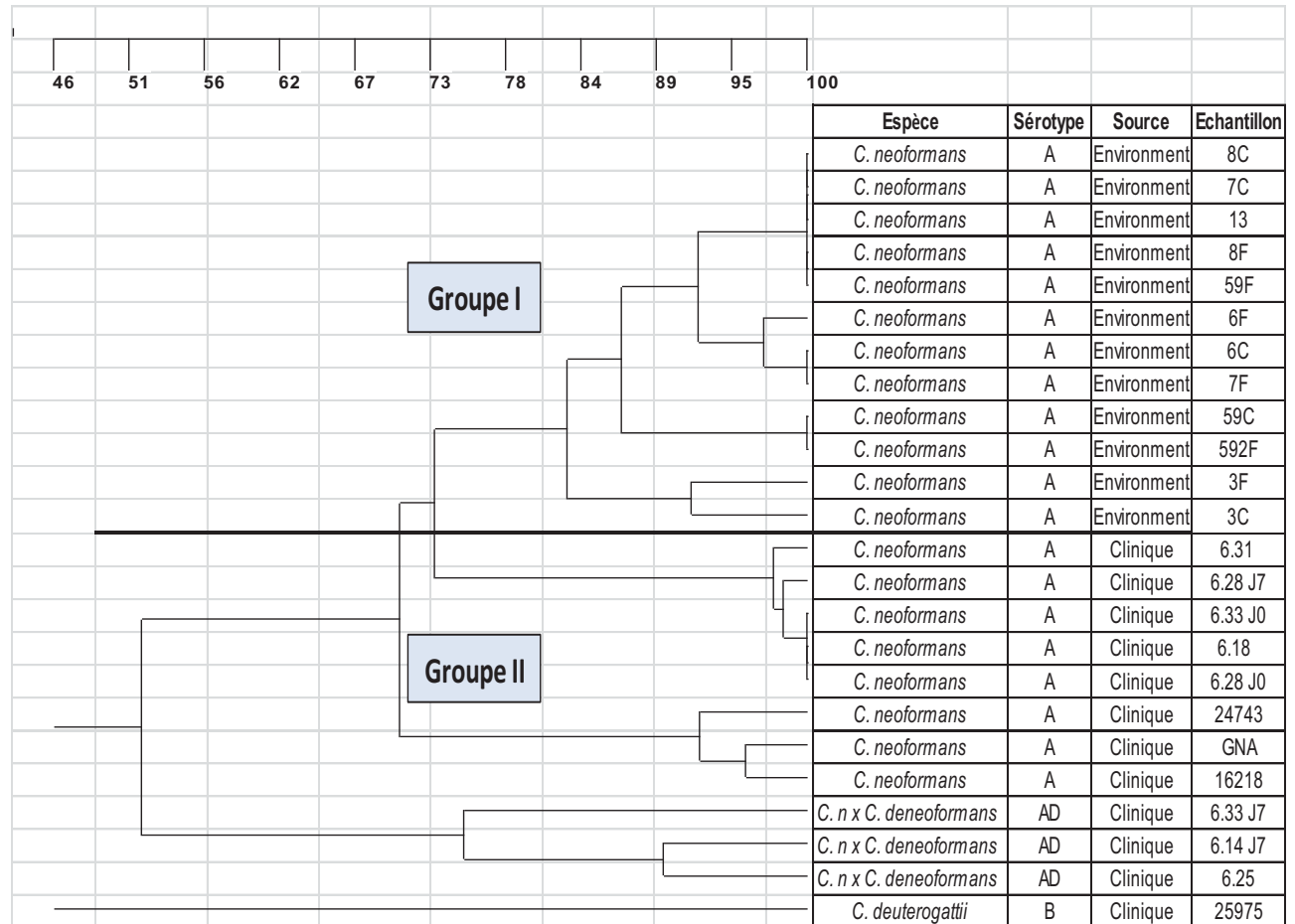
Concernant les 12 isolats d'origine clinique, 5 profils électrophorétiques différents sont observés. Tout d'abord, 8 isolats sur 12 sont de sérotype A. Parmi eux, 6 isolats (6.18, 6.28 J0 et J7, 6.33 J0, GNA et 24743) ont un profil identique. Le profil électrophorétique des deux autres isolats (6.31 et 16218) se différencie des 6 isolats précédents par l'absence d'une bande à 800 pb. Ensuite, 3 isolats sur 12 sont de sérotype AD. Parmi eux, 2 isolats (6.14 et 6.33 J7) ont un profil identique, le profil électrophorétique du troisième isolat (6.25) se différencie d'eux par l'absence d'une bande à 550 pb. Enfin, le cinquième profil électrophorétique est celui de l'isolat de sérotype B (25975) qui est unique.

Les profils de migration de notre population de 24 isolats (figure 40) illustrent bien la possibilité que pour un sérotype donné, plusieurs profils électrophorétiques différents sont obtenus après amplification des séquences minisatellites M13.

En somme, les souches cliniques et les souches issues de l'environnement proche des patients atteints de CNM sont génétiquement différentes.

### III.5. Comparaison des isolats cliniques et environnementaux

A partir des profils électrophorétiques obtenus avec la PCR-RFLP du gène *URA5*, (GTG)<sub>5</sub>, M13, et (GACA)<sub>4</sub>, nous avons généré un dendrogramme (figure 41).



**Figure 41:** Dendrogramme de la diversité génétique d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* obtenu par analyse des séquences mini et microsatellites et *URA5*-RFLP.

Le dendrogramme a été généré à l'aide du logiciel Gene Directory (Syngene) en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean) avec un coefficient de corrélation de Dice de 10% calculé à partir des profils des 24 isolats de *Cryptococcus*. Gene Directory a généré le dendrogramme en expérience croisée (ensemble des profils obtenus pour l'ensemble des amorces). Le pourcentage de similarité entre deux isolats a été défini à 99%.

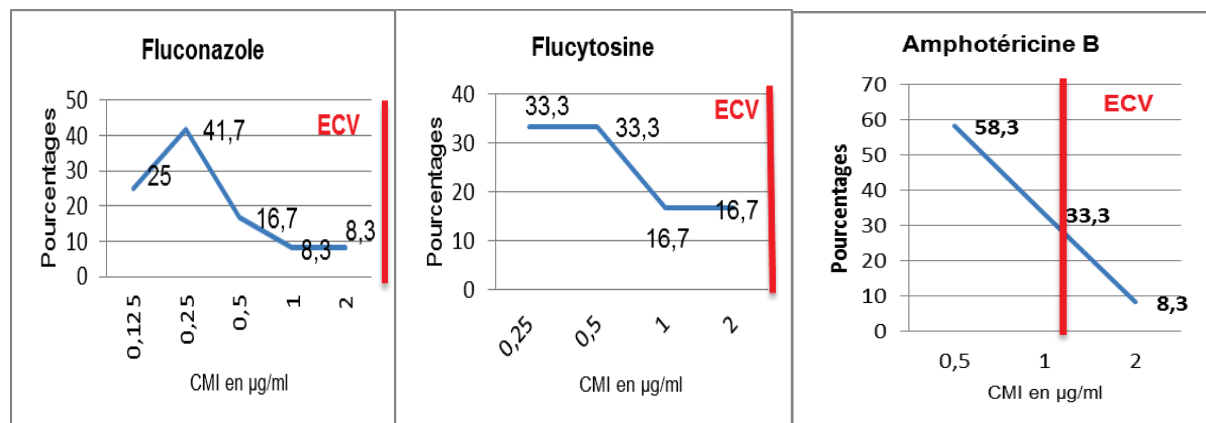
Le dendrogramme permet de mettre en évidence 2 groupes (I et II) avec 16 types moléculaires différents. Le groupe I, correspondant aux 12 isolats environnementaux, est subdivisé en 6 sous-types moléculaires, mettant en évidence une diversité intra-spécifique de *Cryptococcus*. Le sous-type moléculaire le plus important regroupe 5 isolats. Le groupe II, constitué des 12 isolats cliniques, est subdivisé en 10 sous-types moléculaires majeurs distincts mettant en évidence une plus grande diversité intra-spécifique de *Cryptococcus*.

Le dendrogramme permet également d'observer un regroupement de 5 isolats d'origine clinique (6.18, 6.28 J0, 6.28J7, 6.31 et 6.33J0) et 2 isolats d'origine environnementale (3F et 3C). Ils sont tous de sérotype A. Le nœud entre les deux groupes est à 73% de correspondance.

En conclusion, l'analyse des données a permis de différencier les souches cliniques de celles prélevées dans l'environnement proche des patients. Nous avons donc des souches de génotypes différents.

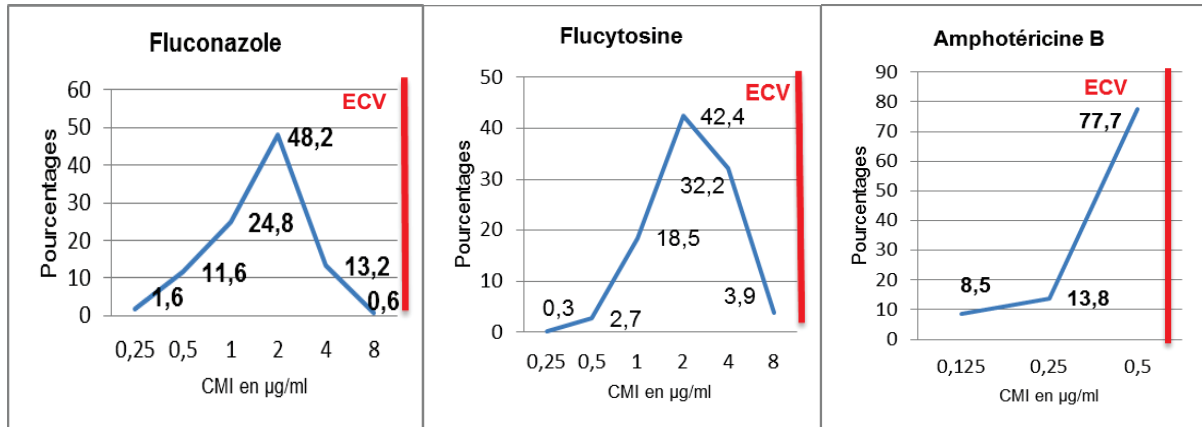
### III.6 Sensibilité de *Cryptococcus* aux antifongiques

La concentration minimale inhibitrice pour les 3 antifongiques de référence est déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide (CLSI, M27A3). Dans notre population de 24 isolats clinique et environnementaux, aucun n'est résistant au FCZ (CMI  $\leq$  8  $\mu\text{g/ml}$ ) ou à la 5FC (CMI  $\leq$  8  $\mu\text{g/ml}$ ). En revanche, un seul isolat d'origine clinique a une CMI = 2  $\mu\text{g/ml}$  pour l'AMB, le définissant comme résistant à cet antifongique. Les figures 42 et 43 présentent les pourcentages d'isolats en fonction des CMI pour un antifongique donné.



**Figure 42:** Pourcentage des isolats cliniques de *Cryptococcus* sensibles à chaque CMI et pour chaque antifongique testé.

Les limites figurées en rouge représentent les ECVs publiés pour chaque antifongique (**Espinel Ingroff et al., 2012a et b; Pfaller et al., 2011**).



**Figure 43:** Pourcentage des isolats environnementaux de *Cryptococcus* sensibles à chaque CMI et pour chaque antifongique testé.

Les limites figurées en rouge représentent les ECVs publiés pour chaque antifongique (Espinel Ingroff et al., 2012a et b; Pfaller et al., 2011).

La globalité des résultats de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques de référence des 24 isolats est présentée en annexe 10.

### III.7. Discussion

L'écologie de *Cryptococcus* est bien documentée, y compris son influence sur l'épidémiologie de la cryptococcose (Cogliati et al., 2013, 2016; Franzot et al., 1996). Cependant, en Côte d'Ivoire, l'habitat de *Cryptococcus* n'a pas été encore étudié. Notre étude comparative est le premier rapport sur l'isolement et la caractérisation de *Cryptococcus* de l'environnement à Abidjan, Côte d'Ivoire. C'est aussi le premier rapport comparant des isolats cliniques et environnementaux au niveau moléculaire et sur leur profil de sensibilité aux antifongiques de référence. Cette étude rapporte la prédominance du génotype VNI aussi bien au niveau des souches cliniques (8/12; 66,67%) qu'environnementales (12/12; 100%).

Malgré le grand échantillonnage (n=667), l'isolement de *Cryptococcus* de l'environnement a été beaucoup plus difficile. D'une part, les fientes prélevées étaient le plus souvent humides et d'autre part, la notion de «bois pourri à l'intérieur des creux d'arbres vivants» était rarement observée dans notre contexte. De nombreuses études ont isolé *Cryptococcus* plus fréquemment dans les fientes sèches par rapport aux fientes humides (Baroni et al., 2006, Granados et al., 2005, Mseddi et al., 2011). En fait, les excréments secs constituent un substrat plus favorable

parce qu'il a moins de bactéries et donc moins de concurrence pour la croissance de *Cryptococcus* (Ruiz et al., 1981).

Notre échantillonnage environnemental a permis l'isolement de *C. neoformans* VNI (12/518; 2,3%) uniquement dans des échantillons de fientes de pigeon. Comme suggéré par certains auteurs, la fiente de pigeon est une source majeure de contamination et semble être l'habitat le plus approprié à la croissance du champignon (Lin and Heitman 2006). Des taux de positivité plus élevés ont été rapportés à partir de fientes de pigeons dans certains pays Africains: 18% (99/550) en Egypte, 13,7% (11/80) au Kenya et 10,4% (930/950) en Tunisie (Kangogo et al., 2015, Mahmoud et al., 1999, Mseddi et al., 2011). Par contre, de faibles taux de positivité (0,6%; 5/700) ont été rapportés à partir de creux d'arbres en Tunisie (Mseddi et al., 2011). Le faible taux de positivité de notre échantillonnage nous permet de suggérer un biais lié au biotope ou que la méthode de prélèvement n'est pas encore maîtrisée. Par exemple, aucun prélèvement issu d'arbres n'a été positif pour *Cryptococcus*. Par conséquent, un nouvel échantillonnage dans une zone plus grande, tenant compte des biais rapportés, incluant d'autres variétés d'arbres, le sol, les animaux, sur une longue période de temps permettrait d'améliorer la récupération de cet agent pathogène, étant donné que sa présence a été rapportée dans certains pays Africains (Kangogo et al., 2015; Refai et al., 1983).

Les isolats cliniques sont plus diversifiés (génotypes VNI, VNIII et VGII) et incluent des génotypes qui étaient rares ou absents dans l'échantillon environnemental. Des différences similaires entre populations cliniques et environnementales de *Cryptococcus* ont été décrites précédemment aux Etats-Unis (Litvintseva et al., 2005), au Botswana (Chen et al., 2015), et au Kenya (Kangogo et al., 2015). L'explication la plus probable de la répartition inégale des génotypes dans les populations cliniques et environnementales est la limitation de l'échantillonnage environnemental. Par exemple, il est possible que certains isolats qui étaient significativement surreprésentés dans l'échantillon clinique, mais rares ou absents de l'échantillonnage environnemental, sont limités à des zones géographiques spécifiques et/ou des niches écologiques qui n'ont pas été suffisamment échantillonnées (Chen et al., 2015).

Le génotype VNI a été isolé seulement dans la commune d'Adjamé, dans un site domestique d'élevage de pigeons. Ceci peut s'expliquer par le fait que la commune d'Adjamé, est située au centre de la ville d'Abidjan et bénéficie d'une activité humaine et commerciale intense. Elle abrite la plus importante gare routière de la ville qui dessert toutes les grandes villes ivoiriennes et de l'Afrique de l'Ouest. D'autre part, c'est une zone à forte activité commerciale avec de nombreux sites d'élevages de pigeons, parfois même à proximité des habitations humaines. La proximité des cages de pigeons et des habitations peut être un important facteur de risque pour l'infection à *Cryptococcus*. En effet, il a été rapporté que le principal facteur associé à la



contamination par *Cryptococcus* est la présence d'oiseaux soit dans la maison soit dans l'environnement (**Passoni et al., 1998**).

Beaucoup d'études ont démontré une hétérogénéité génétique marquée entre les isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* (**Bertout et al., 1999; Chen et al., 2015; Escandon et al., 2006; Franzot et al., 1997; Litvintseva et al., 2005**). L'existence de variation génétique pour un pathogène est importante car elle pourrait se traduire par des différences dans la virulence ou la réponse au traitement. En outre, la connaissance de la variation génétique est essentielle pour comprendre la structure de la population d'un micro-organisme (**Tibayrenc et al., 1996**). Dans la présente étude, l'analyse de la liaison entre population environnementale et clinique laisse entrevoir un regroupement des souches en fonction de leur origine. Une structuration de l'échantillon ressort de manière évidente avec 2 groupes distincts. Le premier groupe réunit toutes les souches d'origine environnementale alors que le second est composé de souches cliniques. Les souches provenant de l'environnement présentent un profil particulier qui les distingue nettement des souches humaines. Ces souches environnementales, certes prélevées dans l'environnement proche des patients atteints de CNM sont génétiquement différentes. A priori, la contamination de nos patients ne s'est pas faite par les fientes de pigeons desquelles *Cryptococcus* a été isolé. Nous aurions pu évoquer une contamination par les arbres si les isolements de *Cryptococcus* avaient été concluants. Une hypothèse pour expliquer la différence entre souches environnementales et cliniques serait une dérive génétique de *Cryptococcus* par adaptation à l'hôte. En utilisant la MLST, **Chen et al., (2015)** ont trouvé une différence significative dans les compositions génétiques des populations cliniques et environnementales au Botswana (**Chen et al., 2015**). Des 125 types alléliques identifiés à partir des sept loci MLST, 48 ont été partagés à la fois par les isolats cliniques et environnementaux. Ces différentes structures de population entre isolats cliniques et environnementaux peuvent indiquer que certains isolats cliniques soient plus susceptibles de causer des infections chez l'homme. Il a déjà été démontré que les différences géographiques dans l'épidémiologie moléculaire de *Cryptococcus* pourraient aussi résulter d'une sélection naturelle des conditions environnementales et climatiques spécifiques du site géographique concerné (**Escandon et al., 2006**). La cryptococcose n'ayant pas de transmission interhumaine connue, nous pouvons aussi suggérer une contamination dans l'environnement hospitalier de nos patients. Ceci a été démontré dans les domiciles des PVVIH atteints ou non de CNM au Brésil mais pas encore en milieu hospitalier (**Passoni et al., 1998**). Ces résultats suggèrent que la distribution du champignon ne se limite pas aux biotopes classiquement connus avec la possibilité d'une infection dans l'environnement domestique. La transmission nosocomiale a été suspectée mais n'a jamais été prouvée (**Wang et al., 2005**).

