

**UNIVERSITY OF YAOUNDE I
UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I**

**POST-GRADUATE AND TRAINING
SCHOOL OF LIFE SCIENCE-HEALTH
AND ENVIRONMENT**

**CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE SCIENCE
DE LA VIE-SANTÉ ET
ENVIRONNEMENT**



**FACULTY OF SCIENCE
FACULTÉ DES SCIENCES**

**POST-GRADUATE AND TRAINING
UNIT OF LIFE SCIENCE-HEALTH**

**UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE
SCIENCE DE LA VIE**

**DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY**

**LABORATOIRE DE PHYTOBIOCHIMIE ET D'ÉTUDE DES PLANTES MÉDICINALES
LABORATORY FOR PHYTOBIOCHEMISTRY AND MEDICINAL PLANTS STUDIES**

**UNITÉ DES AGENTS ANTIMICROBIENS ET DE BIOCONTROLE
ANTIMICROBIAL AND BIOCONTROL AGENTS UNIT**

**Diversité génétique des isolats de *Candida tropicalis*
issus des patients diabétiques et VIH positifs et étude
de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de
champignons endophytes de *Azadirachta indica* A. Juss**

Thèse rédigée et présentée en vue de l'obtention partielle du Diplôme de Doctorat /Ph.D en

Biochimie

par

DOUGUE NGUEGUIM Aude
Maître ès Sciences en Biochimie

Matricule : 17U4030

Sous la



Supervision de :

FEKAM BOYOM Fabrice

(Professeur, UYI)

Direction de :

DZOYEM Jean Paul

(Professeur, UDs)

Année académique 2023/2024

FICHE DE CERTIFICATION DE L'ORIGINALITE DU TRAVAIL

DOUGUE NGUEGUIM Aude, soussignée, atteste que la présente thèse ayant pour titre « Diversité génétique des isolats de *Candida tropicalis* issus des patients diabétiques et VIH positifs et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de champignons endophytes de *Azadirachta indica* A. Juss », est le fruit de mes travaux de recherche personnel. Ils ont été effectués dans le Laboratoire de Phytobiochimie et de l'étude des plantes médicinales, unité antimicrobienne et biocontrôle, du Département de Biochimie, de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I sous la Supervision de Pr. FEKAM BOYOM Fabrice (Professeur) et la Direction de Pr. DZOYEM Jean Paul (Professeur).

Cette thèse est authentique et n'a pas été antérieurement présentée pour l'acquisition de quelque grade universitaire que ce soit.

L'auteur

Date :

DOUGUE NGUEGUIM Aude

Superviseur

Date :


Directeur

Date :

Pr FEKAM BOYOM Fabrice

Pr DZOYEM Jean Paul

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADÉMIQUE 2022/2023
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 31 MAI 2023

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*
VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Professeur*
VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*
VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences*
Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*
Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS :
 AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (43)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11.	AZANTSA KINGUE Gabin Boris	Maître de Conférences	En poste
12.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14.	DJUUKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
15.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>

16.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
18.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
19.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
20.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
21.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
22.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
23.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

24.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
25.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
26.	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
27.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
31.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
32.	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
34.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35.	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
36.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

37.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
38.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
39.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
40.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Assistant	En Poste
41.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
42.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistant	En poste
43.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (52)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste

6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
22.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
23.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
24.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
25.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
26.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUNSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGO Indou	Chargé de Cours	En poste

41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
42.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
43.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
44.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
45.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
46.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
47.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
48.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

49.	AMBADA NDZENGUE Georgia Elna	Assistante	En poste
50.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
51.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
52.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (34)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
12	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	En poste
13	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

19.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
20.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
21.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
22.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste

23.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/ UNESCO MALI</i>
25.	Godswill NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
26.	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Chargé de Cours	En poste
27.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
28.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
29.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
30.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
31.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
32.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
33.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
34.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

1.	GHOYOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen FS Univ.Ngaoundéré</i>
6.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
15.	NEBAH Née NDOSSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
16.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
17.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
18.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
19.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
20.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
21.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste

22.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste
23.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
24.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
25.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
26.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
27.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
28.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (37)			
1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/MINESUP/ Chef de Département</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13.	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14.	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
15.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
16.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
17.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
18.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
19.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23.	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
24.	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

25	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
26	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
27	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
28	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste

30	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
34	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

36	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
37	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général/ MINESUP</i>
3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
15.	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
16.	NZEKON NZEKO'O Armel Jacques	Chargé de Cours	En poste
17.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur ENSET Ebolowa</i>
18.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

19	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	<i>Directeur CUTI</i>
22	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UII</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
17.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
19.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
20.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
21.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
22.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
23.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
24.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
25.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
26.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste

27.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
30.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
31.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste

32.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste
33.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
4.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
5.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
10.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
11.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
12.	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
13.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste
14.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
15.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
16.	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
17.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

18.	NKOUÉ TONG Abraham	Assistant	En poste
19.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistant	En poste
20.	EZO'O MENGO Fabrice Téléstor	Assistant	En poste
21.	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23.	NGOUE NAM Romial Joël	Assistant	En poste
24.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOUDA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	HONA Jacques	Professeur	En poste
6.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
9.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16.	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18.	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19.	EYEBE FOUDA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>
30.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférence	<i>En stage depuis février 2023</i>
31.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
32.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
33.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste

34.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
35.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
36.	FOUEJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
37.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
38.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	<i>Directeur Unité de production des réactifs /IMPM</i>
40.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
43.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA /UDs</i>
2.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
7.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
8.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

9.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
11.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
12.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. d'Etat/MINMIDT</i>
14.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
15.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i>
16.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste
17.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
19.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
20.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
21.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste

22.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
23.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
25.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

26.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
27.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29.	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
31.	MBESSE Cécile Olive	Chargée de Cours	En poste
32.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef Serv./Uté Maroua</i>
34.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
37.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
40.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

41.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
43.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	de Chargés de Cours	de Assistants	Total
BCH	8 (01)	15 (11)	13 (03)	7 (05)	43 (20)
BPA	14 (01)	16 (09)	18 (04)	4 (02)	52 (16)
BPV	6 (01)	12 (02)	13 (07)	3 (00)	34 (10)
CI	7 (01)	15 (04)	5 (01)	1 (00)	28 (06)
CO	6 (01)	18 (04)	11 (04)	2 (00)	37 (09)
IN	2 (00)	2 (00)	14 (01)	4 (00)	22 (01)
MAT	1 (00)	8 (00)	17 (01)	7 (02)	33 (03)
MIB	2 (01)	7 (03)	8 (04)	7 (02)	24 (10)
PHY	15 (01)	15 (04)	11 (01)	2 (00)	43 (06)
ST	8 (00)	17 (03)	15 (04)	3 (01)	43 (08)
Total	69 (07)	125 (40)	125 (30)	40 (12)	359 (89)

Soit un total de	359 (89) dont :
- Professeurs	69 (07)
- Maîtres de Conférences	125 (40)
- Chargés de Cours	125 (30)
- Assistants	40 (12)

() = Nombre de Femmes

89

DÉDICACE

Je dédie ce travail à mes parents *Dorice* et *Paul DOUGUE*

et

à mon très chère et tendre épouse **FOUODZING Stéphane Arnaud**

REMERCIEMENTS

Rien ne saurait être réalisé sans la main protectrice de l'Éternel Dieu tout puissant que je remercie pour m'avoir donné la force et surtout la santé tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier :

Le **Pr. FEKAM BOYOM Fabrice**, un père qui m'a accueillie dans son équipe de recherche (Laboratoire de Phytobiochimie et de l'étude des plantes médicinales, unité antimicrobienne et biocontrôle, du Département de Biochimie, de Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I) faisant le pari de l'innovation et de la valorisation de notre richesse végétale et traditionnelle. Vos suggestions, conseils et rigueur scientifique ont marqué ce travail, ainsi en témoignage de ma profonde gratitude. Veuillez trouver en ce travail la manifestation de mon plus profond respect et de ma vive reconnaissance.

Le **Pr. DZOYEM Jean Paul**, vous avez été à l'origine de ce projet de thèse. Votre disponibilité, votre générosité, votre accompagnement, et vos précieux conseils ont contribué à l'accomplissement de ce travail. Veuillez trouver à travers ces mots toute ma gratitude.

Le **Dr. NGOUANA Thierry**, vous avez accueilli à bras ouvert ce projet et vous n'avez ménagé aucun effort pour que celui-ci soit réalisé. Votre savoir-faire, votre expertise, votre disponibilité ont significativement contribué à la réalisation de ce travail. Vous m'avez tenu par la main et sans cesse vous m'avez encouragé et incité à l'excellence. Merci pour tout.

Le Chef de Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I, **Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul** et tous les enseignants pour la qualité des enseignements reçus, du suivi et des conseils.

Le **Dr. TOGHUEO Rufin**, votre soutien, votre disponibilité permanente et votre aide ont été nécessaires à la réalisation de ce travail. Vous avez constamment continué à m'assister dans l'accomplissement de ce travail. Merci

Le **Pr. ORAZIO Roméo** et toute son équipe de travail de l'Université de Messina en Italie sans qui la réalisation d'une partie de ce travail ne serait pas effective.

Le **Dr. SEREPA-DLAMINI Mahloro Hope** et le **Pr. NJOBEBH Patrick** qui m'ont chaleureusement accueilli dans leurs laboratoires de l'Université de Johannesburg et dont la fourniture matérielle m'a permis d'effectuer une partie de ce travail de recherche.

Ma profonde obligeance s'adresse à l'endroit de l'ensemble des docteurs qui m'ont permis de circonscrire le champ de l'étude menée notamment aux Docteurs : **TSOUH Valère**, **HZOUNDA Jean-Baptiste**, **ZEUKO'O Elisabeth**, **EKE Pierre**, **SAMA Léonard**, **NGO MBACK Nina**, **MAJOUMOUO Stella** et **NGUEMNANG Christère** qui ont toujours

accordé une attention particulière à mes doléances, partagé leurs expériences au cours d'échanges édifiants et fourni de précieuses données. Toute ma reconnaissance.

J'exprime par ailleurs mes obligations aux directeurs de l'Hôpital Régional de Bafoussam (HRB) et de l'Hôpital Central de Yaoundé (HCY), le responsable de laboratoire, les responsables de l'UPEC (Unité de Prise En Charge), les responsables des services de diabétologie et l'ensemble du personnel ; Merci pour votre hospitalité, votre soutien et votre grande disponibilité.

Je remercie :

Le **Laboratoire SION** et tout son personnel pour leur accueil et leur bonne humeur quotidienne dans le service.

Tous mes aînés, promotionnaires et cadets du laboratoire pour leurs contributions et leurs conseils qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Ma sœur **DOUGUE Nelly**, mes frères **DOUGUE Aubin**, **DOUGUE Roméo**, **DOUGUE Berthollet**, **DOUGUE Fredy**, **DOUGUE Svensson** et ma fille **MONOSANA DOUGUE Anne Valérie** pour le soutien remarquable dont vous m'avez toujours fait grâce et les encouragements afin que la réalisation de ce travail puisse être effective.

Mme **TSAGUE Sidonie**, Mr **SAPTCHI Romeo**, Mr et Mme **NOUZA**, Mme **MONOSANA Fernande**, Mr **NGUEKENG Rémi** et Mr **WATI** pour le soutien remarquable dont vous avez sans cesse effectué.

Tous mes ami(e)s et collaborateurs en particulier Dr **NANGWAT Claude**, Mme **DIZE Darline**, Dr **DIESSE Joel**, Dr **TCHUENGUEM Roland**, Mr **KOUNTCHOU Cyrille**, Dr **EKPO Alfred**, Dr **TSAMO Léonel**, Mr **DJOUMESSI Roméo**, Dr **DJUISSI Nadège**, Mme **DZEZA Joséline** pour l'assistance, les encouragements et le soutien.

Je suis également reconnaissante pour la participation de la population incluse dans cette étude, ainsi que les Médecins, Infirmiers, Techniciens Médicaux Sanitaires et les Assistants psychosociaux.

Enfin à tous ceux dont les noms n'ont pas été cités et qui auraient contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, acceptez ici l'expression de ma profonde gratitude.

TABLE DES MATIERES

FICHE DE CERTIFICATION DE L'ORIGINALITE DU TRAVAIL.....	i
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	ii
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	ii
DEDICACES	xv
REMERCIEMENTS	xvi
RESUME.....	xxiii
ABSTRACT	xxv
LISTE DES ABREVIATIONS	xxvii
LISTE DES FIGURES	xxix
LISTE DES TABLEAUX.....	xxxi
LISTE DES PHOTOGRAPHIES.....	xxxi
INTRODUCTION.....	1
I. Revue de la littérature	4
I.1. Quelques pathologies immunodépressives prédisposant aux infections opportunistes	4
I.1.1. Infection à VIH.....	4
I.1.1.1. Epidémiologie de l'infection à VIH	4
I.1.1.2. Manifestations cliniques de l'infection à VIH.....	4
I.1.1.3. Infection au VIH et système immunitaire.....	5
I.1.1.4. Infections opportunistes à <i>Candida</i> liées au VIH	6
I.1.2. Diabète sucré	6
I.1.2.1. Epidémiologie du diabète sucré.....	6
I.1.2.2. Différents types de diabète sucré.....	7
I.1.2.3. Diabète et système immunitaire.....	7
I.1.2.4. Infections opportunistes liées au diabète	8
I.2. Infections à <i>Candida</i>	8
I.2.1. Généralités sur les candidoses	8
I.2.1.1. Aspects cliniques des candidoses cutanéomuqueuses.....	8

I.2.1.2. Les différents mécanismes de défense de l'hôte contre les levures du genre <i>Candida</i>	12
I.2.2. Généralités sur le genre <i>Candida</i>	13
I.2.2.1. <i>Candida tropicalis</i>	13
I.3. Diagnostic biologique des candidoses muqueuses et identification de <i>C. tropicalis</i>	16
I.3.1. Prélèvement du produit biologique	16
I.3.2. Culture sur milieu spécifique	16
I.3.3. Identification de <i>Candida tropicalis</i>	16
I.3.3.1. Identification grâce aux milieux chromogéniques.....	16
I.3.3.2. Identification au MALDI/ToF	17
I.3.3.3. Identification génétique de <i>Candida tropicalis</i>	19
I.4. Epidémiologie moléculaire de <i>Candida tropicalis</i>	20
I.4.1. Différentes techniques du génotypage de <i>Candida tropicalis</i>	20
I.4.2. Les gènes de ménages	24
I.4.3. Génome de <i>Candida tropicalis</i>	26
I.4.4. Carte génotypique mondiale actuelle de <i>Candida tropicalis</i>	26
I.5. Facteurs de virulence chez <i>Candida tropicalis</i>	27
I.5.1. Généralités.....	27
I.5.2. Les biofilms.....	28
I.5.2.1. Morphologie et architecture du biofilm de <i>Candida tropicalis</i>	28
I.5.2.2. Processus de développement du biofilm chez <i>Candida tropicalis</i>	28
I.6. Traitement des infections à <i>Candida tropicalis</i> et résistance au traitement	30
I.6.1. Traitement des infections à <i>Candida tropicalis</i>	30
I.6.1.1 Les polyènes	30
I.6.1.2. Les azolés	31
I.6.1.3. Les échinocandines	33
I.6.1.4. Les pyrimidines	34
I.6.1.5 Les allylamines	35
I.6.2. Résistance de <i>Candida tropicalis</i> aux antifongiques	36
I.6.2.1. Définition du concept de la résistance	36

I.6.2.2. Différents mécanismes de résistances développés par <i>Candida tropicalis</i>	36
I.6.2.3. Détection des résistances : Détermination <i>in vitro</i> de la sensibilité aux antifongiques.....	39
I.6.2.4. Prévalence des résistances chez <i>Candida tropicalis</i>	41
I.7. Extraits de champignons endophytes de <i>Azadirachta indica</i> comme alternative aux antifongiques usuels	42
I.7.1. Généralités sur les champignons endophytes.....	42
I.7.2. Transmission des champignons endophytes	43
I.7.3. Interaction champignons endophytes-plantes hôtes	43
I.7.4. Métabolites secondaires isolés des champignons endophytes	44
I.7.5. Généralités sur <i>Azadirachta indica</i>	44
I.7.5.1. Description botanique.....	44
I.7.5.2. Usage ethno-pharmacologique de <i>Azadirachta indica</i>	45
I.7.5.3. Champignons endophytes chez <i>Azadirachta indica</i>	46
I.8. Travaux antérieurs	47
II. Matériels et Méthodes	48
II.1. Matériels	48
II.1.1. Cadre d'étude	48
II.1.2. Population d'étude.....	48
II.1.3. Échantillons biologiques	48
II.2. Méthodes	48
II.2.1. Étude de l'épidémiologie descriptive et moléculaire de <i>Candida tropicalis</i>	48
II.2.1.1. Conception de l'étude.....	48
II.2.1.2. Prélèvement, culture des échantillons biologiques et identification de <i>C. tropicalis</i>	50
II.2.1.3. Étude de la diversité génétique de <i>Candida tropicalis</i>	53
II.2.1.4. Typage moléculaire des isolats de <i>Candida tropicalis</i>	55
II.2.1.5. Analyse phylogénétique et structure de la population	57
II.2.2. Étude de la sensibilité de <i>Candida tropicalis</i> aux antifongiques usuels et formation de biofilm.....	58
II.2.2.1. Évaluation de la sensibilité aux antifongiques usuels	58

II.2.2.2. Évaluation de la capacité de <i>Candida tropicalis</i> à former le biofilm.....	59
II.2.3. Étude de la sensibilité de <i>Candida</i> aux extraits de champignons endophytes de <i>Azadirachta indica</i>	60
II.2.3.1. Isolement et identification des champignons endophytes de <i>Azadirachta indica</i>	60
II.2.3.2. Détermination de l'activité antifongique des extraits bruts à l'acétate d'éthyle .	62
II.2.3.3. Fractionnement de l'extrait d'intérêt.....	64
II.2.3.4. Étude du mode d'action de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle sur la souche <i>Candida tropicalis</i> CTCMR15S.	65
II.2.3.6. Analyse phytochimique de l'extrait brut.....	67
II.2.4. Analyses statistiques	67
III. Résultats et discussion.....	68
III.1. Résultats	68
III.1.1. Épidémiologie descriptive et moléculaire de <i>Candida tropicalis</i>	68
III.1.1.1. Caractéristique générale de la population	68
III.1.1.2. Répartition des <i>Candida</i> isolées par site de prélèvement, par type de patients et par type d'échantillon biologique	69
III.1.1.3. Répartition des isolats de <i>C. tropicalis</i> après confirmation au MALDI/ToF.....	71
III.1.1.4. Répartition des souches de <i>Candida tropicalis</i> par la MLST	73
III.1.1.5. Description des DST en fonction des sites de prélèvements, des types de patients et des types échantillons biologiques	76
III.1.1.6. Polymorphisme du nucléotide unique.....	76
III.1.1.7. Structure de la population des DSTs de <i>Candida tropicalis</i>	79
III.1.2. Profil de sensibilité des isolats de <i>Candida tropicalis</i> aux antifongiques usuels et formation de biofilm.....	81
III.1.2.1. Profil de résistance des isolats en fonction du type d'échantillon biologique ...	81
III.1.2.2. Profil de résistance des isolats en fonction du type de patient et du lieu de prélèvement ainsi qu'en fonction des isolats provenant des sites biologiques différents chez un même patient.....	84
III.1.2.3. Relation entre complexes clonaux et résistance aux antifongiques	86
III.1.2.4. Volume du biofilm de <i>Candida tropicalis</i> formé	86
III.1.2.5. Relation entre les isolats formateurs de biofilms de façon significative et la résistance aux antifongiques ainsi que les génotypes MLST.....	87
III.1.2.6. Structure du biofilm de <i>Candida tropicalis</i> au microscope électronique à balayage	87

III.1.3. Étude de la sensibilité de <i>Candida</i> aux extraits de champignons endophytes de <i>Azadirachta indica</i>	88
III.1.3.1 Champignons endophytes isolés de <i>Azadirachta indica</i>	88
III.1.3.2 Activité antifongique préliminaires des extraits bruts à l'acétate d'éthyle des champignons endophytes à 500 µg/mL	89
III.1.3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits sélectionnés	90
III.1.3.4. Identification du champignon endophyte d'intérêt	91
III.1.3.5. Fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle A/bf11	92
III.1.3.6. Étude de quelques modes d'action de l'extrait à l'acétate d'éthyle A/bf11 sur <i>C. tropicalis</i> CTCMR15S	93
III.1.3.7. Inhibition de la formation du biofilm de <i>Candida tropicalis</i> CTCMR15S.....	94
III.1.3.8. Analyse GC-MS de l'extrait brut de l'acétate d'éthyle A/bf11	95
III.2 Discussion	100
CONCLUSION	111
PERSPECTIVES.....	112
RÉFÉRENCES.....	113
ANNEXES	a

RÉSUMÉ

Candida tropicalis est une levure pathogène couramment isolée chez les Hommes particulièrement les immunodéprimés tels que les patients VIH positifs et diabétiques. Le traitement des candidoses à *C. tropicalis* inclut des antifongiques qui ont soit des niveaux de toxicité élevés ou qui deviennent de plus en plus inactifs. Une alternative consiste en l'exploitation des métabolites secondaires de champignons endophytes comme antifongiques contre *C. tropicalis*, associée à l'étude de sa diversité génétique qui pourrait permettre de comprendre comment ce pathogène se propage et résiste aux antifongiques. La présente étude a été entreprise afin de déterminer la diversité génétique des isolats de *C. tropicalis* chez les patients VIH+ et les diabétiques au Cameroun et étudier leur profil de sensibilité aux antifongiques usuels et aux métabolites secondaires de champignons endophytes isolés de *Azadirachta indica*. Sur le terrain, les isolats de *C. tropicalis* ont été identifiés à partir des échantillons de selles, urines, prélèvements vaginaux et buccaux chez des personnes vivants avec le VIH (PVVIH) et des patients diabétiques de l'Hôpital Central de Yaoundé (HCY) et de l'Hôpital Régional de Bafoussam (HRB). Ces isolats ont été séquencés par la technique de typage de séquence multilocus ; puis, leur sensibilité *in vitro* à divers antifongiques usuels a été effectuée afin d'évaluer si certains génotypes étaient associés à la résistance aux médicaments ainsi que leurs capacités à former le biofilm. Pour pallier au problème de résistance de *C. tropicalis*, l'activité antifongique des extraits de champignons endophytes de *A. indica* a été évaluée par la méthode de microdilution en milieu liquide sur *C. tropicalis* CTCMR15S ainsi que le fractionnement et l'identification des composés présents dans l'extrait d'intérêt. Les résultats ont montré que sur les 2 657 échantillons biologiques collectés, 626 avaient une culture positive à *Candida*, et 26 *C. tropicalis* ont été identifiés soit un pourcentage de 5,1%. Le typage moléculaire de ces isolats de *C. tropicalis* a permis d'identifier 16 génotypes DST (*Diploid Sequence Type*) avec 14 (87,5%) nouveaux. Il n'existait aucune relation entre ces différents génotypes et le type d'échantillon biologique collecté. Sur les 2 677 nucléotides analysés, 38 allèles (avec 4 nouveaux allèles), 42 (1,5%) sites polymorphes et 50 cas de perte d'hétérozygoties ont été détectés. L'analyse eBURST a révélé la présence de 5 complexes clonaux (CC) avec les CC 63 et CC 64 abondant. Les isolats des CC 7 et CC 63 ont tous été résistants au fluconazole et ont formé de façon significative les biofilms. Pour ce qui est de l'activité antifongique des extraits de champignons endophytes de *A. indica*, les résultats obtenus ont donné de constater que, des

129 champignons endophytes isolés, 13 ont présenté une activité sur l'isolat de *C. tropicalis* testé avec des CMI allant de 125 à 500 µg/mL. L'extrait provenant des brindilles de fleur de *A. indica* (A/Bfl11) identifié comme *Aspergillus niger* était le plus actif avec une CMI de 125 µg/mL. Son action antifongique sur *C. tropicalis* serait pariétale ou membranaire avec une capacité d'inhiber la formation de biofilm aux doses dépendantes. Par ailleurs, le fractionnement a permis d'obtenir 6 fractions faiblement actives et l'analyse GC-MS de l'extrait d'intérêt (A/Bfl 11) a permis la détection de 118 composés avec comme composés majoritaires l'acide acétique, trifluoro-, ester éthylique (6,85%), le 3-butyn-2-ol, 2-méthyl- (3,25%) et l'acide pentanoïque (2,43%). Globalement, cette étude a permis de montrer une variabilité génétique entre les isolats de *C. tropicalis* sans une quelconque association avec le site de prélèvement ou le type de patient mais avec certains complex clonaux tendant à être résistants au fluconazole. Elle a en plus apporté une voie prometteuse dans le développement d'une thérapie alternative à base d'extraits de champignons endophytes afin d'améliorer la prise en charge des infections à *Candida*.

Mots clés : *Candida tropicalis*, *Multilocus sequence typing* (MLST), diversité génétique, Champignons endophytes, *Azadirachta indica*, activités antifongiques.

ABSTRACT

Candida tropicalis is a pathogenic yeast commonly isolated from human, particularly immunocompromised patients such as HIV-positive and diabetic patients. Treatment of *C. tropicalis* includes antifungal agents that either have high levels of toxicity or are becoming increasingly inactive. An alternative is to exploit the secondary metabolites of endophytic fungi as antifungal agents against *C. tropicalis*, combined with the study of its genetic diversity, which could help to understand how this pathogen spreads and becomes resistant to antifungal agents. The present study was undertaken to determine the genetic diversity of *C. tropicalis* isolates in HIV+ patients and diabetics in Cameroon and to study their sensitivity profile to the usual antifungal agents and to the secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica*. In the field, *C. tropicalis* were identified from stool, urine, vaginal and buccal samples from people living with HIV (PLHIV) and diabetic patients at the Yaoundé Central Hospital (HCY) and the Bafoussam Regional Hospital (HRB). These isolates were sequenced using the multilocus sequence typing technique; their in vitro susceptibility to various standard antifungal agents was then assessed in order to determine whether certain genotypes were associated with drug resistance, as well as their ability to form biofilms. To overcome the problem of resistance of *C. tropicalis* infections, the antifungal activity of extracts of endophytic fungi from *A. indica* was assessed using the liquid microdilution method on *C. tropicalis* CTCMR15S, as well as fractionation and identification of the compounds present in the extract of interest. The results showed that from the 2 657 biological samples collected, 626 had a positive culture, and 26 *C. tropicalis* were identified, representing a percentage of 5.1%. Molecular typing of these *C. tropicalis* isolates identified 16 DST (Diploid Sequence Type) genotypes with 14 (87.5%) new. There was no relationship between these different genotypes and the type of biological sample collected. Of the 2 677 nucleotides analysed, 38 alleles (with 4 new alleles), 42 (1.5%) polymorphic sites and 50 cases of loss of heterozygosity were detected. eBURST analysis revealed the presence of 5 clonal complexes (CC) with abundant CC 63 and CC 64. Isolates of CC 7 and CC 63 were all resistant to fluconazole and significantly formed biofilms. With regard to the antifungal activity of endophytic fungi extracts from *A. indica*, the results obtained showed that, of the 129 endophytic fungi isolated, 13 exhibited activity on *C. tropicalis* isolate tested with MICs ranging from 125 to 500 µg/mL. The extract from *A. indica* twigs flower (A/bf11) identified as *Aspergillus niger* was the most active with an MIC of 125 µg/mL. Its antifungal action is thought to be parietal or membranous, with the ability to inhibit biofilm formation at

dose-dependent levels. Fractionation yielded 6 weakly active fractions, and GC-MS analysis of the extract of interest (AIBfl 11) resulted in the detection of 118 compounds, with acetic acid, trifluoro-, ethyl ester (6.85%), 3-butyn-2-ol, 2-methyl- (3.25%) and pentanoic acid (2.43%) as the main compounds. Overall, this study showed genetic variability between *C. tropicalis* isolates without any association with the sampling site or patient type, but with certain clonal complexes tending to be resistant to fluconazole. It has also provided a promising avenue for the development of an alternative therapy based on extracts of endophytic fungi to improve the management of *Candida* infections.

Keywords: *Candida tropicalis*, genetic diversity, Multilocus Sequence Typing (MLST), endophytic fungi, *Azadirachta indica*, antifungals activities.

LISTE DES ABBREVIATIONS

A. I	<i>Azadirachta indica</i>
ABC	<i>ATP Binding Cassettes</i>
AmB	Amphotéricine B
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C. tropicalis	<i>Candida tropicalis</i>
CC	Complex Clonal
CNA	<i>Candida non albicans</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COVID-19	<i>Corona Virus Disease 19</i>
CBP	<i>Clinical Breakpoint</i>
CVV	Candidose vulvovaginale
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECV	<i>Epidemiological Cut Off</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
DST	<i>Diploïde Sequence Type</i>
FID	Fédération Internationale du Diabète
GC-MS	<i>Gaz Chromatography/ Mass Spectrometry</i>
CHCA	<i>alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid</i>
CTCMR	<i>Candida tropicalis</i> Cameroun
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HCY	Hôpital Central de Yaoundé
HRF	Hôpital Régional de Bafoussam
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MALDI/ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/ Time-Of-Flight</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>

MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PVC	polyvinyle de chlorure
RAT	Riz-Agar-Tween
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SNP	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i>
UFC/mL	Unités Formant Colonies par millilitre
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VMA	<i>Vacuolar Molecular ATPase</i>
VITEK	<i>Value, Integrity, Teamwork, Excellent and Knowledge</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de la candidose oro-pharyngée.....	10
Figure 2 : Représentation de la candidose gastro-intestinale.	10
Figure 3 : Représentation de la candidose vulvo-vaginale.....	11
Figure 4 : Représentation de la balanite candidosique.....	12
Figure 5 : Structure cellulaire.....	15
Figure 6 : Aspect des colonies de <i>C. tropicalis</i> sur Candida ID® 2 après 48 heures de culture à 37°C.....	17
Figure 7 : Apparences des colonies de <i>C. tropicalis</i> sur CHROMagar® Candida après 48 heures d'incubation.	17
Figure 8 : Principe du système de la spectrométrie de masse MALDI-TOF	18
Figure 9 : Représentation schématique des ITS.	20
Figure 10 : Source des isolats de <i>Candida tropicalis</i> soumis à la base de données avant la présente étude.....	27
Figure 11 : Développement du biofilm de <i>Candida</i> à une surface.....	30
Figure 12: Structures des polyènes.....	31
Figure 13 : Structures des imidazolés.....	32
Figure 14 : Structures des triazolés de première génération	32
Figure 15 : Structures des échinocandines selon Denning.....	34
Figure 16 : Structure de la 5-Fluorocytosine.....	34
Figure 17 : Structures des allylamines	35
Figure 18 : Mécanismes cellulaires de résistance aux antifongiques	37
Figure 19 : Différentes techniques de détermination <i>in vitro</i> de la sensibilité d'antifongique ;	39
Figure 20 : Les étapes de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	53
Figure 21 : Fractionnement de l'extrait d'intérêt A/bfl 11.	64
Figure 22 : DST regroupés en complexes clonaux (CC) grâce à l'analyse BURST.....	79
Figure 23 : Dendrogramme montrant la relation entre les souches de <i>C. tropicalis</i>	80
Figure 24 : Pourcentages de sensibilité des isolats de <i>C. tropicalis</i> testés en fonction de chaque antifongique.	81
Figure 25 : Aptitude des isolats de <i>C. tropicalis</i> à former le biofilm après 48h.	86
Figure 26 : structure du biofilm de <i>C. tropicalis</i> CTCMR15S observé au microscope électronique à balayage après 48 h de culture sur du <i>yeast nitrogen base</i>	88
Figure 27 : Spectre de masse de <i>Aspergillus niger</i>	92

Figure 28 : Cinétique de mortalité de *C. tropicalis* CTCMR15S en présence de l'extrait brut à la CMI. 94

Figure 29 : Concentration dépendant de l'inhibition de la formation du biofilm. 95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Différentes techniques de détermination <i>in vitro</i> de la sensibilité d'antifongique..	39
Tableau II: <i>C. tropicalis</i> clinical breakpoints et epidemiological cutoff values de certains antifongiques.	41
Tableau III: Liste des fragments de gènes et détails des amorces pour la MLST de <i>C. tropicalis</i>	56
Tableau IV: Antifongiques utilisés et dilutions des plaques Sensititre Yeast One.....	59
Tableau V: Répartition de la population d'étude.....	68
Tableau VI: Fréquence des levures isolées par site de prélèvements, par type de patients et par type d'échantillon biologique.....	70
Tableau VII: Répartition de <i>C. tropicalis</i> après identification au MALDI/ToF en fonction du site de prélèvement.....	72
Tableau VIII: Liste des isolats de <i>Candida tropicalis</i> avec leurs profils alléliques et leurs DST générés par l'analyse MLST.....	74
Tableau IX: Caractéristiques des 6 fragments de gènes utilisés dans cette étude.....	78
Tableau X: Profil de résistance des isolats de <i>C. tropicalis</i> en fonction du type d'échantillon biologique.....	83
Tableau XI: Profil de résistance des isolats provenant des sites différents chez un même patient.....	84
Tableau XII: Fréquence de colonisation des différents organes de <i>A. indica</i> par les champignons endophytes.	88
Tableau XIII: Rendement d'extraction des champignons endophytes.....	89
Tableau XIV: Répartition des extraits bruts à l'acétate d'éthyle des champignons endophytes en fonction de l'origine de la plante.	90
Tableau XV: CMI des extraits de champignons endophytes en $\mu\text{g/mL}$ ayant montré une activité à 500 $\mu\text{g/mL}$	91
Tableau XVI: Concentrations minimales inhibitrices des fractions.....	93
Tableau XVII: CMI ($\mu\text{g/mL}$) de l'extrait brut en présence de l'ergostérol et du sorbitol.....	94
Tableau XVIII: Métabolites identifiés par GC-MS dans l'extrait brut d'acétate d'éthyle de <i>A/bf11</i>	96

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Morphologie de <i>Candida tropicalis</i>	15
Photographie 2 : <i>Azadirachta indica</i>	45
Photographie 3 : Photographie de <i>C. tropicalis</i> sur le milieu CHROMagar Candida	51

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La prévention de la menace des maladies infectieuses et non infectieuses a toujours été l'objectif principal de plusieurs Organisations sanitaires internationales, mais l'épidémie du VIH et plus récemment la pandémie de la COVID 19 ont mis en évidence d'importants problèmes de surveillance épidémiologique, ainsi que des faiblesses dans divers systèmes de santé publique à travers le monde (**Dancer, 2020**). Il en est de même pour les cas de maladies non infectieuses telles que le diabète dont la prévalence va grandissante. En effet, le VIH et le diabète ont façonné les comportements humains, de part leurs complexités et surtout les infections opportunistes qui les accompagnent le plus souvent (**Adalja et al., 2019**). Parmi ces infections opportunistes, les candidoses contribuent substantiellement à la charge totale des infections fongiques, comme le démontrent les plus de 750 000 cas signalés chaque année dans le monde avec plus de 280 000 cas de décès (**Bongomin et al., 2017 ; Falces-Romero et al., 2021**). Ceci représente une préoccupation croissante compte tenu du taux de mortalité global élevé (41-61%) (**O'Brien et al., 2021**). Cette forte mortalité est due à l'accroissement des patients présentant une faible fonction immunitaire (notamment les patients infectés par le VIH et les patients diabétiques) (**ANOFEL, 2014**). A cet effet, environ 80% des personnes vivants avec le VIH (PVVIH) développent des candidoses. Bien que ces infections aient diminué chez les PVVIH depuis l'introduction de la trithérapie antirétrovirale, l'infection à VIH reste l'un des principaux facteurs prédisposant aux candidoses cutanéomuqueuses avec un taux de mortalité de 10 à 20% (**Shivaswamy et Neelambike, 2014**). Le diabète mal équilibré quant à lui, augmente le risque de survenue et de propagation des candidoses avec une prévalence pouvant aller jusqu'à 70% (**Usha et al., 2017**).

Parmi les différentes espèces de *Candida* impliquées dans ces candidoses, plus de 95% des infections sont attribuables à cinq espèces (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*) dont *C. albicans* demeure la plus incriminée (**Pappas et al., 2018**). Néanmoins, les espèces de *Candida non albicans* (CNA) sont de plus en plus isolées avec des incidences qui peuvent même dépasser celles de *C. albicans* dans certaines régions géographiques et/ou dans certains échantillons biologiques (**Chakrabarti et al., 2015 ; Megri et al., 2020 ; Tabei et al., 2019**). Parmi ces espèces de CNA, *C. tropicalis* a émergé, est devenue potentiellement importante avec une prévalence qui est en constance augmentation depuis 1960. Depuis lors, elle est considérée comme une importante cause de candidose dans certaines régions géographiques comme l'Asie de l'Est (17,6%), l'Inde (3- 66%) et l'Amérique latine (22%) (**Xiao et al., 2018 ; Liu et al., 2020**). En Afrique du Nord, plus précisément en

Egypte et en Tunisie, *C. tropicalis* est la principale cause de candidoses invasives et représente respectivement 37,7% et 17% (Sellami *et al.*, 2011 ; Ghazi *et al.*, 2019). La prévalence de cette espèce isolée en Afrique Subsaharienne semble suivre la même tendance. En effet, au Cameroun, *C. tropicalis* est considérée entre la 2^{ème} et la 4^{ème} espèce la plus répandue (Africa et Abrantes, 2017). La gravité de cette pathologie va des infections superficielles aux infections invasives mettant en jeu le pronostic vital et entraînant une morbidité et une mortalité considérables, en particulier chez les patients immunodéprimés avec un taux de survie les plus bas de l'ordre de 90 jours (Pfaller *et al.*, 2012 ; Al-Obaid *et al.*, 2017).

La résistance de plus en plus croissante de *C. tropicalis* aux antifongiques couramment utilisés a facilité l'émergence de cette espèce qui aujourd'hui est un sérieux problème. Plusieurs études récentes ont montré l'augmentation du taux de résistance de *C. tropicalis* allant de <2% en 2000 à 16,7% une décennie plus tard (Keighley *et al.*, 2022). De plus, sa pathogénicité est facilitée par l'expression de facteurs de virulence, y compris la formation de biofilm. La capacité de *C. tropicalis* à former des biofilms a des implications cliniques importantes en raison de leur capacité à résister aux défenses de l'hôte ainsi que leur résistance accrue aux traitements antifongiques. En outre, des études des mécanismes moléculaires portant sur la variabilité du génome de la souche de *C. tropicalis* pourraient également sous-tendre ce phénomène surtout que les données sur la diversité génétique de cette espèce sont manquantes au Cameroun. Ainsi, le typage moléculaire des souches de cette espèce est important pour surveiller le maintien, le remplacement et la micro-évolution des souches au sein des hôtes humains en utilisant la technique de typage des séquences multilocus (MLST) (Tavanti *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2017). Toutefois, ces données imposent aujourd'hui de mettre en place un programme de surveillance épidémiologique permanent. D'autant plus que, la structure génétique de *C. tropicalis* ainsi que la potentielle association entre ses différents génotypes et la résistance antifongique, le type d'échantillon biologique, ou les emplacements géographiques en Afrique et particulièrement au Cameroun demeurent limités voire inexistantes. Il est donc important de disposer d'informations sur ces données afin d'optimiser la prise en charge.

Les médicaments antifongiques ayant montré des limites liées au développement de la résistance antimicrobienne et à l'existence des effets secondaires indésirables, il est donc nécessaire de se pencher sur la recherche de nouvelles substances naturelles bioactives comme alternative pour une meilleure prise en charge de ces infections à *C. tropicalis* (Ensieh *et al.*, 2016 ; Jasim *et al.*, 2016). A cet effet, les métabolites secondaires d'origine

microbienne particulièrement ceux produits par les champignons endophytes des végétaux constitueraient une alternative prometteuse (Ana *et al.*, 2018). En effet, de nombreuses études ont montré que les métabolites de structures particulières, synthétisés par les endophytes, sont doués de diverses activités biologiques parmi lesquelles l'activité antifongique (Strobel et Daisy, 2003). Ainsi, *Azadirachta indica* appartenant à la famille des meliaceae plus connu sous le nom de *Neem*, est une plante médicinale utilisée par environ 80% de la population des pays en développement pour le traitement de nombreuses pathologies telles que les candidoses. Elle abriterait des champignons endophytes capables de synthétiser des substances à activité antifongique (Eyob *et al.*, 2018) qui représenteraient une opportunité pour le développement de médicaments contre les infections fongiques.

Au regard de ces données susmentionnées, deux principales questions de recherche ont été dégagées. A savoir :

➤ Existerait-il une variabilité génétique des isolats de *C. tropicalis* associée à la résistance aux antifongiques ?

➤ Les extraits de champignons endophytes de *A. indica* possèdent-ils des métabolites secondaires pouvant constituer une alternative dans la prise en charge des infections à *C. tropicalis* ?

Pour répondre à ces questions, les hypothèses suivantes ont été émises :

❖ Il existe une variabilité génétique des isolats de *C. tropicalis* associée à une différence de profils de sensibilité aux antifongiques usuels ;

❖ *Azadirachta indica* utilisée traditionnellement dans le traitement de nombreuses infections héberge des champignons endophytes pouvant produire des métabolites à activité antifongique.

Afin de vérifier les différentes hypothèses de recherche mentionnées, cette étude s'est donc proposée pour objectif général de déterminer la diversité génétique des isolats de *C. tropicalis* chez les patients VIH+ et les diabétiques au Cameroun et étudier leur profil de sensibilité aux antifongiques usuels et aux métabolites secondaires de champignons endophytes isolés de *Azadirachta indica*.

Pour atteindre cet objectif, il était question pour nous de :

1. Déterminer l'épidémiologie descriptive et moléculaire des espèces de *C. tropicalis* ;
2. Étudier leur sensibilité aux antifongiques usuels et leurs capacités à former le biofilm ;
3. Évaluer l'activité antifongique des extraits de champignons endophytes de *Azadirachta indica* contre *C. tropicalis*.

CHAPITRE I
REVUE DE LA LITTÉRATURE

I. Revue de la littérature

I.1. Quelques pathologies immunodépressives prédisposant aux infections opportunistes

Les pathologies immunodépressives sont des maladies qui affectent le système immunitaire en diminuant la capacité de l'organisme de se défendre face à des corps étrangers. On peut en citer une panoplie de maladies parmi lesquelles, des maladies infectieuses dont l'infection à VIH ou non infectieuses comme le diabète.

I.1.1. Infection à VIH

I.1.1.1. Épidémiologie de l'infection à VIH

En 2020, le monde comptait 37,7 millions de personnes vivant avec le VIH, dont 1,7 millions d'enfants de moins de 14 ans et 36,0 millions d'adultes ; dont 53% de l'ensemble étaient des femmes et des filles. L'Afrique Centrale et de l'Ouest comptaient 4,7 millions de cas (OMS, 2020). Bien que les nouvelles infections au VIH aient diminué de 31%, passant de 2,1 millions en 2010 à 1,5 million en 2020 nous sommes encore loin des moins de 500 000 nouveaux cas, prévus pour 2020 par l'ONUSIDA (ONUSIDA, 2020). Chez les enfants, les nouvelles infections au VIH ont diminué de 53%, passant de 320 000 en 2010 à 150 000 en 2020. L'Afrique Centrale et de l'Ouest ont enregistré 200 000 nouveaux cas en 2020. Aujourd'hui plus de 70% des cas dans le monde vivent en Afrique Subsaharienne. Les observations des années 90 impliquant les sites urbains en priorité ont évolué et placent également certains sites ruraux au cœur de l'épidémie (ONUSIDA, 2020 ; OMS, 2020). Les femmes apparaissent particulièrement touchées par l'infection (55%) et les raisons évoquées pour expliquer cette forte prévalence sont dans la nature bio-épidémiologique (efficacité de transmission de l'homme à la femme, le jeune âge des femmes...) et socio-épidémiologique de la transmission/diffusion du virus (Diessé *et al.*, 2017). Selon le Comité National de Lutte contre le SIDA (CNLS, 2018), au Cameroun, 48 815 personnes avaient été testées positifs, soit un taux de séropositivité de 3,34% avec une grande variabilité d'une région à l'autre.

I.1.1.2. Manifestations cliniques de l'infection à VIH

Les symptômes induits par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) varient en fonction du stade de l'infection. Si les personnes vivant avec le VIH ont tendance à présenter la plus forte contagiosité au cours des premiers mois, nombreuses sont celles qui ignorent leur statut sérologique jusqu'à des stades plus avancés.

L'évolution clinique de l'infection à VIH s'effectue en 4 phases.

La Phase A : Il s'agit d'une phase cliniquement latente mais biologiquement active. La réplication virale est constante avec la détérioration progressive du système immunitaire. La régression du taux de CD4 se fait progressivement en quelques années de 500 à 350/mm³. On n'assiste ni à la perte de poids, ni à l'apparition des symptômes.

La phase B : La perte de poids est < à 10%, on observe des crevasses autour des lèvres, des dermatites prurigo, du zona dans les 5 dernières années, des infections des voies respiratoires supérieures à répétition et les ulcères buccaux récidivants. Ces symptômes peuvent manquer ou passer inaperçus. La numération des lymphocytes T CD4⁺ est comprise entre 499-350/mm³.

La Phase C : La perte de poids est > à 10% et les manifestations de fièvre et de diarrhée pouvant durer jusqu'à 1 mois. On observe également la candidose buccale, la leucoplasie chevelue, la tuberculose pulmonaire et ganglionnaire, la gingivite ulcéreuse et les infections sévères répétées. La numération des lymphocytes T CD4⁺ est comprise entre 349-200/mm³.

La phase D ou SIDA : Cette phase est définie par une numération des lymphocytes T CD4⁺ < 200/mm³. Au cours de cette phase surviennent les infections dites opportunistes dont les principales sont : la tuberculose, la pneumocystose, la toxoplasmose, la cryptococcose, le cancer du col, lymphome, la leishmaniose viscérale et la candidose (OMS, 2010 ; Libey, 2002).

I.1.1.3. Infection au VIH et système immunitaire

Le VIH a été identifiée comme l'agent causal du SIDA, une maladie épidémique qui constitue une menace pour la santé publique depuis trois décennies (Elfaki, 2014). Il est bien établi que le VIH infecte préférentiellement les lymphocytes, avec pour conséquence une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ au niveau des muqueuses (Douek *et al.*, 2002 ; Brenchley *et al.*, 2006). La mort progressive des lymphocytes T est attribuée à une activation immunitaire. Le dysfonctionnement immunitaire qui en résulte chez les patients séropositifs est probablement dû à des effets combinatoires résultant de l'infection des cellules immunitaires (lymphocytes T CD4⁺, macrophages, cellules dendritiques) par le VIH, de la réplication virale incontrôlée qui nuit à la présentation des antigènes, de l'augmentation des mutations de la protéine env gp120, qui conduit au tropisme et à la survie du virus, à l'apoptose accrue des cellules T helper CD4⁺ activées, à la régulation négative de la synthèse des CD4⁺ avec déficience fonctionnelle et à la perturbation des voies des cytokines (Brenchley *et al.*, 2006 ; Trautmann *et al.*, 2006). La suite de ces effets rend les patients immunodéprimés et vulnérables aux infections dites opportunistes.

I.1.1.4. Infections opportunistes à *Candida* liées au VIH

L'infection à VIH est considérée comme étant la 6^{ème} cause de mortalité dans le monde et la 2^{ème} en Afrique subsaharienne (ONUSIDA, 2020). L'altération de la réponse immunitaire observée au cours de l'évolution de l'infection par le VIH est liée à la diminution du nombre des lymphocytes T CD4+, cible essentielle du virus. Cette diminution est un facteur essentiel qui favorise le développement des infections opportunistes parmi lesquelles les infections fongiques dues à *Candida sp.* (Candidoses). Très fréquente, la candidose peut être très précoce et survenir pendant la période de séroconversion. Ses récurrences sont fréquentes et, avec la progression du déficit immunitaire, elle augmente en intensité (Born, 2013). Différentes formes de candidoses peuvent être observées et provoquer des infections superficielles touchant les muqueuses ainsi que des infections viscérales (Ngouana, 2014). Le muguet et les formes diffuses sont très fréquents alors qu'en dehors d'un déficit immunitaire, ces formes sont rares. Depuis l'introduction des thérapies antirétrovirales hautement actives (*highly active antiretroviral therapy HAART*) pour le traitement de l'infection à VIH, le taux de certaines candidoses particulièrement les candidoses oro-pharyngées et œsophagiennes a diminué même si le taux de colonisation asymptomatique semble rester stable (Ship, 2007). On considère néanmoins qu'environ 90% des patients infectés par le VIH développeront une candidose oro-pharyngée durant leur maladie et qu'au moins 75% d'entre eux souffrent d'une candidose œsophagienne associée (Born, 2013).