Certains auteurs ne sont pas en accord avec nos résultats. **Escandon et al., (2006)** ont démontré à partir 108 isolats cliniques et 56 de l'environnement de type VNI, obtenus dans cinq régions de la



Colombie, une similitude globale de 100% (**Escadon et al., 2006**). Cette observation indique une forte relation génétique entre ces isolats, et soutient des preuves antérieures, ce qui suggère que la cryptococcose peut être acquise par l'exposition à des sources environnementales (**Currie et al., 1994; Franzot et al., 1997; Sorrell et al., 1996; Yamamoto et al., 1995**).

Tous les isolats cliniques et environnementaux sont sensibles au FCZ, à la 5FC et à l'AMB à l'exception d'un isolat d'origine clinique ayant présenté une CMI de 2 µg/ml à l'AMB. Quelques études ont documenté l'existence d'isolats avec des CMI élevées ou des cas de résistance à l'AMB en utilisant une méthodologie similaire (**Andrade-Silva et al., 2013; Lee et al., 2012; Matos et al., 2012**). L'AMB, 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. Il est connu que l'AMB n'est pas hydrosoluble, raison pour laquelle, il est dissous dans du DMSO dans la technique du CLSI. Cette technique de dilution pourrait être inadaptée pour l'AMB, c'est pourquoi nous envisageons de vérifier ce cas isolé de résistance à l'AMB par d'autres techniques.

Contrairement à nous, certains auteurs ont documenté des cas de résistance au FCZ parmi les souches environnementales, révélant une résistance primaire à cet antifongique (**Franzot et al., 1996**). Cette constatation est appuyée par une étude du Brésil avec 6,2% d'isolats (11/176) résistants au FCZ (**Andrade-Silva et al., 2013**).

### III.8. Conclusion partielle 3

Dans cette troisième partie, nous avons comparé l'épidémiologie et la sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*.

Nos résultats décrivent pour la première fois, l'isolement de *Cryptococcus* à partir de sources environnementales à Abidjan. Les isolats environnementaux sont tous de sérotype A alors que ceux isolés de patients sont de sérotype A, AD ou B. Nous avons démontré que les souches cliniques sont génétiquement différentes de celles prélevées dans l'environnement proche des patients, excluant la contamination probable de nos patients par *Cryptococcus* isolé de ces fientes.

L'étude de la sensibilité aux antifongiques a montré que les 24 isolats sont sensibles aux trois antifongiques de références excepté un d'origine clinique pour l'AMB. Comprendre les risques à partir de différents sources environnementales est essentielle pour l'identification de microfoyers du pathogène, facilitant l'adoption de mesures de prévention et de contrôle. Des études de surveillance sont nécessaires pour élucider toutes les niches écologiques de cette levure, la répartition des espèces fongiques et l'évolution de leur sensibilité aux antifongiques à Abidjan.

## Conclusion générale et perspectives

Le but de mon travail de thèse a été d'obtenir et de caractériser génétiquement des isolats de *Cryptococcus* issus des PVVIH et de l'environnement à Abidjan par diverses techniques de typage moléculaire ainsi que le profil de sensibilité des souches aux antifongiques de référence.

L'étude de l'épidémiologie globale de la cryptococcose a permis de montrer une grande diversité génotypique au sein de l'ensemble de notre cohorte ainsi que la présence de plusieurs espèces de cryptocoques dans un seul prélèvement chez un même patient. Nos résultats ont démontré l'existence d'infection mixte à *C. neoformans* et *C. deuterogattii*. Dans un premier temps, nous avons utilisé, une combinaison de méthode de typage moléculaire (PCR-RFLP du gène *URA5*, M13, (GACA)<sub>4</sub> et (GTG)<sub>5</sub>) pour analyser une cohorte de 61 patients. Dans un second temps, nous avons décidé de poursuivre ce travail avec une étude de suivi chez d'autres patients par la technique de référence de typage de *Cryptococcus*, la MLST, ce qui n'avait jamais été effectué en Afrique de l'Ouest. Cette technique a confirmé la présence de plusieurs espèces de cryptocoques dans un seul prélèvement chez un même patient mais aussi au cours du suivi. La MLST a également permis de montrer que la récurrence de la CNM est due à une réinfestation par des souches multiples. Cependant, chez la majorité des patients, certains ST issus des isolats de départ persistent au cours du suivi. Ceci souligne l'importance du typage de six isolats pour chaque échantillon. L'échantillonnage de souches dont nous disposons aujourd'hui (633 isolats) pourrait être d'une grande utilité pour la poursuite d'études de génétique des populations (mode de reproduction et de recombinaison, changement des fréquences des allèles aboutissant à la spéciation,...). Selon la littérature, la virulence de ce pathogène varie selon le sérotype et le type sexuel ( $\alpha$  et  $\underline{a}$ ). En effet, les souches de sérotype A provoquent des infections plus sévères chez l'homme. Les souches de type sexuel  $\underline{a}$  sont peu ou pas virulentes alors que les souches  $\alpha$  ont une plus grande prédilection à infecter le système nerveux central. Il serait intéressant de d'étudier le type de reproduction de l'ensemble des souches isolées. Enfin, nous envisageons de coupler la surveillance *in vitro* de la sensibilité et l'épidémiologie moléculaire à travers une grande étude prospective de suivi, au sein d'une population plus hétérogène (foyers épidémiologiques distincts, différents paliers de CD4, spécimens biologiques divers, ...) afin de confirmer ou infirmer les résultats obtenus au cours de ces travaux.

Afin de rechercher l'origine de la contamination de nos patients, nous avons effectué une collecte dans l'environnement. Il est bien connu que la contamination se fait par inhalation de spores et les habitats décrits sont les fientes de pigeons et les creux d'arbres. Nous nous sommes intéressés à ces deux biotopes. Ainsi, 667 échantillons environnementaux dont 518 fientes de pigeons et 149 issus d'arbres ont été recueillis dans l'environnement proche des patients puis

analysés. Nous avons réussi à isoler puis analyser des isolats à partir de fientes pigeons mais pas à partir des arbres, ce qui ne veut pas dire que *Cryptococcus* y est absent. Ces isolats environnementaux sont tous de sérotype A alors que ceux isolés des patients sont de sérotype A, AD ou B. Nous avons pu démontrer que les souches cliniques sont génétiquement différentes de celles prélevées dans les fientes de pigeons. Pour améliorer la récupération de l'agent pathogène, mieux comprendre son mode transmission et mesurer les facteurs de risques de contamination, nous poursuivrons cette étude en effectuant de nouveaux prélèvements environnementaux dans l'environnement hospitalier, dans l'environnement du patient, à leur domicile à partir de différentes zones géographiques du pays. L'objectif final étant d'appliquer des mesures préventives efficaces afin de diminuer la progression de la maladie dans les foyers à risque.

La résistance aux antifongiques concerne surtout le fluconazole, suivi par la flucytosine et rarement l'amphotéricine B. La résistance au fluconazole a été observée exclusivement au cours du suivi avec les isolats de sérotype B (96%; 22/23). Un même patient peut être contaminé par des isolats de sensibilité différente. Malgré la diversité très marquée de *Cryptococcus*, il n'existe aucune relation entre les souches typées et la charge fongique, le titre antigénique, la résistance et le décès à la dixième semaine de traitement antifongique (S10). Tous les isolats environnementaux sont sensibles aux antifongiques usuels. Dans un avenir proche, nous étudierons les mécanismes de résistance chez des isolats cliniques résistants versus des souches sensibles ou de référence. Cette étude démontre l'intérêt du séro-génotypage dans les études épidémiologiques et permet d'envisager l'utilité de l'antifongigramme en vue d'une meilleure prise en charge thérapeutique des patients atteints de cryptococcose en Côte d'Ivoire.

# REFERENCES

- Adachi H, Shimizu K et al., (2009).** Genotyping of *Candida albicans* by fragment analysis of microsatellites combined with 25S rDNA and RPS-based strategies. *J Med Mycol*, 50 : 167–174.
- Adoubryn KD, Ouhon J et al., (2006).** Biochemical and serotyping study of 40 strains of *Cryptococcus neoformans* isolated from HIV patients in Abidjan (Ivory Coast). *J Mycol Med*, 16:95–99.
- Aller AI, Martin-Mazuelos E et al., (2000).** Correlation of Fluconazole MICs with Clinical Outcome in Cryptococcal Infection. *Antimicrob 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.
- Almeida F, Wolf JM, Casadevall A, (2015).** Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 14:1173–1185.
- Aminnejad M, Diaz M et al., (2012).** Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia*, 173 (5–6): 337–346.
- Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K et al., (2013).** Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*, 51 (6): 635–640.
- Aoussi EF, Ehui E et al., (2012).** Cryptococcal meningitis and HIV in the era of HAART in Ivory Coast. *Med Mal Infect*, 42: 349–354.
- Bamba S, Barrot F, Sawadogo E, Millogo A and Guiguemdé RT, (2012).** Étude rétrospective des cas de cryptococcose neuroméningée au centre hospitalier universitaire de Bobo Dioulasso depuis l'accessibilité aux antirétroviraux au Burkina Faso. *J Mycol Med*, 22 (1): 30–34.
- 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.
- 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.
- Baroni F de A, Paula CR et al., (2006).** *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 48:71–5.
- Beale MA, Sabiiti W et al., (2015).** Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, 9 (6):e0003847.
- Bernham WR (1935).** *Cryptococcus*, their identification by morphology and serology. *J Infect Dis*, 57: 255-274.

- Bertout S, Drakulovski P et al., (2013).** Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients. *Clin Microbiol Infect*, 19 (8):763-769.
- Bertout S, Renaud F, Swinne D, Mallié M & Bastide, JM, (1999).** Genetic multilocus studies of different strains of *Cryptococcus neoformans*: Taxonomy and genetic structure. *J of Clin Microbiol*, 37(3): 715–720.
- Bicanic T, Meintjes G et al., (2007).** Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naïve or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole. *Clin Infect Dis*, 45:76–80.
- 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, Makimura K et al., (2007).** Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses*, 50: 25–30.
- Blasi E, Brozzetti A et al., (2001).** Evidence of microevolution in a clinical case of recurrent *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 20: 535–543.
- Boekhout T, Theelen B et al., (2001).** Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 147 (4): 891–907.
- Borgeat-Bosco ME, Mazza M et al., (2016).** Amino acid substitution in *Cryptococcus neoformans* lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase involved in fluconazole resistance in clinical isolates. *Rev Argent Microbiol*, 48 (2):137-142.
- 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.
- 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.
- Bovers M, Hagen F et al., (2006).** Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res*, 6 (4), 599–607.
- Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T, (2008a).** Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol*, 45 (4), 400–421.
- Bovers M, Hagen F et al., (2008b).** AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. *Emerg Infect Dis*, 14 (7):1105-1108.
- Brandt ME, Pfaller MA et al., (2001).** Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 3065–3069.
- Brandt ME et al., (2005).** Serotype and susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates:



- population-based surveillance, Gauteng Province (Johannesburg), South Africa, 2002-04, abstr. F-004. Abstr. 45th Intersci. Conf. Antimicrob Agents Chemother American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen RA, White NJ, (2004).** Combination antifungal therapies for HIV-associated Cryptococcal meningitis: a randomised trial. *Lancet*, 363: 1764–7.
- Buschke A, (1895).** Ueber eine durch Coccidien hervorgerufene Krankheit des Menschen. *Dtsch Med Wochenschr*, 21:14.
- Busse O, (1895).** Ueber parasitaere Zelleinschluesse und ihre Zuechtung. *Zentralbl Bakteriol*, 16: 175–180.
- Byrnes EJ et al., (2009).** First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. *PLoS One*, 4 (6): 1–12.
- Byrnes EJ, Li W et al., (2010).** Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog*, 6:e1000850.
- Cannon RD, Lamping E et al., (2007).** *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiol*, 153 (10):3211-3217.
- Carbone I, Anderson JB and LM Kohn, (1999).** Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. *Evolution*, 53: 11–21.
- Carvalho VG, Terceti MS et al., (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? *Clin Invest*, 120: 1389–1392.
- Casadevall A, Spitzer ED, Webb D & Rinaldi MG, (1993).** Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 37: 1383–1386.
- Chan MY and Tay ST, (2010).** Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus spp.* *Mycoses*, 53 (1): 26-31.
- Chang YC and Kwon-Chung KJ. (1994).** Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol*, 14: 4912-9.
- 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.
- Chau TT, Mai NH et al., (2010).** A prospective descriptive study of cryptococcal meningitis in HIV uninfected patients in Vietnam—high prevalence of *Cryptococcus neoformans var grubii* in the absence of underlying disease. *BMC Infect Dis*, 10, 199.
- Chayakulkeeree M, Sorrell TC et al., (2008).** Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 69:809–826.
- Chen SC, Currie BJ et al., (1997).** *Cryptococcus neoformans var. gattii* infection in northern Australia: existence of an environmental source other than known host eucalypts. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91:547–50



- Chen SC, Slavin MA et al., (2012).** Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin Infect Dis*, 55: 789–798.
- Chen Y, Litvintseva AP et al., (2015).** Comparative analyses of clinical and environmental populations of *Cryptococcus neoformans* in Botswana. *Molecular Ecology*, 24 (14): 3559–3571.
- Cheong JW, McCormack J, (2013).** Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? *Med Mycol*, 51 (3): 261–269.
- Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S and Carter D, (2010).** *In vitro* susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *J Clin Microbiol*, 48: 4115–4120.
- Chowdhary A, Randhawa HS et al., (2011).** *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. *J Med Microbiol*, 60: 961–967.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), (2008).** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. *Approved standard, M27-A3*. Wayne, P A:
- Coelho C and Casadevall A, (2016).** Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. *Cellular Microbiology*, 18(6): 792–799.
- Cogliati M, (2013).** Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, Article ID 675213.
- Cogliati M, Zani A, Volker R, (2016).** Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. *Fungal Genetics and Biology*, 87: 22–29.
- Colom MF, Hagen F et al., (2012).** *Ceratonia siliqua* (carob) trees as environment, natural habitat and source of infection by *Cryptococcus gattii* in the Mediterranean. *Med Mycol*, 50: 67–73.
- 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.
- 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.
- Cruz MC, Cavallo LM et al., (1999).** Rapamycin antifungal action is mediated via conserved complexes with FKBP12 and TOR kinase homologs in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol*, 19:4101–12
- Currie BP, Freundlich LF, and Casadevall A, (1994).** Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. *J Clin Microbiol*, 32:1188–1192.
- Danesi P, Furnari C et al., (2014).** Molecular identity and prevalence of *Cryptococcus* spp. nasal carriage in asymptomatic feral cats in Italy. *Med Mycol*, 52 (7): 667–673.
- Dannaoui E, Abdul M et al., (2006).** Results obtained with various antifungal susceptibility testing

methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 2464–2470.

- David WD and William W, (2010).** Hope Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol*, 18 (5): 195-204.
- Day JN, Chau TT, Wolbers M, (2013).** Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med*, 368: 1291–1302.
- 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.
- Desalermos A, Kourkoumpetis TK, Mylonakis E, (2012).** Update on the Epidemiology and Management of Cryptococcal Meningitis. *Expert Opin Pharmacother*, 13: 783–789.
- Desnos-Ollivier M, Patel S et al., (2010).** Mixed infections and *in vivo* evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, 9:91–10.
- Desnos-Ollivier M, Patel S et al., (2015).** Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* speciation. *mBio*, 6: e00311-15.
- Djordjevic JT, (2010).** Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol*, 1: 125.
- Dou HT, Xu YC, Wang HZ, Li TS, (2015).** Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using multilocus sequence typing and the DiversiLab system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34 (4):753-62.
- Dromer F and Lortholary O, (2004).** Cryptococcose. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. *Traité de maladies infectieuses*, 8:613-670.
- 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.
- 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, Salamero J, Contrepolis A, Carbon C, and Yeni P, (1987).** Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 55: 742-748.
- D'Souza CA, Kronstad JW et al., (2011).** Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *mBio*, 2 (1): e00342-10.
- 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.
- Eholie SP, Adou-Brynh KD et al., (2000).** Méningites lymphocytaires non virales de l'adulte à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Bull Soc Pathol Exot*, 93: 50-54.

- Eisenman HC, Mues M et al., (2007).** *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiol*, 153 (12): 3954-3962.
- Ellis D and Pfeiffer T, (1992).** The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol*, 8: 321-5.
- Emmons CW (1951).** Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol*, 62 (6):685–90.
- Escandon 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.
- Espinel-Ingroff A, Aller AI et al., (2012a).** *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.
- Espinel-Ingroff A, Chowdhary A et al., (2012b).** *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.
- Evans EE, (1950).** The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J Immunol*, 64: 423-30.
- Evans EE and KESSEL JF, (1951).** The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. II. Serologic studies with the capsular polysaccharide. *J Immunol*, 67: 109-14.
- Evans EE and THERIAULT RJ, (1953).** The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. IV. The use of paper chromatography for following purification of the capsular polysaccharide. *J Bacteriol*, 65: 571-7.
- Evans EE, SORENSEN LJ, WALLS KW, (1953).** The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. V. A survey of cross-reactions among strains of *Cryptococcus* and other antigens. *J Bacteriol*, 66: 287-93.
- Everett KD and Andersen AA, (1999).** Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int J Syst Bacteriol*, 49 (2):803-813.
- Favalessa OC, Lazera MS et al., (2014).** Fatal *Cryptococcus gattii* genotype AFLP6/VGII infection in a HIV-negative patient: case report and a literature review. *Mycoses*, 57: 639–643.
- Fera, MT, LaCamera E and DeSarro A, (2009).** New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7: 981–998.
- Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M and Carriço JA, (2012).** PHYLOVIZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics*, 13: 87.
- Franzot SP, Hamdan JS, Currie BP, Casadevall A, (1997).** Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *J Clin Microbiol*, 35: 2243-2251.
- Franzot SP, Fries B, Hamdan JS and Casadevall A, (1996).** Analysis of electrophoretic

- karyotypes of *Cryptococcus neoformans* strains from temperate and tropical regions, abstr. F-8, p. 75. In Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology 1996. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Franzot SP, Mukherjee J, Cherniak R, Chen LC, Hamdan JS, Casadevall A, (1998).** Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect Immun*, 66:89–97.
- Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A, (1999).** *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol*, 37: (3), 838–840.
- Fraser JA, Subaran RL et al., (2003).** "Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada." *Eukaryot Cell*, 2 (5): 1036-1045.
- 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 & Casadevall A, (1998).** Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. *J Infect Dis*, 178: 1761–1766.
- 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.
- 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 and Janbon G, (2004).** *Cryptococcus neoformans* capsule structure evolution *in vitro* and during murine infection. *Infection and Immunity*, 72: 3359-65.
- Garcia-Rivera J, Tucker SC et al., (2005).** Laccase expression in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*, 73 (5): 3124-3127.
- Garcia-Rodas, Casadevall RA, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M and Zaragoza O. (2011).** *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *Plos One*, 6 (9): e24485.
- Gazzoni AF, Bittencourt SC, Ferreira SE & Carlos SL, (2009).** Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51 (5), 255-259.
- 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.
- Gillece JD, Schupp JM et al., (2011).** Whole genome sequence analysis of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest reveals unexpected diversity. *PLoS One*, 6:e28550.
- 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.
- Gomez-Lopez A, Zaragoza O et al., (2008).** Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother*, 9 (16): 2801-2816.
- Govender NP, Patel J et al., (2011).** Trends in antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population based surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (6):2606-11.
- Granados DP, Castaneda E, (2005).** Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogota, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb Ecol*, 49:282–90.
- Hagen F, Illnait-Zaragozi MT et al., (2010).** *In vitro* antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 54:5139–5145.
- Hagen F, Khayhan K et al., (2015).** Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii* / *Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*, 78: 16–48.
- Huang W, Liao G et al., (2016).** Lipid flippase subunit Cdc50 mediates drug resistance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, 7(3):e00478-16.
- Hull CM and Heitman J, (2002).** Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet*, 36: 557-615.
- Hunter PR and Gaston MA, (1988).** Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26 : 2465–2466.
- Idnurm A, Bahn YS et al., (2005).** Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*, 3 (10): 753-764.
- Igreja RP, Mdos SL, Wanke B, 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.
- Illnait-Zaragozi MT, Hagen F et al., (2011).** Reactivation of a *Cryptococcus gattii* infection in a cheetah (*Acinonyx jubatus*) held in the National Zoo, Havana, Cuba. *Mycoses*, 54 (6): e889–e892.

- Illnait-Zaragozi MT, Martínez-Machín GF et al., (2010a).** Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. *BMC Infectious Diseases*; 10:289-295.
- Illnait-Zaragozi M-T, Martínez-Machín GF et al., (2010b).** Microsatellite Typing of Clinical and Environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. *PLoS ONE*, 5 (2): e9124.
- Institut National de la Statistique (INS) et ICF International, (2012).** *Enquête démographique et de santé et à indicateurs multiples de Côte d'Ivoire 2011-2012*. Calverton, Maryland, USA : INS et ICF International.
- Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S and Vidotto V, (2007).** Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Mycoses*, 50: 277– 281.
- Iqbal N, DeBess EE et al., (2010).** Correlation of genotype and *in vitro* susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. *J Clin Microbiol*, 48:539–544.
- Jackson A and Hosseinipour MC, (2010).** Management of cryptococcal meningitis in sub-saharan Africa. *Curr HIV/AIDS Rep*, 7(3): 134-142.
- Jain N, Guerrero A et al., (2006).** "Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*." *FEMS Yeast Res*, 6 (4): 480-488.
- Jain N, Wickes BL et al., (2005).** Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. *J Clin Microbiol*, 43:5733-5742.
- Jarvis JN, Bicanic T et al., (2014).** Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated Cryptococcal meningitis: implications for improving outcomes. *Clin Infect Dis*, 58: 736–745.
- 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.
- Joseph-Horne T, Hollomon D, Loeffler RS, Kelly SL, (1995).** Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1526–1529
- Kadjo K, Ouattara B et al., (2007).** La cryptococcose neuroméningée à Abidjan. *Med Afr Noire*, 2007: 54:66—8.
- Kambugu A, Meya DB et al., (2008).** Outcomes of cryptococcal meningitis in Uganda before and after the availability of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, 46:1694–701.
- Kangogo M, Bader O et al., (2015).** Molecular types of *Cryptococcus gattii* / *Cryptococcus neoformans* species complex from clinical and environmental sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses*, 58: 665–670.
- Kelly SL, Lamb DC et al., (1994).** Resistance to amphotericin B associated with defective sterol  $\Delta 8$ , 7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiol Lett*, 122:39–42.

- Khayhan K, Hagen F et al., (2013).** Geographically structured populations of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in Asia correlate with HIV status and show a clonal population structure. *PLoS One*, 8:e72222.
- Kidd SE, Hagen F et al., (2004).** "A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada)," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (49): 17258–17263.
- Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfel SL, Wengenack NL, (2009).** Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*, 47: 3669 –3672.
- Kong BN, Harwell JI et al., (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.
- Kwon-Chung KJ, (1975).** A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 67: 1197–1200.
- Kwon-Chung KJ, (1976).** A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68:943–946.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Rhodes JC, (1982).** Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 48: 25–38.
- Kwon-Chung KJ, Hill WB and Bennett JE, (1981).** New special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *J Clin Microbiol*, 13: 383-387.
- 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.
- Leal AL, Faganello J, et al., (2008).** Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil." *Mycopathologia*, 166 (2): 71-75.
- Lee CH, Chang YT et al., (2012).** Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with Cryptococcal meningitis. *BMC Infectious Diseases*, 12:361-370.
- Lemke A, Kiderlen AF and O Kayser, (2005).** Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68:151-162.
- Lessells RJ, Mutevedzi PC, Heller T, Newell ML (2011).** Poor Long-Term Outcomes for Cryptococcal Meningitis in Rural South Africa. *S Afr Med J*, 101: 251–252.
- Lev S, Desmarini D et al., (2013).** Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. *Infect Immun*, 81:1245–1255.
- Li SS and Mody CH, (2010).** *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc*, 7 (3): 186-196.



- 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 and Heitman J, (2006).** The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol*, 60: 69-105.
- Lin X, Hull CM, Heitman J, (2005).** Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, 434:1017–21.
- Lin X, Litvintseva AP et al., (2007).** Alpha AD alpha hybrids of *Cryptococcus neoformans*: evidence of same-sex mating in nature and hybrid fitness. *PLoS Genet*, 3 (10): 1975–1990.
- Lindsley MD, Mekha N et al., (2011).** Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of Cryptococcosis. *Clin Infect Dis*, 53 (4):321-5.
- Litvintseva AP and Mitchell TG, (2009).** Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) are not lethal for mice. *Infect Immun*, 77 (8): 3188–3195.
- 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.
- Lockhart SR, Iqbal N et al., (2012).** Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and *in vitro* susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73:144–148.
- Loftus BJ, Fung E et al., (2005).** The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307: 1321-1324.
- Lortholary O, Poizat G et al., (2006).** Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *Aids*, 20:2183-2191.
- 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.
- 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.
- Mahmoud YA (1999).** First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gatti* from the Gharbia Governorate, Egypt. *Mycopathologia*, 148:83–6.
- Marra RE, Huang JC et al., (2004).** A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotypeD (*Filobasidiella neoformans*). *Genetics*, 167:619–31

- Maslin J, Morand JJ, Menard G, Camparo P, (2002).** Les Cryptococcoses. *Med Trop*, 62:480-484.
- Matos CS, Andrade S, Oliveira S, and Barros TF, (2012).** Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus spp.* in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31:1647-1652.
- McClelland CM, Chang YC, et al., (2004).** "Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*." *Trends Microbiol*, 12 (5): 208-212.
- McTaggart L, Richardson SE, Seah C, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX, (2011).** Rapid identification of *Cryptococcus neoformans var. grubii*, *C. neoformans var. neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*, 49:2522–2527.
- Mdodo R, Stephen A et al., (2011).** Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates from AIDS patients in Kenya. *Mycoses*, 54: 438–442.
- Merkel GJ and Scofield BA, (1997).** "The in vitro interaction of *Cryptococcus neoformans* with human lung epithelial cells." *FEMS Immunol Med Microbiol*, 19 (3): 203-213.
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T., et al., (2009).** Consensus multilocus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*, 47:561–570.
- 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.
- Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ and Vilgalys R, (1993).** Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*." *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2274–2280.
- Mihara T, Izumikawa K et al., (2013).** Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol*, 51:252–260.
- 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.
- Montenegro H and Paula CR, (2000).** Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans var. gattii* and *C. neoformans var. neoformans* in the city of Sao Paulo, Brazil. *Med Mycol*, 38:385–90.
- Morera N, Hagen F et al., (2014).** Ferrets as sentinels of the presence of pathogenic *Cryptococcus* species in the Mediterranean environment. *Mycopathologia*, 178: 145–151.
- Morschhauser J, (2010).** Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*, 47(2): 94-106.

- Mseddi F, Sellami A, Jarboui MA, Sellami H, Makni F, Ayadi A (2011).** First environmental isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and review of published studies on environmental isolations in Africa. *Mycopathologia*, 171:355–60.
- Mueller UG and Wolfenbarger LL, (1999).** AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol*, 14 (10): 389–394.
- Nascimento E, Vitali LH et al., (2016).** Refractory and/or relapsing cryptococcosis associated with Acquired Immune Deficiency Syndrome: clinical features, genotype, and virulence factors of *Cryptococcus* spp. isolates. *Am J Trop Med Hyg*, 94:975-981.
- Nedjma A, Marc B, Jérôme L, (2005).** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique Elsevier Masson, 705p.
- Neill JM et al., (1949).** Capsular reactions and soluble antigens of *Torula histolytica* and of *Sporotrichum schenckii*. *J Exp Med*, 89:93-106.
- Neill JM, Abrahams I, Kapros CE, (1950).** A comparison of the immunogenicity of weakly encapsulated and of strongly encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). *J Bacteriol*, 59:263-75
- Ngouana KT, Dongtsa J et al., (2016).** Cryptococcal meningitis in Yaoundé (Cameroon) HIV infected patients: Diagnosis, frequency and *Cryptococcus neoformans* isolates susceptibility study to fluconazole. *J Mycol Med*, 25: 11-16
- Ngamskulrungraj P, Chang Y, Hansen B, Bugge C, Fischer E, Kwon-Chung KJ. (2012).** Characterization of the chromosome 4 genes that affect fluconazole-induced disomy formation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 7:e33022.
- 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.
- Niimi K, Maki K et al., (2006).** Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2 or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 1148–1155.
- Nosanchuk JD, Rosas AL et al, (2000).** Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet*, 355 (9220): 2049-2050.
- Nyazika TK, Hagen F, Meis FG, Valerie, Robertson JV, (2016).** *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIVinfected individuals in Harare, Zimbabwe. *J Infect*, 72 (6):745-52.
- Odehour K, Moreau J et al., (1991).** La méningite à cryptocoque à propos de 3 cas. *Rev Med Côte d'Ivoire*, 1991 : 61:21-7.
- 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.
- ONUSIDA, (2015).** Diapositives clés sur les données épidémiologiques. [www.unaids.org](http://www.unaids.org).
- Ortblad KF, Lozano R & Murray CJL, (2013).** The burden of HIV: insights from the Global Burden of Disease Study 2010. *AIDS*, 27 (13): 2003-2017.
- 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.
- 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.
- Park SH, Choi SC, Lee KW., et al., (2015).** Genotypes of Clinical and Environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in Korea. *Mycobiology*, 43 (3), 360–365.
- Park SH, Kim M et al., (2014).** "Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* isolates in Seoul, Korea." *Mycobiology*, 42: 73–78.
- Passoni LFC, Wanke B, Nishikawa MM & Lazera MS (1998).** *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of Aids patients with and without cryptococcosis. *Med Mycol*, 36: 305-311, 1998.
- Perfect JR and Bicanic T. (2015).** *Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now.* *FEMS Yeast Res*, 6:463-468. *Fungal Genet Biol*, 78:49-54
- Perfect JR, (2006).** *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res*, 6:463-468.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al., (2010).** Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 50 (3): 291–322.
- 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, Messer SA et al., (2005).** Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990–2004). *J Clin Microbiol*, 43: 2163–2167.
- Pfaller MA, Zhang J et al., (1998).** Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from Ugandan AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 32: 191–199.
- Polak A and Scholer HJ (1975).** Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanism of resistance. *Chemotherapy*, 21:113-130.



- Posteraro B, Sanguinetti M et al., (2003).** Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Molecular Microbiology*, 47: 357–371.
- Posteraro B, Vella A et al., (2012).** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*, 50: 2472–2476.
- Rathore SS, Raman T and Ramakrishnan J, (2016).** Magnesium Ion Acts as a Signal for Capsule Induction in *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, 7:325.
- Refai M, Taha M, Selim SA, Elshabourii F, Yousseff HH (1983).** Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other yeasts from pigeon droppings in Egypt. *Sabouraudia*, 21:163–5.
- 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.
- Richard GF, Kerrest A and Dujon B, (2008).** "Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes." *Microbiol Mol Biol Rev*, 72 (4): 686-727.
- Rodrigues ML (2016).** Funding and innovation in diseases of neglected populations: the paradox of cryptococcal meningitis. *PLoS Negl Trop Dis*, 10 (3): e0004429.
- Rosas AL and Casadevall A, (2001).** Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. *Mycopathologia*, 151 (2): 53-56.
- Ruiz A, Fromtling RA, Bulmer GS (1981).** Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infect Immun*, 31:560–3.
- Sanfelice F, (1894).** Contributo alla morfologia e biologia dei blastomyceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann Igiene*, 4: 463-95.
- Sanguinetti M, Posteraro B et al., (2006).** Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 74: 1352–1359.
- Sanglard D, (2002).** Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol*, 5: 379–385.
- Sanglard D, Coste A, and Ferrari S, (2009).** Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*, 9 : 1029–1050.
- 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.
- Seaton RA, Verma N, Naraqi S, Wembri JP, Warrell DA, (1997).** The effect of corticosteroids on visual loss in *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91: 50–52.
- 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.
- Shirley RM and Baddley JW, (2009).** Cryptococcal lung disease. *Curr Opin Pulm Med*, 15 (3): 254-260.
- Singer LM, Meyer W, Firacative C, Thompson GR, Samitz E, Sykes JE, (2014).** Antifungal drug susceptibility and phylogenetic diversity among *Cryptococcus* isolates from dogs and cats in North America. *J Clin Microbiol*, 52 (6): 2061–2070.
- 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.
- Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Dolan MA, Ghannoum MA, Kwon-Chung KJ. (2012).** Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 56:1162–1169.
- Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ, (2009).** Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:2804–2815.
- Sionov E, Chang YC, Kwon-Chung KJ, (2013).** Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 57:5127–5130.
- Sorrell TC, Chen SCA, Ruma P, et al., (1996).** Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 34:1253–1260.
- Souto ACP, Bonfietti LX et al., (2016).** Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon rainforest to the semi-arid desert in the Northeast of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 10 (8): e0004885.
- Spitzer ED, Spitzer SG, Freundlich L F & Casadevall A (1993).** Persistence of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* meningitis. *Lancet*, 341: 595–596.
- Springer DJ, Chaturvedi V (2010).** Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis*, 16: 14–20.
- Staib F, Seibold M, Antweiler E, Fröhlich B, Weber S & Blisse A, (1987).** The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *Cryptococcus neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 266: 167–77.
- Sullivan D, Haynes K, Moran G, Shanley D & Coleman D, (1996).** Persistence, replacement, and microevolution of *Cryptococcus neoformans* strains in recurrent meningitis in AIDS patients. *J Clin Microbiol*, 34, 1739–1744.
- Suwantarat N, Watkins T, Lee R, Carroll KC, Zhang SX, (2014).** False-Positive Reaction of I-Canavanine Glycine Bromothymol Blue Medium with *Candida famata*. *J Clin Microbiol*, 52 (4):1308-1309.
- Tanaka R, Taguchi H, Takeo K, Miyaji M and Nishimura K, (1996).** Determination of ploidy by flow cytometry. *J Med Vet Mycol*, 34: 299-301.
- Tay ST, Tanty Haryanty T, Rohani MY, Hamimah H. (2006).** *In vitro* susceptibilities of Malaysian



- clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. *Mycoses*, 49:324–330.
- Thompson JR, Douglas CM et al., (1999).** A glucan synthase *FKS1* homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol*, 181:444–453.
- Thornewell SJ, Peery RB and Skatrud PL (1997).** Cloning and characterization of *CneMDR1*: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. *Gene*, 201 : 21–29.
- Trilles L, Lazéra MS et al., (2008).** Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103: 455–62.
- 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.
- Tibayrenc M, (1996).** Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Annu Rev Microbiol*, 50:401–429.
- 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 Wyk M, Govender NP, Mitchell TG, Litvintseva PA, GERMS-SA (2014).** Multilocus Sequence Typing of Serially Collected Isolates of *Cryptococcus* from HIV-Infected Patients in South Africa. *J Clin Microbiol*, 52: 1921–1931.
- 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.
- Vermes A, Guchelaar H and Dankert J (2000).** Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interaction. *J Antimicrob Chemother*, 46: 171–179.
- Verses M, (1914).** Über einen Fall von generalisierter Blastomykose beim Menschen. *Verh. Dtsch Pathol Ges*, 17: 275-278.
- Viviani MA, Cogliati M et al., (2006).** Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Res*, 6: 614–619.
- Vuillemin P, (1901).** [Les blastomycètes pathogènes]. *Rev Gen Sci Pures Appl*, 12: 732-751.
- Wang CY, Wu HD, Hsueh PR (2005).** Nosocomial transmission of cryptococcosis. *N Eng J Med*, 24:352 (12):1271-1272.
- 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.