I.1.2. Diabète sucré

I.1.2.1. Épidémiologie du diabète sucré

Le diabète sucré est une maladie chronique due à l'incapacité du corps à produire de l'insuline ou à l'utiliser de manière efficace. Le nombre de personnes souffrant de diabète a pratiquement quadruplé depuis 1980. Les rapports de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et de la FID (Fédération Internationale du Diabète) présentent tous deux une nette augmentation du nombre total de diabétiques dans le monde durant la dernière décennie. En 2019, pas moins de 463 millions de personnes seraient atteintes par cette pathologie chronique (soit 8,8% de la population mondiale) tandis que la Fédération Internationale du Diabète (FID) prévoit d'atteindre 643 millions pour 2030 et 784 millions de patients diabétiques d'ici 2045 (soit 9,9% de la population mondiale). Au cours de cette seule année, 4 millions de décès dans le monde seraient imputables au diabète et à ses complications (FID, 2020). Bien que l'Afrique soit le continent où il est dénombré le plus grand nombre de personnes qui ne connaissent pas leur statut pour le diabète (70%), environ 24 millions de personnes vivaient

avec le diabète en 2021, et selon la FID, le continent devrait connaître la plus forte augmentation du nombre de cas de diabète dans le monde avec un chiffre pouvant atteindre 55 millions d'ici à 2045, soit une augmentation de 134% par rapport aux données disponibles en 2021. Au Cameroun, le diabète touche 615 000 personnes soit une prévalence de 6% (**FID, 2020 ; Eugène, 2014**). Cette prévalence est en constance augmentation dans la population générale allant de 2% en 1999 à 4,7% en 2002 et 5,8% en 2018 ; les populations des zones urbaines sont les plus affectées comparées à celles en zones rurales (**Sobngwi et al., 2002 ; Bigna et al., 2018**).

I.1.2.2. Différents types de diabète sucré

Il existe deux principales formes de diabète sucré :

Le diabète de type I, qui survient essentiellement chez l'enfant ou l'adulte jeune (environ 6% des cas de diabète) ;

Le diabète de type II, qui est la forme la plus fréquente (plus de 90%), survient essentiellement chez l'adulte mais peut apparaître également dès l'adolescence.

Il existe aussi le diabète gestationnel (qui survient pendant la grossesse et disparaît après l'accouchement) (**OMS, 2021**).

Près de 90% des personnes diabétiques dans le monde et la grande majorité en Afrique, sont atteintes du diabète de type II, et l'on attribue la hausse de ce taux d'incidence à la mauvaise alimentation et à la sédentarisation (**FID, 2020**). Les infections sont souvent plus sévères et plus compliquées lorsqu'elles surviennent chez un patient diabétique car chez ce dernier, plusieurs étapes de la réponse immunitaire sont altérées (**Hannedouche, 2004**).

I.1.2.3. Diabète et système immunitaire

Le taux de sucre élevé dans l'organisme favorise l'altération de l'activité phagocytaire affaiblissant ainsi le système immunitaire. En effet, on assiste à une faible production des cytokines locales, la déplétion de la fonction des leucocytes polynucléaires particulièrement lorsqu'une acidose est présente, sans oublier les fonctions d'adhérence, de chimiotaxie et de phagocytose leucocytaire qui peuvent aussi se trouver affectées, les systèmes anti-oxydants intervenant dans l'activité bactéricide sont également altérés. En plus, une augmentation de l'adhérence des micro-organismes aux cellules urothéliales. La défaillance de la phagocytose est en partie due à la relation entre le glucose et les protéines plasmatiques impliquées dans l'opsonisation (**Hannedouche, 2004 ; Davidson et al., 2015**). Une fois le système immunitaire défaillant, les microorganismes qui sont normalement colonisateurs pourraient exprimer leurs pouvoirs pathogènes.

I.1.2.4. Infections opportunistes liées au diabète

Le diabète est un trouble métabolique et dégénératif chronique qui se caractérise par une hyperglycémie chronique avec une glycémie au-dessus de la valeur normale (1,26 g/L ou 7 mmol/L) à jeun. Au cours du diabète, l'immunité cellulaire étant compromise, avec des modifications des cellules polymorphonucléaires, des monocytes et des lymphocytes, on observe une susceptibilité accrue de l'apparition et du développement des germes pathogènes parmi lesquels les levures dans l'organisme (**Rodrigues et al., 2019**). Plusieurs mécanismes sont attribués à une prédisposition élevée de *Candida sp.* chez les patients diabétiques, selon si l'infection est locale ou systémique. Parmi les conditions d'accueil reconnues pour la colonisation par les *Candida* et l'infection ultérieure, on peut citer l'adhésion des levures aux surfaces des cellules épithéliales, des taux de glucose salivaire plus élevés, une réduction du flux salivaire, une dégénérescence micro-vasculaire et une altération de l'activité anticandida des neutrophiles (**Kadir et al., 2002**). Ces conditions sont particulièrement graves en présence de glucose élevé et ont une influence majeure sur l'équilibre entre l'hôte et les levures, favorisant la transition de *Candida sp.* de commensal à pathogène conduisant donc à l'infection.

I.2. Infections à *Candida*

I.2.1. Généralités sur les candidoses

Les candidoses sont des infections fongiques cosmopolites localisées ou généralisées dues à des champignons levuriformes du genre *Candida* qui profitent d'un dysfonctionnement du système immunitaire de l'hôte pour exprimer leur pouvoir pathogène. Elles représentent plus de 80% des infections à levures. Ces champignons peuvent être endogènes ou exogènes, et n'expriment leur pouvoir pathogène qu'en présence de facteurs favorisants (**Pappas et al., 2016**).

Les pathologies associées aux candidoses sont extrêmement variées puisque tout organe ou système du corps peut être infecté. Les candidoses existent sous deux formes : la candidose cutanéomuqueuse et la candidose disséminée ou septicémique. Toutefois, nous allons nous appesantir sur les candidoses cutanéomuqueuses (**Chambard, 2009**).

I.2.1.1. Aspects cliniques des candidoses cutanéomuqueuses

L'adhérence aux cellules épithéliales, la multiplication des levures et leurs capacités de filamentation sont à l'origine de lésions cutanéomuqueuses inflammatoires. Les candidoses cutanéomuqueuses sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Elles sont

le plus souvent la conséquence d'un déséquilibre de la flore commensale de la peau et des muqueuses, liées au développement anormalement important des levures du genre *Candida* qui vont alors exercer un pouvoir pathogène générateur de lésions et de signes cliniques divers. Elles peuvent atteindre les muqueuses telles que la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, les intestins, le système urinaire, et la muqueuse vaginale (ANOFEL, 2014).

a. Candidoses digestives

Les levures du genre *Candida* sont responsables de près de 90% des mycoses du tube digestif. Ces candidoses digestives sont alors très fréquentes, tous les âges et les états de santé étant concernés mais l'incidence est plus élevée chez les sujets immunodéficients. Les candidoses digestives (oropharyngées, œsophagiennes, gastriques, intestinales et anales) sont pratiquement d'origine endogène, et résultent du passage de l'état commensal à l'état pathogène des levures (Chambard, 2009).

➤ **Candidose oro-pharyngée**

C'est la manifestation la plus fréquente des candidoses ; elle concerne à la fois les sujets non immunodéprimés (27%) et les sujets immunodéprimés (68-84% chez les patients diabétiques et entre 80-90% chez les personnes vivant avec le VIH au cours de l'évolution de leur maladie, avec un caractère de gravité systématique chez ces derniers) (Kumar *et al.*, 2005 ; Ranganathan et Hemalatha, 2006). L'intérêt porté à cette infection s'est accru ces dernières années, car elle constitue l'une des manifestations orales de l'infection par le VIH et le diabète. Cependant, elle peut aussi survenir chez des patients leucémiques ou cancéreux (Pappas *et al.*, 2016). Les études décrivent également comment cette colonisation ne conduit pas toujours à une infection. Néanmoins, elle constitue un prélude à l'infection lorsque l'immunité de l'hôte est compromise avec un risque d'infection disséminée élevé (Van der Meer *et al.*, 2010). Cliniquement, elle se traduit par une dysphagie douloureuse, un pyrosis et une sensation de brûlure au passage des aliments. L'examen révèle des membranes blanchâtres reposant sur une muqueuse très inflammatoire comme le montre la figure 1.



Figure 1 : Représentation de la candidose oro-pharyngée (Kah, 2011).

➤ **Candidose de la muqueuse gastro-intestinale**

Elle intéresse tout l'intestin, de l'estomac au colon (Figure 2). Les lésions se présentent comme un muguet intestinal avec des ulcérations. Elle se manifeste par des douleurs abdominales à la palpation, des nausées et des vomissements, des diarrhées aqueuses, des ballonnements, des démangeaisons anales, la constipation associée à une fatigue progressive et inexplicable (Nguana, 2014).

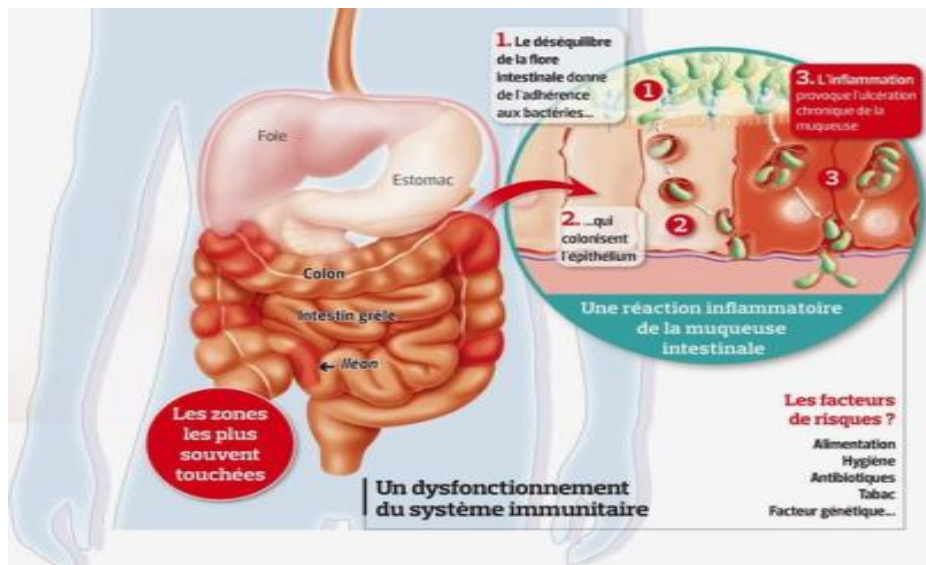


Figure 2 : Représentation de la candidose gastro-intestinale. (<https://naturopathe-biarritz.com/en-finir-avec-candidose-et-mycose-vaginale/>).

b. Candidoses uro-génitales

➤ **Candidose vulvo-vaginale (CVV)**

La candidose vulvo-vaginale (CVV) est une vaginite infectieuse provoquée par les levures du genre *Candida* (Figure 3). Elle est la deuxième plus fréquente cause des vaginites infectieuses, sa contamination est presque exclusivement endogène, son importance est fonction de sa localisation et de l'espèce de levure responsable. La CVV affecte environ 70-

75% des femmes en activité sexuelle à un moment de leur vie dont 40 à 50% représenteraient un ou deux épisodes (Al-Ahmadey et Mohamed, 2017).

Les symptômes les plus évocateurs sont l'existence de leucorrhées abondantes blanchâtres, d'aspect granuleux, et d'un prurit vulvaire ou une sensation de brûlure, surtout durant l'émission de l'urine qui génèrent souvent des douleurs ou des sensations d'inconfort. Le point de départ d'une telle infection reposerait sur un dysfonctionnement hormonal ou immunitaire local. Le caractère récidivant assez fréquent des infections à *Candida* chez la femme est susceptible d'induire lors des traitements répétés des phénomènes de résistance passant par l'émergence de souches moins sensibles (Lagane, 2007).

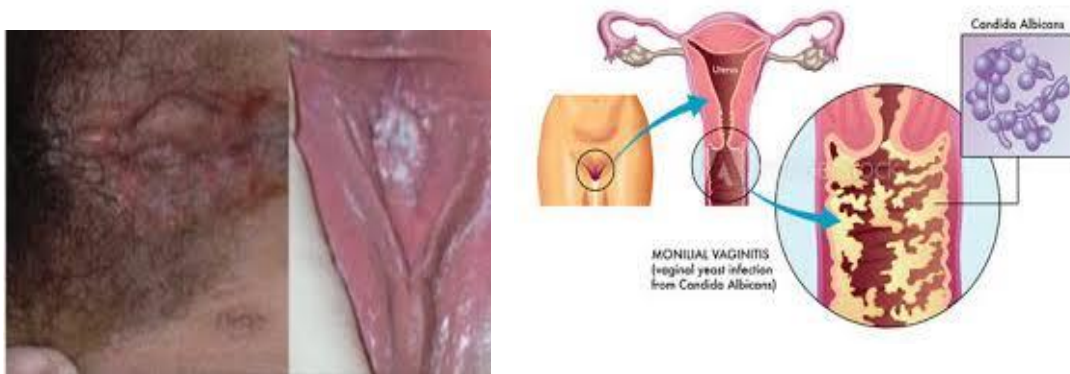


Figure 3 : Représentation de la candidose vulvo-vaginale (Kah, 2011).

➤ La balanoposthite ou balanite

Chez l'homme, la balanite candidosique n'est pas une maladie sexuellement transmissible bien qu'elle survienne souvent après un rapport sexuel en particulier si la partenaire a une candidose vaginale. On peut trouver *Candida sp* dans le sillon balanopréputial en l'absence d'infection (Figure 4). Les colonies sont souvent les mêmes chez les partenaires sexuels, mais il n'est pas toujours possible de déterminer si la source est exogène ou endogène. En effet, la pathogénicité du *Candida* dépend des facteurs liés à l'hôte parmi lesquels le diabète est le plus important mais aussi l'obésité ou la prise d'antibiotiques.

L'aspect typique donne des placards érythémateux rouge vif macérés, prurigineux parfois érosifs couverts d'un enduit blanchâtre. À la périphérie des lésions, une collerette épithéliale semée de pustulettes est un bon signe d'orientation. Parfois dans les formes graves, il peut y avoir un œdème important, voire des vésicules ou des ulcérations. Les balanites candidosiques récidivantes peuvent causer des fissures préputiales, une fibrose et une sclérose (Lagane, 2007 ; Bloch, 2013).



Figure 4: Représentation de la balanite candidosique (Bloch, 2013).

➤ Candidoses urinaires

La candidose urinaire ou candidurie (présence de *Candida* sp. dans l'urine) est une découverte davantage fréquente chez les patients (Belazi *et al.*, 2005). Elle peut répondre à plusieurs mécanismes pathogéniques, dont les implications pronostiques et thérapeutiques sont radicalement différentes et qu'il est pourtant difficile pour le clinicien d'identifier avec certitude. Les levures peuvent atteindre le rein par voie hématogène, dans le cadre d'une candidose systémique et/ou profonde. La candidurie est alors un symptôme d'une infection disséminée. L'infection peut aussi se faire par voie ascendante, le point de départ étant digestif ou vaginal. La distinction entre colonisation et infection est difficile (Odabasi *et Mert*, 2020); on passe généralement de simples épisodes de candiduries asymptomatiques à une infection intégrale du tractus urinaire se manifestant par la fièvre, la dysurie, la leucocyturie, la pyurie, l'hématurie, etc.

I.2.1.2. Les différents mécanismes de défense de l'hôte contre les levures du genre *Candida*

a) Immunité non spécifique : réponse innée

Le premier mécanisme de défense de l'hôte contre les levures repose sur la mise en place de la réponse immunitaire non spécifique. Elle est immédiatement déclenchée par la pénétration des microorganismes dans les muqueuses. L'immunité non spécifique se caractérise par la présence de barrières naturelles de défense, par le recrutement de cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles et monocytes, macrophages) et par l'activation du complément. Aucune exposition préalable n'est nécessaire pour engendrer une réponse effective. Dans les macrophages, l'élément pathogène est détruit dans le phagosome et les composants pathogènes sont présentes par des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T pour activer la réponse spécifique (Netea *et al.*, 2008).

b) Immunité spécifique

Les lymphocytes T se composent de lymphocytes CD4 helper, qui secrètent des cytokines et CD8. Pour les lymphocytes CD4, on peut distinguer en fonction de leur profil de sécrétion de cytokines deux types de cellules à savoir les Th1 (T helper de type 1) qui produisent l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron gamma (IFN- γ) impliqués dans l'activation des macrophages et dans la cytotoxicité à médiation cellulaire T. Et les Th2 (T helper de type 2) qui produisent l'interleukine 4, 5, 6 et 10 impliqués dans la production d'anticorps par les lymphocytes B dans l'immunité humorale. Selon la nature commensale ou pathogène du *Candida*, l'état du patient et le type de candidose, on observe une influence complexe orientant plus vers un type de réponse Th1 et/ou Th2 médiée par leurs cytokines secrétées (**Ashman et Farah, 2005**).

Les déficits immunitaires, principalement de l'immunité cellulaire, prédisposent à une candidose muqueuse. En effet, le rôle important des lymphocytes CD4+ dans la protection contre les candidoses s'exprime par l'apparition précoce des candidoses cutanéomuqueuses chez les patients ayant un déficit en lymphocytes CD4+, par exemple chez les patients porteurs du virus VIH (**Ashman et Farah, 2005**).

I.2.2. Généralités sur le genre *Candida*

Les espèces du genre *Candida* sont intimement liées ; ce sont des champignons microscopiques, unicellulaires et eucaryotes, saprophytes et/ou commensales. De nos jours, *Candida* sp représente la quatrième cause d'infection la plus fréquente et est responsable de 8 à 15% des infections nosocomiales (**kumara et al., 2014**).

Environ 95% de toutes les infections à *Candida* sont causées par 5 espèces qui sont *C. albicans* (46,5%) et (53,5%) pour les espèces *Candida non albicans* à savoir *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*. Parmi ces derniers, *C. tropicalis* occupe une place importante avec une prévalence allant de 8 à 17% (**Osman et al., 2020**) et nous nous appesantirons sur cette espèce.

I.2.2.1. *Candida tropicalis*

I.2.2.1.1. Épidémiologie descriptive des infections à *Candida tropicalis*

Candida tropicalis est une levure pathogène opportuniste et une cause d'infections tant superficielles que systémiques chez l'Homme. Elle est particulièrement répandue en Asie du Sud et de l'Est, et en Amérique latine, où elle a été identifiée comme la deuxième ou troisième cause la plus fréquente de candidose (**Xiao et al., 2018 ; Liu et al., 2020**) et la

principale cause de candidémie en Inde (3-66%), en Algérie, en Egypte (17%) et en Tunisie (37,7%). En Afrique subsaharienne, particulièrement au Cameroun et au Nigéria, elle est entre la 2ème et la 4ème espèce couramment isolées (**Sellami et al., 2011 ; Chakrabarti et al., 2015 ; Megri et al., 2020**). Même si les résultats sont variables en fonction des études (localisations géographiques, formes cliniques, catégories de patients...), les infections par *C. tropicalis* lorsqu'elles atteignent le sang, elles sont associées au pronostic vital le plus défavorable parmi les espèces de CNA avec un taux de mortalité élevé, allant de 41 à 61% (**Ko et al., 2019 ; O'Brien et al., 2021**). Cette augmentation est probablement la conséquence directe de la faible sensibilité de cette espèce aux antifongiques azolés dont l'intensification de l'usage prophylactique coïncide avec l'émergence des espèces non-*albicans* (**Price et al., 1994**). Cependant, il semble que d'autres facteurs prédisposent à l'infection par *C. tropicalis*. Ainsi, l'existence simultanée d'une antibiothérapie ou la nature de la maladie sous-jacente semble avoir plus d'incidence sur la probabilité de développer une candidose profonde ou systémique à *C. tropicalis* que l'utilisation prophylactique d'antifongiques azolés (**Pfaller et Diekema, 2007**).

I.2.2.1.2 Taxonomie / classification

Cette classification s'appuie sur des caractères phénotypiques et sur la comparaison des séquences nucléotidiques

Règne : Champignon

Phylum : Ascomycota

Classe : Hemiascomycètes

Ordre : Saccharomycétales

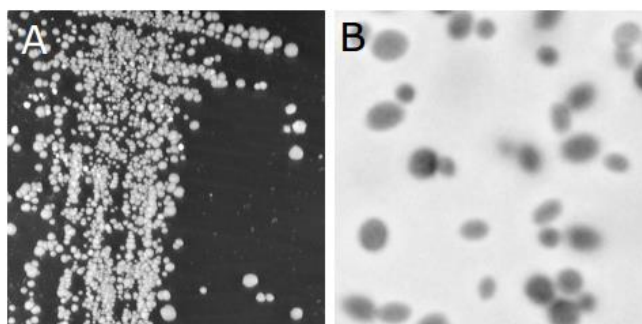
Famille : Candidaceae

Genre : Candida

Espèces : *tropicalis* (**Barnett, 2000**)

I.2.2.1.3. Morphologie et structure

Macroscopiquement, *Candida tropicalis* se présente sur milieu standard (Sabouraud dextrose agar) sous la forme de colonies lisses et brillantes de couleur blanc crème (Photographie 1A). Microscopiquement, il se présente généralement sous forme de levure et produit de petites blastospores ovoïdes de 4 à 8 µm, se multipliant par bourgeonnement (Photographie 1B). Toutefois, il est capable de produire de courts pseudofilaments dans des conditions de culture particulières (**El-Kirat-Chatel, 2010**).



Photographie 1 : Morphologie de *Candida tropicalis*. (A) Observation macroscopique de colonies sur milieu de Sabouraud. (B) Observation en microscopie photonique de blastospores en suspension (Dougue, 2019).

Ce microorganisme eucaryote, comme tous les champignons possèdent une paroi qui joue un rôle de protection contre les attaques physico-chimiques de l'environnement et permet de résister aux variations de la pression osmotique (figure 5A). Cette paroi est composée d'éléments structuraux et d'une matrice qui assurent une balance entre résistance et plasticité. Le composant majeur de la paroi est le β -1,3 glucane liée covalamment à des β -1,6 glucanes et à la chitine (polymère de *N*-acétylglucosamine lié en β -1,4). Ces polymères forment des microfibrilles liées par des liaisons hydrogènes et se situent dans les couches les plus basales de la paroi. La matrice est constituée de protéines glycosylées (figure 5B). L'ensemble de ces composants pariétaux est commun au règne fongique, mais chaque espèce peut avoir des composés spécifiques et une proportion et répartition différente de chaque élément, ce qui peut modifier l'interaction avec les cellules de l'hôte (Netea et al., 2008).

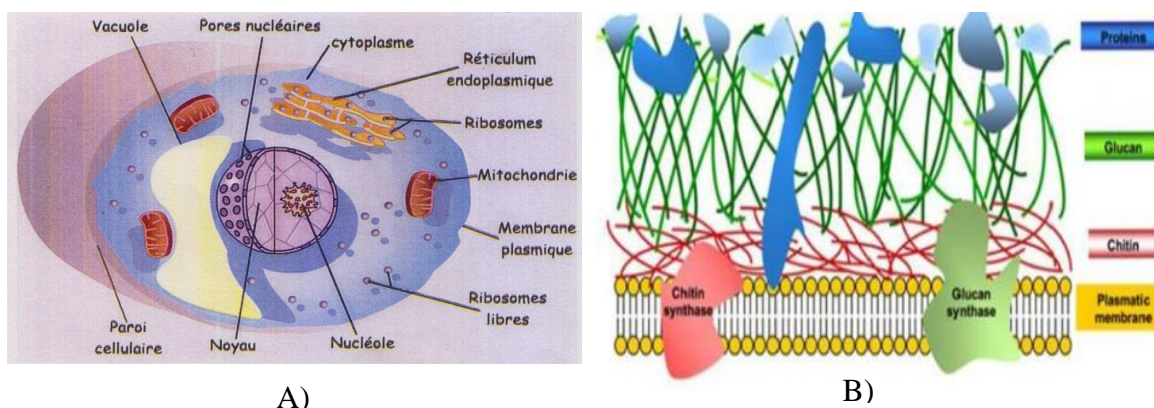


Figure 5 : Structure cellulaire (A) et de la paroi (B) de *Candida sp* (Netea et al., 2008)

I.2.2.1.4 Mécanisme de reproduction

Candida tropicalis peut adopter deux morphologies différentes : levures (blastopore) et pseudofilament. Cependant, elle se reproduit essentiellement par bourgeonnement, donnant ainsi naissance à de nouvelles levures, aussi appelées blastopores. La production de tubes

germinatifs conduit au passage à la phase de croissance filamenteuse ou hyphe, aussi appelée forme mycélienne (Bennett, 2010).

I.3. Diagnostique biologique des candidoses muqueuses et identification de *C. tropicalis*

Le diagnostic des candidoses muqueuses est difficile et repose sur un faisceau d'arguments cliniques. Il consiste à prélever le produit biologique, à mettre le prélèvement en culture sur milieu spécifique et enfin identifier l'agent fongique en cause (Rispaïl, 2008). La distinction entre colonisation et infection est difficile sur le plan purement biologique.

I.3.1. Prélèvement du produit biologique

En fonction du type d'échantillon, l'écouvillon porte-coton stérile est utilisé pour les prélèvements de surface et les pots stériles pour les échantillons tels que les urines, les selles.

I.3.2. Culture sur milieu spécifique

Les *Candida* sont des levures peu exigeantes sur le plan nutritif et de nombreux milieux permettent leurs développements. Toutefois, le milieu d'isolement de référence utilisé pour les levures est la gélose de Sabouraud supplémentée à un antibiotique (Chloramphénicol, gentamicine) pour limiter le développement des bactéries. Il contient les éléments nécessaires à la croissance de la majorité des champignons : matières azotées (peptone à 10%), un sucre (glucose à 20%) et des traces de vitamines (vitamines du groupe B). Les cultures sont incubées à 37°C et se positivent dans un délai de 24 à 72 heures pour la majorité des *Candida*, et ceux-ci apparaissent sous forme de colonies blanches crémeuses. Il existe aussi des milieux chromogènes qui permettent la culture et la différenciation directe de certaines levures (Symms, 2007).

I.3.3. Identification de *Candida tropicalis*

I.3.3.1. Identification grâce aux milieux chromogéniques

Ce sont des milieux, auxquels sont ajoutés des substances chromogènes, qui confèrent aux colonies qui s'y développent une coloration particulière, variable en fonction de l'espèce. Il existe des milieux chromogènes qui permettent une discrimination des espèces selon leur couleur, mais surtout de déceler d'éventuelles associations (plusieurs espèces de levures dans un même prélèvement biologique). La coloration est dans la plupart des cas fondée sur la mise en évidence d'une activité de type hexosaminidase (N-acétyl- β -D-galactosaminidase). De nombreux milieux chromogéniques sont disponibles dans le commerce parmi lesquels Candida ID2 et CHROMagar® candida qui sont couramment identifiés.

▪ **Candida ID2** : Les colonies de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* et *C. kefyr* apparaissent roses. La figure 6 nous présente l'aspect de ces colonies sur Candida ID® 2 après 48 heures de culture à 37 °C selon **Eraso et al., (2006)**.

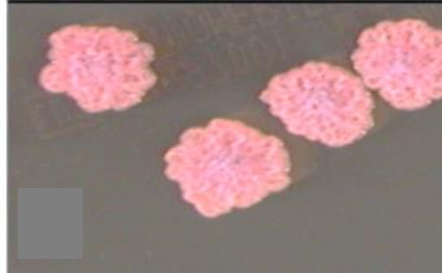


Figure 6 : Aspect des colonies de *C. tropicalis* sur Candida ID® 2 après 48 heures de culture à 37°C (**Eraso et al., 2006**).

▪ **CHROMagar Candida** : sur ce milieu, *C. tropicalis* forme des colonies bleues métalliques ou violettes ; la figure 7 ci-dessous montre l'apparence des diverses colonies sur CHROMagar® Candida après 48 heures d'incubation selon **Koehler et al. (1999)**.



Figure 7 : Apparences des colonies de *C. tropicalis* sur CHROMagar® Candida après 48 heures d'incubation (**Koehler et al., 1999**).

I.3.3.2. Identification au MALDI/ToF

En microbiologie, la confirmation et l'identification des microorganismes se basaient au début principalement sur la morphologie. Puis, sont apparus les tests biochimiques en tubes à essai qui ont été par après miniaturisés. Ces techniques sont progressivement supplantées par la spectrométrie de masse de type MALDI/ToF qui connaît un essor important en microbiologie et permet une identification plus rapide et fiable (**ANOFEL, 2014**).

Principe : La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge.

Le spectromètre de masse MALDI/ToF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI=*Matrix-Assisted Laser*

Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (ToF = *Time of Flight*) (Figure 8). Il se produit une ionisation des protéines du microorganisme par un rayon laser et la création de pics caractéristiques (spectres). À partir d'une base de données de spectres, le logiciel associe la correspondance à l'espèce selon un indice de fiabilité entre les deux spectres. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge (m/z). Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules les plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre. Actuellement, 7 000 spectres classiques existent dans la base de données permettant d'identifier plus de 2 000 espèces. La matrice est constituée de molécules cristallisées dont les plus utilisées sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide sinapinique (Bizzini *et al.*, 2010).

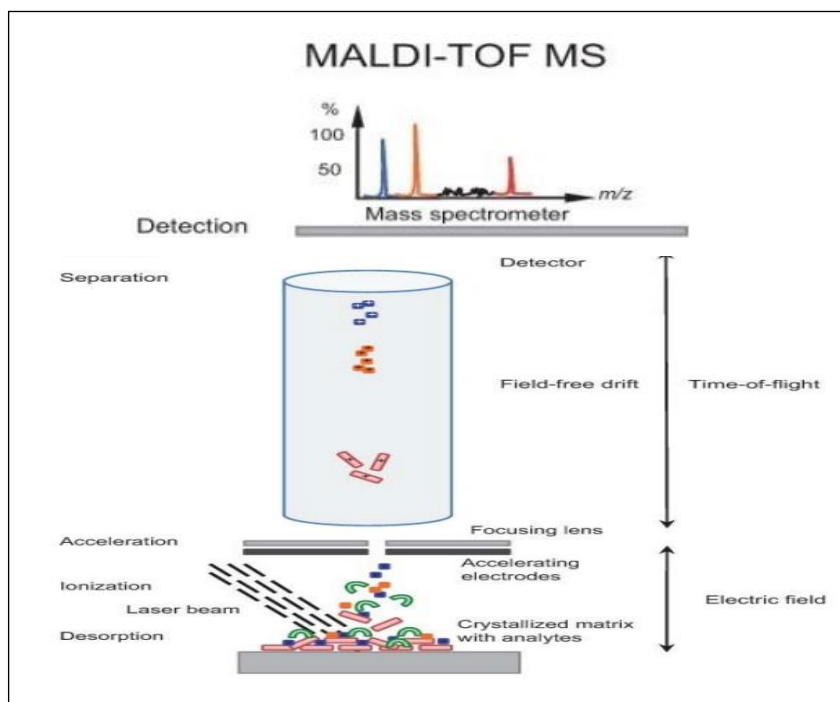


Figure 8 : Principe du système de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bizzini *et al.*, 2010).

Lecture et interprétation des résultats

Une fois l'analyse terminée, le spectromètre de masse affiche les résultats sous forme de spectres qui sont comparés à ceux présents dans la base de données. Les résultats sont classés par score ; Score 2,00-3,00 : Identification excellente (identification de l'espèce) ; Score 1,70-1,99 : Identification acceptable (identification du genre) ; score 0,00-1,69 : Aucune

identification possible. Un échantillon dont le score d'identification se situe entre 0 et 2,00 est à relancer. L'identification est validée lorsque le score se situe entre 2,00 et 3,00 et si le même germe est retrouvé pour les 2 dépôts.

Nous avons en plus de celle-ci, les techniques moléculaires qui utilisent le matériel génétique et permettent non seulement de confirmer l'identité d'un isolat mais aussi de le caractériser.

I.3.3.3. Identification génétique de *Candida tropicalis*

Les techniques d'identification classiques des levures pathogènes ne sont parfois pas suffisantes et comportent des limites comme leur manque de sensibilité, de spécificité et de rapidité. En mycologie, les techniques de biologie moléculaire sont utilisées dans le but de confirmer un diagnostic. Elles sont extrêmement précises et rapides, mais leur coût est très élevé. Pour cela, elles sont utilisées dans les centres de référence et ne sont pas encore adaptées aux laboratoires polyvalents. Dans le domaine de la recherche, une multitude de publications relatent le développement de techniques de PCR permettant l'identification de levures déjà isolées. L'identification exacte de l'espèce revêt la plus grande importance en raison de la sensibilité variable aux antifongiques des différentes espèces de *Candida* (Chabasse *et al.*, 2006).

- **ITS (*Internal Transcribed Spacer*)**

L'ITS ou espace interne transcrit est une région de l'ARN ribosomique non codante et hautement polymorphe. Pour cette raison, elle est très fréquemment utilisée en biologie cellulaire pour mettre en évidence une différence génétique entre les espèces, particulièrement chez les champignons. Les ITS 5,8 S sont les plus utilisées et l'amplification du gène ITS1-5,8S ARNr- ITS2 est généralement réalisée à l'aide des amorces ITS1 (59-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-39) et ITS4 (59-TCCTCCGCTTATTGATATGC-39) (White *et al.*, 1990) (Figure 9). Parmi les espèces du genre *Candida*, la grande variabilité observée, tant au niveau de la longueur de la région amplifiée comprise entre 390 et 900 pb, qu'au niveau de leurs schémas de restriction, permet une identification sans équivoque au niveau de l'espèce, à l'exception de quelques espèces (*C. conglobata*, *C. atlantica*, *C. atmosphaerica*, *C. aaseri*, *C. butyri*, *C. fructus*, *C. musae*, *C. santamariae* var. *santamariae*, *C. beechii*, *C. zeylanoides*, *C. krissii* et *C. oleophila*) qui nécessitent le séquençage du domaine D1/D2 du gène de l'ARNr 26S pour être correctement différenciées. Il est actuellement possible d'identifier plus de 300 espèces de levures. Cette méthode, bien que fiable et reproductible, nécessite de séquencer les amplicons PCR pour identifier l'espèce, ce qui est

couteux et ne peut pas être utilisée pour des applications pratiques dans les cliniques et les hôpitaux (Frutos *et al.*, 2004).

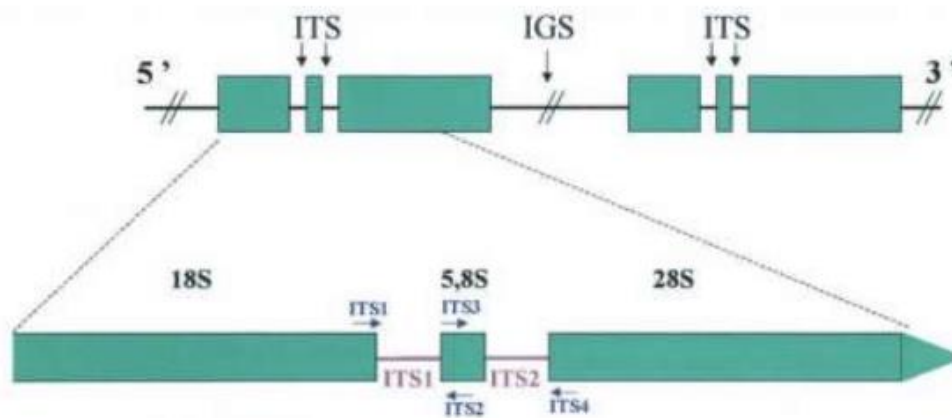


Figure 9 : Représentation schématique des ITS. Les rectangles correspondent aux régions codantes, les amorces et les positions d'hybridation sont représentées par les flèches bleues (Frutos *et al.*, 2004).

- **Vacuolar Molecular ATPase (VMA) ou intéines**

Récemment, des techniques de VMA (*Vacuolar Molecular ATPase*) ou intéines ont été mises sur pied pour l'identification spécifique de *C. tropicalis*. Les intéines (protéines internes) sont des séquences souvent trouvées dans les régions conservées de gènes de ménages et sont utilisées pour le diagnostic spécifique à l'heure actuelle (Fernandes *et al.*, 2016). L'étude menée par Rajasekharan *et al.* (2018) souligne l'importance de l'intéine en tant que marqueur diagnostique potentiel pour l'identification spécifique de certaines espèces parmi lesquelles *C. tropicalis*. La technique établie est un prototype pour le développement de tests PCR à facettes multiples et pour les tests au point dans un avenir proche. Les amorces des séquences intéines VMA (VMA-f : AATCCGAAGGCTTGATGG et VMA-r : AATGCCAGCAGCAAAGTAG) sont absentes dans le génome de plusieurs espèces de *Candida*, et offrent finalement une stratégie de diagnostic rentable pour *C. tropicalis*. Rajasekharan *et al.* (2018) démontrent le rôle plausible de séquences d'ADN de l'intéine comme marqueur biologique prometteur pour l'identification spécifique de *C. tropicalis*.

I.4. Épidémiologie moléculaire de *Candida tropicalis*

I.4.1. Différentes techniques du génotypage de *Candida tropicalis*

Les méthodes classiques de génotypage sont basées sur l'analyse du polymorphisme génique d'individus d'une même espèce. L'efficacité des méthodes de typage est définie par

son pouvoir discriminant qui caractérise son aptitude à distinguer deux souches n'ayant aucune relation entre elles. D'autres paramètres sont considérés pour le choix d'une méthode par rapport à une autre, comme la reproductibilité et la standardisation de la méthode permettant de comparer les résultats de typage des souches entre les différents laboratoires. Parmi ces différentes techniques, nous avons :

❖ **RAPD (*Randomly Amplified Polymorphism DNA* ou **Amplification aléatoire d'ADN polymorphe**)**

C'est une technique consistant à réaliser une PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant une amorce courte d'une dizaine de nucléotides, de séquence arbitraire. Cette amorce va s'hybrider au hasard dans le génome et ceci à chaque fois qu'elle trouvera dans l'ADN une séquence qui lui est complémentaire. Si deux sites d'hybridation sont proches l'un de l'autre (à moins de 3 000 pb) et en direction opposée, l'amplification aura lieu. Si un de ces deux sites est absent dans un autre individu, il n'y aura pas d'amplification et un polymorphisme de présence/absence sera observé. Les produits d'amplification obtenus en RAPD, dont le nombre dépasse rarement la dizaine, sont en général séparés par électrophorèse en gel d'agarose (Santoni *et al.*, 2000).

Avantages :

Elle est rapide et d'une faible technicité. En effet, l'amplification obtenue dépend beaucoup des conditions de réalisation de la PCR.

Inconvénients :

Faible reproductibilité et pas d'amorce standard.

❖ **AFPL (*Amplified Fragment length Polymorphism* ou **Polymorphisme de longueur de fragment amplifié**)**

C'est une technique de marquage moléculaire permettant de révéler par PCR des polymorphismes de restriction. Utilisée pour confirmer l'identification des espèces et pour évaluer la variabilité génétique intra-spécifique, l'analyse du polymorphisme de longueur du fragment amplifié (AFLP) est généralement fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. La technique AFLP permet de révéler un polymorphisme important chez des groupes d'être vivant, essentiellement de type présence/absence et peut produire des marqueurs issus de toutes les régions du génome. Elle constitue une technique de choix pour marquer rapidement un grand nombre de locus dans un génome. Cette technique permet donc de réaliser des empreintes génétiques hautement informatives afin de comparer des génotypes génétiquement très

proches, de réaliser facilement des cartes génétiques ou de saturer une région particulière d'un génome (Mefti et Bouzerzou, 2012).

Avantage :

Le polymorphisme de longueur des fragments d'amplification est hautement reproductible, moins sensible aux conditions de la réaction et ne nécessite pas d'informations sur la séquence d'ADN comparé à la RAPD.

Inconvénient :

Elle présente parfois des problèmes de reproductibilité.

❖ **RFLP-PCR (*Restriction Fragment length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction* ou Polymorphisme de longueur de fragment de restriction)**

Cette technique est une technique utilisée pour différencier les séquences variables des nucléotides d'un fragment d'ADN homologue. Les enzymes de restriction coupent l'ADN en des sites spécifiques comprenant en général, un nombre pair de bases (4, 6 ou 8). Une enzyme ayant un site de reconnaissance à 6 bases coupe l'ADN à toutes les 4 096 bases en moyenne. La spécificité est que le remplacement d'une seule base dans un site suffit à empêcher la coupure de l'ADN par l'enzyme utilisée. C'est cette spécificité qui est exploitée pour la mise en évidence du polymorphisme : une présence/absence de site de restriction entraîne un polymorphisme de longueur des fragments. Ce phénomène n'étant pas rare, la digestion de l'ADN génomique de deux individus quelconques dans une espèce donnée produit de très nombreuses différences de longueur de fragments (Santoni *et al.*, 2000).

Avantage :

Elle permet de marquer toutes les régions du génome, nucléaire ou cytoplasmique, les régions codantes ou non codantes. Elle présente également un bon potentiel de transfert entre espèces, grâce à certaines sondes de séquences très conservées.

Inconvénients :

La mise en œuvre de la technique RFLP demande des compétences en biologie moléculaire ainsi qu'une organisation et des matériels de laboratoire adaptés. Il est très difficile d'automatiser les différentes étapes de cette technique. En plus, les laboratoires spécialisés ont optimisé et standardisé les protocoles et s'appuient sur des personnels très compétents. La quantité d'ADN requise par génotype à analyser est assez importante (de l'ordre du microgramme). La reproductibilité des résultats dépend du soin apporté à la préparation des échantillons d'ADN, afin d'exclure tout risque de digestion partielle par les enzymes de restriction.

❖ **Microsatellites**

Les séquences microsatellites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) sont parmi les marqueurs les plus puissants pour révéler le polymorphisme et sont constituées de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétranucléotidiques. Parmi les plus courantes, on retrouve (A)_n, (AT)_n, (GA)_n, (GT)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, etc., la valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Le polymorphisme concerne le nombre d'unités de répétition qui, constitue la séquence microsatellite. Celui-ci varie vraisemblablement surtout à cause des erreurs dues au « glissement » de la polymérase lors de la réplication des chromosomes. La séquence microsatellite est de plus, soumise aux mécanismes d'évolution rapide des séquences répétées en tandem. Les taux de mutation des microsatellites ont été estimés chez l'homme et chez certains animaux. Ils s'établissent en général entre 4.10^{-4} et 5.10^{-6} par allèle et par génération. Ce taux élevé, comparé aux autres séquences d'ADN génomique, explique que les microsatellites soient très peu présents dans les séquences codantes, car trop instables et forcément contre-sélectionnés. Le passage à des espèces d'autres genres de la même famille montre un succès réduit dans l'obtention d'amplification de microsatellites et de leur polymorphisme. La conservation de ces séquences disparaît rapidement avec l'éloignement génétique des taxons. Ils sont de plus en plus fréquemment utilisés pour de nombreuses études et constituent d'excellents marqueurs génétiques, spécifiques de locus, co-dominants et hautement polymorphes. Ils marquent essentiellement les régions non codantes (introns) et leur répartition est assez uniforme sur le génome. Les protocoles de visualisation peuvent être en partie automatisés (**Santoni et al., 2000**).

Avantage :

Les analyses par la méthode microsatellite démontrent un grand pouvoir discriminatoire, une forte reproductibilité et une grande habilité à détecter la microévolution des variétés d'isolats obtenus sur différents sites de prélèvement.

Inconvénient :

Leur faible portabilité entre espèces, même proches, nécessite des efforts de développement, parfois importants, pour chaque espèce.

❖ **MLST (*Multilocus sequence typing* ou typage des séquences sur plusieurs loci)**

Cette technique est basée sur l'analyse du polymorphisme nucléotidique simple (SNPs) de courtes séquences (450 à 600 bp) de plusieurs régions ou loci situées dans des gènes de ménage (*housekeeping genes*). Ce sont des séquences de gènes très conservées au sein de l'espèce considérée, le plus souvent impliquées dans le métabolisme et codant pour des

protéines essentielles (Odds *et al.*, 2007). Ces régions sont le siège de polymorphismes stables dans le temps mais néanmoins suffisamment fréquents pour permettre de distinguer des génotypes de souches très proches génétiquement, faisant de cette méthode une des méthodes de typage la plus discriminante. Au sein de ces séquences, des points de polymorphisme (SNP) sont notés et répertoriés. Chaque séquence différente d'un même gène constitue un allèle et la combinaison des séquences des différents gènes constitue un génotype MLST. Le typage MLST permet de caractériser les souches de certaines espèces de *Candida* par détermination de leur DST (*Diploid Sequence Type*) (Bougnoux *et al.*, 2004). L'efficacité de la méthode de typage est définie par son pouvoir discriminant qui caractérise son aptitude à distinguer deux souches n'ayant aucune relation entre elles. D'autres paramètres sont considérés pour le choix d'une méthode par rapport à une autre comme la reproductibilité et la standardisation de la méthode. La méthode MLST est probablement la méthode la plus standardisée et la plus utilisée pour typer certaines souches de *Candida* (Bougnoux *et al.*, 2002 ; Bougnoux *et al.*, 2004).

Avantages :

L'avantage majeur de cette technique est de recenser et générer les données épidémiologiques des souches, ainsi que leur DST objective et qui sont stockés dans des banques de données numériques internationales (<https://pubmlst.org/ctropicalis/>) auxquelles tout laboratoire a accès pour analyser ses propres données, permettant ainsi de suivre la dispersion des souches à l'échelle internationale (Bougnoux *et al.*, 2004 ; Van Asbeck *et al.*, 2009). Les données de séquençage offrent un niveau de reproductibilité plus élevé et une subjectivité minimale dans l'analyse par rapport aux autres technologies

Inconvénients :

Cette technique est contraignante et coûteuse.

Le typage moléculaire de *C. tropicalis* par la technique MLST utilise des gènes de ménages qui lui sont spécifiques.

I.4.2. Les gènes de ménages

Les gènes de ménages sont des gènes qui s'expriment dans tous types de tissus et dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des cellules. Ils sont aussi appelés gènes domestiques ou gènes constitutifs. Ces gènes représentent la majorité des gènes actifs dans le génome, et leur expression est évidemment vitale pour la survie. Les niveaux d'expression des gènes domestiques sont affinés pour répondre aux besoins métaboliques de divers tissus.

Les six gènes de ménage utilisés pour le génotypage de *C. tropicalis* sont :

- **ICL1** : ce gène code pour l'isocitrate lyase ; c'est une enzyme clé qui intervient dans le cycle de glyoxylate. Ce dernier permet l'assimilation du carbone à partir de composés à deux atomes du carbone (acétyl-CoA). Ainsi, contrairement au cycle de krebs, qui ne permet pas d'assimiler des atomes de carbone, le cycle du glyoxylate produit des intermédiaires qui peuvent être utilisés pour synthétiser du glucose via la néoglucogenèse et d'autres biomolécules. On la trouve chez les plantes, les champignons et les bactéries.

- **MDR1** : gène de résistance multiple aux médicaments (*multidrug resistance*), est connu pour entraîner une intolérance grave à certaines substances médicamenteuses. Ce gène code pour une protéine de transport membranaire de la superfamille des facilitateurs majeurs (*MFS*) qui n'est pas exprimée de manière détectable *in vitro* dans les isolats sensibles au fluconazole. Naturellement polymorphe, la mutation du gène MDR1 provoque cependant la production d'une protéine tronquée défailante, causant une perte de 90 % de la glycoprotéine P. (**Wirsching et al., 2020**).

- **SAPT2 et SAPT4** : les protéases aspartiques sont utilisés par les champignons pour dégrader de nombreuses protéines humaines, y compris des molécules qui protègent les surfaces muqueuses et l'immunoglobuline A (IgA) sécrétoire. Non seulement cela pourrait fournir à la levure de l'azote essentiel à la croissance, mais aussi favoriser l'attachement, la colonisation et la pénétration des tissus de l'hôte par la suppression des barrières de l'hôte. Selon l'environnement, SAPT2 est exprimée en milieu acide et permet l'invasion au travers de la barrière endothéliale, tandis que SAPT4 est produit après dissémination hématogène à pH neutre (**Naglik et al., 2003 ; El-Kirat-Chatel, 2010**).