- White TC et al., (1998).** Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 11 (2):382-402.
- WHO (2016),** Department of HIV/AIDS, World Health Organization. Diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-Infected adults, adolescents and children. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299520/> Accessed date 16 July 2016
- WHO (2014).** How many TB cases and deaths are there? /accessed date 16 July 2016 [http://www.who.int/gho/tb/epidemic/cases\\_deaths/en/](http://www.who.int/gho/tb/epidemic/cases_deaths/en/).
- WHO (2015).** Malaria. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/> Accessed date 16 July 2016
- Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. (1996).** Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7327–7331
- Wilson DE, Benett JE, and Bailey JW, (1968).** Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 127:820-823.
- Xu J, Onyewu C, Yoell HJ, Ali RY, Vilgalys RJ and Mitchell TG, (2001).** Dynamic and heterogeneous mutations to fluconazole resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:420–427.
- Yamazumi T, Pfaller MA et al., (2003).** Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 41 (1): 267-272.
- Yamamoto YS, Kohno HK et al., (1995).** Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J Clin Microbiol*, 33:3328–3332.
- Yang ML, Uhrig J et al., (2016).** Fluconazole susceptibility in *Cryptococcus gattii* is dependent on the ABC transporter *Pdr11*. *Antimicrob Agents Chemother*, 60:1202–1207.

# ANNEXES

## Annexe 1: Résumés des publications

JMM Case Reports (2016)

DOI 10.1099/jmmcr.0.005037

### Case Report

## First case of mixed infection with *Cryptococcus deuterogattii* and *Cryptococcus neoformans* VNI in an Ivorian HIV-positive patient

Fulgence K. Kassi,<sup>1,2</sup> Virginie Bellet,<sup>2</sup> Adama Doumbia,<sup>3</sup>  
Donika Krasteva,<sup>2</sup> Pascal Drakulovski,<sup>2</sup> Gisèle A. Kouakou,<sup>3</sup>  
François Gatchitch,<sup>2</sup> Eric Delaporte,<sup>4</sup> Jacques Reynes,<sup>4</sup> Michèle Mallié,<sup>2</sup>  
Hervé I. E. Menan<sup>1</sup> and Sébastien Bertout<sup>2</sup>

Correspondence:  
Fulgence K. Kassi  
kassul2000@yahoo.fr

<sup>1</sup>Université Félix Houphouët Boigny, UFR Pharmacie, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie – CeDRoS (Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA et les autres maladies infectieuses), CHU de Treichville, BP V3, Abidjan, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup>UMI 233 IRD-UM-INSEERM U1175 Laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale UFR Pharmacie, 15 Av. C. Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France

<sup>3</sup>Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU de Treichville, 01 BP V3, Abidjan, Côte d'Ivoire

<sup>4</sup>UMI 233 Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Gui de Chauiac, Montpellier, France

**Introduction:** Cryptococcal meningitis (CM) may be caused by several species of *Cryptococcus*.

**Case presentation:** We describe a fatal case of CM in a HIV-positive patient from Ivory Coast infected by *Cryptococcus neoformans* VNI and *Cryptococcus deuterogattii*. Isolates were recovered from cerebrospinal fluid (CSF) prior to systemic antifungal treatment. Six isolates were studied (the entire culture plus five isolated colonies from it). Serotyping was performed via LAC 1 and CAP 64 gene amplification. Genotyping was performed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the URA5 gene, (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> and M13 PCR fingerprinting. URA5-RFLP analysis identified the original culture with two different molecular type combinations. However, URA5-RFLP profiles of the five colonies isolated from the original sample revealed two different species. Four colonies were identified as *C. deuterogattii* and the last isolate as *C. neoformans* VNI. The *in vitro* susceptibility profile was determined using the standard method according to the CLSI M27-A3 protocol. The isolates were susceptible to the tested antifungals (fluconazole, flucytosine and amphotericin B). Treatment with fluconazole (1200 mg day<sup>-1</sup>) was initiated; however, the patient died 17 days after the onset of antifungal therapy.

**Conclusion:** This is the first reported case of mixed infection with *C. neoformans* and *C. deuterogattii* in a HIV-positive patient.

**Keywords:** AIDS; *Cryptococcus deuterogattii*; *Cryptococcus neoformans*; genotyping; mixed infection; antifungal susceptibility.

Received 18 February 2016  
Accepted 7 April 2016



Received: 4 April 2016 | Revised: 21 June 2016 | Accepted: 3 July 2016

DOI: 10.1111/myc.12539

ORIGINAL ARTICLE

WILEY mycoses

## Molecular epidemiology reveals genetic diversity among 363 isolates of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complex in 61 Ivorian HIV-positive patients

Fulgence K. Kassi<sup>1,2</sup> | Pascal Drakulovski<sup>2</sup> | Virginie Bellet<sup>2</sup> | Donika Krasteva<sup>2</sup> | François Gatchitch<sup>2</sup> | Adama Doumbia<sup>3</sup> | Gisèle A. Kouakou<sup>3</sup> | Eric Delaporte<sup>4</sup> | Jacques Reynes<sup>4</sup> | Michèle Mallié<sup>2</sup> | Hervé I. E. Menan<sup>1</sup> | Sébastien Bertout<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie - CeDRéS (Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA et les autres maladies infectieuses), UFR Pharmacie, CHU de Treichville, Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup>UMI 233 IRD-UM INSERM U1175 Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie, UFR Pharmacie, Montpellier Cedex 5, France

<sup>3</sup>Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU de Treichville, Abidjan, Côte d'Ivoire

<sup>4</sup>UMI 233 Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Gui de Chaillac, Montpellier, France

Correspondence

Prof. Sébastien Bertout, Laboratoire de parasitologie et mycologie médicale, Faculté de Pharmacie, Montpellier Cedex 05, France.  
Email: sebastien.bertout@univ-montp1.fr

### Summary

Cryptococcal meningitis is a severe opportunistic infection in HIV-infected patients. In Ivory Coast, despite the availability of antiretroviral treatment (ART), this infection is still prevalent. The study investigates the genetic diversity of 363 clinical isolates of *Cryptococcus* from 61 Ivorian HIV-positive patients, the occurrence of mixed infections and the *in vitro* antifungal susceptibility of the isolates. Serotyping was performed via LAC1 and CAP64 gene amplification. Genotyping was performed using the phage M13 core (GACA)<sub>4</sub> and (GTG)<sub>5</sub> primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the *URA5* gene. By PCR fingerprinting, the presence of the three serotypes were demonstrated among the 363 isolates in the population studied: A (n=318; 87.6%), AD (n=40; 11%) and B (n=4; 1.1%). Using PCR fingerprinting with primers M13 (GACA)<sub>4</sub> and (GTG)<sub>5</sub>, we grouped the isolates into 56 molecular subtypes. We observed a high frequency (39.3%) of mixed infections, with up to two different genotypes per sample. None of the isolates were resistant to amphotericin B. Only 0.3% and 1.1% of the isolates were resistant to fluconazole and flucytosine respectively. This study revealed the high genetic diversity among *Cryptococcus* isolates, the occurrence of mixed infections and a high antifungal susceptibility for the majority of Ivorian cryptococcal isolates.

### KEYWORDS

antifungal susceptibility, cryptococcosis, genetic diversity, genotyping, mixed infection

## Annexe 2: Résumés des communications

CBS2 Association

assocbs2.org

### N°34 – Kassi KONDO FULGENCE

#### **Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst 363 isolates of the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complex in Ivorian HIV positive patients**

**Summary** Cryptococcal meningitis (CM) is a severe opportunistic infection in human immunodeficiency virus (HIV) infected patients. In the Ivory Coast, despite the availability of antiretroviral treatment (ARV), this infection is still prevalent. The study investigates the genetic diversity of 363 clinical isolates of *Cryptococcus* from 61 Ivorian HIV positive patients, the occurrence of mixed infections and the in vitro antifungal susceptibility of the strains. Serotyping was performed via LAC 1 and CAP 64 gene amplification. Genotyping was performed using the phage M13 core, (GACA)4 and (GTG)5 primers and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the URA5 gene. We demonstrated the presence of the following 3 serotypes among the 363 isolates in the population studied: A (n=318; 87.6%), AD (n=40; 11%) and B (n=4; 1%). Using PCR fingerprinting with the microsatellite-specific primer M13 and minisatellite-specific primers (GACA)4 and (GTG)5, we grouped the isolates into 56 molecular subtypes. We discovered a high frequency (39.3%) of mixed infections, with up to two different genotypes per sample. None of the isolates were resistant to amphotericin B. Only 0.3% and 0.8% of the isolates were resistant to fluconazole and flucytosine, respectively. No correlations were found among the genotype and resistant strains. This study revealed the high genetic diversity of *Cryptococcus* strains from the Ivory Coast, the occurrence of mixed infections and a high antifungal susceptibility for the majority of Ivorian cryptococcal isolates. **Key words:** Cryptococcosis, genetic diversity, genotyping, mixed infection, antifungal susceptibility, Ivory Coast.

*Fulgence K. Kassi<sup>1</sup>, Pascal Drakulovski<sup>2</sup>, Virginie Bellet<sup>2</sup>, Donika Krasteva<sup>2</sup>, François Gatchitch<sup>2</sup>, Adama Doumbia<sup>4</sup>, Gisèle A. Kouakou<sup>4</sup>, Eric Delaporte<sup>3</sup>, Jacques Reynes<sup>3</sup>, Michèle Mallié<sup>2</sup>, Hervé J.E Menan<sup>1</sup> and Sebastien Bertout<sup>2</sup>.* <sup>1</sup>Université Félix Houphouët Boigny, UFR Pharmacie, Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie – CeDRoS (Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA), CHU de Treichville, Abidjan. <sup>2</sup>UMI 233 IRD-UM INSERM U1175 Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie, UFR Pharmacie, 15 Av. C. Flahault, BP 14491 34093 Montpellier Cedex 5, France. <sup>3</sup>UMI 233 Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Gui de Chauliac, Montpellier, France. <sup>4</sup>Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU de Treichville, Abidjan, Côte d'Ivoire.



2<sup>ème</sup> Congrès de la Société Ivoirienne de Parasitologie et de Mycologie - 9 et 10 mars 2016  
SESSION 9 : Cryptococcoses et autres mycoses

### C57. DIVERSITE GENETIQUE DE 366 ISOLATS DE CRYPTOOCOQUE CHEZ LES PATIENTS VIH POSITIF EN COTE D'IVOIRE

KASSI KI<sup>1</sup>, KONATE A<sup>1</sup>, BELLET VIRGINIE<sup>2</sup>, DRAKULOVSKI PASCAL<sup>3</sup>, DOUMBIA ADAMA<sup>4</sup>, KRASITVA DONIKA<sup>1</sup>, GATCHITCH FRANCOIS<sup>2</sup>, KOUAKOU AG<sup>1</sup>, DELAPORTE ERIC<sup>1</sup>, REYNES JACQUES<sup>1</sup>, MALLIE MICHELE<sup>1</sup>, MENAN EIH<sup>1</sup>, BERTOUI SEBASTIEN<sup>2</sup>

1) Université Félix Houphouët Boigny, UFR Pharmacie, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CeDRoS (Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA et les autres maladies infectieuses), CHU de Treichville

2) UMI 233 IRD-UMI Laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale UFR Pharmacie, 15 Av. C. Flahault, BP 14491 34093 Montpellier Cedex 3

3) UMI 233 Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Gui de Chauliac, Montpellier, France

4) Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU de Treichville, 01 BP 13, Abidjan 01, Côte d'Ivoire

**Introduction :** La cryptococose neuroméningée est due à une levure du genre *Cryptococcus*. Le complexe *C. gatii*/*C. neoformans* comprend 7 espèces et 13 génotypes. Le traitement de référence associe amphotéricine B et flucytosine (5FC), suivi d'un relai par le fluconazole. Dans ce travail, nous avons étudié la diversité génétique d'isolats de *Cryptococcus* chez des patients ivoiriens HIV positif, puis nous avons déterminé leur profil de sensibilité aux 3 antifongiques de référence.

**Patients et méthodes :** Entre mai 2012 et septembre 2014, 1 271 LCR issus de patients VIH positifs et présentant un syndrome méningé ont été prélevés et analysés. La recherche de cryptocoque a été positive pour 61 prélèvements. Le diagnostic mycologique des 61 LCR a été réalisé par examen direct à l'encre de Chine et culture sur milieu Sabouraud chloramphénicol. La sécrétion d'uréase sur milieu indole, la production de mélanine et les caractéristiques biochimiques ont confirmé la présence de *Cryptococcus*. Pour chaque patient, la souche de départ et 5 colonies (366 isolats au total) ont été conservées. Le sérotypage des 366 isolats a été réalisé par amplification des gènes CAP64 et LAC1. Le génotypage a été effectué par PCR-RFLP du gène URA5 et par étude du polymorphisme des séquences microsatellites (GACA)<sub>n</sub> (GTG)<sub>n</sub> et minisatellites M13. La concentration minimale inhibitrice des isolats pour le fluconazole, la 5FC et l'amphotéricine B a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide (CLSI, M27-A3).

**Résultats :** Nous avons trouvé 313 (85,5%) *C. neoformans* VNI, 42 hybrides *C. neoformans* x *C. denoformans* (VNII), 6 *C. neoformans* VNII-AFLP1B, 4 *C. deuterogatii* (VGII) et 1 hybride *C. neoformans* x *C. deuterogatii* (AFLP11). L'étude génétique a montré l'existence de 59 types moléculaires différents. Chez un même patient, plusieurs types moléculaires ont été mis en évidence. Ainsi, 32 patients ont été infectés par au moins deux souches de génotypes différents. Tous les isolats ont été sensibles à l'amphotéricine B. En revanche, pour le fluconazole, une seule souche a été résistante alors que 3 ont été résistantes à la 5 FC.

**Conclusion :** Les cryptocoques étudiés dans ce travail possèdent une grande variabilité génétique. La majorité des souches se sont révélées sensibles aux antifongiques usuels.

**Mots clés:** cryptococose, sensibilité aux antifongiques, diversité génétique, infection mixte.

### Annexe 3 : Avis favorable du comité d'éthique



MINISTÈRE DE LA SANTÉ  
ET DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE

COMITÉ NATIONAL D'ÉTHIQUE  
DE LA RECHERCHE (CNER)

Le Président

N/Réf : 021/MSLS/CNER-kp

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE  
UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL

Abidjan, le 14 mars 2016

**Au**  
**Professeur MENAN Eby Hervé**  
**Investigateur Principal projet**  
**CEDRES/ABIDJAN**

**OBJET:** Autorisation de mise en œuvre du projet de recherche intitulé «*Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats clinique et environnementaux de cryptococcus neoformans de côte d'Ivoire*».

**Professeur,**

Au cours de la session ordinaire du 15 décembre, le Comité National d'Éthique de la Recherche (CNER) a examiné votre demande d'autorisation de mise en œuvre du projet cité en objet.

Sous cette perspective, il a été émis un avis favorable à l'utilisation de ce protocole.

Par conséquent, je vous autorise à mettre en œuvre votre enquête telle que soumise au Comité National d'Éthique.

Toutefois, il faut noter que la validité de cette autorisation est **d'un an (1) à compter de la date de signature et renouvelée une seule fois**. Par ailleurs, je vous saurai gré de bien vouloir transmettre au CNER une copie du rapport de cette étude dès la fin de sa mise en œuvre.

Je vous prie d'agréer, **Professeur**, l'expression de mes salutations distinguées.

Le Président  
  
Dr. Louis PENALI





## Annexe 4 : Fiche d'enquête

Service / \_\_\_\_\_ /  
Numéro d'ordre / \_\_\_\_\_ / Numéro de dossier / \_\_\_\_\_ / Date / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /

**IDENTIFICATION DU PATIENT ET MOTIF D'ADMISSION**

Nom / \_\_\_\_\_ / Prénoms / \_\_\_\_\_ /  
Date de naissance / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Age / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / ans / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / jours  
Lieu de naissance / \_\_\_\_\_ / Sexe : M / \_\_\_\_ / F / \_\_\_\_ /  
Nationalité / \_\_\_\_\_ / Zone rurale : / \_\_\_\_ / Zone urbaine / \_\_\_\_ /  
Profession / \_\_\_\_\_ / Téléphone / \_\_\_\_\_ /  
Ville / quartier / \_\_\_\_\_ / Scolarisé : Oui / \_\_\_\_ / Non / \_\_\_\_ /  
Niveau d'instruction : Analphabète / \_\_\_\_ / Primaire / \_\_\_\_ / Secondaire / \_\_\_\_ / Supérieur / \_\_\_\_ /

**MOTIF D'ADMISSION**  
Provenance : Consultation / \_\_\_\_ / F.S. périphériques / \_\_\_\_ / Domicile / \_\_\_\_ / Autre CHU / \_\_\_\_ /  
Motif d'admission : Fièvre / \_\_\_\_ / Troubles de la conscience / \_\_\_\_ / Céphalée / \_\_\_\_ /  
Convulsions / \_\_\_\_ / Raideur de la nuque / \_\_\_\_ / Constipation / \_\_\_\_ /  
Vomissements / \_\_\_\_ / Autre (s) à préciser : \_\_\_\_\_ /

**DONNEES CLINIQUES**

Taille (cm) / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Poids (kg) / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Tension artérielle / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
VIH + / \_\_\_\_ / Si oui, VIH1 / \_\_\_\_ / VIH2 / \_\_\_\_ / VIH1&2 / \_\_\_\_ / Date du diagnostic / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
CD4 (%) / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / CD4 / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Date du diagnostic / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
CV (log/ml) / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / CV (copie/ml) / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Date du diagnostic / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /

**Neurologique** : Céphalée / \_\_\_\_ / Troubles visuels / \_\_\_\_ / Somnolence / \_\_\_\_ / Coma / \_\_\_\_ /  
Troubles vigilance / \_\_\_\_ / Déficit moteur / \_\_\_\_ / Raideur de la nuque / \_\_\_\_ /  
Raideur de la nuque / \_\_\_\_ / Autre (s) à préciser : \_\_\_\_\_ /

**Respiratoire** : Douleur thoracique / \_\_\_\_ / Dyspnée / \_\_\_\_ / Expectoration / \_\_\_\_ / Toux / \_\_\_\_ /  
Autre (s) à préciser : \_\_\_\_\_ /

**Digestif** : Nausée / \_\_\_\_ / Vomissement / \_\_\_\_ / Diarrhée / \_\_\_\_ / Toux / \_\_\_\_ /  
Autre (s) à préciser : \_\_\_\_\_ /

**Généraux** : Fièvre / \_\_\_\_ / Myalgie / \_\_\_\_ / Arthralgie / \_\_\_\_ / Etat général / \_\_\_\_ / AEG / \_\_\_\_ /  
Autre (s) à préciser : \_\_\_\_\_ /

**Viscéraux** : Adénopathie / \_\_\_\_ / Hépatomégalie / \_\_\_\_ / Splénomégalie / \_\_\_\_ / Autre (s) à préciser : \_\_\_\_\_ /

**HISTORIQUE MEDICAL**

**PATHOLOGIES OPPORTUNISTES DU SIDA**  
Cancer invasif du col / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Candidose bronche/trachéale/poumons / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Candidose œsophagienne / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Cryptococcose extrapulmonaire / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Cryptosporidiose / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Encéphalopathie à VIH / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Histoplasmosse / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Infection à CMV / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Infection à mycobactéries atypique / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Isosporose / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
Lymphome cérébral primaire / \_\_\_\_ / Mois / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / Année / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /







## **Annexe 5: Préparation du milieu aux graines de Niger (*Guizotia abyssinica*)**

**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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (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 90 mm de diamètre et laissé pour solidification.

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



## **Annexe 6: Préparation du milieu L Canavanine glycine bleu de bromthymol (CGB)**

### **Solution A :**

10g Glycine  
1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1g MgSO<sub>4</sub>  
1g Thiamine HCl  
30mg L-Canavanine sulfate  
100mL Eau distillée

1. Dissoudre les ingrédients dans un erlenmeyer et ajuster le pH à 5.6
2. Filtrer la solution avec un filtre de 0.22µm
3. Stocker dans le réfrigérateur

### **Solution B**

64mL NaOH 0.01N  
36mL Eau distillée

1. Dissoudre le bleu de bromthymol dans le NaOH
2. Ajouter le dans l'eau

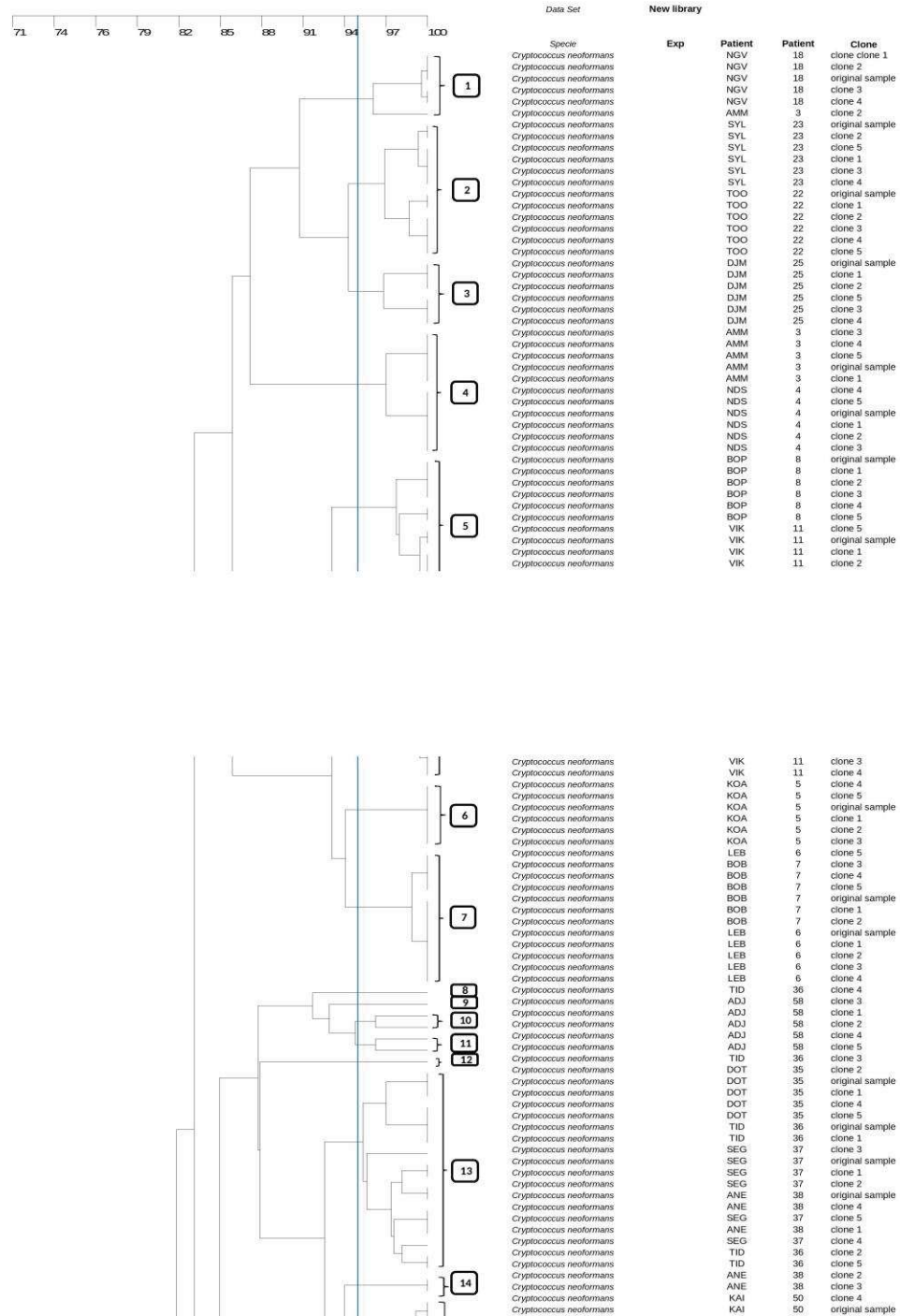
### **Préparation du milieu de culture**

880mL Eau distillée  
20mL Solution B  
20g Bacto agar

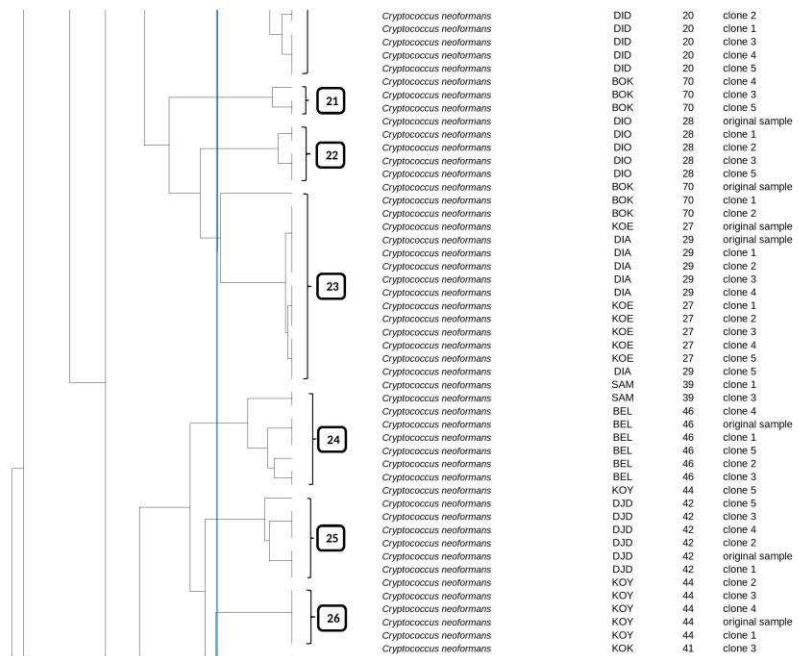
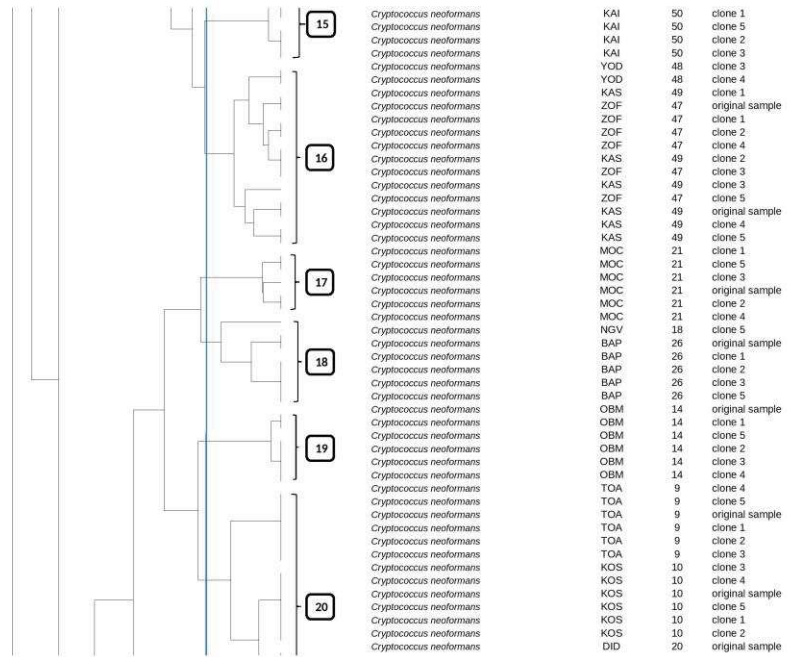
1. Autoclaver à 121°C pendant 15 min, refroidir à 48°C
2. Ajouter 100ml de solution A et mixer doucement. Verser dans des boîtes de Petri

**Test :** Ensemencer le milieu avec un important inoculum de levure et incuber à 25°C pendant 1 semaine. Les colonies du complexe d'espèces *C.gattii* vont colorer le milieu en bleu.

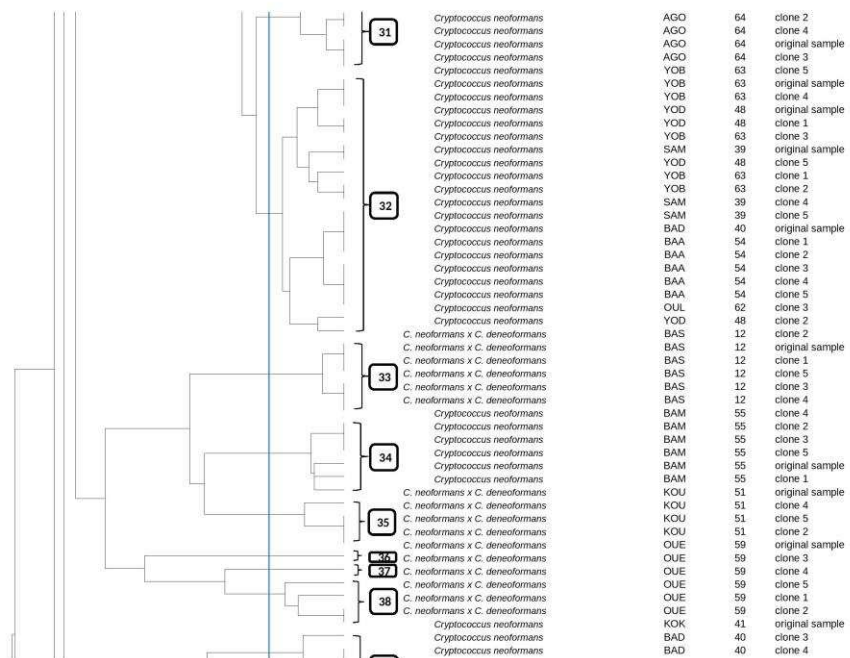
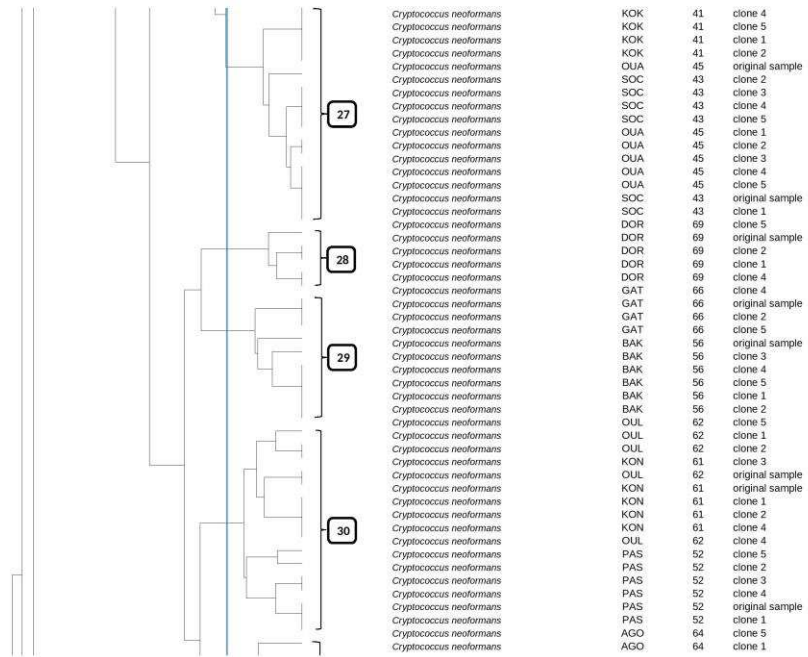
**Annexe 7: Dendrogramme de la diversité génétique des 363 isolats de *Cryptococcus* obtenu par analyse des séquences mini et microsattellites et URA5-RFLP.**



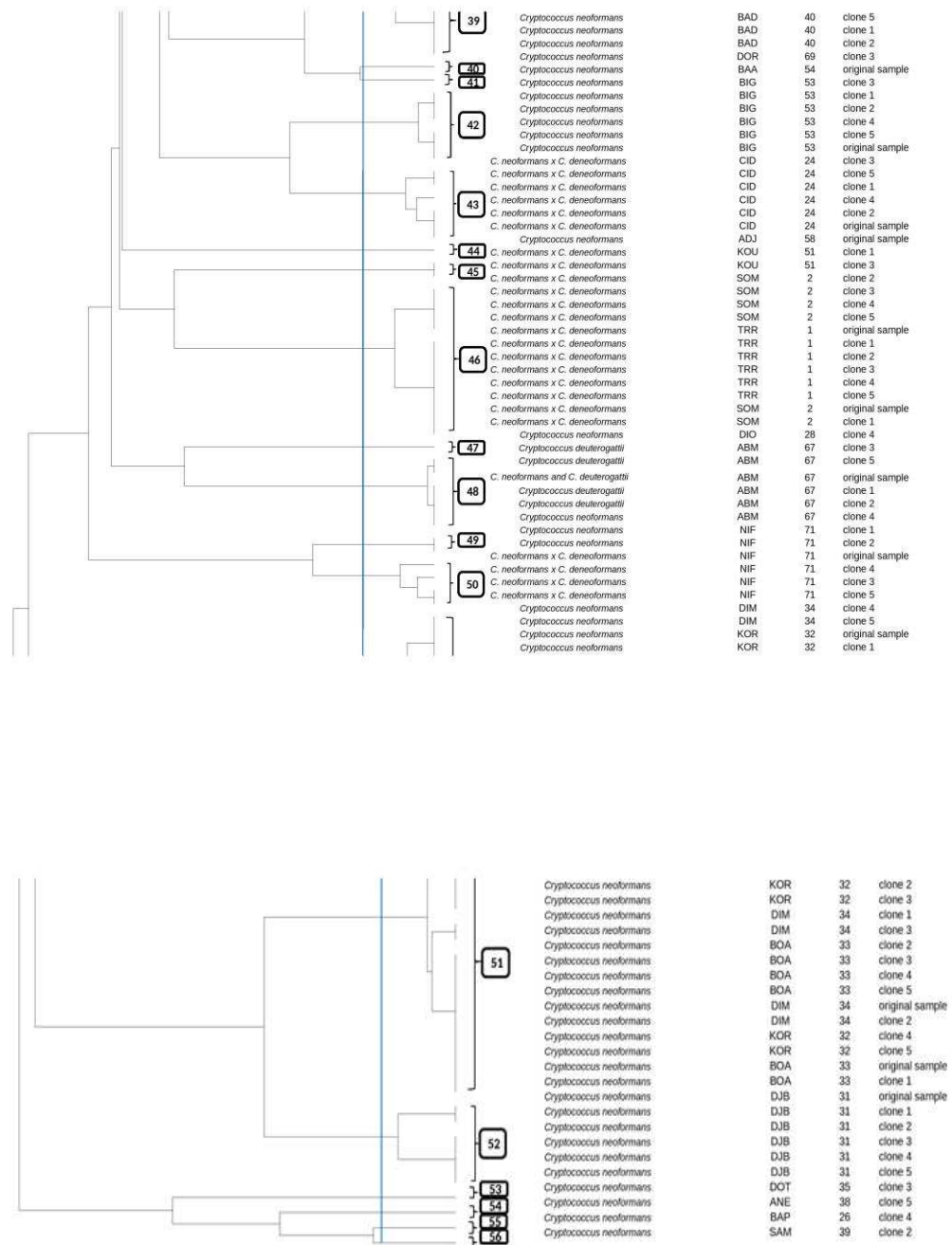
Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire



Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire



Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire



Le dendrogramme a été généré à l'aide du logiciel Gene Directory (Syngene) en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean) avec un coefficient de corrélation de Dice de 10% calculé à partir des profils des 363 isolats de *Cryptococcus*. Gene Directory a généré le dendrogramme en expérience croisée (ensemble des profils obtenus pour l'ensemble des amorces). Le pourcentage de similarité entre deux isolats a été défini à 95%.