- **XYR1** : la D-xylose réductase est une enzyme impliquée dans la conversion du D-xylose en xylitol par la voie du catabolisme des pentoses (PCP) chez les champignons.

- **ZWF1a** : le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est une enzyme régulatrice clé dans la voie des pentoses phosphates (dont les rôles essentiels sont la production de NADPH+H⁺ utilisé lors de la biosynthèse des acides gras, du cholestérol ainsi que la production de ribose-5-phosphate utilisé lors de la synthèse des nucléotides) qui décompose le glucose, favorise l'oxydation du β-D-glucose-6-phosphate en D-glucono-1,5-lactone-6-phosphate, et produit une forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) pour maintenir un environnement réducteur adéquat dans les cellules (**Gómez-Manzo et al., 2016**).

I.4.3. Génome de *Candida tropicalis*

Candida tropicalis est une levure diploïde qui, avec *C. albicans*, *C. parapsilosis* font partie de la clade *Candida* CTG dans lequel le codon CUG est traduit en sérine plutôt qu'en leucine (Papon *et al.*, 2013). Génétiquement, la structure de la population de ce champignon semble assez hétérogène et plus complexe (Wu *et al.*, 2012 ; Al-Obaid *et al.*, 2017 ; Wu *et al.*, 2017) que celle précédemment décrite par Tavanti *et al.* (2005) en utilisant la technique de typage des séquences multilocus (MLST).

Malgré son importance médicale et scientifique, le progrès dans l'élucidation du génome de *C. tropicalis* a été relativement lent comparé aux autres microorganismes. Ce fait est dû en partie aux difficultés rencontrées lors de l'utilisation de la génétique comme approche expérimentale d'étude. Malgré tous ces obstacles, les chercheurs ont développé, pendant les 2 dernières décennies, des stratégies alternatives. Ainsi, à l'heure actuelle, plusieurs approches expérimentales sont disponibles pour l'étude de *C. tropicalis*, y compris les profilages génétiques à grande échelle (Noble et Johnson, 2007 ; Kabir et Hussain, 2009). *C. tropicalis* est un proche parent de *C. albicans*. En effet, le génome de *C. tropicalis* correspond approximativement à 14,6 Mb et code environ 6 441 gènes dont 774 sont spécifiques aux *Candida*, avec une fonction majoritairement inconnue ; et celui de *C. albicans* a 14Mb et code environ 6 400 gènes (Li *et al.*, 2014).

I.4.4. Carte génotypique mondiale actuelle de *Candida tropicalis*

Le rapport de la base de données MLST de *C. albicans* contient des données génétiques provenant de plus de 4 000 isolats ; par contre, le nombre d'isolats de *C. tropicalis* génotypés jusqu'à présent est encore trop faible (1 433 isolats en date de 25/06/2022) pour fournir une bonne estimation du profil de la variation génétique. L'établissement d'une base de données MLST pour *C. tropicalis* sur pubmlst.org comprenant des informations sur la séquence d'ADN des six loci suivants (ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, XYR1 et ZWF1a) a facilité les comparaisons de souches provenant de différents laboratoires et de différentes régions géographiques du monde. La base de données MLST actuelle pour *C. tropicalis* comprend des informations sur la séquence d'ADN aux six loci pour plus de 600 isolats provenant d'Europe, d'Asie et des Amériques (Wu *et al.*, 2017). En fait, le 27 Juin 2022, la base de données MLST de *C. tropicalis* contenait 779 séquences, organisées en 1328 types de séquences diploïdes (DST), obtenues à partir de 1 433 isolats mondiaux. Parmi ceux-ci, seuls 881 isolats provenaient des pays ci-après : 469 Chine ; 124 Royaume-Uni ; 46 Brésil ; 29 Autriche ; 26 Thaïlande ; 25 Inde ; 47 Corée ; 24 Japon ; 17 USA ; 10 Belgique ; 28 Italie ; 9 Colombie ; 5

France ; 4 Canada ; 4 Australie ; 4 Argentine ; 3 Allemagne; 3 Pays-Bas et 1 chacun en Grèce, en Espagne et en Suède, respectivement. Le reste des 552 isolats n'a pas encore fait l'objet de publication et de répartition dans la carte. Aucun isolat de *C. tropicalis* en provenance de l'Afrique (particulièrement du Cameroun) et ainsi que de nombreux autres pays de part le monde n'a jamais été soumis dans la base de données publique. Cela limite considérablement notre compréhension de la diversité génétique de *C. tropicalis* provenant de différentes zones géographiques et, par conséquent, l'épidémiologie moléculaire globale de cet important pathogène fongique humain est, à l'heure actuelle, largement inconnue.

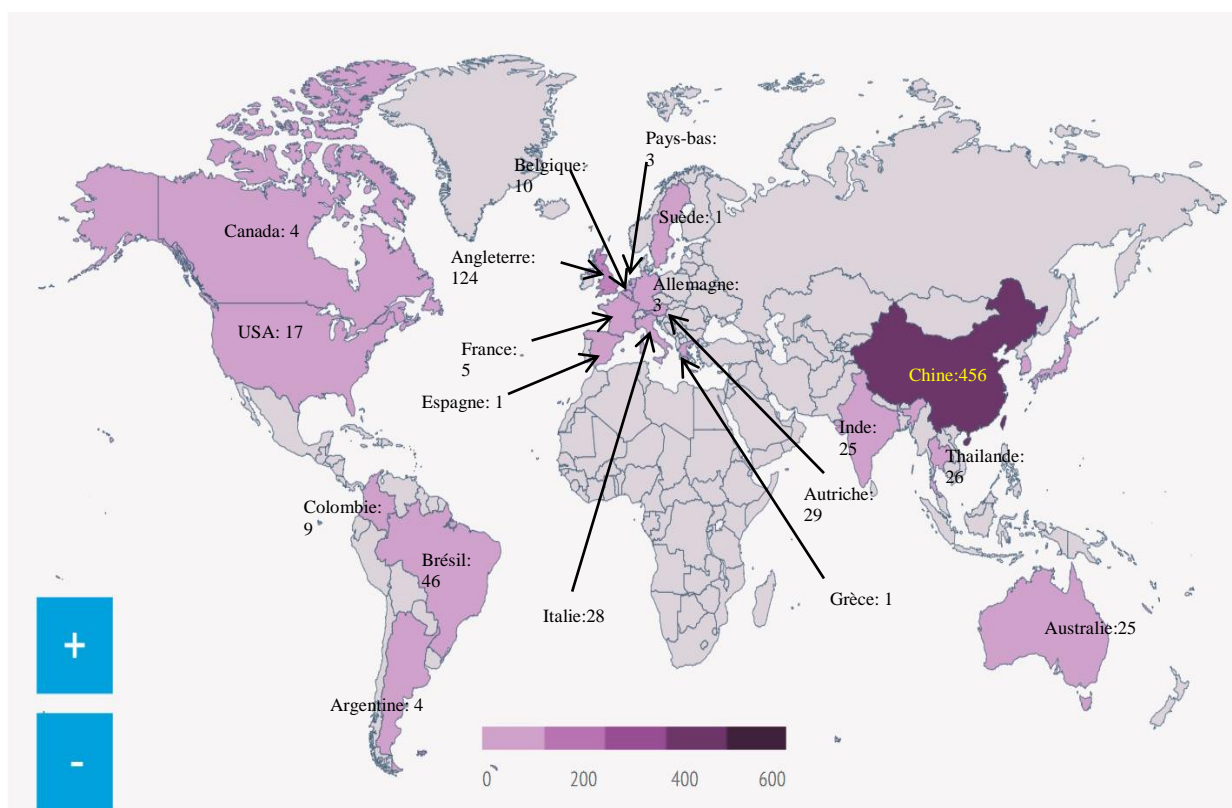


Figure 10 : Source des isolats de *Candida tropicalis* soumis à la base de données avant la présente étude. <https://pubmlst.org/organisms/candida-tropicalis>

I.5. Facteurs de virulence chez *Candida tropicalis*

I.5.1. Généralités

La pathogénicité de *C. tropicalis* est liée à sa capacité à produire diverses substances et enzymes. Parmi lesquelles les enzymes hydrolytiques (aspartyl protéinases ou SAPs, phospholipases, lipases, estérases) et protéolytiques. Elle produit également les invasines et

adhésines qui permettent respectivement l'internalisation des cellules par endocytose et l'adhésion des cellules entre elles et à des surfaces. Plusieurs de ces facteurs, complémentaires participent à la formation d'un des plus importants d'entre eux : le biofilm.

I.5.2. Les biofilms

Les biofilms sont des structures complexes constituées de microorganismes et d'une matrice extra-cellulaire auto-induite. Ils constituent des communautés de micro-organismes enchâssés dans une matrice extracellulaire, qui confèrent une résistance importante aux traitements antifongiques et augmentent les réponses immunitaires de l'hôte (**Rodrigues et al., 2015**). Ces communautés peuvent se former sur des surfaces biotiques (les muqueuses ...) ou abiotiques (les cathéters). En fait, les *Candida sp.* sont souvent reconnus comme étant à l'origine des candidémies dont le taux de mortalité est proche de 40%. Ces infections sont généralement liées à la formation d'un biofilm à la surface des dispositifs médicaux (cathéters, prothèses) et la contamination de ces derniers pouvant provenir de la peau du patient, des mains des professionnels de santé. Plus rarement, si les *Candida sp.* qui colonisent le tractus gastro-intestinal en tant que commensaux commencent à développer un comportement pathogène, ils sont capables d'infiltrer la muqueuse intestinale et de diffuser dans la circulation sanguine (**Chandra et Mukherjee 2015 ; Falagas et al., 2010**).

I.5.2.1. Morphologie et architecture du biofilm de *Candida tropicalis*

Tout comme le biofilm des autres espèces de *Candida*, le biofilm de *C. tropicalis* est constitué de cellules fongiques entourées d'une matrice extracellulaire riche en polysaccharides. Un biofilm mature est constitué ou non d'un réseau dense de cellules sous forme de levures, d'hyphes ou de pseudo-hyphes (selon l'espèce de *Candida*) avec des canaux d'eau entre les cellules permettant la diffusion des nutriments de l'environnement vers les couches inférieures et également l'élimination des déchets (**Chandra et al., 2001**). Autrement dit, l'architecture finale du biofilm est variable et dépend en partie des espèces de *Candida* impliquées, des conditions de croissance et du substrat sur lequel il se forme (**Rodrigues et al., 2019**).

I.5.2.2. Processus de développement du biofilm chez *Candida tropicalis*

Le développement du biofilm (Figure 11) peut être expliqué en quatre étapes chronologiques :

- **L'adhésion** : la formation du biofilm débute par l'adhésion de cellules planctoniques à une surface. Elle est assez précoce et dure environ 1 à 3 h ;

- **L'initiation et la croissance** : une fois les levures liées à la surface d'adhésion de façon irréversible, l'initiation se déroule. Puis, il y a prolifération et formation d'une couche basale avec ancrage cellulaire. Cette phase dure environ 4 à 10 h. Elle va consister en une multiplication plus active des levures et une accélération de la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire.
- **La maturation du biofilm** : cette phase dure environ 20 à 48 h. La maturation va se traduire par une complexification de la structure du biofilm, avec accumulation des couches de cellules de différentes formes, aussi bien levures que des hyphes et pseudohyphes, le tout encadré dans la matrice extracellulaire auto-induite. Le biofilm va augmenter en épaisseur tout en se remodelant en permanence en fonction des conditions du milieu. Cette phase va également être marquée par d'importantes modifications phénotypiques.
- **Le détachement et la dispersion** : ce processus participe à la réorganisation permanente du biofilm (lui permettant de s'adapter aux conditions du milieu) et permet également aux cellules les plus superficielles de quitter le biofilm et coloniser les zones entourant la surface après 24 h. Ce détachement consiste en une réduction globale de la masse totale du biofilm. Il peut s'agir de phénomènes passifs (érosion ou relargage qui correspond au détachement de cellules individuelles ou d'une faible portion de biofilm) ou de phénomènes actifs (qui correspond à l'activation de mécanismes génétiques de régulation du biofilm avec départ d'une ou de plusieurs cellules qui reviennent en mode planctonique) (Rasigade, 2012; Chandra et Mukherjee, 2015).

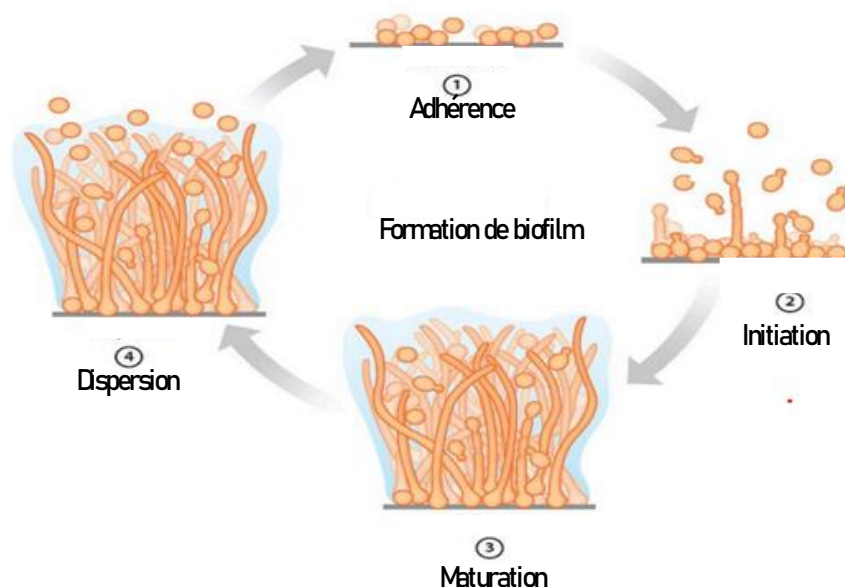


Figure 11 : Développement du biofilm de *Candida* à une surface. 1 : adhérence des levures sur une surface ; 2 : initiation et croissance des cellules ; 3 : maturation du biofilm ; 4 : détachement et dispersion (**Pires et al., 2011**).

I.6. Traitement des infections à *Candida tropicalis* et résistance au traitement

I.6.1. Traitement des infections à *Candida tropicalis*

Malgré la recherche permanente de nouvelles molécules à activités antifongiques, les cibles cellulaires disponibles pour lutter contre ces infections fongiques sont relativement limitées, puisque seules cinq classes de molécules agissant sur trois mécanismes cellulaires distincts, sont utilisées aujourd'hui en clinique (**Vandepute et al., 2012**).

I.6.1.1 Les polyènes

Les polyènes sont des antifongiques naturels produits à partir d'extraits de cultures d'actinomycètes du genre *Streptomyces*. Leur structure est caractérisée par un nombre variable de doubles liaisons conjuguées CH=CH. Les polyènes ont pour cible l'ergostérol. Ils forment avec ce dernier des complexes insolubles, ce qui perturbe la structure de la membrane plasmique du champignon. Il en résulte une fuite des composés intracellulaires notamment des cations tels du potassium, du magnésium et du sucre et permet l'entrée de sodium entraînant la mort de la cellule (**Chabasse et al., 2006**). Cette classe comprend deux molécules principales : L'amphotéricine B et la nystatine.

L'amphotéricine B (AmB) : c'est un polyène macrolide isolé de *Streptomyces nodosus* au début des années 1950 et commercialisé sous le nom de Fungizone®. L'AmB existe sous forme de gélules, de suspension buvable et de lotion pour la voie locale. À faible dose, l'effet est fongistatique car seules de petites molécules et des ions quittent la cellule et les dommages sont réparables. À forte dose, de grosses molécules sont perdues, entraînant la mort de la cellule. En plus de son effet fongicide, l'Amphotéricine B inhibe à faible concentration l'adhésion de *C. albicans* sur l'épithélium buccal ainsi que la formation de tube germinatif (**Abu-El et al., 1989**).

La nystatine : ce polyène a été isolé de *Streptomyces noursei* dans les années 1950 et commercialisé sous le nom de Mycostatine®. La nystatine existe sous forme de comprimé et de suspension buvable. Elle n'est utilisée que par voie orale en raison de sa forte toxicité par voie parentérale. Cette molécule est la plus utilisée pour le traitement des candidoses superficielles (**Abu-El et al., 1989**).

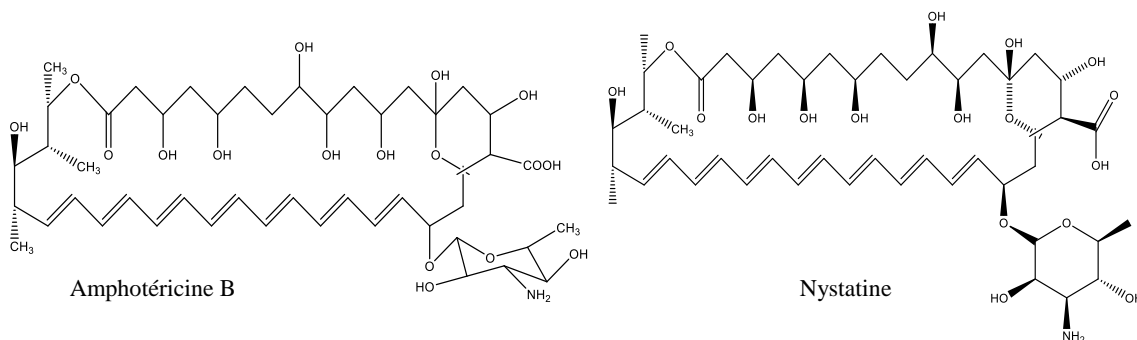


Figure 12: Structures des polyènes (Vandeputte *et al.*, 2012)

Les polyènes ne sont résorbés ni dans le tube digestif encore moins à travers la peau ou les muqueuses, d'où leur intérêt dans la prise en charge des mycoses cutanées et muqueuses. De plus, si l'amphotéricine B possède une forte affinité pour l'ergostérol, c'est également le cas pour certains stérols de mammifères comme le cholestérol entraînant ainsi une certaine cytotoxicité, particulièrement la néphrotoxicité qui est l'effet indésirable majeur (Chabasse *et al.*, 2006).

I.6.1.2. Les azolés

Les azolés perturbent la synthèse de l'ergostérol en inhibant la déméthylation du C-14 du lanostérol. Ceci provoque une baisse de la quantité d'ergostérol ainsi que l'accumulation de stérols aberrants et toxiques dans la membrane cellulaire. Ce sont des substances synthétiques classées en deux groupes : les imidazolés dont le noyau azolé contient deux atomes d'azote et les triazolés dont le noyau contient trois atomes d'azote (Masia *et Gutierrez*, 2002 ; Vazquez *et Sobel*, 2002).

À l'heure actuelle, les antifongiques imidazolés (deux atomes d'azotes) représentent un réel succès du fait de leur efficacité sur tous les types de mycoses superficielles et de leur innocuité (Vazquez *et Sobel*, 2002). On peut citer :

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

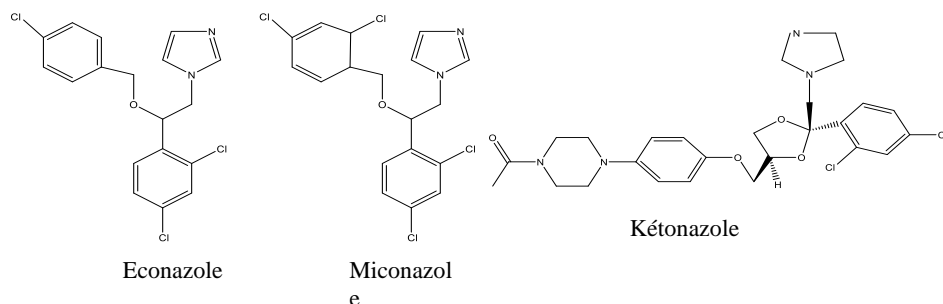


Figure 13 : Structures des imidazolés (Warrilow *et al.*, 2010)

Les antifongiques triazolés possèdent trois atomes d'azotes et sont également un réel succès pour les mêmes raisons que les imidazolés (Masia et Gutierrez, 2002 ; Vazquez et Sobel, 2002). On peut citer :

- **Le fluconazole** : principe actif de Triflucan® (gélule, suspension injectable, poudre orale) ;
- **L'itraconazole** : principe actif de Sporanox®. Il est issu de modifications structurales du fluconazole (substitution d'un cycle triazolé par une fluoropyrimidine, ajout d'un radical méthyl) et présente une meilleure affinité pour la 14- α déméthylase ;
- **Le posaconazole** : principe actif de Noxafil® (suspension buvable, réservé à l'usage hospitalier) ;
- **Le voriconazole** : principe actif de Vfend® (comprimé, poudre injectable, poudre orale suspension buvable).

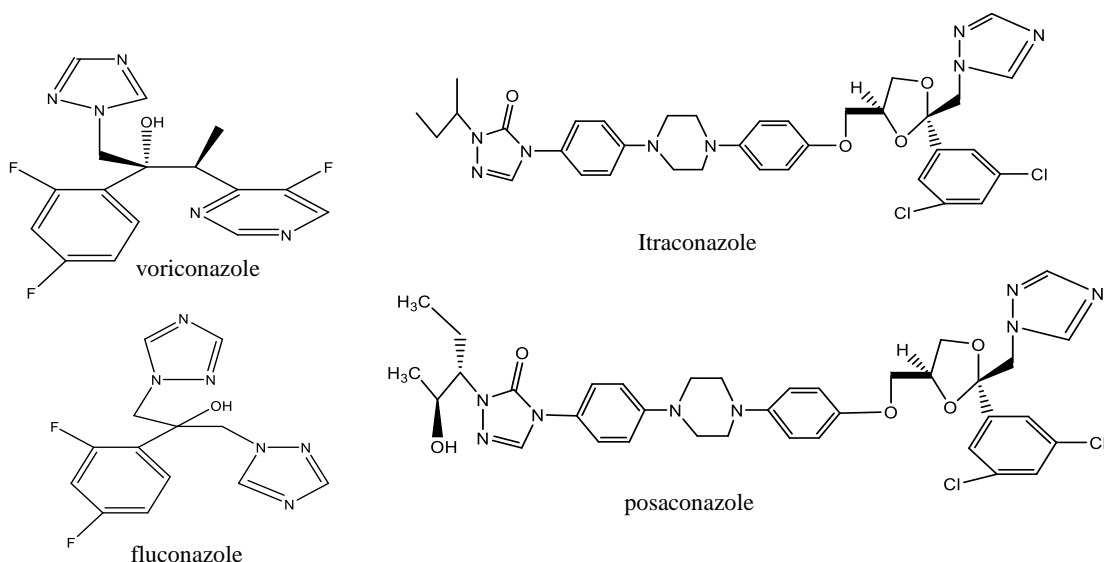


Figure 14 : Structures des triazolés de première génération (Vandeputte *et al.*, 2012).

In vitro, les antifongiques de la famille des azolés présentent un large spectre d'activité et sont actifs sur la plupart des levures du genre *Candida* (Pfaller *et al.*, 2004). La toxicité sélective des azolés est due à leur affinité sélective pour les cytochromes P-450 des mammifères au détriment des cytochromes P-450 fongiques (Lesse, 1995). Les effets indésirables touchent près de la moitié des patients. Ces effets se manifestent par des symptômes gastro-intestinaux (diarrhée, nausées, vomissements, douleurs abdominales, flatulences), l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité, des réactions cutanées (syndromes de Lyell et de Stevens-Johnson), des céphalées, des troubles hépatiques, hématologiques ainsi que des troubles cardiaques et de torsades de pointes sont les plus fréquents.

I.6.1.3. Les échinocandines

Les échinocandines sont des métabolites lipopeptidiques formés par fermentation de différents champignons comme *Zalerion arboricola* ou *Aspergillus nidulans var. echinulatus* (Nyfeler et Keller, 1974). Ils agissent par inhibition de la β (1,3) glucane synthétase, enzyme impliquée dans la synthèse des glucanes, un des composants structuraux responsables du maintien de l'intégrité et de la rigidité de la paroi fongique. Le blocage de la β (1,3) glucane synthétase entraîne une fragilisation de la paroi qui se traduit par une fuite des composants intracellulaires, aboutissant à la lyse de la cellule fongique (Stone *et al.*, 2002). Cette enzyme est présente chez de nombreux pathogènes comme les *Candida* et les *Aspergillus*, mais est absente chez les mammifères ce qui explique sa faible toxicité pour l'Homme. La déplétion en glucane fragilise la paroi et aboutit à une instabilité osmotique qui mène à la mort cellulaire (Onishi *et al.*, 2000 ; Denning, 2003). La famille des échinocandines comprend trois substances :

- **La caspofungine** : principe actif de Cancidas® (injectable), uniquement disponible par voie intra-veineuse pour le traitement des candidoses systémiques ;
- **L'anidulafungine** : commercialisée sous le nom d'Ecalta® (injectable) ;
- **La micafungine** : principe actif de Mycamine® (injectable).

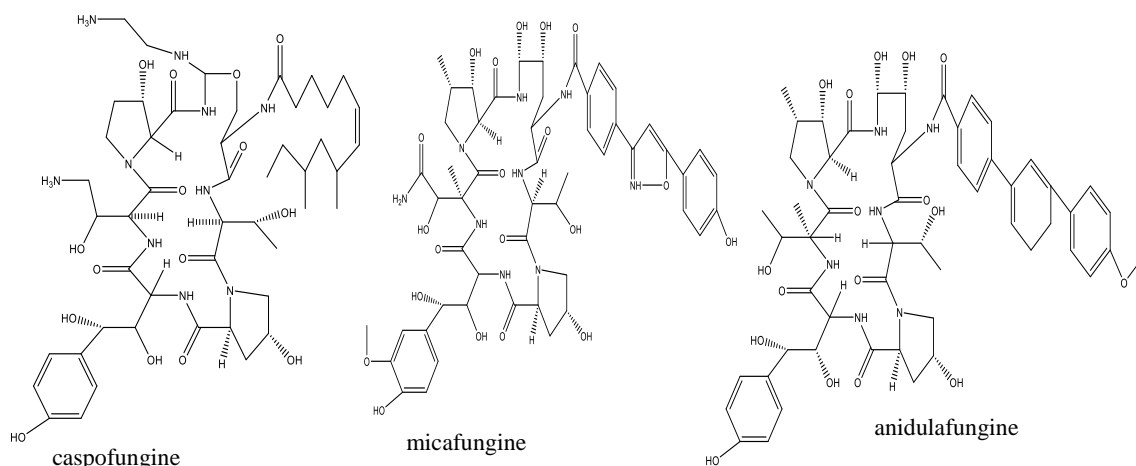


Figure 15 : Structures des échinocandines selon **Denning (2003)**.

En raison de leur haut poids moléculaire, ces molécules sont très peu absorbées par voie orale et sont uniquement utilisées par voie intraveineuse. Ces médicaments ont un large spectre d'activité et leur principal inconvénient est leur coût élevé.

I.6.1.4. Les pyrimidines

Les pyrimidines sont synthétisées pour la première fois en 1957 par **Duschinsky et al., (1957)**, à des fins antitumorales. La 5-fluorocytosine ou 5-FC est un dérivé fluoré de la pyrimidine qui présente une activité inhibitrice contre les levures (*Candida* et *Cryptococcus*). Les cellules des agents pathogènes sensibles sont capables de fixer la 5-FC (bien tolérée) et de la désaminer en 5-fluorouracile (5-FU) toxique grâce à une cytosine désaminase spécifique et absente chez les mammifères. La Flucytosine interfère avec le métabolisme des pyrimidines de l'ARN et la synthèse protéique de la cellule fongique. Elle y pénètre à l'aide d'une perméase, puis est convertie en 5-Fluorouracyl (5-FU) par la cytosine déaminase. La 5-FU est à son tour convertie en acide 5-Fluorouridylique par l'UMP pyrophosphorylase, aboutissant à l'arrêt de la synthèse protéique. La résistance à la 5-FC serait due au blocage de la formation de l'acide 5-Fluorouridylique par perte de l'activité de la cytosine déaminase (**Ghannoun et Rice, 1999**).

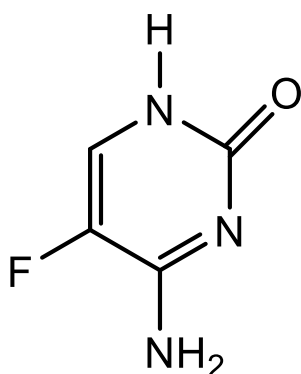


Figure 16 : Structure de la 5-Fluorocytosine (**Cannon et al., 2007**).

Malgré sa bonne tolérance, ses propriétés pharmacocinétiques et son spectre étendu, la 5-FC est de moins en moins utilisée en mycologie médicale en raison de la survenue fréquente de résistance chez les champignons pathogènes. Ainsi, à quelques exceptions près, la 5-FC n'est jamais utilisée en monothérapie, mais toujours en association avec un autre antifongique, le plus souvent l'amphotéricine B (Vermes *et al.*, 2000). Cependant, compte-tenu de la forte toxicité rénale et hépatique de l'amphotéricine B, qui potentialise la toxicité hépatique de la 5-FC, cette dernière est aujourd'hui de plus en plus fréquemment associée à des antifongiques azolés.

La 5-FC possède un spectre d'activité étendu et est disponible uniquement en solution pour perfusion (Ancotil®). Son utilisation est limitée au cas de candidoses invasives. Les effets secondaires sont nombreux et parfois graves (arrêt cardiaque, dyspnée, hémorragie gastro-intestinale, atteinte hépatique, agranulocytose, etc...) (Vicente *et al.*, 2003).

I.6.1.5 Les allylamines

La famille des allylamines comporte essentiellement comme molécule, la terbinafine et la naftifine à usage systémique et topique. Le mode d'action des allylamines repose sur l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol par un mécanisme distinct de celui des azolés qui implique l'inhibition de la squalène époxydase.

La terbinafine à usage topique est commercialisée sous le nom de Lamisil® crème à 1%, solution pour pulvérisation cutanée à 1% et Lamisil dermgel® gel à 1%.

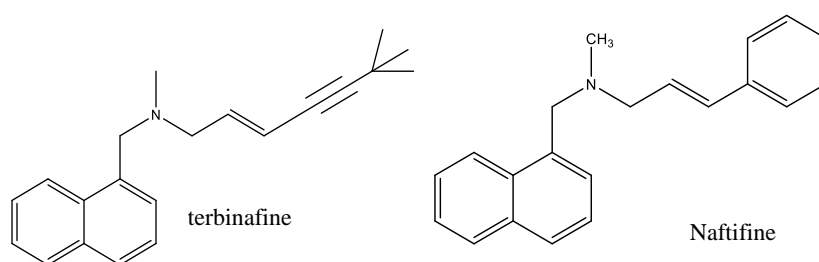


Figure 17 : Structures des allylamines (Chambard, 2009)

Ses effets indésirables se limitent à de rares réactions locales d'intolérance, et elle n'est contre-indiquée que dans le cas d'une hypersensibilité à l'un des composants du produit.

La prise en charge des infections cutanéomuqueuses via l'utilisation des médicaments appartenant à ces familles d'antifongique fait face aujourd'hui à de nombreuses difficultés dont l'émergence et la propagation des espèces résistantes à certains antifongiques.

La palette de molécules antifongiques reste limitée. De plus, l'emploi intempestif ou non conforme de ces médicaments se solde par une émergence de souches résistantes (**Feuilhade de Chauvin et al., 2001**).

I.6.2. Résistance de *Candida tropicalis* aux antifongiques

I.6.2.1. Définition du concept de la résistance

La mauvaise utilisation des molécules antifongiques a malheureusement conduit à une augmentation de l'incidence des résistances aux antifongiques. La résistance d'un pathogène à une substance antimicrobienne pouvant se définir comme sa capacité à survivre en présence de cette substance antimicrobienne (**Dismukes, 2000**). Deux types de résistance sont généralement distingués :

- **La résistance primaire ou résistance naturelle** : elle se rencontre chez certaines espèces fongiques qui sont insensibles à un antifongique donné, ou tout au moins pour lesquelles les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'antifongiques sont supérieures aux concentrations utilisables en thérapie. Ce type de résistance est un caractère d'espèce exprimé par tous les individus constituant l'espèce. L'un des exemples le plus connu est sans doute la résistance primaire de la levure *Candida krusei* vis-à-vis du fluconazole (**Fukuoka et al., 2003**).

- **La résistance secondaire ou résistance acquise** : elle se développe chez des champignons qui appartiennent à une espèce à priori sensible. Cette résistance est la conséquence d'un événement qui a eu lieu préalablement ou pendant le traitement antifongique. C'est un caractère de souche, qui n'affecte que de rares individus au sein de l'espèce et qui ne leur confère un avantage sélectif que lorsqu'ils sont exposés à l'antifongique (**Accoceberry et Noël, 2006**).

I.6.2.2. Différents mécanismes de résistances développés par *Candida tropicalis*

Les *Candida* ont acquis divers mécanismes de résistance aux antifongiques (Figure 19) :

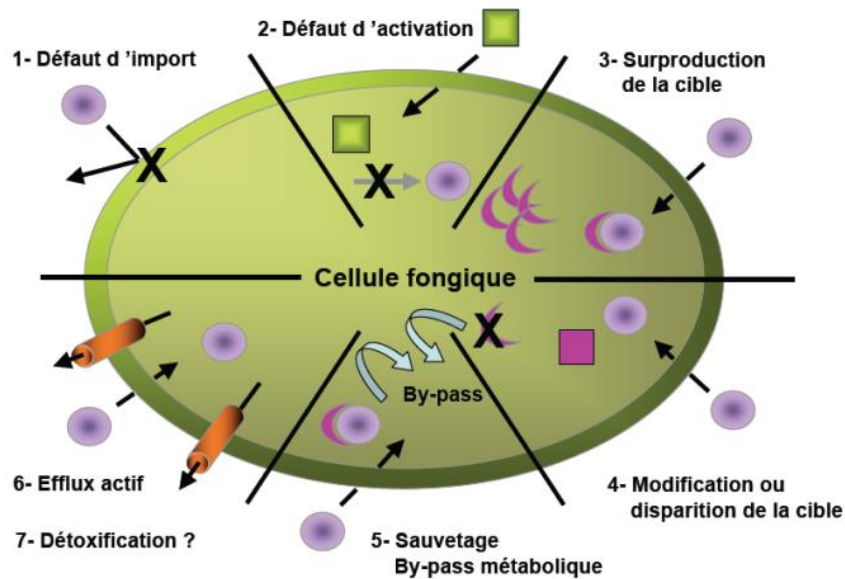


Figure 18 : Mécanismes cellulaires de résistance aux antifongiques (El-Kirat-Chatel, 2010)

- **Défaut de transport ou de pénétration de l'antifongique à l'intérieur de la cellule fongique**

La surexpression des gènes des transporteurs des azolés dans la cellule provoque une baisse de concentration intracellulaire des azolés ; la cellule continue donc de synthétiser l'ergostérol et de croître malgré une concentration élevée en azolés. Ces transporteurs sont appelés ABC (*ATP-Binding Cassette*) transporteurs codés par les gènes CDR1 et CDR2 (*Candida Drug Resistance*) et les transporteurs MFS (*Major Facilitator Superfamily*) codés par les gènes MDR1 et FLU1. Les ABC transporteurs ne sont pas spécifiques et peuvent transporter tous les azolés mais aussi d'autres antifongiques et d'autres composés toxiques. Le transporteur de type MFS est spécifique du fluconazole.

- **Défaut d'activation de l'antifongique en forme active toxique**

Des mutations au niveau des gènes nécessaires au métabolisme de la 5-FC, comme celui de la cytosine désaminase (*FCY1*) et de l'uracile phosphoribosyl transférase (*FUR1*), empêchent sa transformation en 5-FU et confèrent à la levure une résistance totale à la 5-FC (Papon, 2007).

- **Surproduction de la cible cellulaire de l'antifongique**

La surexpression du gène ERG11, par duplication chromosomique ou modification du promoteur, comme l'augmentation de la demi-vie des ARNm, peut aboutir à la résistance. C'est le cas de la résistance aux azolés ou on assiste à une multiplication du nombre de copies de la 14 α

déméthylase. Ainsi, les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanostérol en stérol 14 α déméthylé (Vandeputte, 2008).

▪ **Modification de la cible cellulaire conduisant à la diminution de son affinité pour l'antifongique**

Les modifications membranaires entrent en jeu pour les résistances aux polyènes. En effet, elles sont principalement associées à une altération des lipides membranaires et particulièrement des stérols empêchant la liaison des polyènes et la formation des pores dans la membrane. Il peut aussi avoir mutations ponctuelles du gène *ERG11* pouvant se traduire par la substitution d'acides aminés importants pour la structure tridimensionnelle de la protéine et conduire à la diminution de l'affinité de la protéine pour l'antifongique azolé (Sanglard, 2002).

▪ **Disparition de la cible et son remplacement par le recrutement ou le détournement d'un autre métabolite**

Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la résistance à l'amphotéricine B. Dans un premier temps, la voie de biosynthèse de l'ergostérol serait bloquée afin de soustraire la cible à l'action de l'antifongique. Dans un deuxième temps, l'ergostérol serait remplacé dans les membranes par d'autres stérols viables (Sabra, 2013).

▪ **Utilisation des By pass**

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

▪ **Efflux actif de l'antifongique**

Les protéines d'efflux sont des transporteurs membranaires très ubiquitaires qui ont pour rôle de rejeter en dehors des cellules une grande variété de substances. Les pompes à efflux codées par les gènes de la famille CDR (*Candida Drug Resistance*) confèrent une résistance croisée aux azolés alors que celles codées par les gènes de la famille MDR (*Multidrug Resistance*) confèrent une résistance au seul fluconazole (Ghannoum et Rice, 1999). Le mécanisme d'efflux par la surproduction des transporteurs concerne 85% des isolats résistants et les ABC transporteurs codés par CDR1 et CDR2 sont deux fois plus souvent surproduits que les

transporteurs de type MFS. Les mutations et la surexpression du gène ERG11P concernent respectivement 75% et 35% des isolats résistants.

I.6.2.3. Détection des résistances : Détermination *in vitro* de la sensibilité aux antifongiques

De nombreuses techniques de détermination *in vitro* de la sensibilité des champignons aux antifongiques existent et constituent les méthodes de référence (Pihet et Marot, 2013 ; Pfaller *et al.*, 2014).

Tableau I : Différentes techniques de détermination *in vitro* de la sensibilité d'antifongique

Technique	Principe	Avantages	Inconvénients
CLSI/EUCAST	Microdilution en milieu liquide	Méthode de référence	Lourdes et non adaptées en routine
CLSI	Diffusion en gélose (disques)	Méthode de référence	Lourdes et non adaptées en routine
Sensititre Yeast One	Microdilution liquide colorimétrique	Commercialisée	Kit
E-test	Diffusion en gélose	Commercialisée,	Coût élevé et la lecture n'est pas toujours aisée
VITEK2	Microdilution semi liquide (Carte AST-YS06)	Automatisé standardisé Rapide	Levure + Filamenteux -

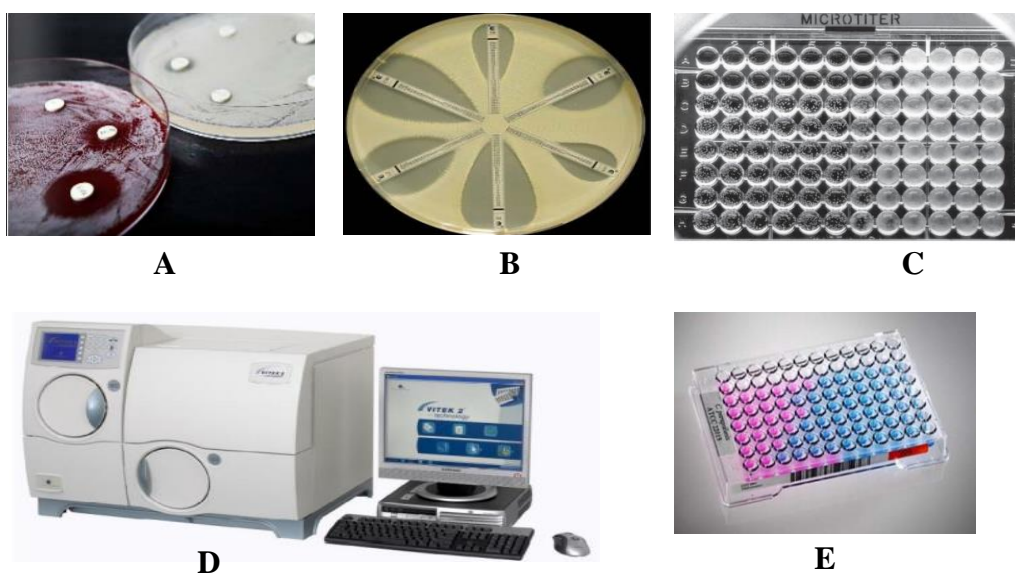


Figure 19 : Différentes techniques de détermination *in vitro* de la sensibilité d'antifongique ;

A) CLSI sur milieu solide ; B) E-test ; C) CLSI milieu liquide ; D) VITEK ; E) Sensititre yeast One.

➤ **La notion de *clinical breakpoints* (CBP)**

Dans la recherche d'un traitement efficace contre les infections à *C. tropicalis*, des *clinical breakpoints* (CBP) ont été développés pour certains antifongiques.

Le CBP fait référence à une concentration choisie (mg/L) d'un antifongique qui définit si une espèce fongique est sensible ou résistante à un antifongique. Il classe les isolats en : sensibles (le médicament est un traitement approprié), résistants (le médicament n'est pas recommandé comme traitement) et intermédiaires (le médicament peut être un traitement approprié, selon certaines conditions) (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015). Les CBP spécifiques pour les microdilutions en milieu liquide de *C. tropicalis* ont été établis pour certains antifongiques comme l'amphotéricine B, les triazolés et les échinocandines, utiles pour alerter sur la possibilité d'une résistance intrinsèque ou acquise (Pfaller *et al.*, 2012 ; Carvalhaes, 2019).

➤ **La notion d'*epidemiological cutoff values* (ECV)**

Les *epidemiological cutoff values* (ECV) sont des valeurs de la CMI qui séparent les populations en celles qui présentent ou non des traits de résistance intrinsèques ou acquis. Il pourrait être utilisé dans l'identification des isolats qui sont moins susceptibles de répondre à la thérapie en raison de mécanismes de résistance acquis lorsque des données cliniques limitées entravent le développement des CBP. Grâce aux ECV, les souches sans CBP établies peuvent être différenciées en souches de type sauvage (TS) et en souches de type non sauvage (TNS). Les souches de type sauvage sont des souches dépourvues de mécanismes de résistance mutationnels ou acquis, tandis que les souches de type non sauvage sont celles qui présentent une résistance aux mécanismes de résistance mutationnels ou acquis (Pfaller *et al.*, 2012 ; Carvalhaes, 2019). En d'autres termes, les ECV permettent de détecter les souches susceptibles d'héberger des mécanismes de résistance aux antifongiques, en particulier lorsque les CBP font défaut (Carvalhaes, 2019). Les CBP du CLSI et de l'EUCAST et les ECVs sont actuellement en accord. Les points d'arrêt de *C. tropicalis* pour certains agents antifongiques dans les deux normes, peuvent être vus dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II : *Candida tropicalis* clinical breakpoints et epidemiological cutoff values de certains antifongiques (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015 ; CLSI, 2017).

Antifongiques	Standard	CBP		ECV	
		S \leq	R $>$	TS \leq	TNS $>$
Amphotericin B	EUCAST	1	1	≤ 2	> 2
	CLSI	-	-		
Anidulafungine	EUCAST	0,06	0,06	-	-
	CLSI	0,25	0,5		
Caspofungine	EUCAST	-	-	-	-
	CLSI	0,25	0,5		
Fluconazole	EUCAST	2	4	-	-
	CLSI	2	4		
Micafungine	EUCAST	-	-	-	-
	CLSI	0,25	0,5		
Posaconazole	EUCAST	0,06	0,06	$\leq 0,12$	$> 0,12$
	CLSI	-	-		
Voriconazole	EUCAST	0,125	0,125	-	-
	CLSI	0,125	0,5		
Itraconazole	EUCAST	0,12	0,12	$\leq 0,5$	$> 0,5$
	CLSI	0,125	0,5		

CBP : clinical breakpoints, **ECV** : epidemiological cutoff values, **S** : sensible, **R**: resistant, - : pas de valeur; **TS** : type sauvage ; **TNS**: type non sauvage.

I.6.2.4. Prévalence des résistances chez *Candida tropicalis*

L'utilisation croissante et intensive des antifongiques dans la prévention et le traitement des infections à *Candida sp.* au cours de ces deux dernières décennies a conduit à l'émergence de souches résistantes. Le lien entre utilisation des antifongiques et l'apparition des résistances a été suggéré dans de nombreuses études. Même après plus de 40 ans d'utilisation clinique, la résistance acquise à l'AmB reste exceptionnelle. Cette observation est tout d'abord la conséquence directe du mode d'action de cet antifongique, sa cible extracellulaire limitant le nombre de mécanismes permettant d'échapper à leur action. De rares cas de résistances acquises ont été rapportés chez *C. tropicalis*, et autres *Candida sp* (*C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*) (Granier, 2003). Tout comme l'AmB, la résistance aux échinocandines est relativement rare chez *C. tropicalis* ; néanmoins, leurs effets secondaires sont nombreux. La proportion d'isolats sensibles est estimée à plus de 99%. Par contre, la résistance à la 5-FC est relativement fréquente. Ainsi, la proportion de souches du genre *Candida* résistantes est estimée à 7-8% et ce taux passe à 22% pour les *Candida* non *albicans* parmi lesquels *C. tropicalis* (Ripert, 2013). De ce fait, la 5-FC n'est pas utilisée en

monothérapie au cours des infections sévères, elle est indiquée uniquement en association avec un autre antifongique, le plus souvent l'AmB car leur association est synergique (**Granier, 2003 ; Vermes et al., 2000**). Le début des années 1990 s'est accompagné d'une augmentation considérable du nombre d'isolats cliniques résistants aux azolés. De même, si le profil des espèces rencontrées s'est modifié depuis ces vingt dernières années, c'est en partie en raison de l'utilisation croissante des antifongiques azolés et de la sélection des espèces qui leurs sont le moins sensibles, ou ayant la plus forte propension à développer une résistance à cette classe d'antifongiques (**Sanglard, 2002**).

Ces phénomènes de résistance aux antifongiques qui s'ajoutent aux effets secondaires indésirés associés à ces derniers entraînent l'accroissement des infections fongiques, notamment celles qui sont dues à la prolifération du genre *Candida* parmi les personnes à risque. D'où l'intérêt de la recherche d'une thérapie alternative pour le traitement et la prise en charge de ces infections par de nouvelles substances antifongiques efficaces.

I.7. Extraits de champignons endophytes de *Azadirachta indica* comme alternative aux antifongiques usuels

I.7.1. Généralités sur les champignons endophytes

Le terme "endophyte" est dérivé d'une combinaison de deux mots : « endo » qui signifie "dans" et « phyte » qui signifie "plante". Les champignons endophytes sont des micro-organismes qui habitent les espaces interstitiels des plantes ou qui se trouvent dans les tissus végétaux formant une association symbiotique avec la plante sans causer d'effet néfaste aux espèces hôtes (**Strobel et Daisy, 2003**). Les champignons endophytes sont des sources prometteuses et abondantes d'une vaste gamme de produits naturels bénéfiques ayant des structures chimiques variées, des biodiversités plus élevées et de nombreuses bioactivités fascinantes. Il est évident que les champignons endophytes ont maintenant été identifiés comme un réservoir de métabolites secondaires bioactifs tels que des antibiotiques nouveaux et uniques, des composés antidiabétiques, anticancéreux, antioxydants et immunomodulateurs (**Khan et al., 2019; Toghueo et Boyom, 2020**). Plusieurs études sur les populations de champignons endophytes des plantes médicinales camerounaises ont confirmé les énormes potentiels qui abondent dans ces organismes en tant que sources de nouvelles molécules bioactives. Une fois la plante colonisée par les champignons endophytes, ceux-ci doivent assurer leur pérennité par différents mécanismes de transmission.

I.7.2. Transmission des champignons endophytes

La transmission des champignons endophytes chez les plantes peut être horizontale ou verticale.