**Annexe 8: Sérotypes, génotypes et valeurs des CMI (µg/ml) des trois antifongiques testés pour les 363 isolats de *Cryptococcus*.**

	Sérotypes	Génotypes	FCZu (µg/mL)		5FC (µg/mL)		AMB (µg/mL)	
			48H	72H	48H	72H	48H	72H
<b>Patients</b>								
TRR-1	AD	VN III	0,25-4	2	4	4	0,25-1	0,25-1
TRR1-1	AD	VN III	0,5	0,5	2	2	1	1
TRR1-2	AD	VN III	4	4	2	2	0,25	0,25
TRR1-3	AD	VN III	0,5	2-4	4	4	1	1
TRR1-4	AD	VN III	2	4	4	4	1	1
TRR1-5	AD	VN III	1	1	0,5	0,5	1	1
SOM-2	AD	VN III	2-4	2	2	2	0,25-0,5	0,25-0,5
SOM2-1	AD	VN III	4	4	2	2	0,5	0,5
SOM2-2	AD	VN III	4	4	4	4	0,5	0,5
SOM2-3	AD	VN III	4	4	4	4	0,5	0,5
SOM2-4	AD	VN III	4	4	0,25	0,125	0,25	0,25
SOM2-5	AD	VN III	2	2-4	4	4	0,25	0,25
AMM-3	A	VN I	1	2	4	4	0,25-0,5	0,25-0,5
AMM3-1	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
AMM3-2	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
AMM3-3	A	VN I	0,5	2	1	1	0,25	0,25
AMM3-4	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
AMM3-5	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
NDS-4	A	VN I	<0,125	2	2	2	0,25-0,5	0,25-0,5
NDS4-1	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
NDS4-2	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
NDS4-3	A	VN I	1-2	1-4	1	1	0,25	0,25
NDS4-4	A	VN I	0,125	0,125	1	1	0,25	0,25
NDS4-5	A	VN I	2	2	2	2	0,25	0,25
KOA-5	A	VN I	1-4	2	4	4	0,5	0,5
KOA5-1	A	VN I	2	4	2	2	0,25	0,25
KOA5-2	A	VN I	2	4	2	2	0,5	0,5
KOA5-3	A	VN I	4	4	4	4	0,25	0,25
KOA5-4	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
KOA5-5	A	VN I	4	4	4	4	0,5	0,5
LEB-6	A	VN I	8	8	8	8	0,25	0,25-0,5
LEB6-1	A	VN I	4	4	4	4	0,5	0,5
LEB6-2	A	VN I	4-8	4-8	8	8	0,5	0,5
LEB6-3	A	VN I	4-8	4-8	4	4	0,5	0,5
LEB6-4	A	VN I	4	4	4	4	0,25	0,25
LEB6-5	A	VN I	2	1-2	4	4	0,5	0,5
BOB-7	A	VN I	8	2	8	8	0,25	0,25
BOB7-1	A	VN I	0,25	0,25	4	4	1	1
BOB7-2	A	VN I	2	4	2	2	1	1
BOB7-3	A	VN I	2	4	4	4	0,5-1	0,5-1
BOB7-4	A	VN I	2	8	4	4	0,5	0,5
BOB7-5	A	VN I	2	2-4	4	4	0,5-1	0,5-1
BOP-8	A	VN I	4	0,25	4	4	1	1
BOP8-1	A	VN I	4	4	2	2	0,5-1	0,5-1
BOP8-2	A	VN I	1	1	4	4	0,5-1	0,5-1
BOP8-3	A	VN I	2	4	4	4	0,5-1	0,5-1
BOP8-4	A	VN I	0,25-1	0,25-1	2	2	0,5-1	0,5-1
BOP8-5	A	VN I	4	4	4	4	0,5-1	0,5-1
TOA-9	A	VN I	0,5-1	0,5-1	2	2	1	1
TOA9-1	A	VN I	0,5	0,5	2	2	0,5-1	0,5-1
TOA9-2	A	VN I	0,5	0,5	1	1	0,5-1	0,5-1
TOA9-3	A	VN I	0,5	0,5	1	1	0,5-1	0,5-1
TOA9-4	A	VN I	0,5	0,5	2	2	0,5-1	0,5-1
TOA9-5	A	VN I	0,5	0,5	8	8	0,5-1	0,5-1
KOS-10	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
KOS10-1	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
KOS10-2	A	VN I	1	1-2	4	4	0,5	0,5
KOS10-3	A	VN I	2	2-4	4	4	0,5	0,5
KOS10-4	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
KOS10-5	A	VN I	2	2-4	4	4	0,5	0,5
VIK-11	A	VN I	0,5	1-2	4	4	0,5	0,5
VIK11-1	A	VN I	1	1	8	8	0,5	0,5
VIK11-2	A	VN I	1	2	8	8	0,5	0,5
VIK11-3	A	VN I	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25
VIK11-4	A	VN I	1	1	8	8	0,25	0,25
VIK11-5	A	VN I	1	1	4	4	0,5	0,5
BAS-12	AD	VN III	0,5-1	0,5	2	2	0,5	0,5
BAS12-1	AD	VN III	<0,125	0,5	1	1	0,5	0,5
BAS12-2	AD	VN III	0,5	0,5	2	2	0,5	0,5
BAS12-3	AD	VN III	<0,125	0,5	2	2	0,5	0,5
BAS12-4	AD	VN III	0,5-1	0,5-1	2	2	0,5	0,5
BAS12-5	AD	VN III	1	1	4	4	0,5	0,5
OBM-13	A	VN I	4	0,5	4	4	1	1
OBM13-1	A	VN I	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5
OBM13-2	A	VN I	1	2	1	1	0,5	0,5
OBM13-3	A	VN I	2	2	2	2	1	1
OBM13-4	A	VN I	2	2-4	1	1	1	1
OBM13-5	A	VN I	2	2	1	1	0,5	0,5
NGV-14	A	VN I	1	2	2	2	0,5	0,5
NGV14-1	A	VN I	2	4	1	1	0,5	0,5
NGV14-2	A	VN I	2	4	0,5	0,5	0,5	0,5
NGV14-3	A	VN I	1	2	1	1	0,5	0,5
NGV14-4	A	VN I	1-2	1-2	1	1	0,5	0,5
NGV14-5	A	VN I	1	1	1	1	0,5	0,5
DID-15	A	VN I	2	2	2	2	1	1
DID15-1	A	VN I	0,125	0,125	0,5	0,5	1	1
DID15-2	A	VN I	<0,125	0,5-2	1	1	0,5	0,5
DID15-3	A	VN I	<0,125	0,25-0,125	1	1	0,5	0,5
DID15-4	A	VN I	0,125	0,125	1	1	0,5	0,5
DID15-5	A	VN I	0,125	0,125	1	1	0,5	0,5



Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire

MOC-16	A	VN I	4	4	4	4	1	1
MOC16-1	A	VN I	4	4	1	1	0,5	0,5
MOC16-2	A	VN I	4	4	1	1	1	1
MOC16-3	A	VN I	8	16	1	1	0,5	0,5
MOC16-4	A	VN I	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5
MOC16-5	A	VN I	0,25	0,25	2	2	0,25	0,25
TOO-17	A	VN I	0,5-4	0,25-0,5	2	2	1	1
TOO17-1	A	VN I	0,5-1	0,5-1	1	1	0,25	0,25
TOO17-2	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,25	0,25
TOO17-3	A	VN I	1	1	2	2	0,25	0,25
TOO17-4	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
TOO17-5	A	VN I	2-4	2-4	2	2	0,5	0,5
SYL-18	A	VN I	1-2	1	1	1	0,5	0,5
SYL18-1	A	VN I	1	1	4	4	0,5	0,5
SYL18-2	A	VN I	2	2	2	4	0,5	0,5
SYL18-3	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
SYL18-4	A	VN I	1	1	4	4	0,5	0,5
SYL18-5	A	VN I	1	1	4	4	0,5	0,5
CID-19	AD	VN III	4	2	2	2	1	1
CID19-1	AD	VN III	2	2-4	16	16	1	1
CID19-2	AD	VN III	2	2	8	8	0,25	0,25
CID19-3	AD	VN III	2	2-4	4	4	0,25	0,25
CID19-4	AD	VN III	2-4	2-4	4	4	0,5	0,5
CID19-5	AD	VN III	1	1	32	16	0,5	0,5
DJM-20	A	VN I	4	1	2	2	0,125-0,25	0,125-0,25
DJM20-1	A	VN I	2	2	1	1	0,5	0,5
DJM20-2	A	VN I	1	2	1	1	0,125	0,125
DJM20-3	A	VN I	2	2	1	1	0,25	0,25
DJM20-4	A	VN I	1	1	1	1	0,5	0,5
DJM20-5	A	VN I	2	4	1	1	0,5	0,5
BAP-21	A	VN I	4	4	1	2	0,5	0,5
BAP21-1	A	VN I	1	4	1	1	0,5	0,5
BAP21-2	A	VN I	2	4	1	1	0,5	0,5
BAP21-3	A	VN I	1	4	1	1	0,5	0,5
BAP21-4	A	VN I	4	4	1	1	0,5	0,5
BAP21-5	A	VN I	2	2	1	1	0,5	0,5
KOE-22	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
KOE22-1	A	VN I	0,5	2	0,5	2	0,5	0,5
KOE22-2	A	VN I	2	2	1	1	0,5	0,5
KOE22-3	A	VN I	2	2	1	1	0,5	0,5
KOE22-4	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
KOE22-5	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
DIO-23	A	VN I	4	1	0,5	0,5	1	1
DIO23-1	A	VN I	1-2	1-2	2	2	1	1
DIO23-2	A	VN I	2-4	2-4	2	2	1	1
DIO23-3	A	VN I	0,125	0,125	1	1	1	1
DIO23-4	A	VN I	0,5-1	0,5-1	2	2	1	1
DIO23-5	A	VN I	1	1	1	4	1	1
DIA-24	A	VN I	4	2	2	2	0,5	0,5
DIA24-1	A	VN I	4	4	1	1	0,5	0,5
DIA24-2	A	VN I	2	2	1	1	0,5	0,5
DIA24-3	A	VN I	1	1	0,5	1	0,5	0,5
DIA24-4	A	VN I	2	2	1	1	0,5	0,5
DIA24-5	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
DJB-25	A	VN II	1	0,5	1	1	0,125-0,25	0,125-0,25
DJB25-1	A	VN II	0,5-1	0,5-1	0,5	0,5	0,25	0,25
DJB25-2	A	VN II	0,5-1	0,5-1	0,5	0,5	0,25	0,25
DJB25-3	A	VN II	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25
DJB25-4	A	VN II	0,5	0,5	<0,125	0,5	0,25	0,25
DJB25-5	A	VN II	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25
KOR-26	A	VN I	2	2	2	2	0,25	0,25
KOR26-1	A	VN I	2	2	1	1	0,25	0,25
KOR26-2	A	VN I	1-4	1-4	1	1	0,25	0,25
KOR26-3	A	VN I	2	2	1	2	0,25	0,25
KOR26-4	A	VN I	2	2	2	4	0,25	0,25
KOR26-5	A	VN I	4	4	2	2	0,25	0,25
BOA-27	A	VN I	2	2	2	2	0,25	0,25
BOA27-1	A	VN I	2	2	2	2	0,25	0,25-0,5
BOA27-2	A	VN I	1-2	1-2	1	1	0,5	0,5
BOA27-3	A	VN I	0,25	0,25	1	1	0,5	0,5
BOA27-4	A	VN I	0,5	0,5-1	1	1	0,5	0,5
BOA27-5	A	VN I	1-2	1-2	1	1	0,5	0,5
DIM-28M	A	VN I	4	2-4	4	4	0,5	0,5
DIM28-1	A	VN I	0,5	0,5	4	4	0,125	0,125-0,25
DIM28-2	A	VN I	0,5	0,5	16	16	0,25	0,25
DIM28-3	A	VN I	0,125	0,125	8	8	0,125	0,125-0,25
DIM28-4	A	VN I	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25
DIM28-5	A	VN I	1	1	4	4	0,125-0,25	0,125-0,25
DOT-29	A	VN I	1	1-2	4	4	0,5	0,5
DOT29-1	A	VN I	2	2	0,5	4	0,5	0,5
DOT29-2	A	VN I	0,5	1	2	2	0,5	0,5
DOT29-3	A	VN I	2	2	1	2	0,5	0,5
DOT29-4	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
DOT29-5	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
TID-30	A	VN I	2-4	2-4	2	2	0,5	0,5
TID30-1	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
TID30-2	A	VN I	2	2	1	2	0,5	0,5
TID30-3	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
TID30-4	A	VN I	2	2	1	2	0,5	0,5
TID30-5	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5

Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire

SEG-31	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
SEG31-1	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
SEG31-2	A	VN I	2	2	1	4	0,5	0,5
SEG31-3	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
SEG31-4	A	VN I	2	2	1	4	0,5	0,5
SEG31-5	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
ANE-32	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
ANE32-1	A	VN I	4	2	4	4	0,5	0,5
ANE32-2	A	VN I	0,5	2	0,5	4	0,5	0,5
ANE32-3	A	VN I	4	2	4	4	0,5	0,5
ANE32-4	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
ANE32-5	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
SAM-33	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
SAM33-1	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
SAM33-2	A	VN I	1	1	4	2	0,5	0,5
SAM33-3	A	VN I	1	1	4	2	0,5	0,5
SAM33-4	A	VN I	1	1	4	2	0,5	0,5
SAM33-5	A	VN I	1	1	4	2	0,5	0,5
BAD-34	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
BAD34-1	A	VN I	2	2	2	4	0,5	0,5
BAD34-2	A	VN I	1	2	2	2	0,5	0,5
BAD34-3	A	VN I	2	2	1	2	0,5	0,5
BAD34-4	A	VN I	1	2	4	4	0,5	0,5
BAD34-5	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
KOK-35	A	VN I	2	2	2-4	2-4	0,5	0,5
KOK35-1	A	VN I	2	2	1	2-4	0,5	0,5
KOK35-2	A	VN I	1	2	1	2-4	0,5	0,5
KOK35-3	A	VN I	1	2	2-4	2-4	0,5	0,5
KOK35-4	A	VN I	1-2	2	2	2-4	0,5	0,5
KOK35-5	A	VN I	0,5	2	0,5-1	2	0,5	0,5
DJD-36	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
DJD36-1	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
DJD36-2	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
DJD36-3	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
DJD36-4	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
DJD36-5	A	VN I	1	1	2-4	2-4	0,5	0,5
SOC-37	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
SOC37-1	A	VN I	2	2	2-4	2-4	0,5	0,5
SOC37-2	A	VN I	1	1	4	4	0,5	0,5
SOC37-3	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
SOC37-4	A	VN I	0,5-1	0,5-1	2	2	0,5	0,5
SOC37-5	A	VN I	1	1	2-4	2-4	0,5	0,5
KOY-38	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
KOY38-1	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
KOY38-2	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
KOY38-3	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
KOY38-4	A	VN I	2-4	2	4	4	0,5	0,5
KOY38-5	A	VN I	1-2	2	4	4	0,5	0,5
OUA-39	A	VN I	2	2	4	4	0,5-1	0,5-1
OUA39-1	A	VN I	2	2	4	4	1	1
OUA39-2	A	VN I	2	2	2	4	0,5	0,5
OUA39-3	A	VN I	2	2	2	4	0,5	0,5
OUA39-4	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
OUA39-5	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
BEL-40	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
BEL40-1	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BEL40-2	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BEL40-3	A	VN I	2-4	2	1	1	0,5	0,5
BEL40-4	A	VN I	2-4	2	4	4	0,5	0,5
BEL40-5	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
ZOF-41	A	VN I	2	2	2	2-4	0,5	0,5
ZOF41-1	A	VN I	1	2	2-4	2-4	0,5	0,5
ZOF41-2	A	VN I	1	2	2	2	0,5	0,5
ZOF41-3	A	VN I	1	2	1-2	2	0,5	0,5
ZOF41-4	A	VN I	1	2	1	2	0,5	0,5
ZOF41-5	A	VN I	1	2	2	2	0,5	0,5
YOD-42	A	VN I	2	2	4	4	0,25-0,5	0,25-0,5
YOD42-1	A	VN I	1-2	1-2	0,5	2-4	0,25	0,25
YOD42-2	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
YOD42-3	A	VN I	2	2	2	2	0,25	0,25
YOD42-4	A	VN I	1	1	2	2	0,25	0,25
YOD42-5	A	VN I	2	2-4	4	4	0,5	0,5
KAS-43	A	VN I	2	2	1	1	0,5	0,5
KAS43-1	A	VN I	2	2	2	1	0,5	0,5
KAS43-2	A	VN I	2	2	2	1	0,5	0,5
KAS43-3	A	VN I	2	2	2	1	0,5	0,5
KAS43-4	A	VN I	2	2	0,5	1	0,5	0,5
KAS43-5	A	VN I	2	2	2	1	0,5	0,5
KAI-44	A	VN I	0,5	0,5	2	2	0,5	0,5
KAI44-1	A	VN I	1	1	1	2	0,5	0,5
KAI44-2	A	VN I	0,5	0,5	1	2	0,5	0,5
KAI44-3	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
KAI44-4	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
KAI44-5	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
KOU-45	AD	VN III	1	1	4	4	0,25-0,5	0,25-0,5
KOU45-1	AD	VN III	1	1-1	4	4	0,5	0,5
KOU45-2	AD	VN III	1-2	1-2	4	4	0,5	0,5
KOU45-3	AD	VN III	1	1	4	4	0,5	0,5
KOU45-4	AD	VN III	1-2	1-2	4	4	0,5	0,5
KOU45-5	AD	VN III	1	1	4	4	0,5	0,5

Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire

PAS-46		VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
PAS46-1	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
PAS46-2	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
PAS46-3	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
PAS46-4	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
PAS46-5	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
BIG-47	A	VN I	0,5	0,5	2	2	0,5	0,5
BIG47-1	A	VN I	0,5-1	0,5-1	2	2	0,5	0,5
BIG47-2	A	VN I	<0,125	0,5	1-2	1-2	0,5	0,5
BIG47-3	A	VN I	0,5	0,5	1-2	1-2	0,5	0,5
BIG47-4	A	VN I	<0,125	0,5	1	1	0,5	0,5
BIG47-5	A	VN I	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5
BAA-48	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
BAA48-1	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
BAA48-2	A	VN I	0,5	2	4	4	0,5	0,5
BAA48-3	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
BAA48-4	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
BAA48-5	A	VN I	2	2	2	4	0,5	0,5
BAM-49	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BAM49-1	A	VN I	0,5	2	0,5-1	0,5-1	0,5	0,5
BAM49-2	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BAM49-3	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BAM49-4	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BAM49-5	A	VN I	2	2	2-4	2-4	0,5	0,5
BAK-50	A	VN I	1	1	2	2-4	0,5	0,5
BAK50-1	A	VN I	1	1	2-4	2-4	0,5	0,5
BAK50-2	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BAK50-3	A	VN I	0,5	1	2	2	0,5	0,5
BAK50-4	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
BAK50-5	A	VN I	2	2	1	2-4	0,5	0,5
ADJ-51	A	VN I	4	4	1	4	0,5	0,5
ADJ51-1	A	VN I	1	1	4	4	0,5	0,5
ADJ51-2	A	VN I	0,5-1	0,5-1	1	4	0,5	0,5
ADJ51-3	A	VN I	0,5-1	0,5-1	1	4	0,5	0,5
ADJ51-4	A	VN I	0,5	0,5	4	4	0,5	0,5
ADJ51-5	A	VN I	1	1	4	4	0,5	0,5
OUE-52	AD	VN III	0,5-1	0,5-1	4	4	0,5	0,5
OUE52-1	AD	VN III	1	1	4	8	0,5	0,5
OUE52-2	AD	VN III	0,25	0,5-1	4	8	0,5	0,5
OUE52-3	AD	VN III	1	1	2	4	0,5	0,5
OUE52-4	AD	VN III	0,25	1	8	8	0,5	0,5
OUE52-5	AD	VN III	1	1	8	8	0,5	0,5
KON-53	A	VN I	2	2	8	8	0,5	0,5
KON53-1	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
KON53-2	A	VN I	2	2	2-4	2-4	0,5	0,5
KON53-3	A	VN I	2-4	2-4	4	4	0,5	0,5
KON53-4	A	VN I	/	/	/	/	/	/
KON53-5	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
OUL-54	A	VN I	2-4	2-4	4	4-8	0,5	0,5
OUL54-1	A	VN I	2	2	2-4	2-4	0,5	0,5
OUL54-2	A	VN I	1	2-4	2	2-4	0,5	0,5
OUL54-3	A	VN I	1	2-4	2-4	2-4	0,5	0,5
OUL54-4	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
OUL54-5	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
YOB-55	A	VN I	2	2	1-2	1-2	0,5	0,5
YOB55-1	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
YOB55-2	A	VN I	/	1-2	1-2	1-2	0,5	0,5
YOB55-3	A	VN I	0,5-1	0,5-1	1-2	1-2	0,5	0,5
YOB55-4	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
YOB55-5	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
AGO-56	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
AGO56-1	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
AGO56-2	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
AGO56-3	A	VN I	1	1-2	2	2	0,5	0,5
AGO56-4	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
AGO56-5	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
GAT-57	A	VN I	1	1	2	2	0,5	0,5
GAT57-1	A	VN I	/	/	/	/	/	/
GAT57-2	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
GAT57-3	A	VN I	/	/	/	/	/	/
GAT57-4	A	VN I	4	2-4	1-2	2	0,5	0,5
GAT57-5	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
ABM-58	B	VG II	4	4	2	2	0,5	0,5
ABM58-1	B	VG II	4	4	2	2	0,5	0,5
ABM58-2	B	VG II	4	4	2	2	0,5	0,5
ABM58-3	B	VG II	4	4	2	2	0,5	0,5
ABM58-4	A	VN I	4	4	2	2	0,5	0,5
ABM58-5	B	VG II	4	4	2	2	0,5	0,5
DOR-59	A	VN I	2	2	1-2	1-2	0,25-0,5	0,25-0,5
DOR59-1	A	VN I	2	2	1-2	1-2	0,25	0,25-0,5
DOR59-2	A	VN I	2	2	1-2	1-2	0,25-0,5	0,25-0,5
DOR59-3	A	VN I	4	4	1	2-4	0,5	0,5
DOR59-4	A	VN I	0,5	2-4	2-4	2-4	0,25	0,25
DOR59-5	A	VN I	2-4	2-4	2-4	2-4	0,5	0,5
BOK-60	A	VN I	2-4	2-4	2-4	2-4	0,25-0,5	0,25-0,5
BOK60-1	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
BOK60-2	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BOK60-3	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
BOK60-4	A	VN I	1-2	1-2	2	2	0,5	0,5
BOK60-5	A	VN I	2	2	2	2	0,5	0,5
NIF-61	AD	VN III	2	2	16	16	0,5	0,5
NIF61-1	A	VN I	2	2	4	4	0,5	0,5
NIF61-2	A	VN I	2	2	2	4	0,5	0,5
NIF61-3	AD	VN III	2	2	2-4	2-4	0,5	0,5
NIF61-4	AD	VN III	1	2-4	1	1	0,5	0,5
NIF61-5	AD	VN III	1	2-4	1	1	0,5	0,5



**Annexe 9: Sérotypes, génotypes, séquences types, fréquences alléliques et valeurs des CMI (µg/ml) des trois antifongiques testés pour les 246 isolats de suivi.**

Patients	Sérotypes	Génotypes	ST	CAP59	GDP1	IGS1	LAC1	PLB1	SOD1	URA5	FCZu (µg/mL)		5FC (µg/mL)		AMB (µg/mL)	
											48H	72H	48H	72H	48H	72H
6-10NIA JoM	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	2	2	8	8	0,5	0,5
6-10NIA JoM1	AD	VN III	366	29	1	60	23	16	1	1	2	2	4	8	0,5	0,5
6-10NIA JoM2	AD	VN III	354	37	5	32	19	3	1	1	2	2	2	4	0,5	0,5
6-10NIA JoM3	AD	VN III	354	37	5	32	19	3	1	1	2	2	2-4	2-4	0,5	0,5
6-10NIA JoM4	AD	VN III	260	16	23	24	3	4	1	19	1	2	1	1	0,25	0,5
6-10NIA JoM5	AD	VN III	326	26	23	60	23	16	1	40	2	2	4	4	0,5	0,5
6-10NIA J7M	AD	VN III	366	29	1	60	23	16	1	1	2	2	16	16	0,5	0,5
6-10NIA J7M1	A	VN I	93	1	23	10	3	4	1	1	2	2	4	4	0,5	0,5
6-10NIA J7M2	A	VN I	32	1	1	10	3	4	1	1	2	2	2	4	0,5	0,5
6-10NIA J7M3	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	2	2	2-4	2-4	0,5	0,5
6-10NIA J7M4	AD	VN III	256	17	1	28	6	14	1	16	1	2-4	1	1	0,25	0,5
6-10NIA J7M5	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	1	2-4	1	1	0,25	0,5
6-10NIA S10M	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	0,5	<0,125	1	0,3	0,25	0,5
6-10NIA S10M1	A	VN I	23	7	1	1	2	1	1	2	0,5	<0,125	1	<0,125	0,25	0,5
6-10NIA S10M2	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	1	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-10NIA S10M3	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	1	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-10NIA S10M4	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	0,5	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-10NIA S10M5	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	0,5	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-17 MBR JoM	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	2	2	2	4	0,25	0,5
6-17 MBR JoM1	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	2	2	2	2	0,25	0,5
6-17 MBR JoM2	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	1	2	1	2	0,25	0,5
6-17 MBR JoM3	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	1	1	0,5	2	0,25	0,5
6-17 MBR JoM4	A	VN I	186	1	26	1	5	2	1	1	1	1	0,5	2	0,25	0,5
6-17 MBR JoM5	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	2	2	0,5	2	0,25	0,5
6-17 MBR J7M	A	VN I	15	1	2	6	3	2	1	1	2	2	2	4	0,25	0,5
6-17 MBR J7M1	A	VN I	186	1	26	1	5	2	1	1	2	2	2	4	0,25	0,5
6-17 MBR J7M2	A	VN I	15	1	2	6	3	2	1	1	0,5	2	16	0,5	0,25	0,5
6-17 MBR J7M3	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	1	1	8	1	0,25	0,5
6-17 MBR J7M4	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	1	1	16	0,25	0,25	0,5
6-17 MBR J7M5	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	4	4	4	4	0,25	0,5
6-17 MBR J14M	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	<0,125	1	16	0,25	0,25	0,5
6-17 MBR J14M1	A	VN I	59	1	3	14	3	4	1	1	1	2	16	1	0,25	0,5
6-17 MBR J14M2	A	VN I	188	1	1	1	5	2	1	5	1	2	16	2	0,5	0,5
6-17 MBR J14M3	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	1	1	0,25	2	0,5	0,5
6-17 MBR J14M4	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	1	2	1	4	0,25	0,5
6-17 MBR J14M5	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	0,25	2	0,5	2	0,5	1
6-17 MBR J28M	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	<0,125	0,5	0,25	2	0,5	1
6-17 MBR J28M1	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	<0,125	0,5	<0,125	0,5	0,5	1
6-17 MBR J28M2	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	0,5	1	0,5	1	0,25	0,5
6-17 MBR J28M3	A	VN I	329	7	3	1	5	2	13	1	0,25	2	1	2	0,25	0,5
6-17 MBR J28M4	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	1	1	1	4	0,25	0,5
6-17 MBR J28M5	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	2	2	1	4	0,25	0,5
6-19 CAM JoM	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	<0,125	1	0,25	1	0,25	0,5
6-19 CAM JoM1	A	VN I	359	1	25	1	5	2	1	1	0,5	0,5	1	1	0,25	0,5
6-19 CAM JoM2	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	0,25	1	0,25	2	0,25	0,5
6-19 CAM JoM3	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	0,25	1	0,25	1	0,25	0,5
6-19 CAM JoM4	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,25	0,25
6-19 CAM JoM5	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	0,25	1	<0,125	0,25	0,25	0,5
6-19 CAM J28M	A	VN I	193	1	3	1	5	2	1	5	<0,125	<0,125	0,5	0,25	0,5	0,5
6-19 CAM J28M1	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	0,5	1	1	4	0,5	0,5
6-19 CAM J28M2	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	0,5	1	2	4	0,5	0,5
6-19 CAM J28M3	A	VN I	298	1	3	34	5	2	1	1	0,5	1	0,25	2	0,5	0,5
6-19 CAM J28M4	A	VN I	359	1	25	1	5	2	1	1	0,25	1	1	2	0,5	0,5
6-19 CAM J28M5	A	VN I	81	1	1	1	5	2	1	1	0,25	1	1	1	0,25	0,5
6-19 CAM S20M	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	<0,125	2	0,25	2	0,25	0,5
6-19 CAM S20M1	A	VN I	15	1	2	6	3	2	1	1	0,25	2	2	1	0,25	0,5
6-19 CAM S20M2	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	0,25	4	0,5	1	0,25	0,5
6-19 CAM S20M3	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	0,25	4	2	4	0,25	0,5
6-19 CAM S20M4	A	VN I	76	1	1	20	3	2	1	1	4	4	1	4	0,25	0,5
6-19 CAM S20M5	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	<0,125	<0,125	0,25	0,25	0,25	0,5
6-20 SIB JoM	A	VN I	23	7	1	1	2	1	1	2	1	1	0,25	0,5	0,25	0,5
6-20 SIB JoM1	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,25	0,25
6-20 SIB JoM2	A	VN I	68	7	3	1	2	1	1	2	1	1	0,25	2	0,25	0,5
6-20 SIB JoM3	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	1	1	1	1	0,25	0,5
6-20 SIB JoM4	A	VN I	23	7	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	0,25	0,5
6-20 SIB JoM5	A	VN I	68	7	3	1	2	1	1	2	<0,125	<0,125	0,25	0,5	0,25	0,5
6-20 SIB J7M	A	VN I	446	6	33	13	7	8	8	7	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-20 SIB J7M1	A	VN I	23	7	1	1	2	1	1	2	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-20 SIB J7M2	A	VN I	307	7	23	1	2	1	1	2	1	0,5	2	2	0,125	0,25
6-20 SIB J7M3	A	VN I	23	7	1	1	2	1	1	2	1	0,5	2	2	0,25	0,25
6-20 SIB J7M4	A	VN I	103	7	1	1	2	1	3	2	1	0,5	2	1	0,25	0,25
6-20 SIB J7M5	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	1	1	2	2	0,25	0,25
6-20 SIB J14M	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	1	1	2	1	0,25	0,25
6-20 SIB J14M1	A	VN I	250	7	1	1	2	1	38	2	1	1	2	2	0,25	0,25
6-20 SIB J14M2	A	VN I	75	1	1	14	3	4	1	1	1	1	2	2	0,25	0,25
6-20 SIB J14M3	A	VN I	68	7	3	1	2	1	1	2	0,5	0,5	2	1	0,25	0,25
6-20 SIB J14M4	A	VN I	307	7	23	1	2	1	1	2	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-20 SIB J14M5	A	VN I	23	7	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	0,25	0,5

Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*  
à Abidjan, Côte d'Ivoire