- **La transmission horizontale** nécessite la production de spores externes et leur dispersion dans l'air pour coloniser d'autres plantes. Les spores sont transportées d'une plante à une autre. Ce mode de transmission peut être favorisé par l'action du vent, des insectes phytophages. Ceux-ci sont chargés de la dissémination des spores. En outre, les spores endophytes de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et d'autres taxons non spécifiques sont omniprésentes dans l'atmosphère, sporulent lorsque le tissu hôte se sénescence et meurt. Ce mode semble être le mécanisme prédominant de dispersion des champignons endophytes (**González-Coloma et al., 2016**).
- **La transmission verticale** a lieu lorsque la semence ou la graine est infectée par l'endophyte puis transmise à la plante. Ces graines donneront par la suite naissance à des plantes infectées asymptomatiques (**González-Coloma et al., 2016**). La vie des champignons endophytes au sein des plantes hôtes implique une interaction avec ceux-ci.

I.7.3. Interaction champignons endophytes-plantes hôtes

Les plantes et les endophytes sont en interaction continue dans leur existence symbiotique. Leur métabolisme peut interagir à de nombreux niveaux : (a) l'endophyte induit le métabolisme de l'hôte, (b) l'hôte induit le métabolisme de l'endophyte, (c) l'hôte et l'endophyte partagent des parties d'une voie spécifique et y contribuent partiellement, (d) l'hôte peut métaboliser les produits de l'endophyte et vice versa, (e) l'endophyte peut métaboliser des composés secondaires de l'hôte. On pense que dans de nombreux cas, les microbes fonctionnent comme une défense biologique pour la plante contre les phytopathogènes étrangers, car la majorité des métabolites secondaires présents dans les microorganismes endophytes ont une activité antimicrobienne et ont été impliqués dans la protection de la plante hôte (**Ludwig-Müller, 2015**). Le mécanisme de protection des endophytes s'exerce directement, en libérant des métabolites pour attaquer tout antagoniste ou lyser les cellules affectées et indirectement, en induisant des mécanismes de défense de l'hôte ou en favorisant sa croissance. Des antibiotiques ou des enzymes hydrolytiques peuvent être libérés par les endophytes pour empêcher la colonisation des plantes par des agents pathogènes microbiens (**Chutulo et Chalannavar, 2018**).

La possibilité d'obtenir de nouveaux composés bioactifs à partir des endophytes dépend de plusieurs facteurs ; par exemple, l'état de la culture, le type de tissu et l'âge de l'hôte, le degré d'interaction des endophytes avec leurs photobiontes dans la nature, la base génétique

des mycobiontes et des photobiontes. La plupart de ces facteurs mis à part, en modifiant les conditions de culture, différents chercheurs font état de nouveaux isolats endophytes et de nouveaux composés bioactifs dans des études récentes. Cela signifie que l'exploitation des endophytes se poursuit, même à partir des hôtes largement exploités (**Chutulo et Chalannavar, 2018**).

I.7.4. Métabolites secondaires isolés des champignons endophytes

Les métabolites antimicrobiens peuvent être définis comme des substances naturelles organiques de faibles poids moléculaire et actives à faibles concentration contre les microorganismes (**Yu et al., 2010**). De nombreuses études ont montré un grand nombre de composés antimicrobiens isolés des champignons endophytes appartenant à plusieurs classes structurales de métabolites secondaires à savoir les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes, les isocoumarines, les quinones, les flavonoïdes et les composés organiques volatiles dont plusieurs d'entre eux se sont révélés prometteurs par leurs potentiel antifongiques (**Yu et al., 2010**).

La cryptocine et la cryptocandine A sont des métabolites antifongiques obtenus du champignon endophyte *Cryptosporiopsis quercina*. La cryptocandine a démontré une bonne activité antifongique contre certains pathogènes du genre humain tels que *Candida albicans* et *Trichophyton* spp. De plus, les composés dérivés de la cryptocandine A sont actuellement utilisés dans le traitement de nombreuses infections fongiques au niveau de la peau et des ongles (**Strobel et Daisy, 2003**). L'acide ambuique, le pestalosite et les pestalotiopsines A et B isolés de *Pestalotiopsis microspora* ont montré une activité antifongique (**Li et al., 2008**).

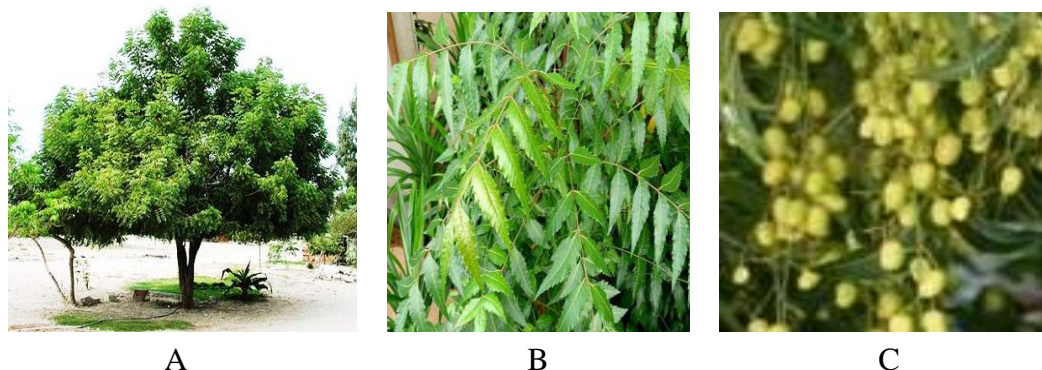
I.7.5. Généralités sur *Azadirachta indica*

Plante de la famille des Meliaceae, et communément appelée Neem, *Azadirachta indica* est un arbre originaire de l'Inde et de l'Afrique, que l'on trouve dans les régions tropicales du monde (**Nnanna et al., 2018**).

I.7.5.1. Description botanique

Azadirachta indica est un arbre feuillu à feuilles persistantes qui peut atteindre une hauteur de 30 mètres avec un tronc de 2,5 mètres de diamètre et qui peut vivre plus de deux siècles. Son système racinaire profond est bien adapté pour récupérer l'eau et les nutriments présents dans le sol. Le neem prospère dans les climats chauds et secs (températures moyennes annuelles de 21-32°C) et où les précipitations annuelles varient de 400 à 1 200 mm. L'arbre peut résister à de nombreuses adversités environnementales, notamment la sécheresse,

l'infertilité, l'acidité des sols. Le neem produit des fruits charnus à noyaux ellipsoïdaux, d'environ 2 centimètres de long, portés par des grappes axillaires (**Schmutterer, 1990**).



Photographie 2 : *Azadirachta indica*

A) arbre du neem ; B) feuilles de neem ; C) graines de neem (**Dougue, 2019**).

I.7.5.2. Usage ethno-pharmacologique de *Azadirachta indica*

Le neem et ses produits dérivés gagnent aujourd'hui en importance en raison de leur large champ de commercialisation dans les domaines de l'agriculture, de la médecine vétérinaire, de la cosmétique, de la médecine, des produits de toilette et de diverses autres industries. Toutes les parties de l'arbre ont des propriétés médicinales (graines, feuilles, fleurs et l'écorce) et sont utilisées pour la préparation de nombreux produits médicaux.

Utilisée comme contraceptif, l'huile de neem (nimbidin et nimbin) est un spermicide puissant et peut donc être utilisé comme une méthode de contrôle des naissances peu coûteuse (**Biswas *et al.*, 2018**). Elle a aussi prouvé ses propriétés antibactériennes car des extraits d'huile de neem ont supprimé plusieurs espèces de bactéries pathogènes, y compris celles des genres *Staphylococcus* et *Salmonella*. En dermatologie, l'huile de neem est appliquée sur le cuir-chevelure pour le traitement des teignes et pour tuer les poux, le psoriasis. Il soulage les démangeaisons (symptômes cutanés chez les humains et le bétail) et la douleur tout en réduisant l'ampleur et la rougeur des lésions hétéromorphes (**Tiwari *et al.*, 2014**).

Les feuilles sous forme de pâte sont frottées sur la peau pour le traitement de la variole et la varicelle. Les populations utilisent les décoctions de feuilles ainsi que le « thé de neem » réalisé avec ses feuilles, pour le traitement du paludisme car elle permet de bloquer la métamorphose du stade larvaire à celui d'adulte et paralyse le tube digestif de la larve (**OMS, 2008 ; Anyaehie, 2009**).

Les fruits secs de *Azadirachta indica* sont broyés dans de l'eau et utilisés pour traiter les maladies cutanées, les infections urinaires, les hémorroïdes, les vers intestinaux ou encore la lèpre.

Les autres différentes parties du neem ont des propriétés antifongique, analgésique, antipyrétique, antihelminthique, antiseptique, diurétique et purgative et sont également utilisées pour traiter les furoncles, les boutons, les maladies oculaires, l'hépatite, la lèpre, le rhumatisme, la scrofule, la teigne, les ulcères, les diarrhées, la blennorragie, et comme vermifuge et pour lutter contre les gales et les poux (Thas, 2008 ; Tiwari *et al.*, 2014).

En médecine vétérinaire, la pratique ancienne et éprouvée initiale des dérivés de neem contre les ravageurs du bétail divers a indiqué qu'il s'agit d'un domaine particulièrement prometteur pour l'avenir. Il est utilisé entre autres contre les tiques, poux, puces, mouches de la corne, mouches des étables et porcheries, gale, acariens, scarabées des fermes, triatomes.

Traditionnellement, les minces branches de neem sont utilisées pour se brosser les dents, ses propriétés antiseptiques en font un agent redoutable contre le tartre et aussi comme bois de chauffage. Le bois de l'arbre est utilisé pour les constructions, pour la fabrication des contre-plaqués, des tableaux, des meubles, des armoires, des bibliothèques et placards, ainsi que les caisses d'emballage parce que sa qualité insectifuge aide à protéger le contenu contre les dégâts d'insectes (Manoj *et al.*, 2013 ; National Research Council, 1992).

I.7.5.3. Champignons endophytes chez *Azadirachta indica*

La distribution et l'abondance des champignons endophytes dans les espèces végétales sont hyper diverses et dépendent de paramètres tels que l'espèce végétale, les organes végétaux, la situation géographique et la saison (Kouipou et Boyom 2019 ; Taware *et al.*, 2017). Ces dernières années, plusieurs recherches ont analysé la composition des champignons endophytes de *A. indica* poussant dans plusieurs endroits du monde et dans tous les organes (feuilles, fleurs, tiges, tronc, racines, graines). Les différentes espèces de champignons endophytes sont couramment isolées et regroupées en *Acremonium* spp, *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Bartalinia* spp, *Chaetomium* spp, *Cladosporium* spp, *Chloridium* spp, *Cochlonema* spp, *Colletotrichum* spp, *Curvularia* spp, *Drechslera rostrata*, *Eupenicillium parvum*, *Fusarium* spp, *Geotrichum* spp, *Gliomastix* spp, *Humicola grisea*, *Nigrospra* spp, *Penicilium* spp, *Pestalotiopsis* spp, *Phoma* spp, *Phomopsis* spp, *Phyllosticta minima*, *Stenella* spp, *Scytalidium* spp, *Trichoderma* spp, *Ulocladium chlamydosporum*, *Verticillium* spp, *Xylaria* spp.

I.8. Travaux antérieurs

Le besoin de nouveaux agents antifongiques et la découverte de champignons endophytes dans les tissus végétaux a ouvert de nouvelles possibilités dans la recherche de composés métaboliquement actifs (**Toghueo et al., 2016**). À cet égard, les endophytes de *A. indica* ont été signalés comme capables de produire des métabolites ayant le potentiel d'inhiber les microbes pathogènes chez les plantes et chez les humains.

Pour des pathogènes responsables de maladies végétales, **Huang et al. (2015)** ont isolé à partir des tiges de *A. indica* un champignon endophyte *Xylaria* sp. YM 311647, dont le fractionnement a permis d'obtenir cinq composés qui ont inhibé la croissance de *Pyricularia oryzae* et *Hormodendrum compactum* avec des valeurs de CMI allant de 32 à 512 µg/mL.

Pour le cas des pathologies humaines, les champignons endophytes de *A. indica* ont plus fait l'objet d'étude sur les bactéries, les parasites et les champignons filaments, mais rarement sur les levures du genre *Candida*. En effet, **Chatterjee et al. (2019)** ont présenté une activité contre *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des valeurs de CMI allant de 300 à 500 µg/mL. De plus, **Kharwar et al. (2009)** ont montré une très puissante activité de la javanicine (isolé du champignon endophyte *Chloridium* sp en provenance de la racine) contre *Pseudomonas aeruginosa* (2 µg/mL) et une activité modérée contre *Escherichia coli* et *Bacillus* sp. avec des valeurs CMI allant de 20 à 40 µg/mL. **Verma et al. (2013)** ont rapporté la capacité des métabolites de cinq champignons endophytes, dont *Nigrospora* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Chaetomium* sp. et *Pestalotiopsis* sp. à présenter une activité scolicide prometteuse avec un pourcentage de mortalité compris entre 64 et 97%. Par ailleurs, **Wu et al. (2011)** dans une investigation visant à rechercher des produits naturels ayant une activité insecticide, ont isolé onze composés de *Xylaria* sp. (provenant des feuilles de *A. indica*), qui ont été testés contre le troisième stade larvaire de *Plutella xylostella*. L'acide succinique et l'acide halorosellinique étaient les plus efficaces avec un pourcentage de mortalité de 32,36% et 31,55% respectivement.

CHAPITRE II
MATÉRIELS ET MÉTHODES

II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Cadre d'étude

Cette étude a été menée à l'Hôpital Central de Yaoundé (HCY) et à l'Hôpital Régional de Bafoussam (HRB). Situés respectivement en plein cœur des villes de Yaoundé et de Bafoussam, ces hôpitaux sont des centres de traitement agréés pour la prise en charge des PVVIH et des patients diabétiques. Avec une file active de plus de 15 000 malades VIH positifs pour l'HCY, et 5 500 malades VIH positif pour l'HRB. De même, la file active des patients diabétiques est respectivement de 2 500 et 1 000 patients. Ces patients proviennent de diverses aires de santé à l'échelle départementale, régionale et nationale. En outre, ces hôpitaux de référence sont directement rattachés aux groupes régionaux techniques pour la prise en charge du VIH et du diabète, et disposent d'outils de collecte des données de qualité pour l'implémentation des directives nationales en matière de suivi et d'accompagnement multidisciplinaire.

II.1.2. Population d'étude

Pour cette étude, nous avons porté notre choix sur les patients VIH positifs et diabétiques. Ladite population d'étude était constituée des femmes et des hommes sans distinction d'âge, de sexe, d'appartenance religieuse, ethnique ou sociale.

II.1.3. Échantillons biologiques

Les échantillons biologiques étaient constitués des selles, des urines, des prélèvements buccaux et vaginaux pour les femmes et ces mêmes échantillons chez les hommes exceptés les prélèvements vaginaux.

II.2. Méthodes

II.2.1. Étude de l'épidémiologie descriptive et moléculaire de *Candida tropicalis*

II.2.1.1. Conception de l'étude

a) Type et période de l'étude

Il s'est agi d'une étude transversale prospective à visé analytique et descriptive réalisée durant une période de deux ans (de Septembre 2017 à Septembre 2019) à l'Hôpital Régional de Bafoussam et à l'Hôpital Central de Yaoundé.

b) Critères de sélection

Avant le passage des patients aux services de consultation et de dispensation du Centre de Traitement Agréé (CTA) et en diabétologie où l'enquête se déroulait, une sensibilisation a été menée par le personnel et les assistants psychosociaux (APS) pour informer et mobiliser les potentiels participants à l'étude en vue d'une collecte plus efficace. L'enquête a été effectuée lors des consultations de routine avec l'aide du personnel. Des questionnaires (Annexe 6 et 7), ainsi que les dossiers médicaux des patients ont été utilisés pour collecter les caractéristiques démographiques, socioculturelles, cliniques, l'histoire thérapeutique, et les antécédants médicaux.

▪ Critères d'inclusion

Cette étude a inclus les personnes vivants avec le VIH et les patients diabétiques qui ont accepté de participer à l'étude en signant un formulaire de consentement éclairé libre et volontaire (Annexe 6 et 7) après lecture de la notice d'information (Annexe 4 et Annexe 5).

▪ Critères de non inclusion

Ne pouvaient participer à l'étude :

- Les patients hospitalisés puisqu'ils pouvaient souffrir d'infections nosocomiales;
- Les patients portant une sonde urinaire ou une prothèse dentaire car ces objets pouvaient favoriser la formation de biofilms et permettre la dispersion des levures ;
- Les personnes présentant une coïnfection active à *Mycobacterium tuberculosis* ou aux virus de l'hépatite B et C étant donné qu'ils contribuent également à l'affaiblissement du système immunitaire ;
- Les personnes sous traitement antifongiques, car les levures isolées chez pourraient présenter une sénilité au traitement utilisé
- Toute situation de gêne particulière, notamment la difficulté à obtenir les échantillons biologiques ;
- Le refus de participer à l'étude était considéré comme critères de non-inclusion.

▪ Critères d'exclusion

Les participants chez qui l'un des critères de non inclusion était détecté au cours de l'étude, et ceux qui manifestaient la volonté de quitter l'étude à un moment donné.

c) Considérations éthiques

Pour une évaluation de la validité scientifique et éthique, ce projet a été soumis au Comité Régional d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine du Centre (CRERSH/C)

pour obtention de leur approbation et la délivrance d'une clairance éthique CE N° 0222/CRERSHC/ 2016 (Annexe 1). Les autorités administratives locales du site de collecte ont également été informées et ont donné l'approbation à travers une autorisation du Directeur de l'hôpital (Annexe 2 et Annexe 3). Tous les participants à l'étude ont donné leur consentement libre et éclairé en signant un formulaire de consentement (assentiment pour les participants âgés de moins de 21 ans) (Annexe 6 et 7) et pour le cas des personnes qui étaient dans l'incapacité de le faire, un représentant légal de leur famille le faisait en ses lieux et place ; ceci après que la notice d'informations soit préalablement expliquée au participant (Annexe 4 et 5). Les échantillons ont été codifiés dans le but de respecter l'anonymat des participants et les restes ont été détruits par stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes puis, incinérés.

II.2.1.2. Prélèvement, culture des échantillons biologiques et identification de *C. tropicalis*

a) Collecte des échantillons biologiques

Les échantillons d'urines, de selles, de prélèvements vaginaux et buccaux ont été collectés chez différents groupes de patients après avoir reçu les instructions sur le procédé.

- **Prélèvement des urines du deuxième jet**

Les urines émises en milieu de jet ont été recueillies par le (la) patient(e) aux toilettes (après nettoyage de la vulve avec du tampon imbibé du dakin) pour environ 10 à 20 mL dans un pot à urine stérile.

- **Prélèvement des selles**

Les selles ont été émises par le (la) patient(e) aux toilettes dans un pot stérile et ramenées à l'investigateur.

- **Prélèvement vaginal**

Le prélèvement vaginal a été effectué par un technicien de laboratoire (après nettoyage de la vulve avec du tampon imbibé du dakin) à l'aide d'un écouvillon en coton stérile au niveau du cul de sac vaginal de la patiente en dehors de sa période menstruelle et n'ayant eu ni de rapports sexuels la veille, ni fait sa toilette vaginale le matin.

- **Prélèvement buccal**

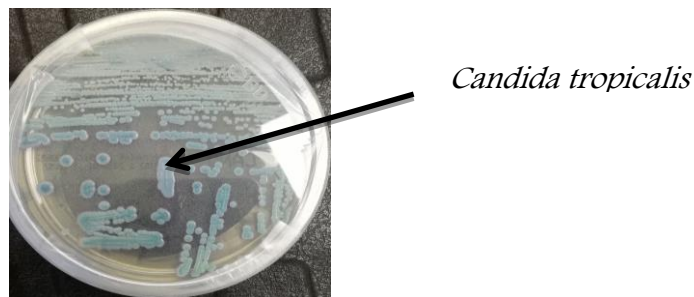
Le prélèvement a été effectué par un technicien de laboratoire par écouvillonnage de la muqueuse buccale et pharyngée à l'aide d'un écouvillon en coton stérile.

b) Culture des échantillons biologiques et isolement de *C. tropicalis* sur milieu de culture chromogénique CHROMagar Candida

La culture et l'isolement des différentes espèces de *Candida* se sont faites suivant le principe d'utilisation du CHROMagar.

Principe : Il est basé sur un mélange chromogène composé de substrats artificiels (chromogènes) qui libèrent des composés de couleur différente lors de la dégradation par les enzymes microbiennes spécifiques, assurant ainsi la différenciation directe de certaines espèces ou la détection de certains groupes d'organismes avec seulement un minimum de tests de confirmation.

Mode opératoire : L'ensemble des échantillons collectés a été transporté dans une glacière pour le service du laboratoire de l'hôpital. Une quantité de chaque échantillon (10 µL d'urines, environ 1 à 5 g de selles et les écouvillons des prélèvements vaginaux et buccaux) a été ensemencée en strie dans la boîte de pétri contenant le milieu de culture CHROMagar Candida préalablement préparé (39 g de poudre de CHROMagar Candida solubilisés dans 1 litre d'eau distillée). Après 48h d'incubation à 37°C, les colonies de *C. tropicalis* y présentaient une coloration bleue métallique ou violette (Borst *et al.*, 2003 ; Ellepola *et al.*, 2003). Les colonies isolées ont été purifiées et multipliées sur le milieu SDA préalablement préparé (65 g de poudre de SDA solubilisés dans 1 litre d'eau distillée).



Photographie 3 : Photographie de *C. tropicalis* sur le milieu CHROMagar Candida (Dougue, 2018)

c) Identification des isolats de *C. tropicalis* par le MALDI /ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/ Time-of-Flight*)

Le MALDI/ToF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et un analyseur à temps de vol (ToF).

Principe : La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge.

Mode opératoire

▪ Préparation de la matrice MALDI (1 mL)

Dans un tube de 1,5 mL, 2 pointes de spatules (2g) d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) ont été dissous dans 500 μ L d'acétonitrile, puis successivement 250 μ L d'eau distillée et 250 μ L de l'acide trifluoroacétique (TFA) 10% ont été ajoutés puis vortexés. Par après, la solution a été soniquée pendant 10 min (P : 30 W, F : 50/60 Hz) à température ambiante, jusqu'à l'obtention d'une solution saturée. L'ensemble a été centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 min et le surnageant transféré dans un autre tube polystyrène 1,5 mL.

▪ Préparation des échantillons et dépôt sur la cible MALDI

Dans un tube de 1,5 mL, 1 000 μ L d'éthanol 70% et 1 colonie d'isolat ont été introduit, l'ensemble a été vortexé et centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 min. Après élimination du surnageant, 10 μ L d'acide formique (70%) et 10 μ L d'acétonitrile ont été ajoutés puis centrifugés à nouveau à 13 000 rpm pendant 2 min.

Il a été déposé sur la cible MALDI, 2 spots de 1 μ L de témoin positif (*C. krusei*) ; sur la ligne suivante de la même colonne, 2 spots de 1 μ L de témoin négatif (matrice MALDI) ont également été déposés. Et sur les lignes suivantes, 1 μ L de surnageant de chaque échantillon en deux exemplaires minimums a été déposé. Après séchage de l'échantillon à température ambiante, celui-ci a été recouvert de 1 μ L de matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique saturée. L'ensemble a été porté à la machine (Bruker, German) et les résultats ont été observés après 1 heure.

Une fois dans l'appareil, la source d'ionisation bombarde la matrice et on assiste à une dispersion des particules ioniques dirigées dans le détecteur. Les ions sont détectés en mesurant le temps que met les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge (m/z). Les molécules plus grandes mettent plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arrivent plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de score et de spectres (**Bizzini et al., 2010**).

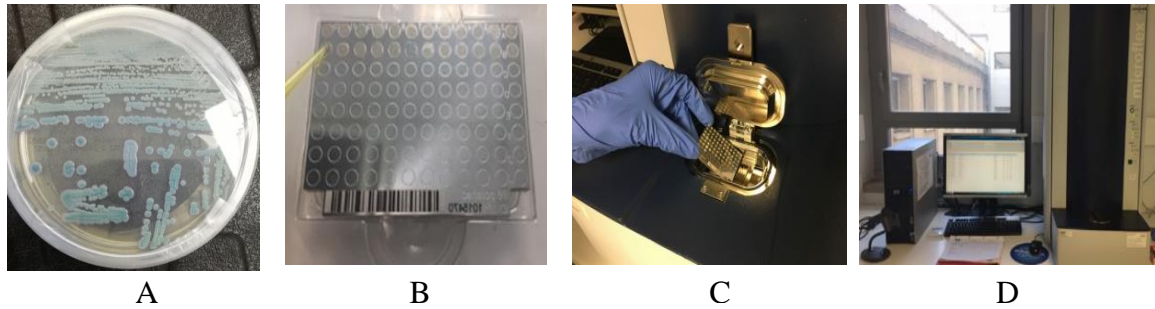


Figure 20 : Les étapes de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF
 A) Préparation de l'échantillon à partir de la colonie *C. tropicalis* ; B) Dépôt de l'échantillon sur le spot de la plaque et ajout de la matrice sur chaque spot ; C) Insertion de la plaque dans le spectromètre de masse ; D) Lecture des résultats (Martin, 2020).

▪ **Lecture et interprétation des résultats**

Les résultats ont été donnés sous forme d'une série de pics (spectre) correspondant aux différents fragments issus de la molécule originale. Les protéines détectées correspondaient aux protéines ribosomales, mais aussi à différents types de protéines structurales. Ainsi, en comparant le spectre de l'échantillon à une base de données (levures protocole billes, levures parasitologie), il était possible d'identifier l'espèce fongique de l'isolat clinique. Une fois terminée, les résultats ont été affichés sous forme de score avec des couleurs comme indicatif pour l'identification des différents germes. Ce test a été réalisé à l'Institut Hospitalo-Universitaire en maladies infectieuses de Marseille (IHU Méditerranée Infection) de l'Université Aix-Marseille.

Valeur	Description	Symbole	Couleur
2,00 - 3,00	Identification avec une haute confiance (espèce)	+++	Vert
1,70 - 1,99	Identification avec une faible confiance (genre)	+	Jaune
0,00 - 1,69	Aucune identification possible	-	Rouge

Conservation des isolats

À l'issue de l'isolement et identification, les isolats de *C. tropicalis* obtenus ont été conservés dans le mélange glycérol/SDB (v/v) et gardés au congélateur à -80 °C pour d'éventuelles études.

II.2.1.3. Étude de la diversité génétique de *Candida tropicalis*

a) Extraction de l'ADN des isolats de *C. tropicalis*

L'ADN a été extrait suivant le protocole décrit par Müller *et al.* (1998) en utilisant la méthode de désintégration à grande vitesse combinée à l'extraction au phénol-chloroforme-

alcool isoamylique et à la précipitation à l'éthanol. Ceci fut réalisé au laboratoire de Biologie et de Sciences environnementale de l'Université de Messina en Italie.

Procédure

Dix microlitres de culot de culture fraîche (cultivé dans du bouillon de *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) comprenant 2% de glucose, 2% de peptone mycologique (Oxoid) et 1% d'extrait de levure (Difco, Detroit, MI)) ont été mis en suspension dans 200 µL de tampon de lyse (2% Triton X-100, 1% de dodécylsulfate de sodium, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA) avec 0,3 g de billes de verre (0,45 à 0,52 mm de diamètre ; Sigma, St. Louis, MO). L'ensemble a été broyé 2 fois au broyeur cellulaire pendant 30 secondes. Entre les différents broyages, le tube a été refroidi sur glace pendant 10 minutes, puis le contenu centrifugé à $14\ 000 \times g$ pendant 5 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant jeté, le culot a été remis en suspension dans 500 µL d'éthanol à 80%. Le mélange a été transféré dans un filtre à spin et centrifugé 2 fois à $14\ 000 \times g$ pendant 2 min pour éliminer les dernières traces d'éthanol. Le filtre à spin contenant le culot a été transféré dans le tube de capture propre, puis un volume de 100 µL de tampon d'éluant (Tris-HCl-0,001 M EDTA pH 8,0) a été ajouté. Le tube a été chauffé dans un bain-marie à 70°C pendant 10 minutes et centrifugé pendant 2 minutes à $14000 \times g$. L'échantillon a été traité avec de la RNase (RNase A ; Sigma, St. Louis, Mo.) pendant 1 heure à 37°C, puis 10 µL de cet échantillon a été analysé sur gel d'agarose à 1% afin de confirmer la présence de l'ADN.

b) Amplification par PCR de l'ADN

Principe

Cette méthode est basée sur l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique à l'espèce en utilisant une paire d'amorces. Cette technique de réplique ciblée *in vitro* imaginée par Mullis en 1998 permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.

Procédure

L'amplification a été réalisée dans 50 µL de mélange réactionnel DreamTaq Green PCR (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) supplémenté de 1 µL (0.5 µg) d'ADN et 0,4 µL (0.5 µM) des amorces forward et reverse. L'amplification par PCR de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur MyCycler (Bio-Rad, Milan, Italie) en utilisant les conditions suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, d'hybridation à 53°C pendant 40 sec et d'extension à 72°C pendant 45 sec, et

d'une étape d'extension finale de 7 min à 72°C. Les produits PCR ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% m/v pour confirmer la présence de l'amplicon attendu.

II.2.1.4. Typage moléculaire des isolats de *Candida tropicalis*

Le schéma de MLST utilisé pour le génotypage de *C. tropicalis* était basé sur l'analyse de la séquence de six gènes de ménage : ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, XYR1, et ZWF1 (Tableau III) (**Tavanti *et al.*, 2005**).

Pour chaque isolat, six amplifications PCR distinctes ont été réalisées dans 50 µL de Premix TaKaRa Taq version 2.0 DNA polymerase (TaKaRa, Italie), 1 µL (100 ng) d'ADN et 0,4 µL (1 µM de concentration finale) de chaque amorce, de l'eau ultra pure (38,7 µL), du tampon (5 µL), des dNTP (4 µL) (**Tavanti *et al.*, 2005**). Les amorces spécifiques des loci MLST et les conditions de cyclage utilisées pour les amplifications PCR étaient les mêmes que celles précédemment décrites lors de l'amplification de l'ADN extrait.

Après la PCR, chaque produit PCR a d'abord été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% m/v pour vérifier la présence/taille de l'amplicon attendu. Puis les produits purifiés à l'aide du réactif de nettoyage des produits PCR ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italie) ont été séquencés de manière bidirectionnelle à Eurofins Genomics, Ebersberg, Allemagne (www.eurofinsgenomics.eu) en utilisant le séquençage Sanger standard avec pour but de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN) avec les mêmes amorces spécifiques des loci MLST que celles utilisées pour la PCR.

Tableau III : Liste des fragments de gènes et détails des amorces pour la MLST de *C. tropicalis* (Tavanti *et al.*, 2005).

Fragment de gène	Produit du gène	Amorces	taille amplicons (bp)	Début de séquence		Fragment séquencé (bp)	No accession genbank
				5'	3'		
ICL1	<i>Isocitrate lyase</i>	Fwd,5'-CAACAGATTGGTTGCCATCAGAGC-3' Rev,5'-CGAAGTCATCAACAGCCAAAGCAG-3'	737	CGAAGCTG	TGGCAATT	447	D00703
MDR1	<i>Multidrug resistance protein</i>	Fwd,4'-TGTTGGCATTACCCCTTCCT-3' Rev,5'-TGGAGCACCAAACAATGGGA-3'	663	TGATGGTG	GCCYTTAT	425	AF194419
SAPT2	<i>Secreted aspartic protease 2</i>	Fwd,5'-CAACGATCGTGGTGCTG-3' Rev,5'-CACTGGTAGCTGAAGGAG-3'	658	CTGGTGTC	TXTTCCAA	525	AF115320
SAPT4	<i>Secreted aspartic protease 4</i>	Fwd,5'-TGCTTCTCCTACAACCTCACCTCC-3' Rev,5'-ATTCCCATGACTCCCTGAGCAACA-3'	483	CATXATTA	CAACAATT	390	AF115322
XYR1	<i>D-Xylose reductase I or II</i>	Fwd,5'-AGTTGGTTTCGGATGTTG-3' Rev,5'-TCGTAAATCAAAGCACCAGT-3'	479	TCTACAAT	AAATTGGT	370	AB002105
ZWF1a	<i>Putative glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>	Fwd,5'-GGTGCTTCAGGAGATTTAGC-3' Rev,5'-ACCTTCAGTACCAAAAAGCTTC-3'	647	TGCCTTGTTT	ATTGTTTCAGT	520	

Fwd : forward ; *Rev* : reverse.

II.2.1.5. Analyse phylogénétique et structure de la population

Les électrophérogrammes de séquençage brut ont été inspectés visuellement à l'aide du logiciel *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) 11.0.9 pour détecter les erreurs et déterminer les positions des polymorphismes hétérozygotes après que les séquences des 06 différents gènes des isolats ont été transférées sur le format FASTA et concaténées. Les séquences consensus d'ADN, y compris les polymorphismes mononucléotidiques (SNP), ont d'abord été confirmées en faisant correspondre les tracés de séquençage avant et arrière. La présence de deux pics coïncidents dans les chromatogrammes des séquences a été considérée comme une hétérozygotie, puis les données hétérozygotes (K, M, R, S, W et Y) de la nomenclature de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) ont été utilisées pour affiner les résultats.

Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences de la base de données Genbank à l'aide du BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) à partir du site Web NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), afin de confirmer qu'il s'agit bien des séquences de *C. tropicalis*.

Les séquences de chaque locus MLST ont été comparées aux séquences de référence respectives déposées dans la base de données centrale MLST de *C. tropicalis* (<https://pubmlst.org/organisms/candida-tropicalis>) pour l'attribution de numéros d'allèles. Ces derniers ont été utilisés pour définir le type de séquence diploïde (DST), ou génotype MLST, pour chaque isolat de *C. tropicalis*. Les séquences d'allèles non attribuées ont été soumises à la base de données MLST et les nouveaux numéros d'allèles, y compris les nouveaux DST, ont été fournis par la conservatrice : Prof. Hsiu-Jung Lo.

L'outil d'analyse BURST (*Inferring patterns of evolutionary descent among Clusters of related bacterial genotypes from Multilocus Sequence Typing data*) accessible en ligne via <http://eburst.mlst.net/> a été utilisé consécutivement pour diviser les souches en complexes clonaux en fonction de leurs profils alléliques (types moléculaires), identifier l'ancêtre commun c'est à dire le type moléculaire dont découle les autres types moléculaires.

Disponibilité des données

Toutes les données générées au cours de cette étude sont incluses dans ce travail et également accessibles en ligne dans la base de données MLST de *C. tropicalis*

(<https://pubmlst.org/ctropicalis>) et au visualiseur interactif Microreact (<https://microreact.org/project/C.tropicalis>).

II.2.2. Étude de la sensibilité de *Candida tropicalis* aux antifongiques usuels et formation de biofilm

II.2.2.1. Évaluation de la sensibilité aux antifongiques usuels

Le profil de résistance des isolats de *C. tropicalis* vis-à-vis des antifongiques a été fait par la méthode de microdilution en milieu liquide (référentiel CLSI, 2012 M27 S4) à l'aide du kit *Sensititre Yeast One* (TREK Diagnostic Systems), qui est une méthode de microdilution en milieu liquide fournissant des résultats qualitatifs et quantitatifs de CMI. Les antifongiques utilisés étaient les suivants : Amphotéricine B, anidulafungine, micafungine, caspofungine, 5-fluorocytosine, posaconazole, voriconazole, itraconazole et fluconazole.

Principe :

Il repose sur la croissance des levures dans les solutions antifongiques mises en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance du bleu ou pourpre (négatif) au rose (positif).

Procédure :

Des colonies pures, bien isolées de *C. tropicalis* âgées de 24 à 48 h ont été émulsifiées dans de l'eau physiologique stérile en ajustant la densité selon la densité 0,5 McFarland ($2,5 \times 10^6$). Puis, 20 μ L de suspension ont été transférés dans 10 mL de milieu liquide d'inoculum *Yeast One*, afin d'obtenir un inoculum de 5×10^3 cellules/mL et réparti 100 μ L dans chaque cupule de la plaque. Les plaques contenant des antifongiques à des concentrations précises. Enfin, les cupules ont été couvertes à l'aide d'un ruban adhésif et l'ensemble porté à incubation à 37°C pendant 24 h.

Lecture des résultats :

La croissance des levures dans les solutions antifongiques est mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance du bleu ou pourpre (négatif) au rose (positif). Certaines levures peuvent ne pas faire virer complètement l'indicateur au rose, mais entraînent une prise de teinte pourpre notamment pour les azolés.

La CMI représente la plus faible concentration d'un antifongique qui inhibe substantiellement la croissance du microorganisme c'est-à-dire la cupule dont le contenu est resté bleu où il n'est observé aucun virage juste avant la cupule dont le contenu est rose ayant

été sujet au virage. Le changement de couleur dans les cupules contenant l'antifongique est comparé à la couleur des cupules de contrôle de croissance positive ; voir annexe 9.

Aucune croissance n'est survenue s'il n'y a pas de virage de l'indicateur bleu à rose pour les antifongiques utilisés.

Valeurs critiques

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

Antifongiques	CBP de <i>C. tropicalis</i> ($\mu\text{g/mL}$)		Intervalle de CMI	Dilution des plaques	des ECV
	$\leq S$	$\geq R$			
Amphotéricine B	1	2	0,25 - 1	8 - 0,12	2
Anidulafungine	0,25	1	0,25 - 1	8 - 0,015	-
Micafungine	0,25	1	0,25 - 1	8 - 0,008	-
Caspofungine	0,25	1	4 - 32	8 - 0,008	-
5-Fluorocytosine	4	32	0,12 - 2	64 - 0,06	-
Posaconazole	0,12	2	0,12 - 2	8 - 0,008	0,12
Voriconazole	0,12	1	0,12 - 1	8 - 0,008	-
Itraconazole	0,12	1	2 - 8	16 - 0,015	0,5
Fluconazole	2	8	1 - 2	128 - 0,12	-

CBP : *clinical breakpoint*, **S** : sensible, **R** : resistant; **ECV** : *epidemiological cutoff value*

II.2.2.2. Évaluation de la capacité de *Candida tropicalis* à former le biofilm

a) Quantification du biofilm formé au crystal violet

La capacité de formation des biofilms des 26 isolats de *C. tropicalis* a été évaluée selon la méthode décrite par **Silva et al. (2008)** avec quelques modifications. Brièvement, 100 μL d'une solution d'inoculum de charge $2,5 \times 10^5$ cellules/mL ont été introduites dans les cupules d'une microplaque de 96 puits contenant au préalable 100 μL de *Yeast Nitrogen Broth* supplémentées à 5% de glucose. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Après incubation, les plaques ont été vidées et rincées 3 fois à de l'eau distillée stérile, puis 150 μL de méthanol 99% ont été introduits dans chacune des cupules et incubées pendant 15 minutes pour fixer les biofilms. Les microplaques ont été essorées et séchées à 25°C. Par la suite, 150 μL d'une solution de crystal violet 1% ont été introduites dans les cupules des plaques qui ont ensuite été incubées pendant 20 minutes. Les plaques ont été vidées et

essorées puis, 150 µL d'acide acétique glacial 33% ont été introduits dans chaque cupule. Les densités optiques (DO) ont été lues à 570 nm.

b) Observation de l'architecture du biofilm au microscope électronique à balayage

Principe du microscope électronique à balayage :

Il est fondé sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin faisceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée.

Procédure :

Dans une microplaque de 96 puits, un inoculum de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL provenant d'une culture de 24 h a été préparé dans du milieu *yeast nitrogen base* supplémenté à 5% de glucose a été utilisé pour former le biofilm. Un peg lip stérile a été par la suite immergé dans ces suspensions et incubés à 37°C. Après 24 h d'incubation, 100 µL de milieu *yeast nitrogen base* supplémenté à 5% de glucose a été ajouté puis, réincubé à nouveau. Après un total de 48 h d'incubation, les cellules non adhérentes ont été éliminées en les lavant délicatement 3 fois avec du tampon phosphate salin pH 7,2. Par la suite, les cellules ont été déshydratées par une série de lavages à l'éthanol (30%, 50%, 70%, 90%, 95% et 100%), puis séchées à température ambiante. Après 24 h, le produit de séchage a été monté sur des talons du microscope et recouvert d'or à l'aide d'un microscope SC 500. Ils ont été visualisés avec un microscope électronique à balayage TESCAN VEGA (VEGA 3 LHM, AVG9731276ZA) (à l'Université de Johannesburg en Afrique du Sud) connecté à un moniteur.

II.2.3. Étude de la sensibilité de *Candida* aux extraits de champignons endophytes de *Azadirachta indica*

II.2.3.1. Isolement et identification des champignons endophytes de *Azadirachta indica*

a) Récolte du matériel végétal

Des organes végétaux sains et matures ont été collectés sur *Azadirachta indica* à Maroua dans la région de l'Extrême-Nord du Cameroun (Latitude 11°13'09"N, Longitude 14°02'09"E) le 19 Mars 2018. Les spécimens de référence (brindilles avec feuilles, fleurs et graines) ont été déposés à l'Herbier national du Cameroun et identifiés sous le numéro d'identification 11 447/SRFK. Les feuilles, les brindilles de feuilles, les fleurs, les brindilles de fleurs, l'endocarpe, l'exocarpe, le mésocarpe, les tiges, les racines, l'écorce des racines, le tronc, l'écorce du tronc et l'écorce de la tige ont été collectés et apportés au laboratoire dans des sacs stériles.

b) Stérilisation des échantillons de matériel végétal

Le matériel végétal a été soigneusement lavé à l'eau de robinet. Après lavage, les différents organes à savoir les fleurs, les feuilles, l'endocarpe, le mésocarpe, l'exocarpe, les brindilles de feuilles, les brindilles de tige et les tiges, ont été découpés en de petits fragments de 5 mm de long puis, soumis à une stérilisation de surface par traitement à une solution d'hypochlorite de sodium 1% pendant 15 minutes, suivi d'un rinçage à l'eau distillée stérile. Les écorces de tronc, le tronc, les écorces de tige, les racines et les écorces des racines ont subi une désinfection de surface au moyen d'un traitement à l'éthanol 70% pendant 5 minutes puis à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium 1% pendant 15 minutes et enfin avec de l'éthanol 70% pendant 2 minutes. L'ensemble a été soumis à un rinçage répété à l'eau distillée stérile (Toghueo *et al.*, 2017). Les échantillons ont été séchés sous conditions stériles.

c) Culture et isolement des champignons endophytes

Après stérilisation, des boîtes de pétris contenant du milieu *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) supplémentées au chloramphénicol (500 mg/L pour inhiber la croissance des bactéries opportunistes) ont été ensemencées chacune avec des fragments de chaque organe du matériel végétal. Les boîtes ont par la suite été scellées et incubées à l'obscurité à température ambiante ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Les hyphes des champignons émergeant des tissus de la plante vers le milieu ont été prélevés à l'aide d'un scalpel et réensemencés sur un nouveau milieu PDA ne contenant pas d'antibiotique, puis réincuber afin d'obtenir des cultures pures. En vue de vérifier l'effectivité de la méthode de désinfection, l'eau distillée ayant servi au dernier rinçage des organes a été ensemencée dans la boîte de pétri contenant du milieu PDA puis, incubée. Les boîtes ont été périodiquement observées (Toghueo *et al.*, 2017).

Calcul de la fréquence d'infection

La fréquence d'infection de chaque partie de la plante a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Fréquence d'infection} = \frac{\text{Nombre de fragments isolés}}{\text{Nombre de fragments ensemencés}} \times 100$$

d) Identification du champignon endophyte d'intérêt

Le champignon endophyte a été cultivé sur le milieu de culture PDA. Après 7 jours d'incubation, l'identification du champignon d'intérêt a été effectuée grâce au MALDI-ToF comme précédemment décrit.

II.2.3.2. Détermination de l'activité antifongique des extraits bruts à l'acétate d'éthyle

La détermination de l'activité antifongique a été effectuée sur *C. tropicalis* CTCMR15S compte tenu de son habilité à former le biofilm de façon significative et de la petite quantité de l'extrait. Quarante-huit heures avant chaque expérience, cette dernière était mise en sub-culture sur de la gélose Sabouraud dextrose (SDA) (TM MEDIA) supplémentée en chloramphénicol (Sigma Aldrich, USA) à 37°C.

a) Culture et extraction des champignons endophytes

Des mycéliums purs de chaque champignon isolé ont été inoculés dans 200 mL de milieu *potatoes dextrose broth* (PDB) (TM MEDIA) et incubés à température ambiante pendant 21 jours avec agitation constante. Deux cents millilitres à l'acétate d'éthyle (AcOEt) ont ensuite été ajoutés à chaque culture fongique et maintenus pendant 24 h à température ambiante. La phase à l'acétate d'éthyle a été séparée du mélange et séchée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 70°C (Heidolph, Allemagne). Le processus a été répété trois fois. Les extraits bruts d'acétate d'éthyle obtenus ont été pesés, dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Loba Chemie, Inde) et conservés à 4°C pour utilisation ultérieure.

b) Screening d'activité antifongique des extraits de champignons endophytes

Pour le screening d'activité antifongique, chaque extrait fongique a été testé à une concentration unique de 500 µg/mL en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits. Bref, 10 µL de chaque extrait (10 mg/mL) ont été ajoutés à deux puits de la microplaque contenant 90 µL de milieu Sabouraud dextrose broth (SDB), suivis de l'ajout de 100 µL d'inoculum (5×10^3 UFC/mL). Des puits contenant uniquement le milieu de culture et d'autres contenant le milieu et la souche ont été inclus pour le contrôle de stérilité et le contrôle négatif, respectivement. Après 48 heures d'incubation à 37°C, une turbidité a été observée comme indication de la croissance. Les extraits présentant une bonne activité sur l'isolat testé ont été sélectionnés pour l'étude dose-réponse afin de déterminer leur CMI. Les tests ont été effectués en duplicate.

c) Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées par la méthode de microdilution utilisant le protocole M27-S4 décrit par le *Clinical and Laboratory Standard Institute M27-S4 (CLSI, 2012)*.

Principe :

Il est basé sur la capacité du microorganisme à survivre dans un milieu supplémenté en antifongique matérialisé par l'observation visuelle du culot formé par le dépôt de levures au fond des cupules ou du trouble dans le bouillon nutritif à l'issue de l'incubation (**CLSI, 2012**).

Mode opératoire :

Les essais ont été effectués dans les microplaques de 96 puits. En effet, 100 µL de milieu SDB ont été introduits dans l'ensemble des cupules de la plaque ; ensuite, 20 µL d'une solution stock d'un extrait concentré à 10 mg/mL ont été prélevés et ajoutés aux 100 µL des premiers puits de la ligne 1 excepté ceux des colonnes C et F. Une série de dilutions de raison géométrique 2 a été effectuée de la ligne 1 à la ligne 11 ; enfin, 100 µL d'une suspension d'une seule levure, préparée au titre 5×10^3 cellules/mL ont étéensemencées dans les cupules, exceptée celles des colonnes C et F qui servaient de contrôle de stérilité ; les puits de la ligne 12 qui ne contenaient que le milieu de culture et l'inoculum ont servi de contrôle négatif. Les concentrations testées des extraits étaient comprises entre 500 µg/mL et 3,9 µg/mL, et celles du fluconazole testée comme contrôle positif étaient comprises entre 128 µg/mL et 2 µg/mL. Après 48 heures d'incubation à 37°C, une turbidité a été observée comme indicateur de croissance. Au terme de la période d'incubation, la plus petite concentration à laquelle on observe aucune croissance visible du germe marquée par l'absence de turbidité correspond à la CMI de l'extrait.

Les essais ont été effectués en duplicate. L'extrait le plus actif a été retenu pour la suite des activités et correspondait au code A/bf111.

Les extraits de champignons endophytes bruts possèdent une grande majorité de métabolites parmi lesquels certains peuvent masquer la présence des autres ainsi que leurs activités contre les microorganismes, le fractionnement est nécessaire pour concentrer et/ou séparer certains composés des constituants phytochimiques présents. Ainsi, les différents constituants présents dans l'extrait brut ont été fractionnés utilisant la chromatographie sur colonne.