6-21 BIL JoM	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	4	4	1	2	0,25	0,5
6-21 BIL JoM1	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	4	0,5	0,5	0,5	/	0,25
6-21 BIL JoM2	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	4	2	/	1	/	0,125
6-21 BIL JoM3	A	VN I	186	1	26	1	5	2	1	1	2	8	1	2	0,25	0,5
6-21 BIL JoM4	A	VN I	174	1	1	1	3	2	1	1	4	4	1	2	0,25	0,5
6-21 BIL JoM5	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	2	4	1	2	0,25	0,25
6-21 BIL J7M	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	2	2	0,5	1	<0,03	0,25
6-21 BIL J7M1	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	4	4	0,5	1	0,25	0,5
6-21 BIL J7M2	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	4	4	0,5	1	0,25	0,5
6-21 BIL J7M3	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	/	0,5	0,5	1	/	0,25
6-21 BIL J7M4	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	2	2	0,5	1	0,25	0,25
6-21 BIL J7M5	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	4	4	1	1	0,25	0,5
6-21 BIL J14M	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	4	4	>64	>64	0,25	0,5
6-21 BIL J14M1	AD	VN III	365	22	6	32	19	3	1	1	2	4	>64	>64	0,25	0,5
6-21 BIL J14M2	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	1	2	>64	>64	0,25	0,25
6-21 BIL J14M3	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	2	4	64	>64	0,25	0,5
6-21 BIL J14M4	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	1	4	>64	>64	0,25	0,5
6-21 BIL J14M5	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	<0,125	4	>64	>64	0,5	1
6-21BIL J28M	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	<0,125	4	<0,125	2	<0,03	0,125
6-21BIL J28M1	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	2	4	1	2	0,25	0,125
6-21BIL J28M2	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	2	4	1	2	0,25	0,5
6-21BIL J28M3	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	4	4	1	2	0,25	0,25
6-21BIL J28M4	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	0,5	1	0,5	1	<0,03	<0,03
6-21BIL J28M5	B	VG II	340	8	21	22	4	2	58	2	1	4	0,5	1	0,25	0,5
6-21BIL S10M	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	2	4	1	1	0,25	0,25
6-21BILS10M1	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	1	1	0,5	1	0,125	0,25
6-21BILS10M2	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	1	2	1	1	0,25	0,25
6-21BILS10M3	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	/	1	0,5	<0,125	<0,03	0,25
6-21BILS10M4	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	<0,125	<0,125	<0,125	0,5	0,25	0,5
6-21BILS10M5	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	4	8	1	2	0,06	0,25
6-22 DIA J0M	A	VN II	244	2	23	14	8	11	12	4	0,25	0,25	1	0,5	0,125	0,25
6-22 DIA J0M1	A	VN II	244	2	23	14	8	11	12	4	0,25	0,25	0,5	0,5	0,125	0,25
6-22 DIA J0M2	A	VN II	43	2	9	14	8	11	11	4	0,25	0,5	<0,125	0,5	0,25	0,25
6-22 DIA J0M3	A	VN II	100	2	9	51	8	11	12	4	0,25	0,25	0,5	1	0,125	0,25
6-22 DIA J0M4	A	VN II	40	2	9	14	8	11	12	4	0,5	0,5	1	1	0,125	0,25
6-22 DIA J0M5	A	VN II	100	2	9	51	8	11	12	4	0,25	0,5	0,5	1	0,125	0,25
6-22 DIA J7M	A	VN II	100	2	9	51	8	11	12	4	0,25	0,25	1	1	0,125	0,125
6-22 DIA J7M1	A	VN II	40	2	9	14	8	11	12	4	0,25	0,25	0,25	1	0,125	0,25
6-22 DIA J7M2	A	VN II	244	2	23	14	8	11	12	4	0,25	0,25	0,5	1	0,125	0,25
6-22 DIA J7M3	A	VN II	244	2	23	14	8	11	12	4	<0,125	0,25	<0,125	0,5	0,125	0,125
6-22 DIA J7M4	A	VN II	244	2	23	14	8	11	12	4	<0,125	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125
6-22 DIA J7M5	A	VN II	244	2	23	14	8	11	12	4	<0,125	0,25	0,25	0,5	0,125	0,25
6-23 KOU J0M	A	VN I	359	1	25	1	5	2	1	1	0,5	0,5	2	4	0,25	0,25
6-23 KOU J0M1	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	0,25	0,5	1	2	0,25	0,25
6-23 KOU J0M2	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	0,5	0,5	0,5	2	0,25	0,25
6-23 KOU J0M3	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	0,25	0,25	1	1	0,25	0,5
6-23 KOU J0M4	A	VN I	29	6	13	12	6	9	8	13	0,5	0,5	2	2	0,25	0,25
6-23 KOU J0M5	A	VN I	76	1	1	20	3	2	1	1	0,25	0,5	1	1	0,25	0,25
6-23 KOU J7M	A	VN I	372	1	7	1	18	4	34	1	0,25	0,5	2	0,5	0,125	0,25
6-23 KOU J7M1	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	0,5	0,5	1	1	0,25	0,25
6-23 KOU J7M2	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	0,5	0,5	2	1	0,25	0,25
6-23 KOU J7M3	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	0,25	0,5	2	2	0,25	0,5
6-23 KOU J7M4	A	VN I	175	1	1	1	4	2	1	1	0,5	0,5	2	1	0,25	0,25
6-23 KOU J7M5	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	0,5	0,5	1	1	0,25	0,25
6-23 KOU J14M	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25
6-23 KOU J14M1	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	0,5	0,5	1	2	0,125	0,25
6-23 KOU J14M2	A	VN I	204	1	3	1	5	2	27	1	<0,125	0,25	0,5	0,5	0,125	0,25
6-23 KOU J14M3	A	VN I	359	1	25	1	5	2	1	1	0,25	0,25	1	0,5	0,25	0,25
6-23 KOU J14M4	A	VN I	81	1	1	1	5	2	1	1	0,5	0,5	1	1	0,25	0,25
6-23 KOU J14M5	A	VN I	234	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5	1	1	0,25	0,25
6-23 KOU J28M	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	0,5	0,5	1	2	0,25	0,25
6-23 KOU J28M1	A	VN I	174	1	1	1	3	2	1	1	0,5	0,5	2	2	0,25	0,25
6-23 KOU J28M2	A	VN I	79	1	3	46	5	2	1	1	0,5	0,5	2	2	0,25	0,25
6-23 KOU J28M3	A	VN I	5	1	3	1	5	2	1	1	0,5	0,5	1	1	0,125	0,25
6-23 KOU J28M4	A	VN I	360	1	3	1	5	2	1	45	0,5	0,5	1	1	0,25	0,25
6-23 KOU J28M5	A	VN I	81	1	1	1	5	2	1	1	0,25	0,25	0,5	2	0,25	0,5
6-25 MAM J0M	AD	VN III	256	17	1	28	6	14	1	16	<0,125	1	0,25	2	0,5	0,5
6-25 MAM J0M1	AD	VN III	113	16	21	24	16	14	1	16	0,5	1	0,5	4	0,5	0,5
6-25 MAM J0M2	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	0,5	1	1	2	0,5	0,5
6-25 MAM J0M3	AD	VN III	165	16	22	48	24	13	23	17	<0,125	1	<0,125	1	0,5	0,5
6-25 MAM J0M4	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	<0,125	0,5	<0,125	0,5	0,5	0,5
6-25 MAM J0M5	AD	VN III	358	24	1	32	3	3	1	1	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5
6-25 MAM J7M	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	<0,125	1	<0,125	1	0,5	0,5
6-25 MAM J7M1	AD	VN III	453	11	8	2	7	9	8	8	<0,125	0,25	<0,125	1	0,25	0,5
6-25 MAM J7M2	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	<0,125	2	<0,125	4	0,5	0,5
6-25 MAM J7M3	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	0,25	2	1	8	0,5	0,5
6-25 MAM J7M4	AD	VN III	326	26	23	60	23	16	1	40	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-25 MAM J7M5	AD	VN III	366	29	1	60	23	16	1	1	<0,125	0,5	0,5	4	0,5	0,5
6-25 MAM J14M	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-25 MAM J14M1	AD	VN III	366	29	1	60	23	16	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-25 MAM J14M2	AD	VN III	231	4	11	64	6	25	39	3	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,25
6-25 MAM J14M3	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,25
6-25 MAM J14M4	AD	VN III	260	16	23	24	3	4	1	19	0,25	0,5	2	8	0,25	0,5
6-25 MAM J14M5	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	1	4	2	8	0,25	0,5
6-25 MAM J28M	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	1	1	1	1	0,25	0,5
6-25 MAM J28M1	AD	VN III	267	5	22	24	19	13	23	18	<0,125	1	0,5	1	0,25	0,5
6-25 MAM J28M2	AD	VN III	255	16	1	53	2	14	1	20	<0,125	<0,125	<0,125	1	0,25	0,5
6-25 MAM J28M3	AD	VN III	362	5	22	24	19	10	1	18	<0,125	<0,125	<0,125	1	0,25	0,5
6-25 MAM J28M4	AD	VN III	326	26	23	60	23	16	1	40	<0,125	<0,125	<0,125	0,5	0,25	0,5
6-25 MAM J28M5	AD	VN III	260	16	23	24	3	4	1	19	<0,125	2	<0,125	1	0,25	0,5



Diversité génétique et sensibilité aux antifongiques d'isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus* à Abidjan, Côte d'Ivoire

6-26 DOH J0M	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	32	1	4	0,5	1
6-26 DOH J0M1	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	16	4	8	0,5	1
6-26 DOH J0M2	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	8	8	2	4	0,5	1
6-26 DOH J0M3	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	8	16	2	8	0,5	1
6-26 DOH J0M4	B	VG II	340	8	21	22	4	2	58	2	16	16	1	1	0,5	1
6-26 DOH J0M5	B	VG II	114	43	31	64	43	32	64	18	8	8	0,5	2	0,5	1
6-26 DOH J7M	B	VG II	340	8	21	22	4	2	58	2	16	16	2	4	0,5	1
6-26 DOH J7M1	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	32	2	2	0,5	0,5
6-26 DOH J7M2	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	32	1	4	0,25	0,5
6-26 DOH J7M3	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	32	1	4	0,25	0,5
6-26 DOH J7M4	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	16	1	4	0,5	0,5
6-26 DOH J7M5	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	32	64	1	4	0,5	0,5
6-26 DOH J14M	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	32	<0,125	2	0,25	0,5
6-26 DOH J14M1	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	16	0,5	0,25	0,25	0,5
6-26 DOH J14M2	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	16	0,25	4	0,5	0,5
6-26 DOH J14M3	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	32	1	4	0,5	0,5
6-26 DOH J14M4	B	VG II	340	8	21	22	4	2	58	2	8	32	1	8	0,5	1
6-26 DOH J14M5	B	VG II	88	6	6	15	4	1	15	2	16	32	4	4	0,5	1
6-27 KON J0M	A	VNI	188	1	1	1	5	2	1	5	0,5	2	0,5	1	0,25	0,5
6-27 KON J0M1	A	VNI	137	1	3	1	4	2	1	5	<0,125	0,25	<0,125	0,25	0,25	0,5
6-27 KON J0M2	A	VNI	6	1	1	1	3	2	1	5	8	8	4	2	0,5	0,5
6-27 KON J0M3	A	VNI	6	1	1	1	3	2	1	5	<0,125	<0,125	0,5	0,25	/	1
6-27 KON J0M4	A	VNI	6	1	1	1	3	2	1	5	<0,125	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5
6-27 KON J0M5	A	VNI	76	1	1	20	3	2	1	1	<0,125	0,25	0,5	0,25	/	0,5
6-27 KON J7M	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	8	16	1	4	0,25	1
6-27 KON J7M1	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	16	32	1	8	0,25	1
6-27 KON J7M2	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	8	16	<0,125	2	0,25	0,5
6-27 KON J7M3	B	VG II	173	4	21	21	4	16	93	2	8	16	0,5	2	0,25	1
6-27 KON J7M4	B	VG II	88	6	6	15	4	1	15	2	<0,125	16	0,5	1	0,25	0,5
6-27 KON J7M5	B	VG II	167	2	3	31	4	1	8	7	<0,125	16	1	2	0,25	0,5
6-29 AYA J0M	A	VNI	359	1	25	1	5	2	1	1	4	4	1	1	0,5	0,5
6-29 AYA J0M1	A	VNI	174	1	1	1	3	2	1	1	0,5	4	1	2	0,5	0,5
6-29 AYA J0M2	A	VNI	53	1	3	1	3	2	1	1	0,5	0,5	0,25	<0,125	0,5	0,5
6-29 AYA J0M3	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	0,35	0,25	<0,125	<0,125	0,5	0,5
6-29 AYA J0M4	A	VNI	5	1	3	1	5	2	1	1	0,25	0,5	<0,125	0,25	0,25	0,5
6-29 AYA J0M5	A	VNI	79	1	3	46	5	2	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,5	0,5
6-29 AYA J7M	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	0,5	8	0,5	2	0,25	0,5
6-29 AYA J7M1	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	0,5	4	1	2	0,25	0,25
6-29 AYA J7M2	A	VNI	5	1	3	1	5	2	1	1	4	4	1	2	0,5	0,5
6-29 AYA J7M3	A	VNI	5	1	3	1	5	2	1	1	2	4	1	1	0,5	0,5
6-29 AYA J7M4	A	VNI	75	1	1	14	3	4	1	1	2	0,25	<0,125	0,5	0,5	0,5
6-29 AYA J7M5	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	0,25	0,25	<0,125	<0,125	0,5	0,5
6-29 AYA J14M	A	VNI	5	1	3	1	5	2	1	1	<0,125	0,25	1	64	0,25	0,5
6-29 AYA J14M1	A	VNI	79	1	3	46	5	2	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,125	0,5
6-29 AYA J14M2	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	0,25	0,5	<0,125	64	0,25	0,5
6-29 AYA J14M3	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	0,25	0,5	<0,125	64	0,5	0,5
6-29 AYA J14M4	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	<0,125	<0,125	0,5	<0,125	0,5	1
6-29 AYA J14M5	A	VNI	5	1	3	1	5	2	1	1	8	8	1	1	0,5	0,5
6-29 AYA S10M	A	VNI	79	1	3	46	5	2	1	1	<0,125	1	1	1	0,5	0,5
6-29 AYA S10M1	A	VNI	360	1	3	1	5	2	1	45	<0,125	1	0,25	0,5	0,5	0,5
6-29 AYA S10M2	A	VNI	59	1	3	14	3	4	1	1	<0,125	0,5	<0,125	<0,125	0,5	0,5
6-29 AYA S10M3	A	VNI	298	1	3	34	5	2	1	1	<0,125	2	<0,125	0,25	0,5	0,5
6-29 AYA S10M4	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5
6-29 AYA S10M5	A	VNI	192	1	1	59	3	2	1	1	4	4	1	2	0,25	0,5
6-30 MEN J0M	A	VNI	259	24	23	28	3	2	1	2	<0,125	0,25	0,5	2	0,5	0,5
6-30 MEN J0M1	A	VNI	79	1	3	46	5	2	1	1	<0,125	0,25	<0,125	1	0,5	0,5
6-30 MEN J0M2	A	VNI	337	1	3	1	4	2	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,25	0,5
6-30 MEN J0M3	A	VNI	59	1	3	14	3	4	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5	0,5
6-30 MEN J0M4	A	VNI	360	1	3	1	5	2	1	45	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,25	0,5
6-30 MEN J0M5	A	VNI	360	1	3	1	5	2	1	45	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-30 MEN J7M	A	VNI	79	1	3	46	5	2	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	16	0,5	0,5
6-30 MEN J7M1	A	VNI	360	1	3	1	5	2	1	45	0,5	0,25	1	2	0,5	0,5
6-30 MEN J7M2	A	VNI	206	1	14	10	11	4	1	37	<0,125	0,25	<0,125	<0,125	0,25	0,25
6-30 MEN J7M3	A	VNI	79	1	3	46	5	2	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,5	1
6-30 MEN J7M4	A	VNI	53	1	3	1	3	2	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5	0,5
6-30 MEN J7M5	A	VNI	175	1	1	1	4	2	1	1	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5
6-34 ABI J0M	A	VNI	68	7	3	1	2	1	1	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5
6-34 ABI J0M1	A	VNI	66	7	1	1	12	1	1	2	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5
6-34 ABI J0M2	A	VNI	75	1	1	14	3	4	1	1	1	1	1	2	0,5	0,5
6-34 ABI J0M3	A	VNI	213	7	1	1	5	1	1	2	1	1	1	2	0,5	0,5
6-34 ABI J0M4	A	VNI	213	7	1	1	5	1	1	2	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5
6-34 ABI J0M5	A	VNI	65	7	1	1	6	1	1	2	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5
6-34 ABI J7M	A	VNI	311	7	1	1	3	1	1	2	<0,125	0,5	1	1	0,25	0,5
6-34 ABI J7M1	A	VNI	434	6	8	21	6	9	13	51	<0,125	<0,125	<0,125	0,5	0,25	0,5
6-34 ABI J7M2	A	VNI	213	7	1	1	5	1	1	2	0,25	0,25	<0,125	0,5	0,25	0,5
6-34 ABI J7M3	A	VNI	29	6	13	12	6	9	8	13	0,5	0,5	2	2	0,25	0,5
6-34 ABI J7M4	A	VNI	23	7	1	1	2	1	1	2	1	0,5	2	1	0,25	0,5
6-34 ABI J7M5	A	VNI	311	7	1	1	3	1	1	2	0,25	0,5	<0,125	2	0,5	0,5



**Annexe 10: Sérotypes, génotypes et valeurs des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des trois antifongiques testés pour les 24 isolats cliniques et environnementaux de *Cryptococcus*.**

	Sérotypes	Génotypes	FCZu ( $\mu\text{g/ml}$ )		5FC ( $\mu\text{g/ml}$ )		AMB ( $\mu\text{g/ml}$ )	
			48H	72H	48H	72H	48H	72H
<b>Patients</b>								
6.14	AD	VN III	<0,125	0,25	0,25	0,25	1	1
6.18	A	VN I	<0,125	0,25	0,25	0,5	0,5	1
6.25	AD	VN III	<0,125	1	0,25	2	0,5	0,5
6.28 J0	A	VN I	<0,125	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5
6.28 J7	A	VN I	0,5	0,5	0,5	2	0,25	0,5
6.33 J0	A	VN I	<0,125	<0,125	0,5	0,3	1	1
6.33 J7	AD	VN III	0,25	0,25	1	1	0,25	0,5
GNA	A	VN I	0,25	0,25	0,25	0,25	2	2
16218	A	VN I	<0,125	<0,125	0,5	0,25	0,25	0,5
25975	B	VG II	0,25	0,5	0,5	0,5	<0,03	0,5
24743	A	VN I	8	4	0,25	1	1	1
6.31	A	VN I	<0,125	<0,125	0,25	0,5	0,25	0,5
3F	A	VN I	0,5	<0,125	1	0,25	0,5	0,5
3C	A	VN I	0,25	0,25	1	0,25	0,5	0,5
6F	A	VN I	0,5	<0,125	1	0,25	0,5	1
6C	A	VN I	0,5	<0,125	1	0,25	0,5	0,5
7F	A	VN I	1	0,25	2	0,25	0,5	1
7C	A	VN I	1	0,5	2	0,25	0,5	1
8F	A	VN I	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5
8C	A	VN I	0,5	0,5	2	2	0,5	1
13	A	VN I	0,25	0,5	0,5	4	0,5	0,5
59F	A	VN I	<0,125	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5
592F	A	VN I	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,5	1
59C	A	VN I	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,5	0,5

## Annexe 11: Résumé de diffusion

La cryptococcose neuroméningée (CNM) est la seconde infection opportuniste chez les patients infectés par le VIH. Il s'agit de la 4<sup>ème</sup> cause de décès dus aux maladies infectieuses en Afrique avec une mortalité annuelle de 600.000 cas. Les levures responsables appartiennent au complexe d'espèces *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*. Notre étude décrit, l'épidémiologie et la résistance aux antifongiques de souches environnementales et cliniques de cryptocoques en Côte d'Ivoire. Les isolats sont issus d'une file active de 1750 PVVIH et de 667 prélèvements réalisés dans l'environnement proche des patients. Nous démontrons une grande diversité génotypique au sein de notre cohorte, la présence de plusieurs espèces de cryptocoques dans un seul prélèvement chez un même patient ainsi que dans des prélèvements issus de suivi de patients, ce qui n'avait jamais été démontré en Afrique de l'Ouest. Nous avons constaté que la récurrence de la CNM est due à des infections multiples par des souches différentes au cours du temps. Nos résultats décrivent également pour la première fois, l'isolement de cryptocoques à partir de fientes de pigeons à Abidjan. Et nous constatons que les génotypes des isolats environnementaux et cliniques sont très différents, ce qui exclut les fientes de pigeons comme source de contamination des patients dans notre échantillon. Enfin, la majorité des isolats est sensible aux antifongiques de référence mais un patient peut être contaminé par des isolats de sensibilité différente.

### Abstract

Cryptococcal meningitis (CM) is the second opportunistic infection in HIV infected patients. It is the fourth cause of death due to infectious diseases in Africa with an annual mortality of 600,000. The yeasts responsible belong to the *C. neoformans* / *Cryptococcus gattii* species complex. Our study describes epidemiology and resistance to antifungal of environmental and clinical strains of *Cryptococcus* in Ivory Coast. The isolates are from an active list of 1,750 patients VIH positive and 667 samples taken in the living environment of patients. We demonstrate a high genotypic diversity within our cohort and the presence of several species of *Cryptococcus* in one sample from the same patient as well as in samples from patients follow up, which had never been shown in West Africa. We found that the recurrent cryptococcosis is caused by multiple infections by different strains over time. Our results describe also, for the first time, the isolation of *Cryptococcus* from pigeon droppings from Abidjan. And we notice that, as the genotypes of environmental and clinical isolates are very different, that excludes contamination of patients by pigeon droppings. Finally, most of the isolates were susceptible to reference antifungal but a patient might be contaminated by isolates with different susceptibility.