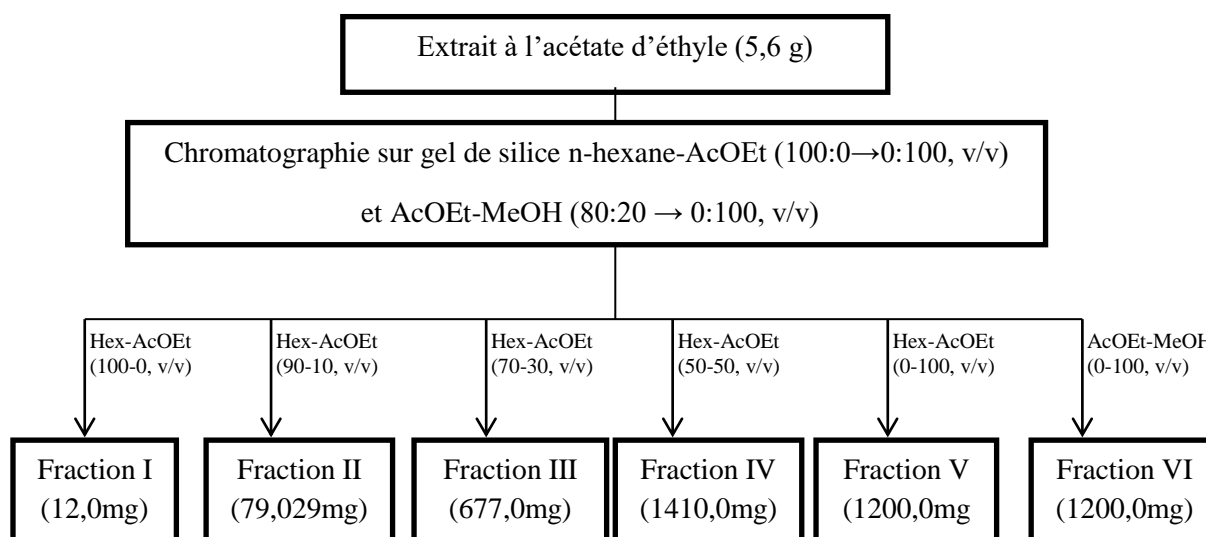
II.2.3.3. Fractionnement de l'extrait d'intérêt

Principe :

Il est basé sur la séparation d'un mélange en fractions successives de propriétés différentes.

Procédure :

Le fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle *A/bfl11* (5,6 g) a été réalisé par chromatographie sur colonne de gel de silice (80 g, 230-400 mesh, « Merck (Merck, Darmstadt, Germany) ») avec pour système d'éluion, les mélanges *n*-hexane-AcOEt (100:0→0:100, v/v) et AcOEt-MeOH (95:5→ 80:20, v/v) par gradient de polarité. Quarante (40) fractions de 100 mL ont été collectées et regroupées en 6 fractions majeurs (I à VI), en fonction de leur profil sur plaque de chromatographie sur couche mince (CCM). Les CCM ont été effectuées avec une plaque de silice (60 GF₂₅₄) de dimension 20 x 20 cm et en utilisant des mélanges de solvants appropriés (*n*-hexane-AcOEt (100:0→0:100, v/v) et AcOEt-MeOH (95:5→ 80:20, v/v)) comme phases mobiles. Après migration, les spots séparés ont été visualisés sous lumière ultraviolet à 254 nm et 365 nm puis révélés avec de l'acide sulfurique 50:50, v/v suivie d'un chauffage subséquent à 100°C (Teke *et al.*, 2011).



Hex : hexane, **AcOEt** : l'acétate d'éthyle, **MeOH** : méthanol

Figure 21 : Fractionnement de l'extrait d'intérêt *A/bfl 11*.

Les CMI des fractions obtenues ont été évaluées par la méthode de microdilution telle que décrite précédemment puis les modes d'action ont été déterminés.

II.2.3.4. Étude du mode d'action de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle sur la souche *Candida tropicalis* CTCMR15S.

a) Cinétique de l'inhibition.

L'extrait brut a été soumis au test d'évaluation de la cinétique de mort en fonction du temps sur la souche *C. tropicalis* CTCMR15S. Le protocole utilisé était celui décrit par **Klepser *et al.* (1998)**, avec quelques ajustements.

Mode opératoire :

Dans des tubes contenant 100 µL de milieu de culture *nutrient broth* supplémenté ou pas à l'extrait brut à la concentration de 125 µg/mL. Un volume de 100 µL de la suspension fongique à la charge de 5×10^3 UFC/mL a été ajouté et l'ensemble incubé à 37°C à différentes périodes (0, 2, 4, 6, 8, 12 et 24 heures). Au moment prédéterminé, 10 µl de chaque essai ont été prélevés puis ajoutés à 190 µl d'eau distillée stérile et l'ensemble a été homogénéisé. Par la suite, 10 µl de ce mélange ont été ensemencés dans des boîtes de pétri contenant du SDA supplémenté au chloramphénicol et les boîtes ont été ensuite incubées pendant 48h à 37°C. Au terme de la période d'incubation, les cellules viables ont été dénombrées par comptage direct des colonies de levures à l'œil nu. Les charges microbiennes ont été déterminées à différents intervalles de temps d'après la formule ci-dessous ; et les courbes ont été tracées par le log₁₀ UFC / mL en fonction du temps. La substance antifongique était considérée fongicide lorsque le nombre d'unités formant des colonies était inférieur ou égal à 3 log₁₀ UFC / ml et fongistatique lorsque supérieur à 3 log₁₀ UFC / ml (**Klepser *et al.*, 1998**).

Not = charge microbienne dans la solution test après un intervalle de temps donné ;

Not = Fd × Nt **Nt** = concentration microbienne de la subculture correspondante ;

Fd = facteur de dilution de la concentration microbienne dans la subculture ;

b) Effet de la supplémentation du milieu de culture en ergostérol exogène et en sorbitol sur la CMI

Les CMI de l'extrait brut ont été déterminées par la méthode de microdilution (**CLSI M27-S4, 2012**). Le sorbitol sera ajouté dans le milieu de culture afin d'avoir une concentration finale de 0,8 M, tandis que l'ergostérol exogène (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, SP,

Brazil) sera testé à la concentration de 100 µg/mL. Après 48 h d'incubation, les plaques ont été lues.

Mode opératoire

Le protocole tel que décrit pour les CMI (CLSI, M27-S4, 2012) a été effectué à cet égard sur *C. tropicalis* CTCMR 15S. En effet, le protocole M27-S4 tel que décrit précédemment a été utilisé, à la seule différence que le milieu de culture (*Nutrient broth*) a été supplémenté avec 0,8M de sorbitol et 100 µg/mL d'ergostérol exogène respectivement. Ainsi, selon **Frost et al. (1995)**, dans un milieu supplémenté en ergostérol exogène ou sorbitol, une augmentation de la CMI de l'extrait traduirait pour l'ergostérol, la formation d'un complexe entre l'ergostérol membranaire des cellules fongiques et la substance testée et par conséquent, un effet de la substance sur la membrane et pour le sorbitol, un effet sur la paroi des cellules car, le sorbitol est un agent protecteur de la paroi des cellules fongiques. L'essai a été réalisé en duplicate.

II.2.3.5. Test d'inhibition de la formation du biofilm

Principe :

Il est basé sur la capacité d'une substance antimicrobienne à inhiber la formation des biofilms des levures à l'issue de l'incubation via la lecture des densités optiques à 570 nm de longueur d'onde.

Mode opératoire :

L'inhibition de la formation des biofilms de *C. tropicalis* CTCMR 15S a été évaluée selon la méthode décrite par **Silva et al. (2008)** avec quelques modifications. Brièvement, 100 µL d'une solution d'inoculum de charge $2,5 \times 10^5$ cellules/mL ont été introduites dans toutes les cupules d'une microplaque de 96 puits contenant au préalable 100 µL de *Yeast Nitrogen Base* supplémenté à 5% de glucose contenant l'extrait brut à différentes concentrations 4 CMI, 2 CMI et CMI. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Après incubation, les plaques ont été vidées et rincées 3 fois à de l'eau distillée stérile puis 150 µL de méthanol 99% ont été introduits dans chacune des cupules et incubées pendant 15 minutes pour fixer les biofilms. Les microplaques ont été essorées et séchées à 25°C. Par la suite, 150 µL d'une solution de crystal violet 1% ont été introduites dans les cupules des plaques qui ont ensuite été incubées pendant 20 minutes. Les plaques ont été vidées et essorées puis, 150 µL d'acide acétique glacial 33% ont été introduits dans chaque cupule. Les densités optiques (DO) ont été lues à 570 nm et ont permis le traçage de l'histogramme pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration. Les tests ont été réalisés en duplicate.

II.2.3.6. Analyse phytochimique de l'extrait brut

Principe :

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) constitue une technique de choix pour identifier ou quantifier des constituants volatils et stables thermiquement au sein d'un mélange. Schématiquement, la chromatographie en phase gazeuse (GC) permet de séparer les différents composés d'un échantillon et la spectrométrie de masse (MS) est employée pour les identifier.

Mode opératoire :

La composition chimique de l'extrait brut a été analysée à l'aide d'un système GC-HRT-MS équipé d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) fonctionnant à haute résolution, muni d'un passeur automatique polyvalent Gerstel MPS (Gerstel Inc, Allemagne) et d'une colonne Rxi®-5 ms (30 m × 0,25 mm ID × 0,25 µm) (Restek, Bellefonte, USA). Brièvement, 1 µL de solution d'extrait diluée dans du méthanol a été injecté en mode sans split en utilisant de l'hélium comme gaz porteur pompé à un débit constant de 1 mL/min. Les températures de l'entrée et de la ligne de transfert étaient de 250 et 225°C respectivement. La température initiale du four a été réglée à 70°C, maintenue pendant 0,5 min, puis augmentée à 10°C/min jusqu'à 150 °C, maintenue pendant 2 min, puis augmentée à 10°C/min jusqu'à 330°C et maintenue pendant 3 min pour que la colonne se détache. La vitesse d'acquisition des données MS était une vitesse recommandée de 13 spectres/s, une gamme m/z de 30 - 1 000, une ionisation électronique à 70 eV, une température de la source d'ions à 250°C et une fréquence d'extraction recommandée par le système de 1,25 kHz. L'alignement des temps de rétention, les rapports masse/charge (m/z), la détection des pics et la mise en correspondance des pics ont été réalisés à l'aide du logiciel ChromaTOF-HRT (LECO, USA). L'identification des composants de l'extrait a été réalisée par comparaison avec les bases de données de spectres de masse des bibliothèques du NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

II.2.4. Analyses statistiques

Les données ont été enregistrées sur Microsoft Excel puis exportées dans le logiciel graphPad version 5.0 pour les analyses et les tracés des histogrammes. Les variables catégorielles ont été analysées à l'aide d'un test du Khi-2 et les p-values < 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Les données des biofilms formés ont été statistiquement analysées par ANOVA en utilisant le test de Friedman au seuil de probabilités 0,01.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats

III.1.1. Épidémiologie descriptive et moléculaire de *Candida tropicalis*

III.1.1.1. Caractéristique générale de la population

Au cours de cette étude, 1008 patients ont été recensés, 55 ont refusé de participer à l'étude, 23 avaient cumulativement le VIH et le diabète, 18 étaient coinfecté soit par *Mycobacterium tuberculosis*, soit par les hépatites virales B ou C. Au total, 913 patients ont accepté de participer à l'étude en donnant par signature leur consentement éclairé. A l'Hôpital Régional de Bafoussam, un total de 403 (44,1%) patients soit 323 PVVIH (80,1%) et 80 diabétiques (19,9%) ont été enrôlés. Par contre, à l'Hôpital Central de Yaoundé, un total 510 (55,9%) patients a été enrôlé soit 402 PVVIH (78,8%) et 108 diabétiques (21,2%) (Tableau V).

Tableau V : Répartition de la population d'étude

Sites de collecte	HRB		HCY		Total
	PVVIH n (%)	Diabétiques n (%)	PVVIH n (%)	Diabétiques n (%)	
Femmes	273 (84,5)	38 (47,5)	306 (76,1)	68 (62,9)	685 (75,1)
Hommes	50 (15,4)	42 (52,5)	96 (23,9)	40 (37,1)	228 (24,9)
	323 (80,1)	80 (19,9)	402 (78,8)	108 (21,2)	
Total	403 (44,1)		510 (55,9)		913 (100)

HRB : Hôpital Régional de Bafoussam ; **HCY** : Hôpital Central de Yaoundé ; **N** : nombre ; **%** : pourcentage ; **PVVIH** : personnes vivants avec le VIH.

Le pourcentage de participation des PVVIH à l'HRB était de 273 (84,5%) et 50 (15,4%) respectivement chez les femmes et les hommes contre 306 (76,1%) et 96 (23,9%) à l'HCY. Que ce soit à l'HRB ou à l'HCY, les femmes étaient les plus représentées, soit 75,1% (685) contre 24,9% (228) d'hommes. Le sexe ratio H/F était donc de 0,33, largement en faveur des femmes. Tout comme chez les PVVIH, le taux de participation chez les diabétiques à l'HCY était plus élevé qu'à l'HRB. Par contre, la proportion d'hommes (47,5%) à l'HRB était très proche de celle des femmes (52,5%), contrairement à l'HCY (62,9% chez les femmes contre 37,1% chez les hommes).

III.1.1.2. Répartition des *Candida* isolées par site de prélèvement, par type de patients et par type d'échantillon biologique

Un total de 2 657 prélèvements muqueux a été obtenu avec un plus grand nombre à l'HCY, soit 1 218 et 283 respectivement chez les PVVIH et diabétiques ; puis, 971 et 185 respectivement chez les PVVIH et diabétiques de l'HRB (Tableau VI). Respectivement, 433, 822, 578 et 824 prélèvements vaginaux, buccaux, selles et urines ont été obtenus de nos patients. De ces différents prélèvements, les levures ont plus été isolées des échantillons de selles (266/578 avec un pourcentage de 46,0%) suivit des frottis buccaux (173/822 avec un pourcentage de 21,0%), puis des frottis vaginaux (102/433 avec un pourcentage de 18,6%) et enfin dans les urines (105/824 avec un pourcentage de 12,7%).

Le pourcentage d'isolement de *Candida sp* était à cet effet de 23,5% (626/2 657).

L'échantillon le plus colonisé chez les PVVIH était les selles (49,4%), suivi du frottis buccal (27,7%), puis du frottis vaginal (25,5%) et les urines étaient les moins colonisées (20,0%). Par contre, chez les patients diabétiques, le vagin était la muqueuse la plus colonisée (60,0%) suivi des échantillons de selles (40,0%) puis les prélèvements buccaux (14,0%) et enfin les urines (4,8%).

Le test de Khi-2 au seuil de probabilité de 5% réalisé pour analyser la relation que ce soit entre le site de prélèvement, le type de patients et le type d'échantillon biologique avec la présence de *Candida sp* a permis de constater qu'il n'existe pas de lien (P-value =1,00) entre ces paramètres et la présence de levure.

Tableau VI : Fréquence des levures isolées par site de prélèvements, par type de patients et par type d'échantillon biologique

		HRB			HCY			Total
		PVVIH	PDB	Total	PVVIH	PDB	Total	
Prélèvement Vaginal (PV)	Nombre de prélèvement	141	10	151	262	20	282	433
	Culture positive n (%)	25 (17,7%)	5 (50,0%)	30 (60,0%)	38 (14,5%)	14 (70%)	52 (18,4%)	82 (18,9%)
Prélèvement buccal (PB)	Nombre de prélèvement	320	80	400	322	100	422	822
	Culture positive n (%)	35 (10,9%)	21 (26,5%)	56 (14,0%)	92 (28,7%)	25 (25,0%)	117 (27,7%)	173 (21,0%)
Selles (S)	Nombre de prélèvement	190	20	210	308	60	368	578
	Culture positive n (%)	70 (3,6%)	14 (70,0%)	84 (40,0%)	128 (41,5%)	54 (90%)	182 (49,4%)	266 (46,0%)
Urines (U)	Nombre de prélèvement	320	75	395	326	103	429	824
	Culture positive n (%)	16 (6,0%)	3 (4,0%)	19 (4,8%)	26 (7,9%)	60 (58,2%)	86 (20,0%)	105 (12,7%)
Total	Nombre de prélèvement	971	185	1156	1218	283	1501	2657
	Culture positive n (%)	146	43	189 (16,3%)	284	153	437 (29,1%)	626 (23,5%)

HRB : Hôpital Régional de Bafoussam ; **HCY** : Hôpital Central de Yaoundé ; **PVVIH** : personnes vivant avec le VIH ; **PDB** : Patients diabétiques.

Différentes espèces ont été présomptivement identifiées grâce à leurs couleurs. En effet, ont été observées, les colonies avec la couleur verte claire (*C. albicans*), celles avec la couleur mauve (*C. glabrata*), celles avec la couleur bleue métallique ou violette (*C. tropicalis*), celles avec la couleur rose pale (*C. krusei*), celles avec la couleur blanche (*C. parapsilosis*) et celles avec la couleur verte foncée (*C. dublinensis*) et d'autres avec des couleurs ne correspondant pas aux couleurs des espèces identifiables sur Chromagar candida (voir annexe 8). Nous avons aussi observé des associations entre certaines espèces dans une même culture (voir annexe 9).

Nous nous intéressons particulièrement aux isolats de *C. tropicalis* (avec les couleurs bleues métalliques ou violettes) dans la suite de ce travail.

III.1.1.3. Répartition des isolats de *C. tropicalis* après identification au MALDI/ToF

Grâce au MALDI/TOF, l'identité de 26 isolats de *C. tropicalis* a été confirmée sur les 86 isolats présentant la couleur bleue métallique/violette sur le milieu de culture Chromagar candida. Le tableau VII ci-dessous montre la répartition de ces différents isolats.

À l'HRB, seuls 7,7% (2) des isolats de *C. tropicalis* ont été isolés et tous provenant des PVVIH. Or sur les 92,3% (24) des isolats de *C. tropicalis* obtenus à l'HCY, 79,2% (19) et 20,8% (5) provenaient respectivement des PVVIH et des patients diabétiques. Le test Khi-2 nous montre que *C. tropicalis* est plus présent à l'HCY et chez les PVVIH (p-value <0,0001).

Les selles constituaient les échantillons dans lesquels le plus grand nombre d'isolats de *C. tropicalis* (38,4%) a été isolé bien que tous isolés à l'HCY ; suivi des échantillons d'urines (30,7%) et dont la plupart des isolats de *C. tropicalis* fut retrouvée chez les femmes. En troisième position, nous avons les prélèvements vaginaux (23,0%) et enfin, les prélèvements buccaux (7,6%) avec une répartition égale (50,0%) chez les femmes et les hommes. Le test Khi-2 d'indépendance nous montre qu'il n'y a aucune association (p-value=0,06) entre la présence de *C. tropicalis* et le site biologique de prélèvement.

Tableau VII : Répartition de *C. tropicalis* après identification au MALDI/ToF en fonction du site de prélèvement.

		HRB			HCY			Total	%
		PVVIH	PDB	Total	PVVIH	PDB	Total		
Prélèvement vaginal	Femmes	0 (0%)	0 (0%)	0	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6	6 (100%)	6 (23%)
	Hommes	0 (0%)	0 (0%)	0	0 (0%)	0 (0%)	0	0 (0%)	
Prélèvement buccal	Femmes	0 (0%)	0 (0%)	0	1 (100%)	0 (0%)	1	1 (50,0%)	2 (7,6%)
	Hommes	1 (100%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	0	1 (50,0%)	
Selles	Femmes	0 (0%)	0(0%)	0	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7	7 (70,0%)	10 (38,4%)
	Hommes	0 (0%)	0 (0%)	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3	3 (30,0%)	
Urines	Femmes	1(100%)	0 (0%)	1	3 (75%)	1 (25%)	4	5 (62,5%)	8 (30,7%)
	Hommes	0 (0%)	0 (0%)	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3	3 (37,5%)	
		2 (100%)	0		19 (79,2%)	5 (20,8%)			
Total				2 (7,7%)				24 (92,3%)	26

HRB : Hôpital Régional de Bafoussam ; **HCY** : Hôpital Central de Yaoundé ; **PDB** : Patients diabétiques ; **PVVIH** : Personnes vivants avec le VIH.

III.1.1.4. Répartition des souches de *Candida tropicalis* par la MLST

Une fois génotypées, les séquences de 26 isolats de *C. tropicalis* ont été comparées à celles de la base de données en ligne <http://pubmlst.org/ctropicalis/> mais la séquence du gène MDR1 de l'isolat CTCMR 65U (provenant de l'HRB) n'a pas pu être comparée aux séquences existantes dans la base de données de *C. tropicalis*. L'analyse des séquences des 25 autres isolats a permis l'identification de 16 profils alléliques différents. Des 16 génotypes MLST obtenus, 2 (2/16 soit 12,5%) DST (DST 346 et DST 522) avaient déjà été obtenus. Les 14 (14/16 soit 87,5%) autres DST allant de 1175 à 1196 ont été identifiés pour la première fois dans cette étude et correspondent à de nouveaux génotypes MLST (Tableau VIII). Ces derniers ont été soumis à la base de données MLST de *C. tropicalis*.

Globalement, le génotype MLST le plus fréquent était le DST 1179 (6/25 soit 24%) avec des isolats provenant tous des 2 centres de prélèvements (HRB et HCY), des différents types de patients et présents dans les échantillons de selles, d'urines et de prélèvements buccaux. Par ailleurs, les DST 522, 1177, 1178, et 1186 possédants chacun 2 isolats (2/25 soit 8%) provenaient des différents échantillons biologiques sauf des prélèvements buccaux. Les 11 DST restant (les DST 346, 1175, 1176, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184, 1185, 1195, 1196) étaient représentées par 1 seul isolat (1/25 soit 4%) avec des profils alléliques différents (Tableau VIII).

Tableau VIII : Liste des isolats de *Candida tropicalis* avec leurs profils alléliques et leurs DST générés par l'analyse MLST.

Code du labo	Echantillon biologique	Type de patients	Lieu de prélèvement	Sexe	Age	Profils alléliques						DST	CC	Résistance aux ATF
						<i>ICL1</i>	<i>MDR1</i>	<i>SAPT2</i>	<i>SAPT4</i>	<i>XYR1</i>	<i>ZWF1a</i>			
CTCMR 10P^a	PV	HIV+	HCY	F	35	3	4	1	41	77	4	346	15	/
CTCMR 14S	Selles	HIV+	HCY	M	46	1	44	1	7	58	3			Po, It, Vo, Fl
TCMR 19S	Selles	HIV+	HCY	F	54	1	44	1	7	58	3	522	6	/
CTCMR 5S	Selles	HIV+	HCY	F	35	1	7	3	10	73	6	1175*	7	Fl
CTCMR 2P	PV	HIV+	HCY	F	45	1	7	3	7	73	6	1176*	7	Ca, It, Fl
CTCMR 6U^b	Urines	HIV+	HCY	F	32	1	76	1	10	73	40			/
CTCMR 7P^b	PV	HIV+	HCY	F	32	1	76	1	10	73	40	1177*	S	Po, It, Fl
CTCMR 9U	Urines	HIV+	HCY	M	55	1	3	3	11	175	6			Po, Vo
CTCMR 12U	Urines	HIV+	HCY	F	57	1	3	3	11	175	6	1178*	S	Fl
CTCMR 13S	Selles	HIV+	HCY	M	50	1	39	3	7	80	17			Po, It, Vo, Fl
CTCMR 15S	Selles	HIV+	HCY	F	43	1	39	3	7	80	17			Po, It, Vo, Fl
CTCMR 46U	Urines	PDB	HCY	F	53	1	39	3	7	80	17			/
CTCMR 50U^c	Urines	PDB	HCY	M	58	1	39	3	7	80	17	1179*	64	Mi
CTCMR 51S	Selles	PDB	HCY	F	46	1	39	3	7	80	17			Po, It, Vo, Fl
CTCMR 58B	PB	PDB	HRB	M	48	1	39	3	7	80	17			/
CTCMR 17S	Selles	HIV+	HCY	F	33	1	26	1	7	206*	3	1180*	S	/
CTCMR 18B	PB	HIV+	HCY	F	26	1	3	1	11	24	10	1181*	S	/

CTCMR 20S	Selles	HIV+	HCY	F	54	1	44	1	7	58	6	1182*	6	Po, It, Vo, Fl
CTCMR 21P	PV	HIV+	HCY	F	31	1	7	1	7	207*	1	1183*	S	Po, It, Fl
CTCMR 47P	PV	PDB	HCY	F	50	1	197*	1	10	48	1	1184*	S	Ca
CTCMR 40S^c	Selles	PDB	HCY	M	58	1	39	3	7	80	9	1185*	64	/
CTCMR 3P^d	PV	HIV+	HCY	F	40	3	148	12	11	74	3			Fl
CTCMR 4U^d	Urines	HIV+	HCY	F	40	3	148	12	11	74	3	1186*	63	Po, It, Fl
CTCMR 11U^a	Urines	HIV+	HCY	F	35	3	148	12	11	175	6	1195*	S	Po, It, Fl
CTCMR 16S	Selles	HIV+	HCY	F	43	3	198*	12	11	74	3	1196*	63	It, Fl
CTCMR 65U	Urines	HIV+	HRB	F	45	1	?	1	7	48	10	?		/

* : nouveaux allèles/ DSTs détectés dans cette étude et attribués après la procédure de soumission ; /: Sensible aux antifongiques ; ^{a, b, c, d} : code de lettres représentant les mêmes patients respectivement ; **CC** : Complexes Clonaux ; **Po** : Posaconazole ; **It** : Itraconazole ; **Fl** : Fluconazole ; **Vo** : Voriconazole ; **Mi** : Micafongine ; **Ca** : Caspofongine ; **ATF** : antifongique ; **PV** : Prélèvement vaginal ; **PB** : Prélèvement buccal ; **HBR** : Hôpital Régional de Bafoussam ; **HCY** : Hôpital Central de Yaoundé.

III.1.1.5. Description des DST en fonction des sites de prélèvements, des types de patients et des types échantillons biologiques

Dans le tableau VIII ci-dessus, on peut observer des DST 522 (des isolats CTCMR 19S et CTCMR 14S) et DST 1178 (des isolats CTCMR 9U et CTCMR 12U) dont les isolats proviennent non seulement du même lieu de prélèvement (HCY), d'un même type de patient (PVVIH), et d'un même type d'échantillon biologique (les selles pour CTCMR 19S et CTCMR 14S et les urines pour CTCMR 9U et CTCMR 12U). À côté, nous avons des DST (CTCMR 7P et CTCMR 6U pour le DST 1177 ; CTCMR 4U et CTCMR 3P pour le DST 1186), pour lesquels les isolats proviennent des échantillons biologiques différents mais du même lieu de prélèvement (HCY) et du même type patients (PVVIH). Toutefois, le DST 1179 qui était le plus fréquent, comporte 6 isolats présents non seulement dans les différents types d'échantillons biologiques, mais aussi dans des deux lieux de prélèvement et chez les différents types de patients. À l'HCY, sur les 5 isolats de *C. tropicalis* provenant des patients diabétiques, 3 appartenaient à un DST commun (1179) et les 2 autres appartenaient aux DST 1185 (CTCMR 40Sc) et au DST 1184 (CTCMR 47P). Le reste de DST appartenait aux isolats issus des patients VIH+.

L'analyse réalisée par le test de Khi-2 montre qu'il n'existe pas de véritable lien (p -value=0,99) entre le type moléculaire et les différents paramètres qui sont le site de prélèvement, le type de patients et les échantillons biologiques.

III.1.1.6. Polymorphisme du nucléotide unique

L'analyse de la séquence des fragments d'ADN de 370 à 525 pb, obtenue à partir de la région codante de l'ensemble des six gènes inclus dans le schéma MLST de *C. tropicalis*, a donné un total de 2 677 nucléotides alignés pour chaque isolat. Parti de là, un total de 38 allèles différents a été détecté sur les six loci MLST étudiés et 10% (4/38) de ces allèles observés étaient nouveaux et ont été identifiés dans des fragments d'ADN obtenus à partir des gènes MDR1 (allèles 197 et 198) et XYR1 (allèles 206 et 207). De plus, ces deux gènes (MDR1 et XYR1) avaient chacun 10 allèles différents sur les 38 observés (10 allèles/38) et étaient les plus informatifs. Tandis que les autres gènes ICL1 (2), SAPT2 (3), SAPT4 (4), et ZWF1 (8) étaient les moins informatifs (Tableau IX). Ces nouveaux allèles provenaient respectivement des échantillons de prélèvements vaginaux (allèles 197 et 207) et de selles (allèles 198 et 207) retrouvés en même temps chez les patients VIH+ et chez les diabétiques.

Pour ce qui est des sites nucléotidiques, un total de 42 sites polymorphes a été identifié dans nos isolats, ce qui correspond à un ratio de 1,5% (42/2 677 nucléotides) par rapport à tous les gènes de ménage séquencés. Le plus grand nombre de sites nucléotidiques a été retrouvé dans les allèles du gène MDR1 (13) suivit du gène XYR1 (11), SAPT4 (9), ZWF1a (5) et enfin les gènes ICL1 (2) et SAPT2 (2). Ceci indique une quantité considérable de diversité génétique pour chacun des loci examinés (Tableau IX). Au cours de ce travail, des microvariations ou microévolutions c'est à dire des modifications génétiques mineures caractérisées par des variations au niveau d'un seul allèle de gène ont été observées. C'est le cas au niveau du fragment du gène ZWF1a pour les isolats CTCMR 50U^c et CTCMR 40S^c provenant des échantillons biologiques différents chez un même patient et au niveau du fragment du gène MDR1 pour les isolats CTCMR 16S et CTCMR 4U^d pour des isolats provenant des patients différents. À côté, des cas de macroévolutions (variation au niveau de 5 à 6 allèles) ont également été observées dans les fragments de gènes MDR1, SAPT2, SAPT4, XYR1 et ZWF1a pour les isolats CTCMR 11U^a et CTCMR 10P^a provenant chez un même patient mais les prélèvements différents. Dans le reste de cas, les modifications au niveau de 2 ou 3 fragments de gènes ont été observées (Tableau VIII).

En ce qui concerne la perte d'hétérozygotie causée par les SNP, délétions..., l'analyse des séquences des tailles des fragments d'ADN a été obtenue pour chacun des six gènes. Au total, 50 cas de perte d'hétérozygoties ont été détectés : Y = C + T (50 %, 25/50), R = A + G (22 %, 11/50), W = A + T (12 %, 6/50), K = G + T (10 %, 5/50), S = G + C (6 %, 3/50) et M = A + C (2 %, 1/50). Ce dernier est utilisé comme un moyen de diversification génétique observé chez les organismes diploïdes, comme *C. tropicalis*. Le fragment de gène MDR1 contient le grand nombre de perte d'hétérozygotie (18), suivit de XYR1 (12) puis SAPT4 (9), ZWF1a (7) et enfin ICL1 (2) et SAPT2 (2) (Tableau IX).

Tableau IX : Caractéristiques des 6 fragments de gènes utilisés dans cette étude

Fragment de gène	Taille du fragment du gène	Nombre d'allèles	Nombre de sites nucléotidiques variables	Positions nucléotidiques	Hétérozygotie						N° d'hétérozygotie
					Y	R	W	K	M	S	
ICL1	447	2	2	271, 277	1	1	0	0	0	0	2
MDR1	425	10	13	13, 55, 178, 242, 247, 250, 262, 310, 319, 340, 394, 403, 421	6	6	4	1	0	1	18
SAPT2	525	3	2	256, 519	0	1	0	1	0	0	2
SAPT4	390	4	9	103, 130, 133, 163, 170, 193, 196, 347, 380	4	2	0	2	0	1	9
XYR1	370	10	11	11, 14, 83, 92, 101, 180, 188, 215, 242, 287, 344	8	1	2	0	1	0	11
ZWF1a	520	8	5	52, 64, 304, 505, 508	6	0	0	1	0	0	7
Total	2 677	38	42		25	11	6	5	1	2	50

III.1.1.7. Structure de la population des DSTs de *Candida tropicalis*

Les données MLST ont été analysées plus en détail pour déduire les relations génétiques entre nos isolats et ceux déposés dans la base de données officielle MLST de *C. tropicalis* (1 269 isolats ; au 26 mai 2021). La diversité génétique signalée avec plusieurs types de séquences diploïdes (DST) de *C. tropicalis* décrits, a été regroupée au sein de complexes clonaux distincts grâce à l'analyse BURST. Cette dernière nous a montré que les 16 DSTs ont été divisés en 5 complexes clonaux et 7 singletons (Tableau VIII). Parmi ces génotypes identifiés, le type le plus fréquent (DST 1179) était le génotype fondateur putatif du CC 64 qui comprend également au génotype DST 1185 du Cameroun et un génotype DST 83 précédemment identifié au Royaume-Uni. En plus, un génotype camerounais supplémentaire (DST 1186) s'est avéré être le génotype fondateur du complexe CC 63 qui contient également le DST 731 isolé en Chine (Figure 22). En outre, le génotype DST 346 aussi précédemment isolé en Chine a été le génotype fondateur putatif du CC 15. Les autres DST des isolats camerounais avaient pour fondateur putatif les isolats venant d'ailleurs.

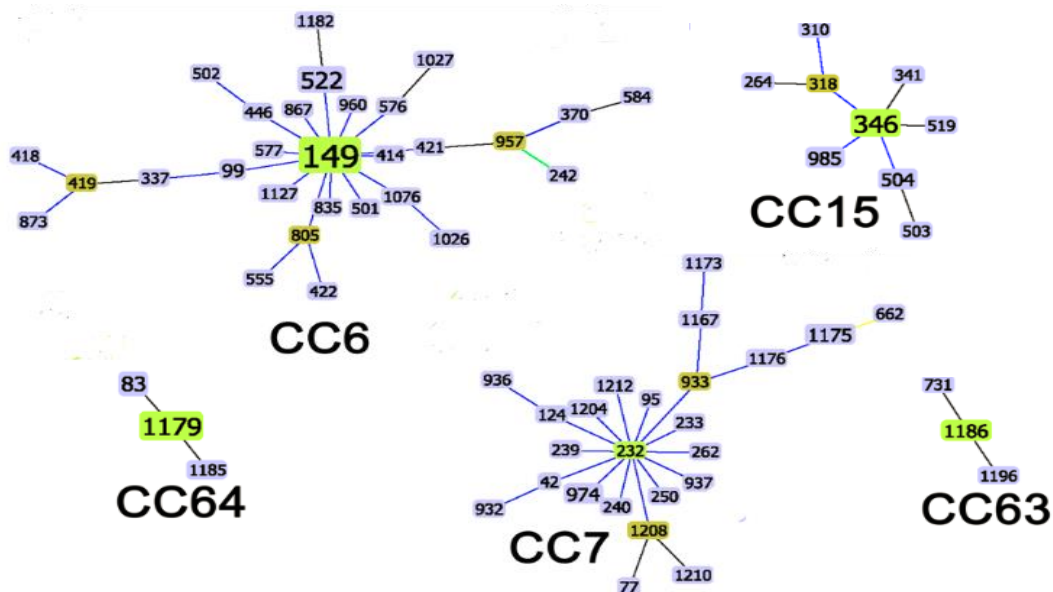
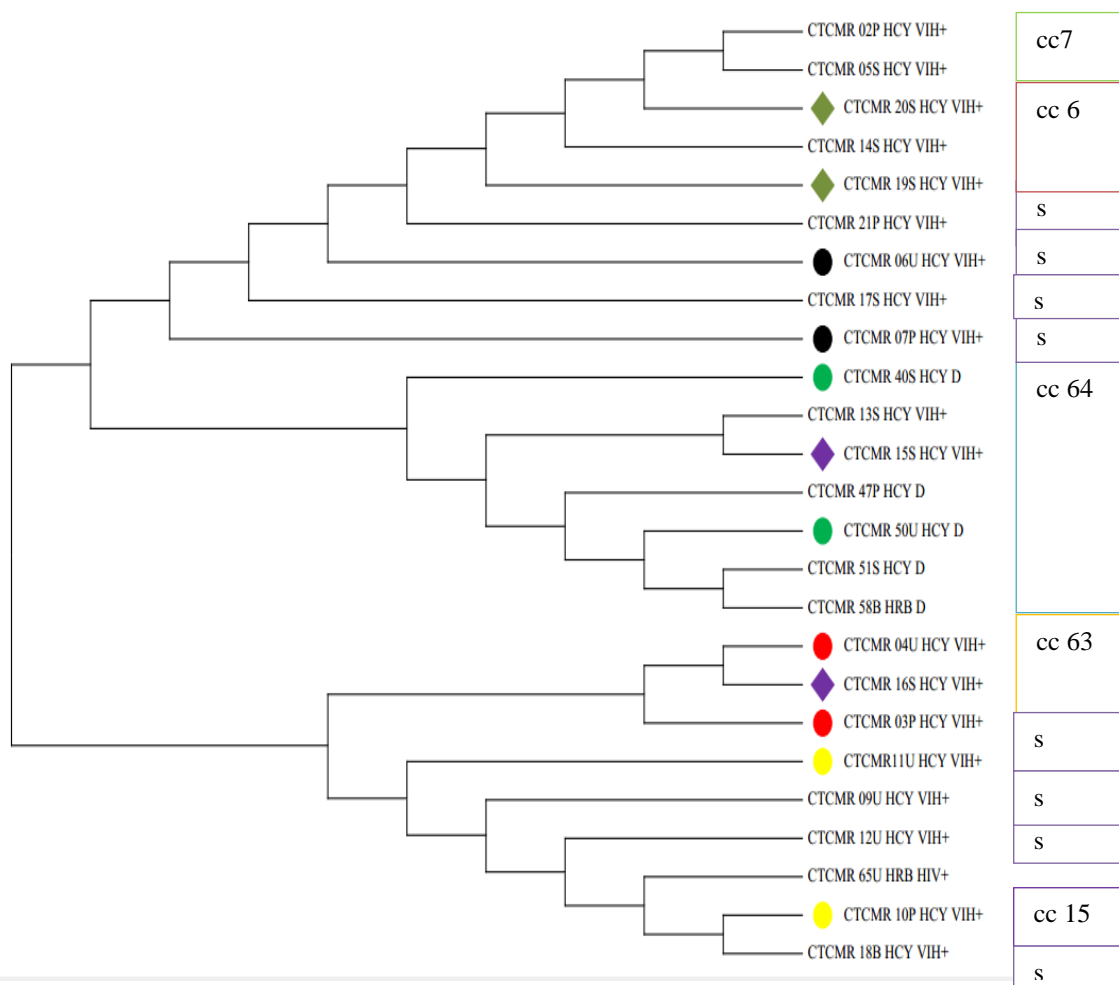


Figure 22 : DST regroupés en complexes clonaux (CC) grâce à l'analyse BURST

Analyse phylogénétique

Le lien de parenté qui existe entre les différents isolats a été illustré par la construction de l'arbre phylogénétique, à partir des séquences concaténées des 06 gènes de chacun des 25 isolats. Le résultat de l'analyse phylogénétique est présenté à travers la figure 23 ci-après. Les

isolats dont les génotypes MLST sont identiques étaient très proches les uns des autres. Les isolats qui n'avaient pas le même génotype MLST étaient génétiquement éloignés. Les isolats dont les génotypes MLST ne différaient qu'au niveau d'un seul gène étaient génétiquement proches par rapport à ceux dont la différence se situait au niveau de 2 gènes. Les isolats étaient de plus en plus génétiquement éloignés à chaque fois que la différence passait de 2 à 3 gènes, de 3 gènes à 4 gènes et ainsi de suite.



Rond noir : *C. t* provenant d'un même patient mais échantillon différent (CTCMR 6U et CTCMR 7P)
 Rond vert : *C. t* provenant d'un même patient mais échantillon différent (CTCMR 40S et CTCMR 50U)
 Rond rouge : *C. t* provenant d'un même patient mais échantillon différent (CTCMR 3P et CTCMR 4U)
 Rond jaune : *C. t* provenant d'un même patient mais échantillon différent (CTCMR 10P et CTCMR 11U)
 Losange vert : Différent *C. t* mais provenant du même échantillon
 Losange violet : Différent *C. t* mais provenant du même échantillon

Figure 23 : Dendrogramme montrant la relation entre les souches de *C. tropicalis*

III.1.2. Profil de sensibilité des isolats de *Candida tropicalis* aux antifongiques usuels et formation de biofilm

Les résultats de CMI des isolats de *C. tropicalis* ont été répertoriés sur la figure 24. Il ressort de cette figure que tous les 26 isolats sont sensibles à la 5-fluorocytosine et à l'Amphotéricine B. Les échinocandines (anidulafungine, caspofungine, micafungine) quant à eux, ont présenté une activité variée entre 80 et 92%. Par contre, les isolats ont plus été résistants aux azolés. De ce fait, 14 (53,8%), 11 (42,3%), 10 (38,4%) et 6 (23,1%) isolats ont été résistants au fluconazole, à l'itraconazole, au posaconazole et au voriconazole respectivement.

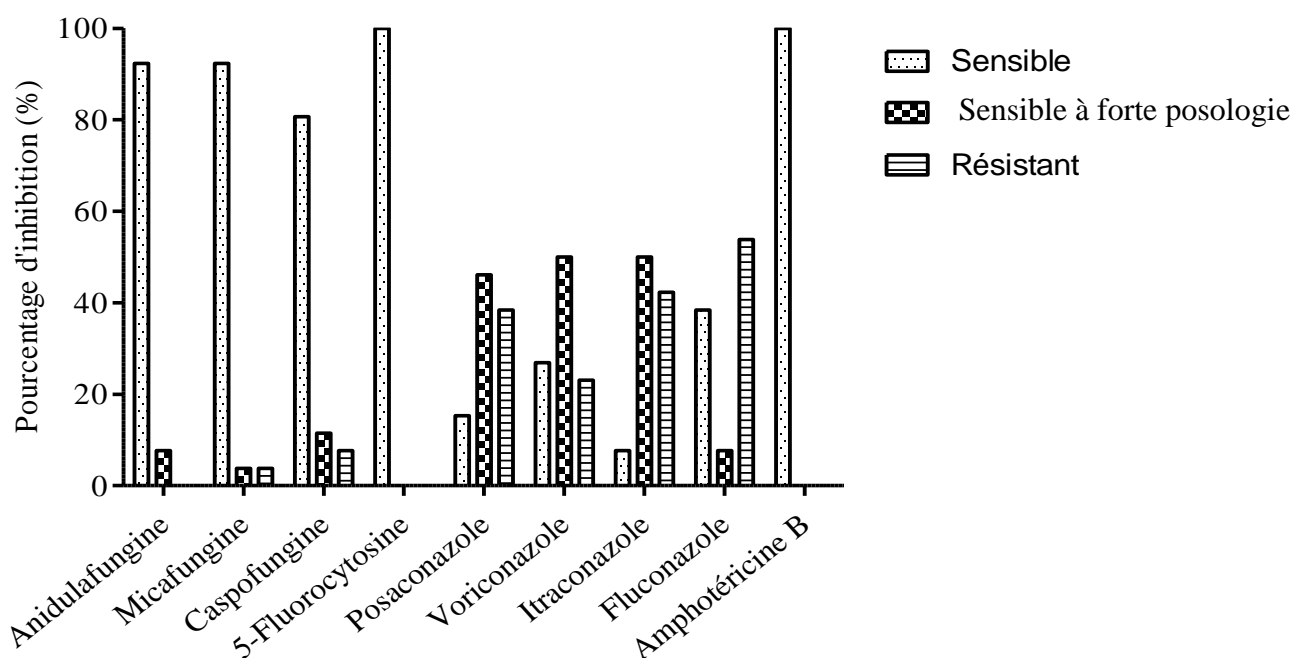


Figure 24 : Pourcentages de sensibilité des isolats de *C. tropicalis* testés en fonction de chaque antifongique.

III.1.2.1. Profil de résistance des isolats en fonction du type d'échantillon biologique

En étudiant la sensibilité en fonction du type d'échantillon biologique (Tableau X), il ressort que les échantillons de selles qui avaient le plus grand nombre d'isolats ont présenté un pourcentage de résistance élevé et varié aux azolés variant de 50% à 70%. Par ailleurs, les isolats en provenance des échantillons d'urines et des prélèvements vaginaux ont pour la plupart présenté une activité sensible à forte posologie vis-à-vis des azolés avec des

pourcentages variants entre 12,5% à 75%. Les isolats des prélèvements buccaux par contre ont été sensibles aux azolés. Pour ce qui était des autres classes d'antifongiques (échinocandines, 5-Fluorocytosine et polyènes) les isolats sans distinction du type d'échantillons biologiques, ont été pour la plupart sensibles.

Tableau X : Profil de résistance des isolats de *C. tropicalis* en fonction du type d'échantillon biologique.

		Antifongiques								
		Anidula fungine	Mica fungine	Caspo fungine	5-Fluoro cytosine	Posaco nazole	Vorico nazole	Itraco nazole	Fluco nazole	Ampho téricine B
Prélèvement vaginal (6)	S	5 (83,3%)	5 (83,3%)	4 (66,7%)	6 (100%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	6 (100%)
	SFP	1 (16,7%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (50,0%)	5 (83,3%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)
	R	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	0 (0,0%)	3 (50,0%)	4 (66,7%)	0 (0,0%)
Prélèvement buccal (2)	S	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)	0 (0,0%)	2 (100%)	2 (100%)
	SFP	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (100%)	1 (50,0%)	2 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	R	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Selles (10)	S	9 (90,0%)	10 (100%)	8 (80,0%)	10 (100%)	2 (20,0%)	2 (20,0%)	1 (10,0%)	3 (30,0%)	10 (100%)
	SFP	1 (10,0%)	0 (0,0%)	2 (20,0%)	0 (0,0%)	3 (30,0%)	3 (30,0%)	3 (30,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	R	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (50,0%)	5 (50,0%)	6 (60,0%)	7 (70,0%)	0 (0,0%)
Urines (8)	S	8 (100%)	7 (87,5%)	7 (87,5%)	8 (100%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)	0 (0,0%)	4 (50,0%)	8 (100%)
	SFP	0 (0,0%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	4 (50,0%)	4 (50,0%)	6 (75,0%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)
	R	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (37,5%)	1 (12,5%)	2 (25,0%)	3 (37,5%)	0 (0,0%)

S : sensible ; **SFP** : Sensible à forte posologie; **R** : résistant.

III.1.2.2. Profil de résistance des isolats en fonction du type de patient et du lieu de prélèvement ainsi qu'en fonction des isolats provenant des sites biologiques différents chez un même patient.

Les isolats issus des patients de l'HRB ont tous été sensibles aux antifongiques testés. Par ailleurs, pour les isolats issus des patients de l'HCY, sur les 5 issus des patients diabétiques, 1 (CTCMR 51S) était résistant à la fois au posaconazole, itraconazole, voriconazole et fluconazole. Deux autres isolats étaient résistants respectivement à la micafongine (CTCMR 50U^c) et à la caspofongine (CTCMR 47P). Les 2 isolats restants (CTCMR 40S^c et CTCMR 46U) étaient tous sensibles aux antifongiques utilisés. Par contre sur les 19 isolats issus des patients VIH+, 4 isolats (CTCMR 14S, CTCMR 13S, CTCMR 15S et CTCMR 20S) étaient résistants aux 4 azolés utilisés (posaconazole, itraconazole, voriconazole, et fluconazole). À côté, 4 (CTCMR 7P^b, CTCMR 21P, CTCMR 11U^a, CTCMR 4U^d) ont été résistants à 3 azolés (posaconazole, itraconazole, fluconazole). Un isolat (CTCMR 2P) a été résistant à 3 antifongiques (Caspofongine, itraconazole et fluconazole). Six (6) isolats ont été sensibles à tous les antifongiques utilisés. Le reste de 5 isolats a été résistant soit à 1 ou 2 antifongiques el qu'indiqué dans le tableau XI.

En étudiant le profil de résistance des isolats obtenus de différents sites de prélèvement chez un même patient (Tableau XI), il ressort que la susceptibilité des isolats provenant de différents types d'échantillon biologique bien qu'obtenu chez un même individu n'avait aucun effet sur les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) obtenues pour tous les antifongiques testés.

Tableau XI : Profil de résistance des isolats en fonction du type de patient et du lieu de prélèvement ainsi qu'en fonction des isolats provenant des sites biologiques différents chez un même patient.

Code du labo	Type de patients	Lieu de prélèvement	CC	Résistance aux ATF
CTCMR 58B	PDB	HRB	64	/
CTCMR 65U	HIV+	HRB		/
CTCMR 46U		HCY	64	/
CTCMR 51S		HCY	64	Po, It, Vo, Fl
CTCMR 50U^c		HCY	64	Mi
CTCMR 40S^c	PDB	HCY	64	/
CTCMR 47P		HCY	S	Ca
CTCMR 10P^a		HCY	15	/
CTCMR 11U^a		HCY	S	Po, It, Fl
CTCMR 14S		HCY	6	Po, It, Vo, Fl
TCMR 19S		HCY	6	/
CTCMR 5S		HCY	7	Fl
CTCMR 2P		HCY		Ca, It, Fl
CTCMR 6U^b		HCY	S	/
CTCMR 7P^b		HCY	S	Po, It, Fl
CTCMR 9U	VIH+	HCY	S	Po, Vo
CTCMR 12U		HCY	S	Fl
CTCMR 13S		HCY	64	Po, It, Vo, Fl
CTCMR 15S		HCY	64	Po, It, Vo, Fl
CTCMR 17S		HCY	S	/
CTCMR 18B		HCY	S	/
CTCMR 20S		HCY	6	Po, It, Vo, Fl
CTCMR 21P		HCY	S	Po, It, Fl
CTCMR 3P^d		HCY		Fl
CTCMR 4U^d		HCY	63	Po, It, Fl
CTCMR 16S		HCY		It, Fl

/: Sensible aux antifongiques ; ^{a, b, c, d} : code de lettres représentant les mêmes patients respectivement ; **CC** : Complexes Clonaux ; **Po** : Posaconazole ; **It** : Itraconazole ; **Fl** : Fluconazole ; **Vo** : Voriconazole ; **Mi** : Micafongine ; **Ca** : Caspofongine ; **ATF** : antifongique ; **PV** : Prélèvement vaginal ; **PB** : Prélèvement buccal ; **HRB** : Hôpital Régional de Bafoussam ; **HCY** : Hôpital Central de Yaoundé ; **PDB** : patients diabétiques ; **VIH+** : patients avec le VIH.

III.1.2.3. Relation entre complexes clonaux et résistance aux antifongiques

Bien que l'analyse de la relation entre les complexes clonaux et la résistance aux antifongiques permette de constater qu'il n'y a pas de lien entre les complexes clonaux et la résistance aux azolés (p-value = 0,82), un constat est tout de même dégagé dans le tableau VIII ci-dessus. Celui de la grande tendance de développement de la résistance au fluconazole de tous nos isolats du CC 7 (CTCMR2P pour le DST 1176 et CTCMR5S pour le DST 1175) et du CC 63 (CTCMR3P et CTCMR4U pour le DST 1186 et CTCMR16S pour le DST1196).

III.1.2.4. Volume du biofilm de *Candida tropicalis* formé

La figure 25 ci-après présente les résultats de la quantification des biofilms en utilisant la coloration au crystal violet. Il est évident que tous ces isolats ont formé des biofilms, bien que des différences apparaissent en fonction des isolats.

Les souches étaient hétérogènes en termes de niveau de formation de biofilms. Dans les échantillons des PVVIH, les isolats issus des prélèvements vaginaux (CTCMR 2P, CTCMR 7P, CTCMR 10P), des prélèvements buccaux (CTCMR 18B) et des selles (CTCMR 14S, CTCMR 15S, CTCMR 16S, CTCMR 17S et CTCMR 20S) ont produit des biofilms de façon significative comparé aux souches de références (C. k ATCC 1415, C. a ATCC 29456). De même, des 6 isolats issus des patients diabétiques, 3 (CTCMR 47P, CTCMR 40S, CTCMR 50U) ont produit de façon significative les biofilms, comparé aux souches de références de levures (C. k ATCC 1415, C. a ATCC 29456).

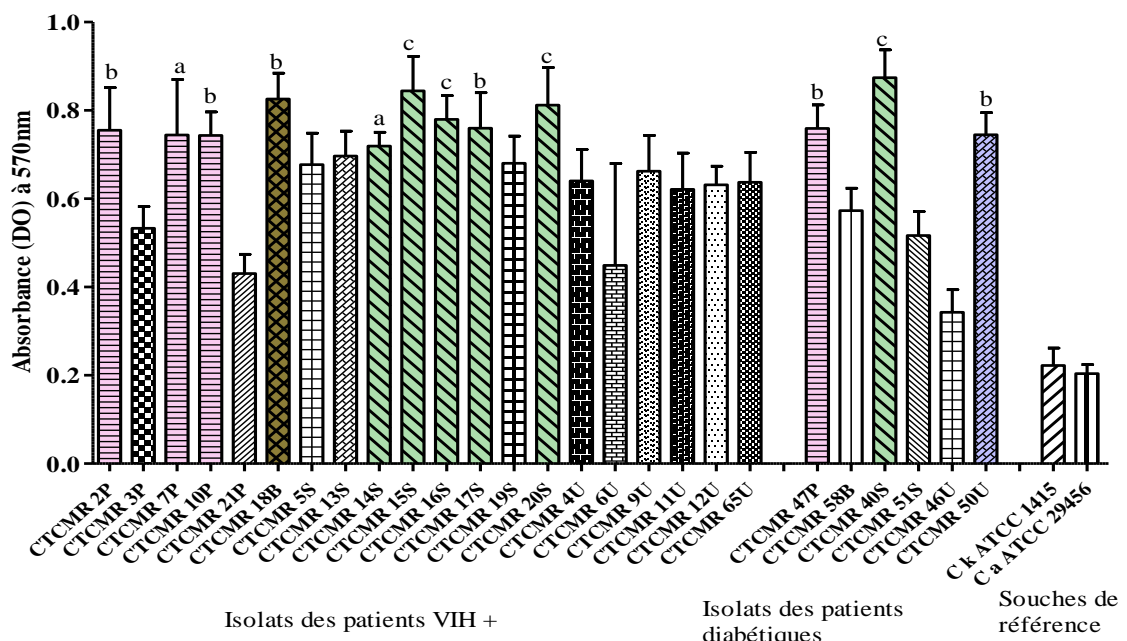


Figure 25 : Aptitude des isolats de *C. tropicalis* à former le biofilm après 48h.

a : les souches sont significativement différentes aux 2 souches de références à $P < 0,05$;

b : les souches sont significativement différentes aux 2 souches de références à $P < 0,01$;

c : les souches sont significativement différentes aux 2 souches de références à $P < 0,001$;

CTCMR : code de la souche ; **P** : prélèvement vaginal ; **B** : prélèvement buccal ; **S** : selles ; **U** : Urines.

III.1.2.5. Relation entre les isolats formateurs de biofilms de façon significative et la résistance aux antifongiques ainsi que les génotypes MLST

Sur les 26 isolats de *C. tropicalis* testés et formateurs de biofilms, 17 ont été résistants sur au moins 1 des 9 antifongiques testés et 47,1% (8/17) d'entre eux ont formé de façon significative les biofilms. Des 9 autres isolats sensibles à tous les antifongiques testés, 44,4% (4/9) ont formé de façon significative les biofilms. On constate qu'indépendamment de leurs susceptibilités aux antifongiques, les isolats de *C. tropicalis* ont des aptitudes à former les biofilms et le test de Khi-2 réalisé à cet effet afin d'établir une possible relation entre les isolats qui ont formés les biofilms de façon significative et la résistance aux antifongiques donne de constater qu'il n'y a aucun lien ($p\text{-value} = 1,00$). De même, la formation du biofilm n'avait pas de rapport avec les génotypes et par ricochet les complexes clonaux car seul un isolat appartenant chacun aux complexes clonaux 7 et 63 respectivement (tous résistants au fluconazole) ont formé de façon significative le biofilm.

III.1.2.6. Structure du biofilm de *Candida tropicalis* au microscope électronique à balayage

Nous remarquons à partir de la figure 26 que le biofilm mature était constitué d'un réseau dense et homogène de cellules de *C. tropicalis*.

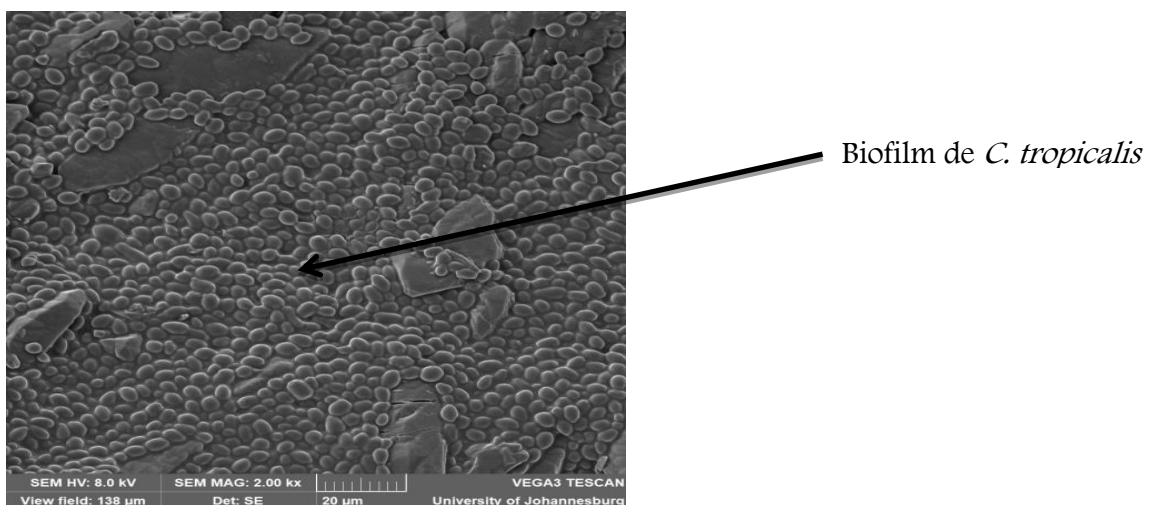


Figure 26 : structure du biofilm de *C. tropicalis* CTCMR15S observé au microscope électronique à balayage après 48 h de culture sur du *yeast nitrogen base*.

III.1.3. Étude de la sensibilité de *Candida* aux extraits de champignons endophytes de *Azadirachta indica*

III.1.3.1 Champignons endophytes isolés de *Azadirachta indica*

À partir des 390 fragments de plantes de *A. indica* ensemencés, 129 isolats de champignons endophytes ont été obtenus. Tous les organes étudiés se sont révélés être colonisés par des champignons à des pourcentages variants entre 6,6% et 70% selon la partie de la plante. L'organe le plus colonisé était l'endocarpe (70%), suivi de l'exocarpe (53,3%) et de la tige (53,3%). Les organes les moins colonisés étaient les brindilles de feuilles (6,6%), l'écorce de tige (16,6%) et le tronc (16,6%) (Tableau XII).

Tableau XII : Fréquence de colonisation des différents organes de *A. indica* par les champignons endophytes.

Organes de plantes	Fréquence d'infection (%)	Nombre d'isolats (%)
Tronc	16,6%	5 (3,87%)
Endocarpe	70,0%	21 (16,27%)
Écorce tronc	36,6%	11 (8,52%)
Écorce racine	40,0%	12 (9,03%)
Mésocarpe	13,3%	4 (3,10%)
Brindille de feuilles	6,6%	2 (1,55%)
Fleurs	40,0%	12 (9,03%)
Écorce tige	16,6%	5 (3,87%)
Racine	20,0%	6 (4,65%)
Exocarpe	53,3%	16 (12,40%)
Fleurs	26,6%	8 (6,20%)
Brindille fleurs	36,6%	11 (8,52%)
Tiges	53,3%	16 (12,40%)
Total		129

III.1.3.2 Activité antifongique préliminaires des extraits bruts à l'acétate d'éthyle des champignons endophytes à 500 µg/mL

Rendements d'extraction

Les champignons endophytes isolés ont été cultivés dans 200 mL de *potatoes dextrose broth*, puis extraits à l'acétate d'éthyle. Les extraits bruts préparés ont donné des rendements d'extraction allant de 12 à 212 mg/200 mL de substrat en fonction des souches de champignons (Tableau XIII). Le rendement le plus élevé (212 mg/200mL) a été obtenu du champignon endophyte provenant de l'écorce de racine et le plus faible (12mg/200mL) de souche provenant des feuilles.

Tableau XIII : Rendement d'extraction des champignons endophytes

Code de l'extrait de champignon endophyte	Extraction (mg/200mL)
<i>Albfl</i> 7	46
<i>Albfl</i> 11	40
<i>Albfl</i> 4	51
<i>Albfl</i> 5	57
<i>Albfl</i> 9	46
<i>Alti</i> 6	131
<i>Aleti</i> 4	47
<i>Alen</i> 2	44
<i>Alme</i> 3	36
<i>Allex</i> 11	119
<i>Alfe</i> 8	12
<i>Aletr</i> 5	93
<i>Alera</i> 8	212

Al : *Azadirachta indica* ; *Alti* : tige ; *Aleti* : écorce tige ; *Altr* : tronc ; *Aletr* : écorce tronc ; *Alen* : endocarpe ; *Alme* : mésocarpe ; *Allex* : exocarpe ; *Aira* : racine ; *Alera* : écorce racine ; *Alfl* : fleurs ; *Albfl* : brindille fleurs ; *Alfe* : feuilles ; *Albfe* : brindille feuilles.

Le screening de l'activité antifongique de ces extraits de champignons endophytes a été effectué sur *C. tropicalis* CTCMR15S. Les résultats ont montré que sur les 129 extraits de champignons endophytes testés, 13 (10,1%), ont présenté une activité inhibitrice à 500 µg/mL contre CTCMR15S, comme indiqué dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Répartition des extraits bruts à l'acétate d'éthyle des champignons endophytes en fonction de l'origine de la plante

Organes de plante	Nombre total d'extraits testés	Endophytes actifs par organe sur <i>C. tropicalis</i> CTCMR15S
Tige	16	1
Écorce de tige	5	1
Tronc	5	0
Écorce de tronc	11	1
Endocarpe	21	1
Mésocarpe	4	1
Exocarpe	16	1
Racine	6	0
Écorce de racine	12	1
Fleurs	12	0
Brindille de fleurs	11	5
Feuilles	8	1
Brindille de feuilles	2	0
Total	129	13

Le screening d'activité antifongique a été effectué sur *C. tropicalis* CTCMR15S. Le nombre total de champignons endophytes isolés d'organes végétaux spécifiques et le nombre d'extraits fongiques actifs par organe de plante présentant une activité antifongique à 500 µg/mL sont indiqués dans le tableau ci-dessus.

III.1.3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits sélectionnés

Les 13 extraits ayant présenté une activité inhibitrice à 500 µg/mL contre CTCMR15S ont été soumis à la détermination des CMI et les résultats sont résumés dans le tableau XV ci-dessous.

Les extraits ont présenté des activités avec des valeurs de CMI allant de 125 à 500 µg/mL. L'extrait A/bfl 11 a été le plus actif (CMI=125 µg/mL) contre *C. tropicalis* CTCMR15S et a été sélectionné pour un fractionnement bioguidé après avoir été identifié.

Tableau XV : CMI des extraits de champignons endophytes en $\mu\text{g/mL}$ ayant montré une activité à 500 $\mu\text{g/mL}$

Organes de plante	Code des extraits de champignons endophytes	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
		<i>C. tropicalis CTCMR 15S</i>
Tige	<i>AI</i> ti 6	500 \pm 0,00
Écorce de tige	<i>AI</i> eti4	500 \pm 0,00
Écorce tronc	<i>AI</i> etr5	500 \pm 0,00
Endocarpe	<i>AI</i> en2	500 \pm 0,00
Mésocarpe	<i>AI</i> me3	250 \pm 0,00
Exocarpe	<i>AI</i> ex11	500 \pm 0,00
Écorce de racine	<i>AI</i> era8	500 \pm 0,00
	<i>AI</i> bfl4	500 \pm 0,00
	<i>AI</i> bfl5	500 \pm 0,00
	<i>AI</i> bfl7	500 \pm 0,00
	<i>AI</i> bfl9	500 \pm 0,00
Brindilles de fleurs	<i>AI</i>bfl11	125\pm0,00
Feuilles	<i>AI</i> fe8	250 \pm 0,00
	Fluconazole	16 \pm 0,00

Le test dose-réponse a été effectué contre cinq *Candida sp.* et les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm SD (écart-type). *AI* : *Azadirachta indica* ; *AI*ti : tige ; *AI*eti : écorce tige ; *AI*etr : écorce tronc ; *AI*en : endocarpe ; *AI*me : mésocarpe ; *AI*ex : exocarpe ; *AI*era : écorce racine ; *AI*bfl : brindille fleurs ; *AI*fe : feuilles.

III.1.3.4. Identification du champignon endophyte d'intérêt

Le champignon endophyte dont l'extrait a présenté la meilleure activité antifongique a été isolé des brindilles de fleurs de *A. indica* (*AI*bfl11) et identifié comme *Aspergillus niger* avec un score de 2,27 grâce au MALDI/ToF. Le spectre étant représenté sur la figure 27 ci-dessous.

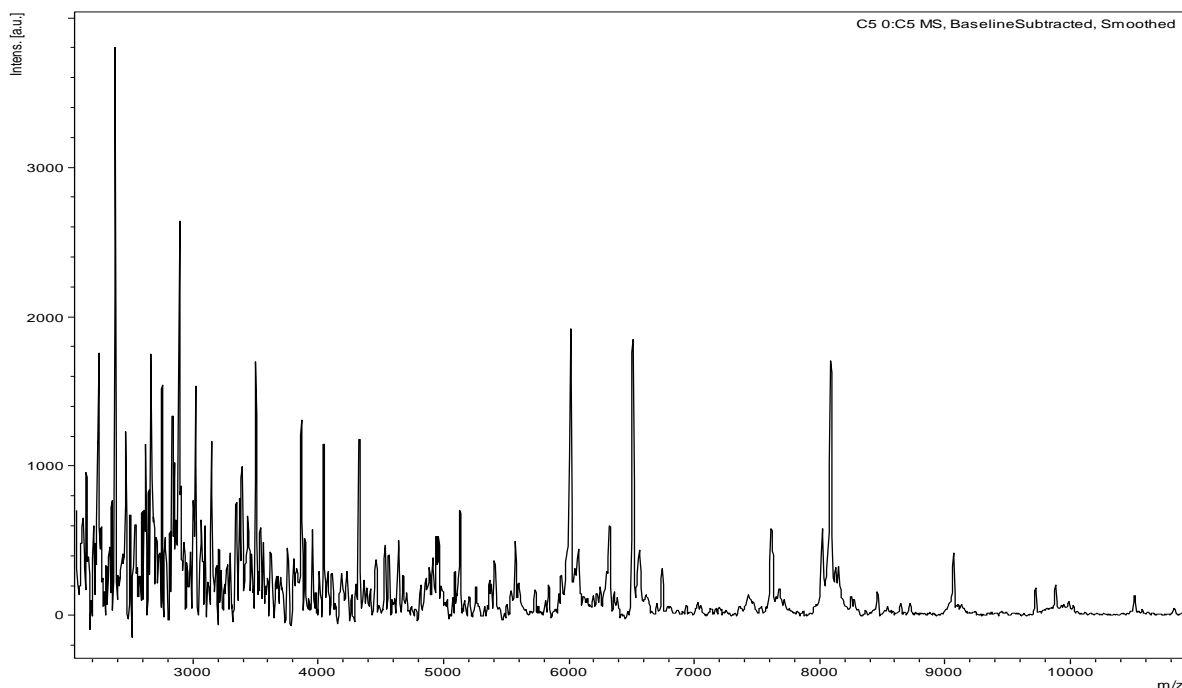


Figure 27 : Spectre de masse de *Aspergillus niger*

III.1.3.5. Fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle *A/bf111*

L'extrait brut d'acétate d'éthyle *A/bf111* a été sélectionné pour le fractionnement et l'analyse phytochimique. La chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait brut d'acétate d'éthyle de *A/bf111* a fourni six fractions : fraction I (n-hexane), fraction II (n-hexane-AcOEt, 9 : 1), fraction III (n-hexane-AcOEt, 7 : 3), fraction IV (n-hexane-AcOEt, 1 : 1), fraction V (acétate d'éthyle) et fraction VI (méthanol). Ces fractions ont été testées pour leur activité antifongique contre *C. tropicalis* CTCMR 15S. Les valeurs de CMI obtenues sont présentées dans le tableau XVI.

Toutes, les fractions testées ont montré une activité avec des valeurs de CMI principalement à 500 $\mu\text{g/mL}$ ou plus contre *C. tropicalis* CTCMR15S. Il est donc pertinent de noter que le fractionnement n'a pas amélioré l'activité biologique comme prévu. Au contraire, les fractions ont montré une activité moins prononcée que l'extrait brut de départ (*A/bf111*). La suite des tests se fera avec l'extrait brut d'intérêt.

Tableau XVI : Concentrations minimales inhibitrices des fractions

	Fractions	Valeurs des CMI ($\mu\text{g/mL}$) <i>C. tropicalis</i> CTCMR15S
Extrait (A/bf11)	Fraction I^a	> 500
	Fraction II^b	> 500
	Fraction III^c	500 \pm 0,00
	Fraction IV^d	> 500
	Fraction V^e	500 \pm 0,00
	Fraction VI^f	> 500
	Fluconazole	16 \pm 0,00

^afraction I (n-hexane), ^bfraction II (n-hexane-AcOEt, 9:1), ^cfraction III (n-hexane-AcOEt, 7:3), ^dfraction IV (n-hexane-AcOEt, 1:1), ^efraction V (acétate d'éthyle) and ^ffraction VI (méthanol).

Le mode d'action de cet extrait d'intérêt a été déterminé afin de voir à quel niveau il agirait.

III.1.3.6. Étude de quelques modes d'action de l'extrait à l'acétate d'éthyle A/bf11 sur *C. tropicalis* CTCMR15S

a) Cinétique d'inhibition de l'extrait à l'acétate d'éthyle A/bf11

Sur la base de la CMI, nous avons effectué un essai d'inhibition en fonction du temps pour *C. tropicalis* CTCMR 15S, en analysant la destruction des structures fongiques à des intervalles de temps choisis et en vérifiant si l'extrait brut avait une action fongistatique ou fongicide. Les résultats sont présentés dans la figure 28 ci-dessous.

De cette figure, il ressort que, l'extrait réduit la croissance de *C. tropicalis* CTCMR 15S de 0,75 logUFC en comparaison au contrôle négatif (4,05 logUFC) sans entraîner une mort totale au bout de 24h d'incubation à 125 $\mu\text{g/mL}$, traduisant son effet fongistatique.

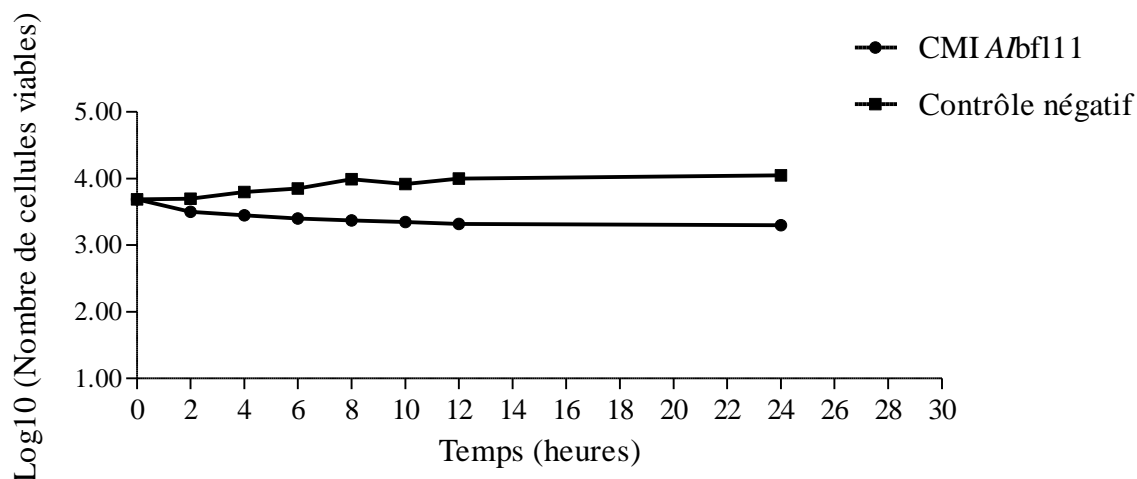


Figure 28 : Cinétique de mortalité de *C. tropicalis* CTCMR15S en présence de l'extrait brut à la CMI.

b) Effet de la présence de l'ergostérol et du sorbitol sur la CMI de l'extrait brut sur *Candida tropicalis* CTCMR15S

La détermination des CMI de l'extrait brut en présence de l'ergostérol exogène et du sorbitol a donné des résultats consignés dans le tableau XVII ci-après.

Il ressort de ces résultats que, les CMI de l'extrait brut en présence de l'ergostérol exogène sont de 500 µg/mL. Cette CMI est 4 fois supérieure à la CMI obtenue en absence d'ergostérol exogène sur *C. tropicalis* CTCMR15S. Il en est de même pour la CMI du sorbitol qui est à 500 µg/mL soit 4 fois supérieure à la CMI en l'absence du sorbitol. Le contrôle avec le sorbitol a assuré la viabilité de la souche puisqu'elle a pu se développer en présence de sorbitol et en l'absence de l'un ou l'autre médicament.

Tableau XVII : CMI (µg/mL) de l'extrait brut en présence de l'ergostérol et du sorbitol

	Extrait brut	Amphotéricine B
En absence d'ergostérol et de sorbitol	125	0,5
En présence de l'ergostérol	500±0,00	16±0,00
En présence du sorbitol	500±0,00	-

III.1.3.7. Inhibition de la formation du biofilm de *Candida tropicalis* CTCMR15S

De l'étude de l'activité antibiofilm de l'extrait brut aux concentrations de 4 CMI, 2 CMI et CMI sur la souche de *C. tropicalis* CTCMR15S, nous avons obtenu les D.O. matérialisées par la figure 29 ci-dessous.

Les D.O sont directement proportionnelles à la quantité de biofilm. Les résultats du test d'inhibition du biofilm ont montré un effet dépendant de la concentration de l'extrait. À partir de la figure 29, nous pouvons dire qu'à la concentration de 4 CMI, il n'y avait pas de différence significative sur l'inhibition du biofilm avec le contrôle positif qui était le fluconazole. Par ailleurs, on observe une inhibition dose dépendante en comparaison au contrôle négatif.

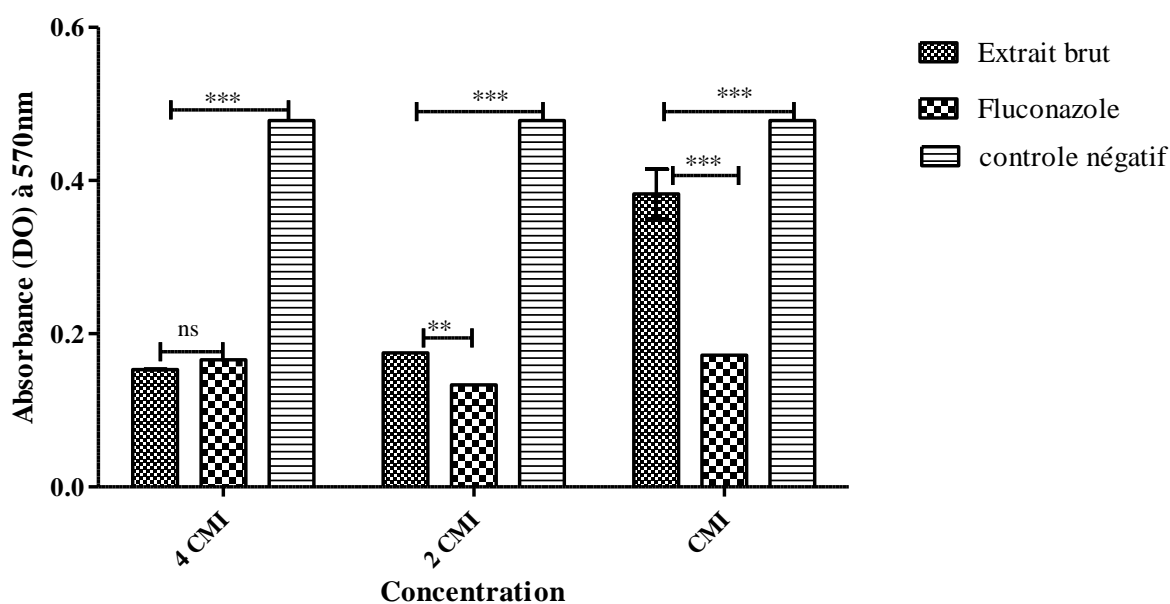


Figure 29 : Concentration dépendant de l'inhibition de la formation du biofilm.

ns : pas de différence significative à $P > 0,05$;

** : différence significative à $P < 0,01$;

*** : différence significative à $P < 0,001$;

Le profil phytochimique de l'extrait brut (A/bf11) a été déterminé afin de faire la lumière sur les métabolites secondaires potentiels qui contribuent probablement à son activité antifongique.

III.1.3.8. Analyse GC-MS de l'extrait brut de l'acétate d'éthyle A/bf11

Les résultats de l'analyse de la composition de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle A/bf11 par GC-MS ont révélé une grande diversité dans le contenu des métabolites. Globalement, le principe actif, la surface du pic de concentration (%), le temps de rétention (RT) et la formule moléculaire sont présentés dans le tableau XVIII. L'analyse GC-MS a fourni 118 pics détectés pour l'extrait brut dont 99 ont été identifiés et correspondent à des composés connus présents dans la base de données NIST, tandis que 19 composés n'ont pas pu être identifiés et ont été

considérés comme "inconnus". Les composés obtenus appartiennent majoritairement à la classe des terpénoïdes. Certains de ces composés étaient abondants, notamment l'acide acétique, trifluoro-, ester éthylique (6,85%), le 3-butyn-2-ol, 2-méthyl- (3,25%) et l'acide pentanoïque (2,43%).

Tableau XVIII : Métabolites identifiés par GC-MS dans l'extrait brut d'acétate d'éthyle de A/bf11.

N°	TR (min)	Nom	Formule	Quantité (%)
1	3,914	Furan, 2-pentyl-	C ₉ H ₁₄ O	1,01
2	4,025	Pentanoic acid	C₅H₁₀O₂	2,43
3	4,252	1,3-Dioxolane, 2-(1,1-diméthylethyl)-	C ₇ H ₁₄ O ₂	0,15
4	4,323	Silane, triméthyl-	C ₃ H ₁₀ Si	0,64
5	4,571	3-Méthyl-2-buténoic acid, tridéca-2-ynyl ester	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	0,01
6	4,613	1,2-Bénédiol, o-(3-méthylbut-2-énoyl)-o'-(6-bromohéxanoyl)-	C ₁₇ H ₂₁ BrO ₄	0,06
7	4,813	Succinic acid, 2-méthylpent-3-yl 2,4-diméthylpent-3-yl ester	C ₁₇ H ₃₂ O ₄	0,02
8	5,624	Inconnu	**	0,01
9	6,387	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	0,39
10	6,479	Tétradonium Bromide	C ₁₇ H ₃₈ BrN	0,13
11	7,047	Conessine	C ₂₄ H ₄₀ N ₂	0,03
12	7,149	N-Butylbenzylamine	C ₁₁ H ₁₇ N	0,01
13	7,260	Benzène, 1,3-bis(1,1-diméthylethyl)-	C ₁₄ H ₂₂	0,17
14	7,297	4-(2-Acétoxyphényl)-1-éthyl-3-méthyl-5-(4-nitrophényl)pyrazole	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₄	1,49
15	7,301	1,2,3-Propanetriol, 1-acétate	C ₅ H ₁₀ O ₄	0,51
16	7,384	2-Décenal, (E)-	C ₁₀ H ₁₈ O	0,06
17	7,384	2-Décenal, (Z)-	C ₁₀ H ₁₈ O	0,04
18	7,448	Cyclohexanone, 2-propyl-	C ₉ H ₁₆ O	0,08
19	7,465	Cyclohexanone, 2-octyl-	C ₁₄ H ₂₆ O	0,25
29	7,482	Cyclohexanone, 2-pentyl-	C ₁₁ H ₂₀ O	0,05
21	7,483	1-Undécanol	C ₁₁ H ₂₄ O	0,18
22	7,507	1-Décanol	C ₁₀ H ₂₂ O	0,41
23	7,51	1-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	0,03
24	7,789	Nonanoic acid	C ₉ H ₁₈ O ₂	0,35
25	7,895	1-[4-(4-tert-Butyl-spirocyclohexyl)-11-oxa-3-azatricyclo[6.2.1.0(1,6)]undéc-9-en-3-yl]-2,2,2-trifluoro-éthanone	C ₂₀ H ₂₈ F ₃ NO ₂	0,01
26	7,982	Naphthalène, 2-méthyl-	C ₁₁ H ₁₀	0,01
27	8,091	Pyridine, 4-(1,1-diméthylethyl)-	C ₉ H ₁₃ N	0,01
28	8,148	2-Méthoxy-4-vinylphénol	C ₉ H ₁₀ O ₂	0,86

29	8,190	9-Oxabicyclo[6.1.0]nonane	C ₈ H ₁₄ O	0,14
30	8,511	4-Methyl-1-heptyn-3-ol	C ₈ H ₁₄ O	0,22
31	8,805	Tetrahydropyran Z-10-dodecenoate	C ₁₇ H ₃₀ O ₃	0,16
32	8,885	Methanol, TBDMS derivative	C ₇ H ₁₈ OSi	0,01
33	9,079	n-Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0,07
34	10,420	1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	0,09
35	10,466	Cyclopropane, octyl-	C ₁₁ H ₂₂	0,15
36	10,760	Tridecane, 6-methyl-	C ₁₄ H ₃₀	0,01
37	10,784	Inconnu	**	0,01
38	11,253	2,4-Di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	0,18
39	12,410	a-Bromo-2,4-difluorotoluene	C ₇ H ₅ BrF ₂	0,01
40	12,548	Dibutyl itaconate	C ₁₃ H ₂₂ O ₄	1,11
41	12,601	Phthalic acid, monoamide, N-ethyl-N-(3-methylphenyl)-, ethyl ester	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	0,01
42	12,643	Diethyl Phthalate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	0,02
43	12,842	N,N-Diethyl-11H-indolo[3,2-c]quinoline-11-ethanamine	C ₂₁ H ₂₃ N ₃	0,1
44	12,849	Acetamide, 2-diethylamino-N-(4,5,6,7-tetrahydro-2-cyanobenzo[b]thiophen-3-yl)-	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ OS	0,29
45	12,851	Cyclobuta[1,2-b:3,4-b']dithiophene, octahydro-, (3aa,3bb,6aa,6ba)-	C ₈ H ₁₂ S ₂	0,14
46	13,981	Dodecyl acrylate	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	0,59
47	14,099	3-Butene-1,2-diol, 1-(2-furanyl)-	C ₈ H ₁₀ O ₃	0,02
48	14,131	1-(Trimethylsilyl)-1-propyne	C ₆ H ₁₂ Si	0,02
49	14,365	Acetic acid, trifluoro-, ethyl ester	C₄H₅F₃O₂	6,85
50	14,370	1H-1,2,4-Triazole	C ₂ H ₃ N ₃	1,73
51	14,379	3-Butyn-2-ol, 2-methyl-	C₅H₈O	3,25
52	14,416	Undecanoic acid, methyl ester	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0,12
53	14,832	N-[3,3'-Dimethoxy-4'-(2-piperidin-1-yl-acetylamino)-biphenyl-4-yl]-2-piperidin-1-yl-acetamide	C ₂₈ H ₃₈ N ₄ O ₄	0,04
54	14,861	Phenazine	C ₁₂ H ₈ N ₂	0,07
55	14,873	Methylphenidate, N-trifluoroacetyl-	C ₁₆ H ₁₈ F ₃ NO ₃	0,22
56	14,879	1,2-Ethanediamine, N,N,N',N'-tetraethyl-1,2-bis(4-fluorophenyl)-, (R*,S*)-	C ₂₂ H ₃₀ F ₂ N ₂	0,04
57	15,659	{Methanediylbis[(3,4,6-trichlorobenzene-2,1-diyl)oxy]}bis(trimethylsilane)	C ₁₉ H ₂₂ Cl ₆ O ₂ Si ₂	0,02
58	15,780	Inconnu	**	0,1
59	15,785	Inconnu	**	0,1
60	16,039	Inconnu	**	0,03
61	16,053	Indoline, 2-(hydroxydiphenylmethyl)-	C ₂₁ H ₁₉ NO	0,01
62	16,221	Phthalic acid, hexyl 2-propylphenyl ester	C ₂₃ H ₂₈ O ₄	0,09
63	16,225	Phthalic acid, hex-2-yn-4-yl hexyl ester	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	0,05
64	16,311	Methyl ethylphosphonofluoridate	C ₃ H ₈ FO ₂ P	0,01
65	16,647	Benzene, (1-methylhexadecyl)-	C ₂₃ H ₄₀	0,07

66	16,829	Tridecanoic acid, methyl ester	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1,01
67	16,833	Dodecanoic acid, methyl ester	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	0,59
68	17,080	Pyrrolidine-2-carboxamide, N-heptyl-N-methyl-	C ₁₃ H ₂₆ N ₂ O	0,03
69	17,105	Inconnu	**	0,01
70	17,302	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-ethylhexyl ester	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	0,24
71	17,373	Malonic acid, bis(2-trimethylsilylethyl ester	C ₁₃ H ₂₈ O ₄ Si ₂	0,03
72	17,564	Inconnu	**	0,03
73	17,745	Inconnu	**	0,28
74	18,858	Hexa-1,3,5-triyne	C ₆ H ₂	0,15
75	19,220	Cyclopropylacetonitrile	C ₅ H ₇ N	0,34
76	19,239	1-Propene-1,2,3-tricarboxylic acid, tributyl ester	C ₁₈ H ₃₀ O ₆	0,22
77	19,364	Nonanamide	C ₉ H ₁₉ NO	0,1
78	19,489	1-Pentyn-3-ol, 3,4-dimethyl-	C ₇ H ₁₂ O	0,13
79	19,632	Hexadecanamide	C ₁₆ H ₃₃ NO	0,05
80	19,637	Sebacic acid, di(3-hexyl) ester	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	0,02
81	19,793	Inconnu	**	0,02
82	19,941	Adipic acid, di(3-heptyl) ester	C ₂₀ H ₃₈ O ₄	0,02
83	20,044	Inconnu	**	0,05
84	20,044	Inconnu	**	0,08
85	20,233	2-Benzyl-3-methoxycyclopropanecarboxylic acid, methyl ester	C ₁₃ H ₁₆ O ₃	0,04
86	20,345	3,4-Difluorobenzonitrile	C ₇ H ₃ F ₂ N	0,09
87	20,367	Butyl citrate	C ₁₈ H ₃₂ O ₇	0,12
88	20,397	Adipic acid, butyl 4-heptyl ester	C ₁₇ H ₃₂ O ₄	0,01
89	20,479	2,4-Pentanedione, 3-(2-propenyl)-	C ₈ H ₁₂ O ₂	0,2
90	20,527	2-Propanone, 1,1,1-trichloro-	C ₃ H ₃ Cl ₃ O	0,02
91	21,012	3-Ureidopropionic acid, N-dimethylaminomethylene-, butyl ester	C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O ₃	0,02
92	21,05	Pregna-5,9(11)-dien-20-ol-3-one ethylene ketal	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	0,02
93	21,120	Inconnu	**	0,02
94	21,191	Benzeneethanamine, 2-fluoro-β,3,4-trihydroxy-N-isopropyl-	C ₁₁ H ₁₆ FNO ₃	0,22
95	21,387	2-Heptenoic acid, pentyl ester	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0,03
96	21,47	1-(1-Methoxypropan-2-yloxy)propan-2-yl 2,2,2-trifluoroacetate	C ₉ H ₁₅ F ₃ O ₄	0,35
97	21,529	Chlorfenapyr	C ₁₅ H ₁₁ BrClF ₃ N ₂ O	0,18
98	21,601	Inconnu	**	0,01
99	21,642	Inconnu	**	0,01
100	22,307	1H-Indene, 1-hexadecyl-2,3-dihydro-	C ₂₅ H ₄₂	0,01
101	22,341	Propanoic acid, 2-(methylthio)-, methyl ester	C ₅ H ₁₀ O ₂ S	0,02
102	22,501	Pentyl ethylphosphonofluoridate	C ₇ H ₁₆ FO ₂ P	0,02
103	22,708	Inconnu	**	0,06
104	24,253	Inconnu	**	0,01

105	24,339	MDPBP	$C_{15}H_{19}NO_3$	0,01
106	24,379	N,N-dimethyl-4-tert-butylamphetamine	$C_{15}H_{25}N$	0,32
107	24,382	2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene	$C_{15}H_{30}$	0,13
108	24,397	Oxalic acid, cyclobutyl tetradecyl ester	$C_{20}H_{36}O_4$	0,12
109	24,556	3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-tris(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	$C_{18}H_{52}O_7Si_7$	0,05
110	26,208	Propane, 1-acetoxy-2-isocyano-	$C_6H_9NO_2$	0,11
111	26,557	5-Hexen-2-one	$C_6H_{10}O$	0,21
112	26,558	3-S-Acetyl-1,2-O-isopropylidene-3-thioad-allofuranose	$C_{11}H_{18}O_6S$	0,17
113	26,558	5,6-Di-O-acetyl-3-S-acetyl-1,2-O-isopropylidene-3-thioad-allofuranose	$C_{15}H_{22}O_8S$	0,41
114	27,146	Cyclopentaneundecanoic acid	$C_{16}H_{30}O_2$	0,51
115	28,659	tri(2-Ethylhexyl) trimellitate	$C_{33}H_{54}O_6$	0,01
116	29,267	Inconnu	**	0,03
117	29,291	Inconnu	**	0,04
118	29,847	Inconnu	**	0,05

L'échantillon a été analysé sur un système GC-HRT-MS, et les composants ont été identifiés sur la base des temps de rétention des pics et des données MS générées par comparaison avec les bases de données spectrales de masse des bibliothèques NIST (National Institute of Standards and Technology) ; TR : temps de rétention.

III.2 Discussion

Les espèces de *Candida* sont des composantes importantes de la flore humaine normale de la peau, des muqueuses buccales, vaginales et du tractus gastro-intestinal. En raison du nombre croissant de patients présentant une faible fonction immunitaire ainsi que l'utilisation accrue des traitements invasifs, *Candida* est devenu le principal agent pathogène opportuniste à l'origine d'infections graves (**Wang et al., 2020**). Depuis plusieurs années, l'adoption d'une hygiène de vie saine et l'introduction des traitements antirétroviraux dans la prise en charge de l'infection à VIH a permis de diminuer considérablement l'incidence des maladies opportunistes grâce à la restauration immunitaire. Cependant, ces infections opportunistes (candidoses) chez l'Homme représentent à elles seules près de 83% des levures isolées (**Develoux et Bretagne, 2005**). Dans le cas de cette étude, le pourcentage d'isolement de *Candida* était de 23,5% et l'échantillon le plus colonisé était les selles (49,4%), suivi du frottis buccal (27,7%), puis du frottis vaginal (25,5%) et les urines étaient les moins colonisées (20%) chez les PVVIH. De nombreux auteurs à l'instar de **Ngouana (2014)** ont montré que les muqueuses seraient colonisées par les espèces de *Candida* à des taux de l'ordre de 41,55%, 28,57%, 14,50%, 11,04% respectivement pour les selles, les frottis buccaux et vaginaux, et les urines chez les PVVIH à Yaoundé. Il en est de même pour **Merenstein et al. (2013)** qui ont trouvé une colonisation buccale et vaginale respectivement de 67,0% et 18,8% chez les PVVIH à Washington. À Buéa, une étude menée par **Njunda et al. (2013)** a mis en exergue 81,2% de colonisation orale et 18,2% de colonisation urinaire par *Candida sp* chez les PVVIH. Une autre étude a trouvé 65,0% de *Candida* dans la muqueuse buccale et 5,0% dans la muqueuse gastro-intestinale (par analyse des selles) (**Khan et al., 2012**). **Lohoué et al. (2005)** et **Diessé et al. (2017)** ont identifié une candidose urinaire avec un taux de 36,2% de colonisation à Yaoundé et 22,0% à Bafoussam chez des personnes infectées par le VIH respectivement. Il a également été constaté chez les patients diabétiques une colonisation des muqueuses à des fréquences différentes. Un rapport publié par **Pallavan et al. (2014)** a montré que 43,3% des patients diabétiques avaient une colonisation sévère par *Candida sp*. ce qui a également été observé dans d'autres études (**Belazi et al., 2005**; **Zomorodian et al., 2016**). Une autre étude menée par **Ngueguim et al. (2017)** à Bafoussam a trouvé un taux de candidurie de 33,3% chez les patients diabétiques. En effet, plusieurs auteurs ont montré que la concentration de glucose est directement liée à la croissance de *Candida sp*, ce qui peut être lié aux fréquentes infections à levures observées chez les patients diabétiques non contrôlés. Tout comme dans la présente étude et de nombreuses autres études,

le pourcentage de colonisation des selles est supérieur, comparé à d'autres échantillons biologiques. En fait, le tube digestif de l'Homme constitue le principal réservoir de cette espèce mais, également le point de départ le plus fréquent des infections. De plus, il a été démontré que la souche responsable de l'infection était souvent la même que celle endogène retrouvée à l'état commensal (**Kullberg et Arendrup, 2015**). Un rapport rédigé par **Soyucen et al. (2014)** a montré qu'en fonction de la pathologie sous-jacente ou du statut du patient comme c'est le cas par exemple du diabète, le nombre d'unité formant colonie total de *Candida* au niveau intestinal augmente de façon significative jusqu'à 40,0% contre 14,3% chez les individus sains. Cela pourrait être lié à la diminution des bactéries commensales, résultante probable du résultat de la compétition levure- bactérie.

La distribution des *Candida sp* dans nos deux groupes de population d'étude est une caractéristique de l'épidémiologie de la région et des sites de colonisation, elle indique la présence d'une prédominance de *C. albicans*, dans les différents échantillons. *C. tropicalis* étant notre centre d'intérêt, une attention particulière lui est portée. Présent dans tous nos échantillons biologiques à un taux de 5,1%, elle est distribuée dans une diversité de niches écologiques chez l'hôte Humain en tant qu'organisme commensal. Selon les résultats de cette étude, on constate que *C. tropicalis* est plus retrouvé dans les échantillons de selles, la raison étant celle sus-évoquée. Par contre, la présence de *Candida* dans l'urine est rarement mise en évidence. Mais, ces candiduries ont connu un regain du fait de la recrudescence d'un terrain d'immunodépression et dans ce contexte elle représente 30,7%. En effet, ces infections ou colonisations urinaires par les *Candida sp* sont associées à un mauvais contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques ou à une mauvaise prise de médicament chez les PVVIH (**Falahati et al., 2016**). C'est ainsi, que certains auteurs ont montré que la présence de *C. tropicalis* dans le tractus urinaire d'un patient souffrant de diabète non contrôlé conduit à la formation d'une boule de levure de *C. tropicalis* et d'une cystite et pyélite emphysémateuse (**Alansari et al., 2015 ; Wang et al., 2015**). La candidurie a été observée en majorité chez les femmes (62,5%) contre 37,5% chez les hommes. Plusieurs raisons expliqueraient cette situation : à savoir l'anatomie génitale de la femme (colonisation vaginale par *Candida sp*, urètre et périnée court) (**Stapleton, 2002**) et la différence hormonale. En fait, la synthèse de l'œstrogène et de la progestérone est réduite chez les hommes et *Candida* possède des récepteurs membranaires qui fixent la progestérone favorisant ainsi sa multiplication (**Sobel, 2007 ; Zvornik et al., 2011**). L'orifice vaginal étant intimement lié à l'urètre, la cavité vaginale constitue une niche écologique de *C. tropicalis*. D'ailleurs dans la présente étude, elle représentait le troisième site le plus colonisé avec 23,0%. Une autre étude développée en

Inde par **Vijaya et al. (2014)** auprès de 300 femmes en âge de procréer présentant des signes cliniques de candidose vulvovaginale a rapporté que *C. tropicalis* était la deuxième espèce de *Candida* la plus répandue, correspondant à 26,4% des isolats. En Iran sur 67 isolats de *Candida* obtenus à partir d'échantillons de sécrétions vaginales de patientes, *C. tropicalis* était présent dans 5,9% des cas. La cavité buccale n'étant pas des reste, *C. tropicalis* s'y loge aussi. Bien que dans cette étude, la cavité buccale soit le site le moins colonisé (7,6%), il reste l'un des sites qui héberge le plus *C. tropicalis*. Au Brésil, **Da Silva-Rocha et al. (2014)** a examiné la distribution des espèces de *Candida* parmi les isolats obtenus à partir de la cavité buccale des transplantés rénaux et à constater que *C. tropicalis* était la deuxième espèce la plus répandue, correspondant à 4,5% des isolats. De même, dans une étude menée dans le Nord-Ouest de l'Ethiopie avec 215 isolats de la cavité buccale provenant de patients séropositifs, cette levure était la troisième espèce la plus répandue, avec un pourcentage d'isolement égal à 14,1% (**Mulu et al., 2013**). Une autre étude de prévalence des espèces de *Candida* obtenues à partir de candidoses orales a été réalisée en Thaïlande avec 250 souches isolées de 207 patients et *C. tropicalis* était la troisième espèce la plus isolée (10,4%) (**Muadcheingka et Tantivitayakul, 2015**).

Dans ce contexte, où l'impact de l'infection à *C. tropicalis* est mondial avec une épidémiologie qui évolue de façon constante car elle dépend de nombreux facteurs, notamment la région géographique considérée, la population de patients, la prophylaxie antifongique et les tests diagnostiques (**Scordino et al., 2018**) ; il serait intéressant d'étudier la diversité génétique de cette espèce, mais également des mécanismes génomiques adaptatifs survenant de façon naturelle chez l'hôte de *C. tropicalis*. La présente étude est la première en Afrique Centrale et particulièrement au Cameroun au cours de laquelle nous avons fait une analyse MLST des isolats cliniques de *C. tropicalis*. Elle a permis d'identifier 4 nouveaux allèles et 16 génotypes MLST, donc 14 nouveaux DST représentant 87,5% (14/16) des DST obtenus. Ceci indique une grande diversité et nouveauté des isolats de *C. tropicalis* au Cameroun. Différentes études essentiellement des approches de typage moléculaire ont montré qu'au cours du commensalisme ou d'une infection, un individu pouvait être colonisé par une ou plusieurs souches de *C. tropicalis* et qu'un nombre limité de souches génotypiquement apparentées pouvait coloniser un ou plusieurs sites d'un même individu (**Bougnoux et al., 2006**). Ces assertions sont en accord avec les résultats observés au cours de ce travail pour le cas des isolats CTCMR 3P^d et 4U^d (DST1186) ; CTCMR 6U^b et 7P^b (DST1177) ; CTCMR 10P^a (DST346) et 11U^a (DST1195) ; CTCMR 40S^c (DST1179) et 50U^c (DST1185), ceci indiquerait une infection endogène par une souche clonale. Cette observation

a également été faite par d'autres auteurs en Italie (**Scordino et al., 2018**) et en Chine (**Wu et al., 2019**) et même sur d'autres espèces de *Candida* telles que *C. albicans* et *C. krusei* isolés au Cameroun (**Ngouana, 2014 ; Kountchou et al., soumis**). En revanche, nous avons aussi obtenu des souches provenant de différents échantillons biologiques de patients non apparentés qui partageaient un génotype MLST commun DST1177 (CTCMR 6U, CTCMR 7P), DST1179 (CTCMR 13S, CTCMR 15S, CTCMR 46U, CTCMR 50U, CTCMR 51S, CTCMR 58B) ; DST1186 (CTCMR 3P, CTCMR 4U), ce qui a été considéré comme une preuve de l'expansion clonale, car les souches étaient capables de se reproduire. Par ailleurs, pour les isolats de *C. tropicalis* provenant non seulement de différents lieux de prélèvement, mais aussi des patients avec des statuts différents, aucun génotype n'a été associé aux sites d'infection ou de prélèvement. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de **Wu et al. (2019)**. Les sites anatomiques humains n'affectent pas les génotypes MLST de *C. tropicalis*. En effet, les isolats mondiaux de *C. tropicalis* isolés dans les différents sites anatomiques chez les humains (sang, fèces, oropharynx, urine, vagin, peau, et autres sites corporels) n'ont contribué qu'à hauteur de 0,5% à la variation génétique totale. Ensemble, ces résultats suggèrent qu'au niveau mondial, il y a très peu de preuves d'une adaptation spécifique au site anatomique humain et que la plupart des génotypes et les groupes génétiques sont capables de coloniser une diversité de site du corps humain et de causer des infections (**Wu et al., 2019**). Il est à noter que cette étude était axée sur les schémas géographiques de la variation génétique de *C. tropicalis* sur la base des données MLST publiées et accessibles au public. Des études récemment menées ont montré qu'une même souche pouvait persister durant plusieurs années chez l'hôte, ou évoluer par le biais de variations génétiques mineures appelées « microvariations » ou « microévolution » (**Odds et al., 2006 ; Bognoux et al., 2006 ; Jacobsen et al., 2008 ; Angebault et al., 2013**). Ces souches dites « microévoluées » diffèrent le plus souvent par une ou deux pertes d'hétérozygotie (LOH) au niveau des loci étudiés en MLST, résultant de mutations ponctuelles ou d'événements de recombinaison homologue (**Bognoux et al., 2006 ; Odds et al., 2006**). *C. tropicalis* étant diploïde, l'analyse des variations génomiques a permis de déterminer l'existence ou la non existence de séquences différentes entre les deux chromosomes homologues qui induisent l'apparition de positions polymorphes hétérozygotes, afin d'identifier des variantes génétiques pouvant impacter l'équilibre entre le commensalisme et la pathogénicité de *C. tropicalis* au cours de l'interaction avec l'hôte (**Braunsdorf et LeibundGut-Landmann, 2018 ; Cavalieri et al., 2017**). Un total de 50 cas de perte d'hétérozygotie a été détecté au cours de cette étude. La perte d'hétérozygotie est un phénomène irréversible qui peut survenir rapidement, permettant

à la souche de survivre à un stress entraînant une homozygotie de tous les gènes de la région concernée (**Forche, 2014**). La perte d'hétérogénéité génomique à l'échelle de la population cellulaire pourrait faciliter l'adaptation de cette levure à ces changements environnementaux en générant des variants capables de survivre dans un contexte ou un environnement particulier chez l'hôte. Plusieurs rapports ont souligné l'importance de l'évaluation de la sensibilité des isolats aux médicaments antifongiques afin de choisir le traitement approprié chez les patients souffrant de candidose.

Le traitement antifongique, quel que soit la gravité des candidoses, ne se conçoit qu'en prenant en compte les facteurs favorisants, la localisation des levures et en maîtrisant la maladie sous-jacente (**ANOFEL, 2014**). Les antifongiques azolés (triazolés) et notamment le fluconazole est la molécule utilisée en première intention et est homologué au Cameroun pour la prise en charge des infections fongiques chez les PVVIH en prophylaxie et en traitement d'appoint. L'itraconazole et plus récemment du posaconazole ou du voriconazole (molécules azolées de deuxième génération) sont utilisés comme alternative bien que leur utilisation par les populations locales soit limitée du fait de sa faible prescription (**Ngouana, 2014**). Ces triazolés sont largement utilisés en raison de leur bonne tolérance, et de leur facilité d'administration (bonne biodisponibilité par voie orale). Cependant, leur activité fongistatique est un inconvénient majeur pour traiter ces patients et joue un rôle dans l'émergence de la résistance. Par ailleurs, les traitements curatifs sont de longue durée, suivis d'une prophylaxie afin de prévenir les récurrences (**Van de Veerdonk et al., 2011**). Ces traitements prolongés par des antifongiques azolés sont la principale cause d'émergence de résistance (**McManus et al., 2011 ; Moorhouse et al., 2016**). Au cours de cette étude, les isolats de *C. tropicalis* étaient moins sensibles aux azolés avec 53,8% des souches résistantes au fluconazole, 42,3% à l'itraconazole, et 23,1% au voriconazole. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Jiang et al. (2013)** ou le profil de sensibilité des 52 isolats cliniques de *C. tropicalis* isolés dans cinq hôpitaux chinois a permis d'observer une résistance au fluconazole chez 34,6% des isolats, tandis que 40,4% étaient résistants à l'itraconazole et seulement 7,7% au voriconazole. Il en est de même pour ces isolats de *C. tropicalis* isolés de la cavité vulvo-vaginale des patientes en Inde parmi lesquels 42,9% étaient résistants au fluconazole et 14,3% au voriconazole (**Vijaya et al., 2014**). Au Nord-Ouest de l'Éthiopie avec 215 isolats de la cavité buccale provenant de patients séropositifs, 8,0% d'entre eux étaient résistants au fluconazole et 4% au kétoconazole, à l'itraconazole et à la 5-fluorocytosine (**Mulu et al., 2013**). Des études récentes réalisées dans plusieurs autres pays indiquent l'émergence d'isolats de *C. tropicalis* résistants aux azolés dans des contextes cliniques (**Arendrup et al., 2011 ; Chakrabarti et al., 2015 ;**

Fan et al., 2017 ; Xiao et al., 2018 ; Pfaller et al., 2019 ; Megri et al., 2020). Malgré le nombre d'études portant sur des souches de *C. tropicalis* résistantes aux azolés, il y a encore relativement peu d'études concernant la résistance de cette espèce à d'autres classes de médicaments, comme les polyènes (l'amphotéricine B) et les échinocandines. L'amphotéricine B est le troisième antifongique le plus utilisé en pratique clinique (**Seneviratne et al., 2016**). Très peu de souches de *C. tropicalis* ont jusqu'ici développé une résistance à l'amphotéricine B (**Zuza-Alves et al., 2017**) et ces assertions sont vérifiées par les résultats de cette étude. L'amphotéricine B, bien qu'étant l'un des plus anciens antifongiques utilisés dans le traitement des infections fongiques reste l'un des plus efficaces, surtout du fait de sa fongicidie qui limite l'émergence des résistances (**Kalpanadevi et al., 2012**). En plus de l'amphotéricine B, les échinocandines ont été de plus en plus utilisées dans le traitement des infections invasives étant donné qu'il s'agit de la nouvelle classe d'échinocandines qui cible la paroi cellulaire fongique en bloquant la β -1,3-D-glucane synthase (**Perlin, 2011**). Il a été décrit que ces médicaments ont un excellent champ d'action contre les principales espèces de *Candida*, y compris *C. tropicalis* (**Pfaller et al., 2008**). Au cours de cette étude, moins de 10,0% des isolats de *C. tropicalis* étaient résistants aux échinocandines. Ce résultat corrobore celui d'**Eschenauer et al. (2014)** où 1,4% des 185 isolats de *C. tropicalis* étaient résistants aux échinocandines. Par contre, **Garcia-Effron et al. (2010)** ont rapporté l'isolement de trois souches de *C. tropicalis* obtenues de patients atteints d'hémopathies malignes résistantes à la caspofungine. Malgré l'utilisation intensive de ces médicaments pendant plus d'une décennie, l'incidence de la résistance dans le genre *Candida* reste très faible.

En étudiant le profil de résistance des isolats en fonction des sites de prélèvement, il ressort que la source clinique des isolats n'a aucun effet sur les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) obtenues pour tous les antifongiques testés, ce qui est en accord avec les rapports précédents (**Koga-Ito et al., 2006 ; Hammad et al., 2013 ; Ngouana, 2014**). De même, cette étude n'a trouvé aucune différence significative dans la sensibilité aux antifongiques testés entre les isolats de *C. tropicalis* isolés chez les patients diabétiques et les PVVIH. L'isolement des souches chez le même patient avec des profils de sensibilités différents aux antifongiques serait lié soit à une mutation de la souche initiale, soit à la contamination du même patient par 2 souches différentes, ce qui renforce la nécessité de prendre en compte l'examen biologique avant d'initier un quelconque traitement.

La relation entre le profil génétique et la résistance aux antifongiques a été étudiée. Une analyse globale récente des génotypes MLST a confirmé l'absence d'association entre les

différents complexes clonaux et la résistance à certaines familles d'antifongiques (les polyènes, la fluoropyridine, les échinocandines), le type d'échantillon biologique, les lieux géographiques ou encore le statut du patient. Cette observation est en accord avec celles des études menées par **Al-Obaid et al. (2017)** et **Wu et al. (2017)**, ceci suggère l'existence d'une évolution indépendante. Néanmoins, bien que le nombre d'isolats inclus dans cette étude représente environ 20% (25/86) des *C. tropicalis* africains (en date du 15 février 2022) déposés dans la base de données MLST, le nombre d'isolats camerounais examinés est encore trop faible pour tirer une conclusion solide et par conséquent, des études supplémentaires seront nécessaires afin de corroborer les observations obtenues à l'issue de cette étude. Néanmoins, il serait intéressant de noter que les complexes clonaux MLST spécifiques CC7 et CC63 étaient enrichis en isolats résistants au fluconazole (azolés). Ces données sont en accord avec les résultats précédents rapportant une corrélation étroite entre divers génotypes du CC1 (DSTs 98, 137, 140 et 144) et les clones de *C. tropicalis* résistants aux médicaments à Taiwan (**Chou et al., 2007 ; Li et al., 2009**). En Chine aussi, des auteurs ont montré une association putative entre certains complexes clonaux MLST et des isolats de *C. tropicalis* non sensibles aux azolés. Nous remarquons aussi que certains complexes clonaux uniques contenaient des isolats de *C. tropicalis* non sensibles au fluconazole, ont également été trouvés dans cette étude, mais également dans d'autres études à Singapour, en Inde et en Chine (**Wang et al., 2020**). L'impact clinique et économique de la candidose dans certains pays comme en Italie (**Bassetti et al., 2018**), en Égypte (**Zaki et Denning, 2017**) et au Cameroun (**Mandengue et Denning, 2018**) étant non négligeable, *C. tropicalis* pourrait à l'avenir devenir l'une des espèces CNA les plus importantes dans ces pays. Cette hypothèse semble être bien étayée par les données épidémiologiques récentes de l'Algérie (**Megri et al., 2020**) et de plusieurs autres pays de la méditerranée (**Fernández-Ruiz et al., 2015 ; Arastehfar et al., 2020 ; Osman et al., 2020**) qui appellent à une attention particulière, notamment lorsque le fluconazole est le médicament antifongique de première intention dans la prophylaxie et le traitement des candidoses.

Une proportion substantielle des infections à *Candida* est associée à la formation de biofilms, en particulier à la surface des dispositifs médicaux implantés (**Ramage et al., 2006**). Contrairement à l'abondante littérature traitant des biofilms de *C. albicans* (**Chandra et al., 2001 ; Ramage et al., 2001**), peu d'attention a été accordée à *C. tropicalis*. Il a été rapporté que cette levure peut former des biofilms étendus *in vitro* sur la surface des cathéters en polyvinyle de chlorure (PVC) et de polystyrène (**Shin et al., 2002**). Au cours de cette étude, il a été noté que la capacité de formation de biofilms de cette espèce de *C. tropicalis* dépendait

fortement de l'isolat et non du site anatomique de prélèvement, du patient ou même de sa résistance aux antifongiques. Ces résultats reflètent sans aucun doute des différences physiologiques et moléculaires inhérentes entre les isolats et pourraient avoir une importance en ce qui concerne le potentiel à être pathogène (Silva *et al.*, 2008). Ces résultats sont en accord avec ceux de Paiva *et al.* (2012) qui ont évalué la formation *in vitro* de biofilms par des isolats de *C. tropicalis* obtenus à partir du frottis vulvovaginal. Une tendance similaire a également été décrite par Udayalaxmi *et al.* (2014) avec des souches isolées du tractus urogénital (échantillons de fluide vaginal et d'urine) de patients d'un hôpital tertiaire du Sud de l'Inde. Marcos-Zambrano *et al.* (2014) et Pannanusorn *et al.* (2013) ont également étudié la formation de biofilms chez différentes espèces de *Candida* obtenues lors d'épisodes de candidémie et ont constaté que les isolats de *C. tropicalis* étaient les plus forts producteurs de biofilms par rapport aux autres espèces isolées. Pour ce qui est de l'architecture du biofilm, elle est variable et dépend en partie, des espèces de *Candida* impliquées, des conditions de formation du biofilm (le milieu de croissance, la supplémentation en hydrates de carbone) et du substrat sur lequel il se forme (Rodrigues *et al.*, 2019). Au microscope électronique à balayage, le biofilm mature de *C. tropicalis* apparaît comme un réseau dense de couches discontinues de blastoconidie ancrés à la surface, ce qui est conforme aux résultats de cette étude et celles menées par Kuhn *et al.* (2002) et Silva *et al.* (2008). Ces derniers ont également rapporté que les biofilms de *C. tropicalis* formés dans le milieu SDB, ne contenaient que des blastoconidies ou généraient une structure hétérogène multicouche couvrant toute la surface. Par contre, dans une autre étude menée par Bizerra *et al.* (2008), les biofilms des isolats de *C. tropicalis* sur une surface en PVC avaient une structure similaire à celle décrite pour *C. albicans* avec une énorme quantité d'éléments hyphaux observés pendant la phase de croissance et de maturation du biofilm de *C. tropicalis* en milieu RPMI. En effet, dans le milieu RPMI, *C. tropicalis* subit des transitions morphologiques réversibles entre les blastospores et les pseudohyphes (Suzuki *et al.*, 2006). L'importance clinique marquée du biofilm concerne la résistance accrue des levures à divers agents antifongiques (Ramage *et al.*, 2001) et sa capacité à résister aux défenses de l'hôte (Vuong *et al.*, 2004). Ainsi, les infections associées aux biofilms sont difficiles à traiter et représentent une source de réinfections (Ramage *et al.*, 2006).

En raison des limites des traitements disponibles, il est fondamental de rechercher et de développer de nouvelles thérapeutiques pour combattre les infections émergentes à *Candida*. Les produits naturels et leurs dérivés semi-synthétiques ont été une source inégalée d'agents thérapeutiques au cours de l'histoire (Jamzivar *et al.*, 2019). La montée en puissance des

métabolites des champignons endophytes a ouvert de nouvelles possibilités pour la découverte de nouveaux médicaments antifongiques (**Deshmukh et Verekar, 2012 ; Gakuubi et al., 2021**) et les champignons endophytes habitant *Azadirachta indica* pourraient constituer une source potentielle de composés antifongiques. À cet effet, l'activité antifongique des extraits bruts d'acétate d'éthyle de différents champignons endophytes isolés de *Azadirachta indica* a été évaluée dans le but d'identifier les extraits actifs potentiels et les constituants phytochimiques responsables de l'activité antifongique causées par *Candida species*.

Dans la présente étude, des métabolites bruts à l'acétate d'éthyle provenant de 129 champignons endophytes isolés de *A. indica* ont été criblés *in vitro* contre *C. tropicalis* CTCMR15S. À une concentration unique de 500 µg/mL, 13 isolats ont présenté une activité inhibitrice contre *C. tropicalis* CTCMR15S. Le nombre de champignons endophytes actifs obtenus dans cette étude était comparable à certains résultats rapportés par d'autres auteurs ayant mené des études similaires. Ainsi, lors d'un récent screening d'extraits d'acétate d'éthyle de 130 champignons endophytes habitant *Chloranthus japonicus*, seuls 9 isolats ont présenté une activité contre *C. albicans* (**An et al., 2020**). Le grand nombre de champignons actifs identifiés dans notre étude a révélé le potentiel des endophytes de *A. indica* comme source de composés antifongiques.

L'étude dose-réponse des extraits sélectionnés a révélé des activités avec des valeurs CMI allant de 125 à 500 µg/mL et l'extrait A/bf111 a été le plus actif (CMI 125 µg/mL) contre l'espèce *C. tropicalis* CTCMR15S. L'activité antimicrobienne des extraits des champignons endophytes des plantes médicinales camerounaises a été précédemment rapportée (**Toghueo et al., 2016 ; Mbekou et al., 2021**). La souche la plus active (A/bf111) identifiée comme *Aspergillus niger* a été soumise à une large fermentation et fractionnée par chromatographie sur colonne en utilisant des solvants de polarité croissante. Malheureusement, aucune des fractions obtenues n'a présenté une activité antifongique améliorée par rapport à l'extrait parent. Bien qu'inattendu, ce résultat n'est pas surprenant car il est bien connu que le fractionnement d'extraits bruts peut entraîner une amélioration de l'activité en concentrant le principe actif ou une perte d'activité en séparant les différents constituants de l'extrait (**Nwodo et al., 2010**). En outre, l'analyse de la composition de l'extrait parent par GC-MS a révélé la présence de plus de 118 composés appartenant à diverses classes de métabolites secondaires. Plusieurs auteurs ont précédemment rapporté la grande variabilité et la riche diversité des métabolites produits par les isolats de *Aspergillus niger* (**Siddiquee et al., 2015 ; Costa et al., 2016 ; Toghueo et al., 2019 ; Belinato et al., 2021**). Globalement, les champignons endophytes du genre *Aspergillus* ont été signalés comme de riches sources de métabolites

secondaires bioactifs ayant des applications dans divers domaines. Ces métabolites secondaires comprennent les buténolides, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les cytochalasines, les phénalénones, les ρ -terphényles, les xanthones, les stérols, l'éther diphénylique et les dérivés de l'antraquinone (El-hawary *et al.*, 2020). Par conséquent, une étude plus approfondie de *Abf11* pourrait aboutir à l'identification et l'isolement de composés d'intérêts. L'analyse des résultats du GC/SM de notre extrait d'intérêt montre la présence de composés terpéniques. Des études antérieures ont révélé l'activité antifongiques des composés terpéniques. Ainsi, Daroui-Mokaddem *et al.* (2010) ont démontré les propriétés antimicrobiennes des composés terpéniques avec des actions s'exercées sur la membrane cytoplasmique des microorganismes provoquant leurs lyses.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au terme de ce travail dont l'objectif général était de déterminer la diversité génétique des isolats de *C. tropicalis* chez les patients VIH+ et les diabétiques au Cameroun et étudier leur profil de sensibilité aux antifongiques usuels et aux métabolites secondaires de champignons endophytes isolés de *Azadirachta indica*, il ressort que :

La fréquence de colonisation des muqueuses par *Candida tropicalis* était de 5,1%. L'analyse MLST des isolats de *C. tropicalis* a permis d'observer 16 génotypes MLST parmi lesquels 14 nouveaux DST. Sur les 2 677 nucléotides analysés, 38 allèles ont été identifiés avec 4 nouveaux. En plus, 50 cas de perte d'hétérozygotie ont été détectés et l'analyse globale BURST a révélé la présence de 5 complexes clonaux (CC) avec les isolats des complexes clonaux CC 63 et CC 64 abondant au Cameroun et fondateurs putatifs.

L'étude de la sensibilité aux antifongiques a permis de constater que les isolats de *C. tropicalis* ont présenté une sensibilité réduite aux azolés. De plus, les isolats de *C. tropicalis* appartenant aux CC 7 et CC 63 ont tous été résistants au fluconazole et ont mieux formé les biofilms.

L'étude de la sensibilité aux extraits de champignons endophytes a permis de constater que l'extrait provenant de *Aspergillus niger* Abfl11 a montré la meilleure activité avec une CMI variant de 125 µg/mL. Son potentiel antifongique sur *C. tropicalis* serait probablement associé à une attaque pariétale ou membranaire associée à une action fongistatique avec une capacité d'inhiber de façon significative la formation de biofilm aux doses dépendantes. Le fractionnement bio-guidé n'a pas permis d'améliorer l'activité antifongique de l'extrait brut ; et l'analyse GC-MS de ce dernier a montré la présence des composés qui ensemble avaient un potentiel antifongique.

Cette étude a permis non seulement d'élargir la bibliothèque d'allèles/génotypes de la base de données de MLST de *C. tropicalis* en ligne, mais a également apporté des éléments pour alerter sur la présence de certains génotypes résistants particulièrement aux fluconazole. Elle a en plus apporté une voie prometteuse dans l'amélioration de la prise en charge des infections à *Candida* par le développement d'une thérapie alternative à base d'extraits de champignons endophytes. La priorité pour l'OMS étant de soutenir les recherches qui permettront de trouver de nouveaux traitements, de lutter contre l'utilisation des antifongiques pour diminuer les impacts sur la résistance, et améliorer les interventions de santé publique en ce qui concerne la prévention et les diagnostics.

PERSPECTIVES

Nous envisageons de :

- ❖ Effectuer le séquençage du génome complet afin d'apporter un complément d'informations permettant de comparer des isolats cliniques présentant le même profil MLST.
- ❖ De tester l'aptitude des isolats à produire les autres facteurs de virulences.
- ❖ Isoler les composés présents dans notre extrait de champignon endophyte et effectuer un le docking moléculaire.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- Abu-El K., Ghannum M., Stretton R. (1989). Effects of sub-inhibitory concentrations of antifungal agents on adherence of *Candida* spp. to buccal epithelial cells in vitro. *Mycoses* ; 32 : 551-562.
- Accoceberry I., Noël T. (2006). Antifongiques : cibles cellulaires et mécanismes de résistance. Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique. Laboratoire de Mycologie Moléculaire, Université de Bordeaux 2, Bordeaux, France. *Thérapie* ; 61 (3) : 195-199 DOI: 10.2515/therapie:2006048.
- Adalja A., Watson M., Toner S., Cicero A., Inglesby V. (2019). Characteristics of Microbes Most Likely to Cause Pandemics and Global Catastrophes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* ; 424 : 1-20.
- Africa J., Abrantes S. (2017). *Candida* antifungal drug resistance in sub-Saharan African populations: A systematic review [version 2; referees: 2 approved]. *F1000Research*, 5:2832 L
- Al-Ahmadey Z., Mohamed A. (2017). Vulvovaginal candidiasis: Agents and its virulence factors. *Microbiology Research International* ; 2(3): 28-37, ISSN : 2354-2128.
- Alansari A., Borrás D., Boma N. (2015). "I have chicken fat in my urine!" A case of *Candida tropicalis* induced emphysematous pyelitis. *Medical Mycology Case Reports* ; 10:27–28. doi:10.1016/j.mmcr.2016.01.004.
- Alastruey-Izquierdo A., Melhem C., Bonfietti L., Rodriguez-Tudela L. (2015). Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo* ; 5 : 57-64.
- Al-Obaid K., Asadzadeh M., Ahmad S., Khan Z. (2017). Population structure and molecular genetic characterization of clinical *Candida tropicalis* isolates from a tertiary-care hospital in Kuwait reveal infections with unique strains. *PLoS ONE* 12(8) : e0182292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182292>.
- An C., Saijian M., Xinwei S., Wenjiao X., Chen L., Hao D. (2020). "Diversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated from *Chloranthus japonicus* Sieb in Qinling Mountains, China" *International Journal of Molecular Sciences* ; 21 : 5958. <https://doi.org/10.3390/ijms21175958>.
- Ana P., Karla T., Thays G., Leticia F., Gianne R., Gualberto S., Iolanda R., Jadson D., Cristina M. (2018). Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. *Acta Botanica Brasílica*. Doi : 10.1590/0102-33062018abb0108.

- Angebault C., Djossou F., Abélanet S., Permal E., Ben Soltana M., Diancourt L., Bouchier C., Woerther P-L., Catzeflis F., Andremont A., d'Enfert C., Bougnoux M-E. (2013). *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians. *Journal of Infectious Disease* ; 208 : 1705-1716. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit389>
- Anyaehe B. (2009). Medicinal properties of fractionned acetone/water neem (*Azadirachta indica*) leaves extract from Nigeria. A Review. *Nigerian Journal of physiological Sciences* ; 24 : 157-159.
- Arastehfar A., Daneshnia F., Hafez A., Khodavaisy S., Najafzadeh M-J., Charsizadeh A., Zarrinfar H., Salehi M., Shahrabadi Z., Sassani E., Zomorodian K., Pan W., Hagen F., Macit K. (2020). Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates. *Medical Mycology* ; <https://doi.org/10.1093/mmy/myz124>.
- Arendrup C., Bruun B., Christensen J., Fuursted K., Johansen K., Kjaeldgaard P., Knudsen J., Kristensen L., Moller J., Nielsen L., Rosenvinge F., Roder B., Schonheyder H., Thomsen M., Truberg K. (2011). National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *Journal of Clinical Microbiology* ; 49 : 325-334.
- Ashman R., & Farah C. (2005). Oral candidiasis : Clinical Manifestatons and Cellular Adaptive Host Response. *Fungal immunology* ; 4 : 59-83.
- Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). (2014) Candidoses Parasitologie Mycologie, Format Utile ; 2014 : 299-378.
- Barnett JA., Payne RW., Yarrow D. (2000). "Yeasts : Characteristics and Identification." Cambridge University Press 3rd edition.
- Bassetti M., Carnelutti A., Peghin M., Aversa F., Barchiesi F., Girmenia C., Pagano L., Sanguinetti M., Tortorano M., Montagna T., Viale P., Viscoli C., Denning W. (2018). Estimated burden of fungal infections in Italy. *Journal of Infection* ; 76 (1) : 103-106.
- Belazi M., Velegraki A., Fleva A., Gidarakou I., Papanau L., Baka D., Daniilidou N., Karamitsos D. (2005). Candidal overgrowth in diabetic patients: Potential predisposing factors. *Mycoses* ; 48:192-196. doi: 10.1111/j.1439-0507.2005.01124.x.
- Belinato R., Costa P., Almeida A., Rocha S., Augusto F. (2021). Mapping *Aspergillus niger* Metabolite Biomarkers for In Situ and Early Evaluation of Table Grapes Contamination. *Foods*; 10 (11) : 2870. <https://doi.org/10.3390/foods10112870>.
- Bennett J. (2010). Coming of Age-Sexual Reproduction in *Candida* Species. *PLoS Pathogens*, 6(12) : e1001155.

- Bigna J., Nansseu R., Katte J-C., Noubiap J. (2018). "Prevalence of prediabetes and diabetes mellitus among adults residing in Cameroon: a systematic review and meta-analysis," *Diabetes. Research and Clinical Practice* ; 137 : 109-118.
- Biswas K., Chattopadhyay I., Banerjee K., Bandyopadhyay U. (2018)."Les activités biologiques et leurs propriétés médicinales de neem (Azadirachta indica)" . *Current Science* 82.
- Bizerra F., Nakamura C., Poersch C. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Research* ; 8 : 442-450
- Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G and Prod'hom G. (2010). Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* ; 48(5) : 1549-1554.
- Bloch M. (2013). Les candidoses chez l'immunodéprimé d'ordre secondaire. Sciences pharmaceutiques. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de lorraine. Faculté de pharmacie ffhal-01733557.
- Bongomin F., Gago S., Oladele O., Denning W. (2017). Global and multi-National prevalence of fungal diseases-estimate precision. *Journal Fungi* (Basel) ; 3 (4) : 57.
- Born F. (2013). Les candidoses buccales : revue de littérature. Thèse de doctorat : Univ. Genève, no. Méd. dent. 714 URN : urn:nbn:ch:unige-279812. Section de médecine dentaire Division de stomatologie, chirurgie orale et radiologie dento-maxillo-faciale DOI : 10.13097/archive-ouverte/unige:27981.
- Borst A., Theelen B., Reinders E., Boekhout T., Fluit C., Savelkoul H. (2003). Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* sp including *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology* ; 41 : 1357-1362.
- Bougnoux M-E., Aanensen M., Morand S., Théraud M., Spratt G., d'Enfert C. (2004). Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infect. Infection, Genetics and Evolution* ; 4, 243–252 : <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.06.002>
- Bougnoux M-E., Diogo D., François N., Sendid B., Veirmeire S., Colombel F., Bouchier C., Van Kruijningen H., d'Enfert C., Poulain D. (2006). Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *Journal of Clinical Microbiology* ; 44 : 1810-1820.
- Bougnoux E. et Espinasse F. (2003). Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médical. *Revue Française des Laboratoires*. 2003 ; 351, pp 67-71

- Bougnoux M-E., Morand S., d'Enfert C. (2002). Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* ; 40 : 1290-1297.
- Braunsdorf C. et LeibundGut-Landmann S. (2018). Modulation of the Fungal-Host Interaction by the Intra-Species Diversity of *C. albicans*. *Pathogens (Basel, Switzerland)* ; 7. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010011>.
- Brenchley M., Price A., Schacker W., Asher E., Silvestri G. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. See comment in PubMed Commons below Nat Med 12 : 1365-1371.
- Butler G., Rasmussen M., Lin M., Santos M., Sakthikumar S. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* ; 459(7247) : 657-662.
- Cannon R., Lamping E., Holmes A., Niimi K., Tanabe K., Niimi M. Monk B. (2007). *Candida* Carvalhaes C. (2019). When Should Antifungal Susceptibility Testing Be Performed for *Candida* Species Isolated from Clinical Specimens? Available at; <https://clsi.org/about/blog/ast-news-update-2019-practical-tips-1/> (Accessed on the 9th of June 2020). *albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology* ; 153(10) : 3211-3217.
- Carvalhaes C. (2019). When Should Antifungal Susceptibility Testing Be Performed for *Candida* Species Isolated from Clinical Specimens? Available at; <https://clsi.org/about/blog/ast-news-update-2019-practical-tips-1/> (Accessed on the 9th of June 2020).
- Cavaliere D., Di Paola M., Rizzetto L., Tocci N., De Filippo C., Lionetti P., Ardizzoni A., Colombari B., Paulone S., Gut G., Berná L., Gut M., Blanc J., Kapushesky M., Pericolini E., Blasi E., Peppoloni S. (2017). Genomic and Phenotypic Variation in Morphogenetic Networks of Two *Candida albicans* Isolates Subtends Their Different Pathogenic Potential. *Frontiers in Immunology* ; 8 : 1997. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01997>.
- Chabasse D., Robert R., Marot A., Pihet M. (2006). *Candida* pathogène, Lavoisier. Edition TEC et DOC Mars 2006.
- Chakrabarti A., Sood P., Rudramurthy M., Chen S., Kaur H., Capoor M., Chhina D., Rao R., Eshwara K., Xess I., Kindo J., Umabala P., Savio J., Patel A., Ray U., Mohan S., Iyer R., Chander J., Arora A., Sardana R., Roy I., Appalaraju B., Sharma A., Shetty A., Khanna N., Marak R., Biswas S., Das S., Harish B., Joshi S., Mendiratta D. (2015). Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Medicine* ; 41(2) : 285-295.

- Chambard F. (2009). Les candidoses cutané-muqueuses: physiopathologie et conseils à l'officine. Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier soutenue publiquement à la faculté de pharmacie de Grenoble; 149P
- Chandra J., Mukherjee K. (2015). Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiology Spectrum* ; 3 : 157-176. Doi : 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015.
- Chandra J., Kuhn D., Mukherjee P., Hoyer L., McCormick T., Ghannoum M. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology* ; 183 : 5385-5394.
- Chatterjee S., Ghosh R., Mandal C. (2019). Production of bioactive compounds with bactericidal and antioxidant potential by endophytic fungus *Alternaria alternata* AE1 isolated from *Azadirachta indica* A. Juss. *PLoS ONE* ; 14(4) : e0214744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214744>
- Chou H., Lo J., Chen W., Liao H.; Li Y. (2007). Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* ; 58 : 427-433
- Chutulo E., Chalannavar R. (2018). Endophytic Mycoflora and Their Bioactive compounds from *Azadirachta Indica*: A Comprehensive Review. *Journal Fungi* ; 4 : 42 <https://doi:10.3390/jof4020042>.
- Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts, approved standard third edition M27-S4, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standard Institute, 2017. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. M59 Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing Wayne, PA.
- Comité National de Lutte Contre le SIDA (CNLS), (2018). Epidémiologie de l'infection à VIH au Cameroun : Premier semestre 2018. Bulletin Epidémiologique n°5, 16p.
- Costa C., Gonçalves S., Rudnitskaya A., Almeida A., Rocha A. (2016). Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome. *Scientific Reports* ; 6 : 27441. <https://doi.org/10.1038/srep27441>.
- Da Silva-Rocha P., Lemos L., Svidizisnki I., Milan P., Chaves M. (2014). *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. *BMC Oral Health*; 14 : 20. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-20>.

- Dancer J. (2020). Covid-19 exposes the gaps in infection prevention and control. *Infection, Disease & Health* ; 25 (4) : 223-226.
- Daroui-Mokaddem H. 2012. Etude phytochimique et biologique des especes *Eucalyptus globulus* (myrtaceae), *Smyrnum olusatrum* (apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (asterarceae). Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba Algérie, 198p.
- Davidson J., Sowden M., Fletcher J. (2015). Defective phagocytosis in insulin controlled diabetics: evidence for a reaction between glucose and opsonising proteins from the 2003. Department of Haematology, City Hospital, Nottingham. *Journal of Clinical Pathology*.
- Denning D. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* ; 362 : 1142-1151.
- Deshmukh K., Verekar A. (2012). Fungal endophytes: A potential source of antifungal compounds. *Frontiers in Bioscience-Elite* ; 4 (6) : 2045-2070.
- Develoux M., Bretagne S. (2005). Candidoses et levures diverses. *Maladies infectieuses* ; 8 : 10-602.
- Diessé J., Kechia A., Iwewe S., Ngueguim A., Nangwat C., Dzoyem P. (2017). Urinary tract candidiasis in HIV+ patients and sensitivity patterns of recovered *Candida* species to antifungal drugs in Dschang District Hospital (Cameroon). *International Journal of Biological and Chemical Science* ; 11(3) : 1029-1038;
- Dismukes D. (2000). Introduction to antifungal drugs. *Journal Clinical Infectious Diseases* ; 30 : 653-657.
- Donlan M., & Costerton J., (2002). Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review* ; 15 : 167-193.
- Douek D., Brenchley M., Betts R., Ambrozak R., Hill J., Okamoto Y., Casazza P., Koup A. (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4+T cells. See comment in PubMed Commons below *Nature* ; 417 : 95-98.
- Duschinsky R., Plevén E., Heidelberger C. (1957). The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *Journal of the American Chemical Society* ; 79 : 4559-4560.
- Ekpo A., Kechia A., Iwewe S., Ngueguim D., Nangwat C., Dzoyem P. (2017). Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida spp* isolated from urine of hospitalized patients in Dschang District Hospital, Cameroon. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* ; 11 : 1212-1221.
- Elfaki M. (2014). Immunosuppression Induced by HIV Infection. *Biology and Medicine* ; 6 : 3 DOI : 10.4172/0974-8369.1000e111.

- El-hawary S., Moawad A., Bahr H., Abdelmohsen U, Mohammed R. (2020). Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. *The Royal Society of Chemistry* 10 : 22058-22079.
- El-Kirat-Chatel S. (2010). Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions *Candida* – phagocytes ; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez *C. lusitaniae*. Thèse de Doctorat présentée et soutenue publiquement à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2. Option : Microbiologie. Pp 187.
- Ellepola N., Hurst F., Elie M., Morrison J. (2003). Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiology and Immunology* ; 18 : 379-388.
- Ensieh L., Parivash K., Hossein M., Farideh Z., Ali G., Rasoul M., Fatemeh N., Maryam M., Liakbar F., Sassan R. (2016). Antifungal Susceptibility Analysis of Clinical Isolates of *Candida parapsilosis* in Iran. *Iran Journal of Public Health* ; 45 : 322-328.
- Eraso E., Moragues M., Villar-Vidal M., Sahand I., González-Gómez N., Pontón J., Quindós G. (2006). Evaluation of the New Chromogenic Medium *Candida* ID 2 for Isolation and Identification of *Candida albicans* and Other Medically Important *Candida* Species. *Clinical Microbiology* ; 44 : 3340-3345.
- Eschenauer G., Nguyen H., Shoham S., Vazquez A., Morris J., Pasculle A., Kubin J., Klinker P., Carver L., Hanson E., Chen S., Lam W., Potoski A., Clarke G., Shields K., Clancy J. (2014). Real-world experience with echinocandin MICs against *Candida* species in a multicenter study of hospitals that routinely perform susceptibility testing of bloodstream isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 58, 1897-1906. Doi : 10.1128/AAC.02163-13.
- Eugène C. (2014). 900.000 diabétiques dénombrés au Cameroun. Consulté le 23 /05/ 2015.
- Eyob C. et Raju K. (2018). Endophytic Mycoflora and Their Bioactive Compounds from *Azadirachta Indica*. *Journal of Fungi* ; 4 : 42.
- Falagas E., Roussos N., Vardakas Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. *International Journal of Infectious Disease* ; 14 : e954–e966. Doi : 10.1016/j.ijid.2010.04.006.
- Falahati M., Farahyar S., Akhlaghi L., Mahmoudi S., Sabzian K., Yarahmadi M., Aslani R. (2016). Characterization and identification of candiduria due to *Candida* species in diabetic patients. *Current Medical Mycology* ; 2:10–14. Doi : 10.18869/acadpub.cmm.2.3.10
- Falces-Romero I., Romero-Gómez P., Moreno-Ramos F., Mingorance J., García-Rodríguez J., and Cendejas-Bueno E. (2021). Epidemiology of bloodstream *Candida* species in a Spanish

- tertiary care hospital as a guide for implementation of T2MR (T2CANDIDA®) or rapid diagnosis of candidemia. *Medical Mycology* ; 59 (4) : 350-354.
- Fan X., Xiao M., Liao K., Kudinha T., Wang H., Zhang L., Hou X., Kong F., Ying-Chun X. (2017). Notable increasing trend in azole non-susceptible *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): molecular epidemiology and clinical azole consumption. *Frontiers in Microbiology* ; 8 : 464. Doi : 10.3389/fmicb.2017.00464.
- Fathallah N., Raafat M., Issa Y., Abdel-Aziz M., Bishr M., Abdelkawy A., Salama O. (2019). Bio-Guided Fractionation of Prenylated Benzaldehyde Derivatives as Potent Antimicrobial and Antibiofilm from Ammi majus L. Fruits-Associated *Aspergillus amstelodami*. *Molecules* ; 24 : 4118. Doi :10.3390/molecules24224118.
- Fédération Internationale du Diabète (FID), Atlas diabète, 10 ème Édition 2021. Brussel Belgique. <https://www.diabetesatlas.org>. Consulté le 13/03/2022.
- Fédération Internationale du Diabète (FID), Atlas diabète, 9 ème Édition 2019. Brussel Belgique. <https://www.diabetesatlas.org>. Consulté le 13/03/2022.
- Fernandes J., Prandini T., Castro M., Arantes T., Giacobino J., Bagagli E., Theodoro R. (2016) Evolution and Application of Inteins in *Candida* species: A Review. *Frontiers in Microbiology* ; 7:1585. Doi : 10.3389/fmicb.2016.01585
- Fernández-Ruiz M., Puig-Asensio M., Guinea J., Almirante B., Padilla B., Almela M. (2015). *Candida tropicalis* bloodstream infection: Incidence, risk factors and outcome in a population-based surveillance. *Journal of Infection* ; 71 : 385-394. Doi : 10.1016/j.jinf.2015.05.009.
- Feuilhade de Chauvin M., Baran R., Chabasse D. (2001). Les onychomycoses III – Traitement. *Journal of Medical Mycology* ; 11 : 205-215.
- Forche A. (2014). Large-Scale Chromosomal Changes and Associated Fitness Consequences in Pathogenic Fungi. *Current Fungal Infectious Report* ; 8 : 163-170. <https://doi.org/10.1007/s12281-014-0181-2>.
- Frost J., Brandt D., Cugier D., Goldman A. (1995). Whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *Journal of Antibiotics* ; 48 (4) : 306-310.
- Frutos L., Fernández-Espinar M., Amparo A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8SrRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Kluwer Academic Publishers* ; 85 : 175-185.

- Fukuoka T., Johnston A., Winslow C., De Groot J., Burt C., Hitchcock A., Filler G. (2003). Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 47 : 1213-1219
- Gakuubi M., Munusamy M., Liang X., Ng B. (2021). Fungal Endophytes: A Promising Frontier for Discovery of Novel Bioactive Compounds. *Journal Fungi (Basel)* ; 7 (10) : 786. doi:10.3390/jof7100786.
- Garcia-Effron G., Chua D., Tomada J., DiPersio J., Perlin D., Ghannoum M., Bonilla H. (2010). Novel FKS mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 54 : 2225-2227.
- Ghannoum A., Rice B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* ; 12(4) : 501- 517.
- Ghazi S., Rafei R., Osman M., El Safadi D., Mallat H., Papon N., Dabboussi F., Bouchara J-P., Hamze M. (2019). The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. *Journal de Mycologie Médicale* ; 29 : 245-252.
- Gómez-Manzo S., Marcial-Quino J., Vanoye-Carlo A., Serrano-Posada H., Ortega-Cuellar D., González-Valdez A., Castillo-Rodríguez A., Hernández-Ochoa B., Sierra-Palacios E., Rodríguez-Bustamante E., Arreguin-Espinosa R. (2016). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *International Journal of Molecular Sciences* ; 17, 2069 ; doi :10.3390/ijms17122069.
- González-Coloma A. Cosoveanu A. Cabrera R. Giménez C. Kaushik N. (2016). Endophytic Fungi and their Bioprospection. *CRC Press*, pp.14-31.
- Granier F. (2003). Antifongiques: classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. *Antibiotiques* ; 5(1) : 39 48.
- Hammad M.; Darwazeh G.; Idrees M. (2013). The effect of glycemic control on *Candida* colonization of the tongue and the subgingival plaque in patients with type II diabetes and periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology* ; 116 : 321-326.
- Hannedouche T. (2004). Infection urinaire et diabète. Complications périnéales du diabète ; 4 : 13-15.
- Huang R., Xieb X., Fang X., Ma K., Wu S. (2015). Five New Guaiane Sesquiterpenes from the Endophytic Fungus *Xylaria* sp. YM 311647 of *Azadirachta indica*. *Chemistry and Biodiversity* ; 12.

- Jacobsen D., Duncan D., Bain J., Johnson M., Naglik R., Shaw J., Gow R., Odds C. (2008). Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS Yeast Research* ; 8 : 1334-1338. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00438.x>
- Jamzivar F., Shams-Ghahfarokhi M., Khoramizadeh M., Yousefi N., Gholami-Shabani M., Razzaghi-Abyaneh M. (2019). Unraveling the importance of molecules of natural origin in antifungal drug development through targeting ergosterol biosynthesis pathway. *Iran Journal of Microbiology* ; 11 (6) : 448-459.
- Jasim T., Flayyih., Abdullah A. (2016). Isolation and identification of candida spp. from different clinical specimens and study the virulence factors. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ; 5 : 121-137.
- Jiang C., Dong D., Yu Q., Cai G., Wang F., Ji H., Peng Y. (2013). Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 68 : 778-785. Doi : 10.1093/jac/dks481.
- Kabir A., Hussain A. (2009). Human fungal pathogen *Candida albicans* in the postgenomic era: an overview. *Expert review of anti-infective therapy* ; 7 : 121-134.
- Kadir T., Pisiriciler R., Akyüz S., Yarat A., Emekli N., Ipbüker A. (2002). Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: Thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. *Journal of Oral Rehabilitation* ; 29 : 452-457.
- Kah N. (2011). Dermatophyties, candidoses et autres mycoses superficielles : rôles du pharmacien d'officine. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy1 ; 30-45.
- Kalpanadevi V., Geethalakshmi S., Sumathi G. (2012). A study on speciation and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates from HIV patients with oropharyngeal candidiasis and correlation with CD4 count. *BMC Infectious Disease* ; 12(1) : P19.
- Kechia F., Dohbit S., Kouotou A., Iwewe Y., Dzoyem P., MbopuwouM., Monamele G., Moyou R. (2015). Profil Épidémiologique et Étiologique de la Candidose Vulvo-Vaginale chez la Femme Enceinte à Yaoundé (Cameroun). *Health Science Disease* ; 16 (4).
- Khan P., Malik A., Subhan H. (2012). Profile of candidiasis in HIV infected patients IRAN. *Journal of Microbiology* ; 4 (4) : 204-209.
- Khan R., Naqvi S., Fatima N., Muhammad A. (2019). Study of antidiabetic activities of endophytic fungi isolated from plants. *Pure and Applied Biology* ; 1287 ; 8(2) : 1287-1295. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2019.80071>.

- Kharwar R., Verma V., Kumar A., Gond K., Harper K., Hess W., Lobkovosky E., Ma C., Ren Y., Strobel G. (2009) Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *chloridium* sp. *Current Microbiology* ; 58 : 233-238.
- Keighle C., Gall M., van Hal S., Halliday C., Chai L., Chew K., Biswas C., Slavin M., Meyer, W., Sintchenko V. (2022). Whole Genome Sequencing Shows Genetic Diversity, as Well as Clonal Complex and Gene Polymorphisms Associated with Fluconazole Non-Susceptible Isolates of *Candida tropicalis*. *Journal of Fungi* ; 8 : 896. <https://doi.org/10.3390/jof8090896>
- Klepser E., Wolfe J., Jones N., Nightingale H., Pfaller A. (1998). Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 41 (6) : 1392-1395.
- Ko J-H., Jung S., Lee Y., Kim A., Ryu S., Jung S-I., Joo E-J., Cheon S., Kim Y-S., Kim S-W., Cho S., Kang C-I., Chung D., Lee Y., Peck R. (2019). Poor prognosis of *Candida tropicalis* among non-*albicans* candidemia: a retrospective multicenter cohort study, Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* ; 95(2) : 195-200.
- Koehler P., Chu C., Houang T., Cheng F. (1999). Simple, reliable, and cost effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* ; 37 : 422-426.
- Koga-Ito Y., Lyon P.; Vidotto V., De Resende A. (2006). Virulence Factors and Antifungal Susceptibility of *Candida albicans* Isolates from Oral Candidosis Patients and Control Individuals. *Mycopathologia* ; 161 : 219-223.
- Kuhn D., Chandra J., Mukherjee P., Ghannoum M. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity* ; 70 : 878-888.
- Kullberg J., Arendrup C. (2015). Invasive Candidiasis. *The New England Journal of Medicine* ; 373 : 1445–1456. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1315399>.
- Kumar B., Padshetty S., Bai Y., Rao S. (2005). Prevalence of *Candida* in the oral cavity of diabetic subjects. *Journal of the Association of Physicians of India* ; 53 : 599–602.
- Kumara A., Attila B., Joshua D. (2014). Nosanchuk a Genetic determinants of virulence – *Candida parapsilosis*. *Revista Iberoamericana de Micología* ; 31 : 16-21.
- Kouipou R., Boyom F. (2019). Endophytic Fungi from *Terminalia* Species: A Comprehensive Review. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland) ; 5(2) : 43. <https://doi.org/10.3390/jof5020043>
- Lagane C. (2007). Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR-gamma dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida*

Albicans. Implication de PPARgamma: Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

- Lesse L. (1995). Antifungal agents. In: Essentials of pharmacology. Smith CM, Reynard A, editors. pp. 404-411. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Li B., Guo T., Chen Y., Xie J., Niu H., Liu D., Cheng J., Chen X., Wu J., Zhuang W., Zhu C., Ying H. (2014). Genome sequence of *Candida tropicalis* no. 121, used for RNA production. *Genome Announcements* ; 2(3) : e00316-14. doi:10.1128/genomeA.00316-14.
- Li E., Lihua J., Guo L., Hua Z., Yongsheng C. (2008). Pestalochlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic Fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* ; 16 : 7894-7899.
- Li S., Yang L., Lin H., Ko C., Wang H., Chen W. (2009). Two closely related Fluconazole-resistant *Candida tropicalis* clones circulating in Taiwan from 1999 to 2006. *Microbial Drug Resistance* ; 15: 205-210. doi: 10.1089/mdr.2009.0915.
- Libey J. (2002). Le virus de l'immunodéficience humaine. Paris: Eurotext, MALIN TROP AFRIQUE; 589 p.
- Lin X., Lu C., Huang Y., Zheng Z., Su W., Shen Y. (2007). Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World journal of Microbiology and Biotechnology* ; 23 : 1037-1040. Doi : 10.1007/s11274-006-9329-8.
- Liu J., Gefen O., Ronin I., Bar-Meir M., and Balaban Q. (2020). Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. *Science* ; 367 : 200-204. doi: 10.1126/science.aay3041.
- Ludwig-Müller J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolites production? *Biotechnology letters* ; 37 : 1325-1334.
- Lohoué J., Angwafo F., Kechia F., Noukeu N. (2005). Candiduria in HIV Infected Patients in Yaoundé, Cameroon. *African Journal of Urology* ; 11(1) : 61-65.
- Mandengue C., Denning W. (2018). The Burden of Serious Fungal Infections in Cameroon. *Journal Fungi* (Basel) ; 4(2) : 44.
- Manoj J., Abhishek A., Krishna S., Paikra R. (2013). Neem : A tree for solving global problem. *Indian Journal of Applied Research* ; 3 : 10. ISSN-2249-555X.
- Marcos-Zambrano L., Escribano P., Bouza E., Guinea J. (2014). Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungaemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology* ; 304 : 1192e8.

- Martin E. (2020). Identification de micro-organismes pathogènes par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF en microbiologie médicale. Ressources en sciences de la vie pour les enseignants. Publié le 15-12-2020. Consulté le 13-03-2022.
- Masia M., Gutierrez F. (2002). Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet Infect Disease* ; 2 : 550-563.
- Mbekou K., Dize D., Yimgang L., Djague F., Toghueo K., Sewald N., Lenta N., Boyom F. (2021). Antibacterial and Mode of Action of Extracts from Endophytic Fungi Derived from *Terminalia mantaly*, *Terminalia catappa*, and *Cananga odorata*. *BioMed Research International* ; 2021 : 13 <https://doi.org/10.1155/2021/6697973>.
- McManus A., McGovern E., Moran G., Healy C., Nunn J., Fleming P., Costigan C., Sullivan D., Coleman D. (2011). Microbiological screening of Irish patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy reveals persistence of *Candida albicans* strains, gradual reduction in susceptibility to azoles, and incidences of clinical signs of oral candidiasis without culture evidence. *Journal of Clinical Microbiology* ; 49(5) : 1879-1889.
- Mefti M., Bouzerzou H. (2012). Étude originale: Étude des variations génétiques chez quelques variétés de fêtuques élevées par les marqueurs AFLP. *Cahiers Agricultures* ; vol. 21, n8 1, 2012.
- Megri Y., Arastehfar A., Boekhout T., Daneshnia F., Hörtnagl C., Sartori B., Hafez A., Pan W., Cornelia Lass-Flörl C., Hamrioui B. (2020). *Candida tropicalis* is the most prevalent yeast species causing candidemia in Algeria: the urgent need for antifungal stewardship and infection control measures. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* ; 9 : 50; <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00710-z>.
- Merenstein D., Hu H., Wang C., Hamilton P., Blackmon M., Chen H., Richard Calderone R., Dongmei Li (2013). Colonization by *Candida* Species of the Oral and Vaginal Mucosa in HIV-Infected and Non infected Women. *AIDS Research and Human Retroviruses* ; 29(1). Doi : 10.1089/aid.2012.0269.
- Moorhouse A., Rennison C., Raza M., Lilic D., Gow N. (2016). Clonal strain persistence of *Candida albicans* isolates from chronic mucocutaneous candidiasis patients. *PLoS One* ; 11 : e0145888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145888> PMID: 26849050.
- Muadcheingka T., Tantivitayakul P. (2015). Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives of Oral Biology* ; 60 (6) : 894-901. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.03.002.

- Müller M., Werner E., Kasai M., Francesconi A., Chanock J., Walsh J. (1998). Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *Journal of Clinical Microbiology* ; 36 : 1625-1629.
- Mulu A.; Kassu A.; Anagaw B.; Moges B.; Gelaw A.; Alemayehu M.; Belyhun Y.; Biadglegne F.; Hurissa Z.; Moges F. (2013). Frequent detection of ‘azole’ resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. *BMC Infectious Disease* ; 13 : 82.
- Naglik R., Challacombe J., Hube B. (2003). *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews* ; 67 (3) : 400-428.
- Nangwat C., Metago L., Iwewe Y., Kechia F., Tchuenguem R., Dzoyem P. (2017). Bloodstream and gastrointestinal candidiasis in HIV-Infected patients attending Dschang District Hospital (Cameroon) and Resistance Profile of the Isolates. *African Journal of Integrated Health* ; 7 : 43-48.
- Nangwat C., Dougue A., Kountchou C., Ekpo A., Ngouana T., Dzoyem J-P., Tume C. (2020). Non Detection of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* Among *Candida glabrata* Sensu Lato Isolates in the West Region of Cameroon. *European Journal of Clinical and Biomedical Sciences*; 5 : 71-77. doi: 10.11648/j.ejcb.20200605.11
- National Research Council (1992). *Neem : A Tree for Solving Global Problems*, National Academic Press, Washington DC.
- Netea G., Brown D., Kullberg J., Gow A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*; 6(1):67
- Ngouana T. (2014). Diversité génétique d’isolats de *Cryptococcus* et *Candida* issus des patients VIH positifs à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes. Parasitologie. Université Montpellier I, 2014. Français. ffNNT : 2014MON13512ff. fftel-01132146ff.
- Ngueguim A., Iwewe Y., Kechia A., Nangwat C., Diessé M, Tchuenguem R., Dzoyem J. (2017). Prevalence of candiduria in diabetic patients attending the Bafoussam Regional Hospital (West Cameroon) and Antifungal Susceptibility of the Isolates. *African Journal of Integrated Health* ; 7(1) : 38-42.
- Njunda A., Assob N., Nsagha D., Kamga F., Ndellejong C., Kwenti E. (2013). Oral and Urinary Colonisation of *Candida* Species in HIV/AIDS Patients in Cameroon. *Basic Sciences of Medicine* ; 2 : 1-8. DOI: 10.5923/j.medicirodrne.20130201.01.
- Nisa S., Khan N., Shah W., Sabir M., Khan W., Bibi Y., Jahangir M., Haq I., Alam S., Qayyum A. (2020). Identification and Bioactivities of Two Endophytic Fungi *Fusarium fujikuroi* and

- Aspergillus tubingensis* from Foliar Parts of *Debregeasia salicifolia*. *Arabian Journal for Science and Engineering* ; 45 : 4477-4487.
- Nnanna C., Eze M., Anyanwu O., Ujam N., Ikegbunam N., Okoye C., Charles Esimone O. (2018). Screening of metabolites of endophytic fungi isolated from leaves of *Azadirachta indica* for Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *The Pharmaceutical and Chemical Journal* ; 5(3) : 20-27.
- Noble M., Johnson D. (2007). Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annual Review of Genetics* ; 41 :193-211.
- Nwodo U., Ngene A., Iroegbu C. (2010). Effects of Fractionation on Antibacterial Activity of Crude Extracts of *Tamarindus indica*. *African Journal of Biotechnology* ; 9 : 7108-7113.
- Nyfelner R., Keller S. (1974). Metabolites of microorganisms. Echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: isolation and structural components. *Helvetica Chimica Acta* ; 57 : 2459-2477.
- O'Brien E., Oliveira-Pacheco O., 'Cinne'ide E., Haase B., Hittinger T., Rogers R., Zaragoza O., Bond U., Butler G. (2021). Population genomics of the pathogenic yeast *Candida tropicalis* identifies hybrid isolates in environmental samples. *PLoS Pathogens* ; 17(3) : 1009138. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009138>.
- Odabasi Z, et Mert A (2020). *Candida* urinary tract infections in adults. *World Journal of Urology* ; 38 : 2699-2707 <https://doi.org/10.1007/s00345-019-02991-5>.
- Odds C., Davidson A., Jacobsen M., Tavanti A., Whyte J., Kibbler C., Ellis D., Maiden M., Shaw J., Gow A. (2006). *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by Multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* ; 44(10) : 3647-3658 .doi : 10.1128/JCM.00934-06.
- Odds C., Bougnoux M-E., Shaw J., Bain M., Davidson D., Diogo D., Jacobsen D., Lecomte M., Li S-Y., Tavanti A., Maiden J., Gow R., d'Enfert C. (2007). Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eucaryotes cell* ; 6 : 1041-1052. <https://doi.org/10.1128/EC.00041-07>.
- OMS, (2008). World Malaria Report 2008. WHO Geneva, Swirzerland. ISBN 9241563699, Pages 190.
- OMS, (2020). Diabètes. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> consulté le 13/03/2022
- OMS, (2021). Diabètes. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> consulté le 13/03/2022
- OMS, (2010). Stades cliniques OMS du SIDA. <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Js5514f/19.html>. Consulté le 10/03/2022

- Onishi J., Meinz M., Thompson J. (2000). Discovery of novel antifungal (1,3)- β -dglucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 44 : 368-377.
- ONUSIDA, (2020). Données épidémiologiques VIH/SIDA. Les statistiques mondiales de l'épidémie de VIH/sida.
- Osman M., Bikai A., Rafei R., Mallat H., Dabboussi F., Hamze M. (2020). Update on invasive fungal infections in the Middle Eastern and North African region Brazilian-Review. *Journal of Clinical Microbiology* ; 51 : 1771-1789.
- Paiva L., Vidigal P., Donatti L., Svidzinski T., Consolaro M. (2012). Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron technology* ; 43(2-3) : 497-502.
- Pallavan B., Ramesh V., Dhanasekaran P., Oza N., Indu S., Govindarajan V. (2014). Comparison and correlation of candidal colonization in diabetic patients and normal individuals. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* ; 13, 66.
- Pannanusorn S., Fernandez V., Romling U. (2013). Prevalence of bio € film formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses* ; 56 : 264e72.
- Papon N., Courdavault V., Clastre M., Bennett R. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathogens* ; 9 : e1003550.
- Papon N., Noel T., Florent M., Gibot-Leclerc S., Jean D., Villard C., Chapeland-Leclerc J. (2007). Molecular mechanism of genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 51 : 369-371.
- Pappas G., Kauffman A., Andes R., Clark J., Marr A., Ostrosky-Zeichner L. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of Americaexternal icon. *Clinical Infectious Diseases* ; 62 : e1-50.
- Pappas G., Lionakis S., Arendrup C., Ostrosky-Zeichner L., Kullberg J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers* ; 4 : 18026.
- Perlin S. (2011). Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiology* ; 6(4) : 441-457.
- Pfaller A., Espinel-Ingroff A., Jones N. (2004). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology* ; 42 : 4577-4580.
- Pfaller A., Espinel-Ingroff A., Canton E., Castanheira M., Cuenca-Estrella M., Diekema J., Fothergill A., Fuller J., Ghannoum M., Jones N., Lockhart R., Martin-Mazuelos E., Melhem C., Ostrosky-Zeichner L., Pappas P., Pelaez T., Peman J., Rex J., Szeszs W. (2012). Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B, Flucytosine,

- and Itraconazole and *Candida* spp. as Determined by CLSI Broth Microdilution. *Journal of Clinical Microbiology* ; 5 : 2040–2046.
- Pfaller A., Diekema D., Gibbs L., Newell A., Ng K., Colombo A., Finkelstein J., Barnes R., Wadula J. (2008). Geographic and temporal trends in the isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: A global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001-2005. *Journal of Clinical Microbiology* ; 46 : 842-849.
- Pfaller A., Diekema J., Procop W., Wiederhold P. (2014). Multicenter evaluation of the new Vitek 2 yeast susceptibility test using new CLSI clinical breakpoints for fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology* ; 52(6) : 2126-30.
- Pfaller A., Diekema J., Turnidge D., Castanheira M., Jones N. (2019). Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997–2016. *Open Forum Infectious Disease*; 6(Suppl. 1), S79-S94. doi: 10.1093/ofid/ofy358
- Pfaller A., Diekema D. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* ; 20 : 133-163.
- Pfaller A., Boyken L., Hollis R., Messer S., Tendolkar S., Diekema D. (2004). Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* ; 50 :113-117.
- Pihet M., Marot A. (2013). Diagnostic biologique des candidoses. *Revue Francophone des Laboratoire s*; (450) : 47-61.
- Pires R., Maia dos Santos J., Zaia E., Martins G., Mendes-Giannini S. (2011). *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* ; 106(6) : 646-654.
- Price F., LaRocco T., Gentry O. (1994). Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 38 : 1422-1424.
- Rajasekharan K., Ray K., Ramesh S., Mohanvel S. (2018). Species-specific detection of *Candida tropicalis* using evolutionary conserved intein DNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* ; 66 (5) : 378-383.
- Ramage G., Martinez P., Lopez-Ribot L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research* ; 6 : 979-986.

- Ramage G., VandeWalle K., Wickes B., Lopez-Ribot J. (2001). Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 45 : 2475-2479.
- Ranganathan K., Hemalatha R (2006). Oral lesions in HIV infection in developing countries: an overview. *Advances in Dental Research* ; 19 : 63-68.
- Rasigade P. (2012). Physiopathologie des infections ostéoarticulaires chroniques : rôle des biofilms et de la persistance bactérienne intracellulaire. : La Lettre de l'Infectiologue • Tome XXVII - n° 3 ; 110-115.
- Richter S., Galask P., Messer S., Hollis J., Diekema D., Pfaller M. (2005). Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. *Journal of Clinical Microbiology* ; 43 : 2155-2162.
- Ripert C. (2013). Mycologie médicale. Tec & doc-Lavoisier. Paris; 2013. 690 p.
- Rispail P. (2008). Bases et principes du diagnostic biologique des mycoses. Cours de mycologie PCEM1, Paris 5.
- Rodrigues C., Rodrigues E., and Mariana H. (2019). *Candida sp.* Infections in Patients with Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine* ; 8(1) : 76. Doi: 10.3390/jcm8010076.
- Rodrigues S., Paillard C., Le pennec G., Dufour A., Bazire A. (2015). *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown ring Disease, forms biofilms with spherical compounds. *Frontiers in Microbiology* ; 6 :1384.
- Sabra A. (2013). Caractérisation moléculaire et phénotypique d'un mutant *dpp3Δ* déficient pour une pyrophosphate phosphatase chez la levure opportuniste *Candida lusitanae* ; Etude de l'interaction des levures avec l'hôte. Thèse de doctorat de l'université bordeaux 2. Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé. Option : Microbiologie – Immunologie P. 167.
- Sanglard D. (2002). Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* ; 20 : 462-469.
- Santoni S., Faivre-Rampant P., Prado E., Prat D. (2000). Ressources génétiques : Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures* ; 9 : 311 -322.
- Schmutterer H. (1990). Future tasks of neem research in relation to agricultural needs worldwide. In: Locke J, and Law son. R.II. (eds.) Proceedings of a workshop on neem's potential in pest management programs. USDA-ARS, Beltsville, MD. ARS-86 :15-22.
- Scordino F., Giuffrè L., Barberi G., Marino F., Orlando G., Giosa D. Romeo O. (2018) Multilocus Sequence Typing Reveals a New Cluster of Closely Related *Candida tropicalis*

- Genotypes in Italian Patients With Neurological Disorders. *Frontiers in Microbiology* ; 9 : 679. doi: 10.3389/fmicb.2018.00679.
- Sellami A., Sellami H., Ne ĳi S., Makni F., Abbes S. (2011). Antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Sfax hospital: Tunisia. *Mycopathologia* ; 171 : 417-422.
- Seneviratne C., Rajan S., Wong W., Tsang C., Lai C., Samaranyake L., Jin L. (2016) Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream Isolates from Hong Kong. *Frontiers in Microbiology* ; 7 : 216. doi: 10.3389/fmicb.2016.00216.
- Shin J., Kee S., Shin M., Kim S., Shin D., Lee S., Suh S., Ryang D. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology* ; 40 : 1244-1248.
- Ship A., Vissink A., Challacombe J. (2007). Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology* ; 103(Suppl.1) : S6.e1-14.
- Shivaswamy U. et Neelambike S. (2014). A study of candidiasis in HIV reactive patients in a tertiary care hospital, Mysore - South India. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* ; 80 : 278.
- Siddiquee S., Azad I., Bakar F., Naher L., Kumar S. (2015). Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultures of *Aspergillus niger* by GC–MS using two different capillary columns and solvents. *Journal of Saudi Chemical Society* ; 19 : 243-256.
- Silva S., Mariana H., Ant3nio M., Ros3rio O., David W., Joana A. (2008). Biofilms of non-*Candida albicans* species: In-vitro and in-vivo Anticandidal potentials and toxicity study of extracts and fractions from *Uvariadendron calophyllum* Page 134 quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology* ; 47 : 681-689
- Sobel D. (2007). Vulvovaginal candidiasis. *Lancet* ; 369 : 1971-1961.
- Sobngwi E., Mbanya N., Unwin C. (2002). “Physical activity and its relationship with obesity, hypertension and diabetes in urban and rural Cameroon,” *International Journal of Obesity* ; 26(7) : 1009-1016.
- Soyucen E., Gulcan A., Aktuglu-Zeybek A.C., Onal H., Kiykim E., Aydin A. (2014). Differences in the gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes. *Pediatrics International* ; 56 : 336-343. doi: 10.1111/ped.12243.

- Stapleton A. (2002). Urinary tract infections in patients with diabetes. *American Journal of Medicine* ; 113 : 80-84.
- Stone A., Fung B., Kirschenbaum L. (2002). Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clinical Therapeutics* ; 24 : 351-377.
- Strobel G., Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ; 67(4) : 491-502.
- Suzuki T., Omi K., Ito T., Takata T., Kikutsugi H., Fujimura T., Kono K., Kamihara T. (2006). Ethanol-induced pseudohyphal transition in the cells of *Candida tropicalis*: participation of phosphoinositide signal transduction. *FEMS Yeast Research* ; 6 : 177-185.
- Symms J. (2007). How to diagnose and relieve *Candida albicans*; intestinal yeast. <http://ezinearticles.Com>.
- Taei M., Chadeganipour M., Mohammadi R. (2019). An alarming rise of non-*albicans Candida* species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. *BMC Research Notes* ; 12(1) : 779.
- Thas J. (2008). Siddha medicine: Background and principles and the application for skin disease; *Clinical Dermatology* ; 26 : 62-78.
- Tavanti A., Davidson D., Johnson M., Maiden C., Shaw J., Gow A., Odds C. (2005). Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *Journal of Clinical Microbiology* ; 43(11) : 5593-5600. Doi : 10.1128/JCM.43.11.5593-5600.2005.
- Taware S., More W., Ghag V., Rajurkar K. (2017). Screening of endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica* A. Juss. for production of enzyme. *Biodiversity Discovery* ; 8(4) : 688-694.
- Teke N., Kuiate R., Kueté V., Teponno B., Tapondjou A., Tane P., Giacinti G., Vilaremy G. (2011). Bio-guided isolation of potential antimicrobial and antioxidant agents from the stem bark of *Trilepisium madagascariense*. *South African Journal of Botany* ; 77 : 319-327.
- Tiwari R., Verma K., Chakraborty S., Dhama K., Singh S. (2014). Neem (*Azadirachta indica*) and its potential for Safeguarding Health of Animals and Humans: A review. *Journal of Biological Sciences* ; 14 : 110-123.
- Toghueo R., Boyom F. (2020). Endophytic *Penicillium* species and their Agricultural, Biotechnological and Pharmaceutical Applications. *3Biotech* ; 10 : 107.
- Toghueo R., Kemgne E., Eke P., Kanko M., Dize D., Sahal D., Boyom F. (2019). Antiplasmodial potential and GC-MS fingerprint of endophytic fungal extracts derived from Cameroonian *Annona muricata*. *Journal of Ethnopharmacology* ; 235 : 111-121.

- Toghueo R., Zabalgoceazcoa G., Vázquez de Aldana R., Boyom F. (2017). "Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. *South African Journal of Botany* ; 109 : 146-153.
- Toghueo R., Zeuko'o E., Mbekou I. (2016). Antimicrobial and antiradical activities of ethyl acetate extracts from endophytic fungi isolated from Cameroonian medicinal plants. *Journal of Medical Studies* ; 4 : 290-295.
- Trautmann L., Janbazian L., Chomont N., Said A., Gimmig S., Bessette B., Boulassel M., Delwart E., Sepulveda H., Balderas R., Routy J-P., Haddad E., Sekaly R-P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* ; 12 : 1198-1202.
- Udayalaxmi J., Jacob S., D'Souza D. (2014). Comparison between virulence factors of *Candida albicans* and non-albicans species of *Candida* isolated from genitourinary tract. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* ; 8(11) : 15-17.
- Usha S., Krupa P., Vandana S., Surabhi S., Vishnu P., Singh R. (2017). Isolation and Speciation of *Candida* in Type II Diabetic Patients using CHROM Agar: A Microbial Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* ; 11(8) : DC09-DC11:
- Van Asbeck C., Clemons V., Markham N., Stevens A. (2009). Correlation of restriction fragment length polymorphism genotyping with internal transcribed spacer sequence, randomly amplified polymorphic DNA and multilocus sequence groupings for *Candida parapsilosis*. *Mycoses* ; 52(6) : 493-498.
- Van de Veerdonk L., Plantinga T., Hoischen A., Smeekens P., Joosten A., Gilissen C., Arts P., Rosentul C., Carmichael J., Smits-van der Graaf A. (2011). STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *The New England Journal of Medicine* ; 365 : 54-61.
- Van der Meer M., Van de Veerdonk L., Joosten B., Kullberg B-J., Netea G. (2010). Severe *Candida* spp. infections: New insights into natural immunity. *International Journal of Antimicrobials Agents* ; 36 : S58-S62. Doi : 10.1016/j.ijantimicag.2010.11.013.
- Vandeputte P. (2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata* - 168p. These en Biologie des organismes, Angers : 930.
- Vandeputte P., Ferrari S., Coste A. (2012). Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology* ; 26.
- Vazquez A., Sobel D. (2002). Mucosal candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*; 16 : 793-820.

- Verma C., Gangwar M., Yashpal M., Nath G. (2013). Anticestodal activity of endophytic *Pestalotiopsis* sp. on protoscoleces of hydatid cyst *Echinococcus granulosus*. *BioMed Research International* ; 308515.
- Vermes A., Guchelaar H-J., Dankert J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 46(2) : 171-179.
- Vicente M., Basilio A., Cabello A., Peláez F. (2003). Microbial natural products as a source of antifungals. *Clinical Microbiology Infectious* ; 9 : 15-32.
- Vijaya D., Dhanalakshmi T., Kulkarni S. (2014). Changing trends of vulvovaginal candidiasis. *Journal of Laboratory Physicians* ; 6 : 28-30.
- Vuong C., Kocianova S., Voyich J., Yao Y., Fischer E., DeLeo F., Otto M. (2004). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *Journal of Biological Chemistry* ; 279 : 54881–54886.
- Wang L., Ji X., Sun G., Qin Y., Gong M., Zhang J., Li N., Na Y. (2015). Fungus ball and emphysematous cystitis secondary to *Candida tropicalis*: A case report. *Canadian Urological Association Journal*; 9:E683-E686. doi: 10.5489/cuaj.3008.
- Wang Q., Tang D., Tang K., Guo J., Huang Y., Li C. (2020). Multilocus Sequence Typing Reveals Clonality of Fluconazole-Nonsusceptible *Candida tropicalis*: A Study from Wuhan to the Global. *Frontiers in Microbiology* ; | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.554249>
- Warrilow A, Martel C., Parker J., Melo N., Lamb D., Nes D., Kelly D., Kelly S., (2010). Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14- α demethylase (CaCYP51). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 54(10) : 4235-4245.
- Watanabe T. (1937). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species Second edition CRC PRESS Boca Raton London New York Washington, D.C. ISBN 0-8493-1118-7, QR111 .W267 2002.
- White M., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics,” in *The PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (New York, NY: Academic Press), 315-321.
- Wirsching S., Michel S., Köhler G., Morschhäuser J. (2020). Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in Fluconazole-Resistant, Clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-Regulatory Factor. *Journal of Bacteriology* ; 182 : 400-404. doi: 10.1128/jb.182.2.400-404.2000.

- Wu Y., Zhou Y., Zhang Y., Mi F., Xu J. (2019). Analyses of the Global Multilocus Genotypes of the Human Pathogenic Yeast *Candida tropicalis*. *Frontiers in Microbiology* ; 10:900.
- Wu S., Chen W., Miao C. (2011). Secondary metabolites of endophytic fungus *Xylaria sp.* YC-10 of *Azadirachta indica*. *Chemistry of Natural Compounds* ; 47 : 858-861.
- Wu Y., Zhou H., Wang J., Li L., Li W., Cui Z., Chen X., Cen R., Lu J., Cheng Y. (2012) Analysis of the clonality of *Candida tropicalis* strains from a general hospital in Beijing using multilocus sequence typing. *PLoS One* ; 7, e47767-47775.
- Wu Y., Guo H., Wang M., Yi H., Zhou M., He W., Zhang Y., Xu J. (2017). Multilocus sequence analyses reveal extensive diversity and multiple origins of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* from tropical China. *Scientific Reports* ; 7, 42537; doi : 10.1038/srep42537.
- Xiao M., Sun Y., Kang M., Guo W., Liao K., Chen A. (2018). Five-year national surveillance of invasive candidiasis: Species distribution and azole susceptibility from the China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) study. *Journal of Clinical Microbiology*; 56:e00577–e518. doi: 10.1128/JCM.00577-18.
- Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P., Qin L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* ; 165 : 437-449.
- Zaki M., Denning W. (2017). Serious fungal infections in Egypt. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; 36(6):971-974.
- Zomorodian K., Kavooosi F., Pishdad G., Mehriar P., Ebrahimi H., Bandegani A., Pakshir K. (2016). Prevalence of oral *Candida* colonization in patients with diabetes mellitus. *Journal of Medical Mycology* ; 26 : 103-110.
- Zuza-Alves L., Silva-Rocha W., Chaves M. (2017). An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Frontiers in Microbiology* ; 8 : 1927.
- Zvotnik A., Ohayon S., Gruenbaum F., Gruenbaum E., Mohar B., Boyko M., Klin Y., Sheiner E., Shaked G., Shapira Y., Teichberg. (2011). Determination of factors affecting glutamate concentrations in the whole blood of healthy human volunteers. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* ; 23 : 45-49.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1: Clairance éthique

<p>REPUBLIQUE DU CAMEROUN <i>Paix – Travail – Patrie</i></p> <p>MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE</p> <p>SECRETARIAT GENERAL</p> <p>COMITE REGIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTÉ HUMAINE DU CENTRE</p> <p>Tél : 222 21 20 87/ 677 94 48 89/ 677 75 73 30 Mail : crersh_centre@yahoo.com</p>		<p>REPUBLIC OF CAMEROON <i>Peace – Work – Fatherland</i></p> <p>MINISTRY OF PUBLIC HEALTH</p> <p>SECRETARIAT GENERAL</p> <p>CENTRE REGIONAL ETHICS COMMITTEE FOR HUMAN HEALTH RESEARCH</p>
---	---	--

CE N°0 2 2 2 /CRERSHC/2016

Yaoundé, le **05 DEC 2016**

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité Régional d’Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine du Centre (CRERSH/C) a reçu la demande de clairance éthique pour le projet de recherche intitulé : « Epidémiologie moléculaire des isolats de *Candida Parapsilosis* et susceptibilité à quelques antifongiques » soumis par Mademoiselle DOUGUE NGUEGUIM Aude.

Après son évaluation, il ressort que le sujet est digne d’intérêt, les objectifs sont bien définis et la procédure de recherche ne comporte pas de méthodes invasives préjudiciables aux participants. Par ailleurs, le formulaire de consentement éclairé destiné aux participants est acceptable.


Pour ces raisons, le Comité Régional d’éthique approuve pour une période de six (06) mois, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

L’intéressée est responsable du respect scrupuleux du protocole et ne devra y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il sans l’avis favorable du Comité Régional d’Ethique. En outre, elle est tenue de:

- collaborer pour toute descente du Comité Régional d’éthique pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé ;
- et soumettre le rapport final de l’étude au Comité Régional d’éthique et aux autorités compétentes concernées par l’étude.

La présente clairance peut être retirée en cas de non-respect de la réglementation en vigueur et des directives sus mentionnées.

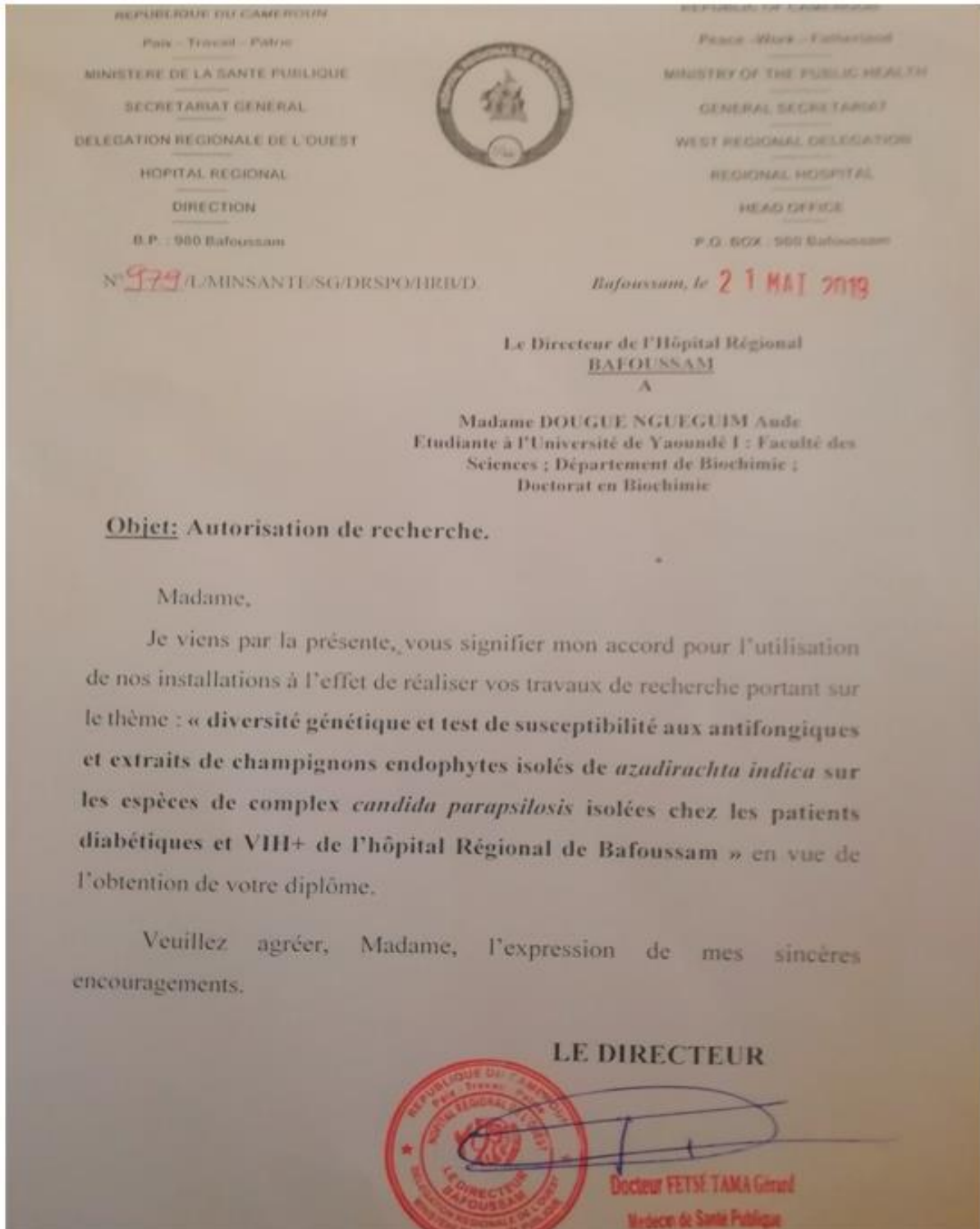
En foi de quoi la présente Clairance Ethique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.



Ampliation:

- CNERSH
- HRS

Annexe 2 : Autorisation de recherche de l'hôpital régional de Bafoussam



Annexe 3 : Autorisation de recherche de l'hôpital Central de Yaoundé

<p>REPUBLIQUE DU CAMEROUN Pais - Travail - Patrie</p> <p>MINISTRE DE LA SANTE PUBLIQUE</p> <p>SECRETARIAT GENERAL</p> <p>DIRECTION DE L'HOPITAL CENTRAL DE YAOUNDE</p> <p>CONSEILLER MEDICAL</p> <p>N°2 HCY/CM</p>		<p>REPUBLIC OF CAMEROON Peace - Work - Fatherland</p> <p>MINISTRY OF PUBLIC HEALTH</p> <p>SECRETARY GENERAL'S OFFICE</p> <p>DIRECTORATE OF CENTRAL HOSPITAL</p> <p>MEDICAL'S COUNCILOR</p> <p>Yaoundé, le 12 SEP. 2011</p>
<h3><u>AUTORISATION DE RECHERCHE</u></h3>		
<p>Je soussigné Pr Pierre MASSO MISSE certifie qu'une autorisation administrative de mener une recherche à l'hôpital Central de Yaoundé, service laboratoire, est accordée à MR NGOUANA KAMALAC THIERRY étudiant à la faculté des sciences de Yaoundé I. L'étude porte sur «caractérisation génétique des isolats de levures et étude de leur profil de sensibilité aux molécules antifongiques disponibles et à celles isolées des extraits de plantes.»</p> <p>L'éthique et la confidentialité sont à respecter</p> <p>Au terme de ce Travail, une copie sera déposée à la bibliothèque de l'HCY.</p>		
<p>Copie :</p> <ul style="list-style-type: none">- Directeur HCY- service laboratoire	 <p>Le Conseiller Médical <i>Professor Masso Misse</i></p>	

Annexe 4 : Notice d'information

SUJET : Epidémiologie moléculaire et susceptibilité aux antifongiques des isolats de *Candida spp* isolés chez les patients VIH+ et diabétiques à l'hôpital régional de Bafoussam et à l'hôpital central de Yaoundé

Le but de cette notice d'information est de vous donner toutes les informations dont vous avez besoin pour décider si vous souhaitez ou non participer à cette étude. Merci de la lire attentivement. Elle vous permettra de poser toutes les questions que vous souhaitez sur l'étude, ses risques éventuels et ses bénéfices, vos droits ou tout autre point à préciser.

Vous pourrez alors décider de participer ou non à cette étude.

Résumé

Les pathologies immunodépressives telles que le VIH, le diabète et bien d'autres affectent d'avantage de nombreuses personnes dans notre société. Elles sont responsables de la diminution de la défense immunitaire et favorisent l'installation des infections dites opportunistes telles que les candidoses. Les candidoses sont des infections causées par des levures du genre *Candida* et il en existe de nombreuses espèces dont les plus incriminées sont *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* et *Candida krusei*. Ainsi, le projet vise à identifier les microbes qui causent cette candidose et à tester leur sensibilité aux médicaments commercialisés et aux extraits de champignons endophytes d'une plante médicinale couramment utilisée, en vue d'améliorer dans l'avenir la prise en charge des patients présentant les candidoses en particulier.

Objectif général : Contribuer à l'amélioration de la prise en charge des patients à risque (personnes vivant avec le VIH et les diabétiques) souffrant d'infection fongique due à *Candida sp.*

Procédure

Si vous acceptez de participer en signant le formulaire de consentement éclairé, vous serez inclus dans cette étude. Un questionnaire est remis aux participants volontiers pour leur identification. Les échantillons d'urines, de selles, de prélèvements vaginaux et prélèvements buccaux seront collectés par un(e) technicien(ne) de laboratoire et acheminés au laboratoire de bactériologie où il s'en suivra la culture et l'isolement des levures du genre *candida*.

Durée

La durée de cette étude sera de 2 ans et chaque participant aura seulement environ 20 minutes pour participer à cette étude, (c'est-à-dire, 5 minutes pour l'information, 5 minutes

pour le remplissage du questionnaire et la signature du formulaire de consentement éclairé et enfin, 10 minutes pour le recueil des échantillons biologiques).

Participation

La participation à l'étude est volontaire. Vous êtes libre d'accepter ou de refuser, ou de démissionner à tout moment de l'étude, sans aucun dommage ou justification.

Avantage

Les patients recevront les résultats des tests effectués gratuitement qui pourront permettre l'amélioration de leur prise en charge.

Désavantage possible

En dehors de l'odeur désagréable des urines et des selles, vous n'auriez aucun désavantage.

Confidentialité

Vos résultats seront gardés confidentiels, étant donné que les échantillons et les résultats seront codifiées, c'est-à-dire, les codes seront utilisés à la place du nom du participant.

NB : Dans le cas où vous auriez besoin de plus d'informations, s'il vous plaît contacter les personnes suivantes.

Chercheur principal : Aude DOUGUE NGUEGUIM ; Tél : (+237) 694 79 29 95 / (+237) 671 61 80 78

Email : audedougue@yahoo.fr

Encadreur : Dr Thierry NGOUANA ; Tél : (+237) 676 16 33 53

Directeur : Pr Jean Paul DZOYEM ; Tél : (+237) 679 09 10 31/ (+237) 656 81 15 07

Superviseur : Pr Fabrice BOYOM FEKAM ; Tél : (+237) 677 27 65 85

Dépenses

La participation à cette étude est libre et gratuite.

Annexe 5 : Information notice

Subject : Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* spp isolates isolated from HIV+ and diabetic patients at Bafoussam Regional Hospital and Yaoundé Central Hospital

The purpose of this information leaflet is to give you all the information you need to decide whether or not to participate in this study. Please read it carefully. It will allow you to ask any questions you may have about the study, its possible risks and benefits, your rights or any other point you wish to clarify. You can then decide whether or not to take part in the study.

Summary

Immunosuppressive diseases such as HIV, diabetes and many others are increasingly affecting many people in our society. They are responsible for a reduction in the immune defence system and encourage the development of so-called opportunistic infections such as candidiasis. Candidiasis is an infection caused by yeasts of the *Candida* genus, of which there are many species, the most common being *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. The aim of the project is to identify the microbes that cause this candidiasis and to test their sensitivity to marketed drugs and to extracts of endophytic fungi from a commonly used medicinal plant, with a view to improving the future management of patients suffering from candidiasis in particular.

General objective:

To help improve the management of at-risk patients (people living with HIV and diabetics) suffering from fungal infections due to *Candida* sp.

Procedure

If you agree to participate by signing the informed consent form, you will be included in this study. Participants will be given a questionnaire for identification purposes. Samples of urine, faeces, vaginal swabs and buccal swabs will be collected by a laboratory technician and sent to the bacteriology laboratory, where *Candida* yeasts will be cultured and isolated.

Duration

The duration of the study will be 2 years, and each participant will only have approximately 20 minutes to take part in the study (i.e. 5 minutes for information, 5 minutes for completing the questionnaire and signing the informed consent form, and 10 minutes for collecting the biological samples).

Participation

Participation in the study is voluntary. You are free to accept or refuse, or to resign from the study at any time, without any penalty or justification.

Benefits

Patients will receive the results of the tests carried out free of charge, which may help to improve their care.

Possible disadvantage

Apart from the unpleasant odour of urine and faeces, you will not have any disadvantages.

Confidentiality

Your results will be kept confidential, as samples and results will be coded, i.e. codes will be used instead of the participant's name.

NB: In case you need more information, please contact the following people.

Principal investigator : Aude DOUGUE NGUEGUIM; Tel: (+237) 694 79 29 95 / (+237) 671 61 80 78 ; Email : audedougue@yahoo.fr.

Supervisor : Dr Thierry Ngouana; Tel: (+237) 676 16 33 53

Director : Pr Jean Paul DZOYEM; Tel: (+237) 679 09 10 31/ (+237) 656 81 15 07

Supervisor : Pr Fabrice BOYOM FEKAM; Tel: (+237) 677 27 65 85

Expenses

Participation in this study is free of charge.

Annexe 6 : Fiche de questionnement

Sujet : Epidémiologie moléculaire et susceptibilité aux antifongiques des isolats de *Candida spp* isolés chez les patients immunodéprimés à l'hôpital régional de Bafoussam et à l'hôpital central de Yaoundé

N°.....

Date.....

CRITERE DE NON INCLUSION

Coinfection VIH+/diabète, VIH+/tuberculose ; Insuffisance rénale ; Antécédent familiale d'anomalie du tractus urinaire ; Hépatite virale C ou B

SECTION I : IDENTIFICATION DU PARTICIPANT

Statut du patient : VIH+ diabète contrôle

i. Code du participant :	v. Age:
ii. Sexe : F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	vi. poids :
iii. Profession :	vii. Tel :
iv. Résidence :	viii. Niveau scolaire : Primaire <input type="checkbox"/> Secondaire <input type="checkbox"/> Supérieur <input type="checkbox"/>

SECTION II : ANTECEDANTS CLINIQUES ET MEDICAUX

VIH+ :

Date et lieu de dépistage.....

Etes-vous sous ARV ? oui non si oui depuis combien de temps ?.....

Taux de CD4+ :

Diabète :

Glycémie à jeun :.....

Il s'agit de quel type de diabète ? DT1 DT2

Depuis combien de temps en souffrez-vous ?.....

Suivez-vous un régime alimentaire ? oui non

Contrôle :

Pour quel motif êtes-vous à l'hôpital ? Garde malade ? Rendez-vous avec le médecin ?

Antécédents médicaux durant ces 3 derniers mois ? Oui non

SECTION III : DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

Consommation d'alcool : non 1/J 2/J occasionnellement

Consommation de tabac : oui non

Prise de contraceptif : oui non

Avez-vous eu à modifier votre régime ? Oui non

Quels signes cliniques ressentez-vous habituellement : pollakiurie brûlures mictionnelles dysurie

pyurie sècheresse de la bouche Aucun

Consommation de farine de ble : oui non Si oui combien de fois/ semaine? chaque jour

1fois/semaine 2fois par semaines 4fois /semaines occasionnellement

Consommation de l'eau du robinet : oui non

Consommation d'antifongiques : oui non

CONSENTEMENT ECLAIRE

Je soussigné, , reconnâit, après avoir lu la notice d'information qui m'a été donnée, et compris la portée de l'étude, les désavantages et les avantages, et aussi avoir compris que j'ai le droit de refuser de participer ou de me retirer à tout moment et que cela n'affectera pas mes soins médicaux, j'accepte librement de participer à cette étude.

Signature de l'investigateur

Signature du participant

Annexe 7 : Question sheet

Subject: Molecular epidemiology and susceptibility to antifungal agents of *Candida* spp isolates isolated from immunocompromised patients at Bafoussam regional hospital and Yaoundé central hospital

N°.....

Date.....

NON-INCLUSION CRITERIA

HIV+/diabetes, HIV+/tuberculosis co-infection; Renal insufficiency; Family history of urinary tract anomaly; Viral hepatitis C or B.

SECTION I : IDENTIFICATION OF PARTICIPANT

Statut of patient : HIV+ diabetes control

i. Code of participant :	v. Age:
ii. Sexe : F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	vi. Weigh :
iii. Profession :	vii. Tel :
iv. Residence :	viii. School level : Primary <input type="checkbox"/> Secondary <input type="checkbox"/> Superior <input type="checkbox"/>

SECTION II : CLINICAL AND MEDICAL ANTECEDENTS

VIH+ :

Date and place of screening.....

Are you on ARV ? yes no if yes for how long ?.....

CD4+ count:

Diabetes :

Fasting blood glucose:.....

What type of diabetes ? DT1 DT2

How long have you had diabetes ?.....

Do you follow a diet ? yes no

Control :

Why are you in hospital? Sick call ? Doctor's appointment ?

Past medical history in the last 3 months ? yes no

SECTION III : ADDITIONAL DATA

Alcohol consomtionl : no 1/J 2/J occasionally

Smoking : yes no

Use of contraceptives : yes no

Have you had to change your diet ? yes no

What clinical signs do you usually experience : pollakiuria urinary burning dysuria

pyuria dry mouth none
Consumption of wheat flour: yes no If yes, how many times a week every day 2
times a week 4 times a week occasionally
Tap water consumption : yes no
Consumption of antifungals: yes no

INFORMED CONSENT

I, acknowledge that, having read the information leaflet given to me, and having understood the scope of the study, the disadvantages and advantages, and also having understood that I have the right to refuse to participate or to withdraw at any time and that this will not affect my medical care, I freely agree to participate in this study.

Signature of investigator

Signature of participant

Annexe 8 : Répartition des *Candida* spp. isolés et identifiés présomptivement au sein de la population d'étude des 02 hôpitaux.

<i>Candida</i> spp.	HRB n (%)	HCY n (%)	
<i>C. albicans</i>	134 (56,75)	117 (44,82)	
<i>C. parapsilosis</i>	28 (11,81)	14 (5,3)	
<i>C. krusei</i>	22 (8,66)	51 (19,54)	
<i>C. glabrata</i>	22 (9,2)	29 (11,11)	
<i>C. dubliniensis</i>	20 (8,4)	0	
<i>C. tropicalis</i>	2 (0,84)	24 (9,19)	
<i>C. guilliermondi</i>	7 (2,95)	1 (0,38)	
<i>C. catenulata</i>	1 (0,42)	0	
<i>C. rugosa</i>	1 (0,42)	11 (4,21)	
<i>C. kefyr</i>	0	4 (1,53)	
<i>C. intermedia</i>	0	1 (0,38)	
<i>C. famata</i>	0	1 (0,38)	
<i>C. sake</i>	0	3 (1,15)	
<i>C. lusitaniae</i>	0	2 (0,76)	
<i>C. norvegensis</i>	0	2 (0,76)	
<i>C. valida</i>	0	1 (0,38)	
Total	237 (47,59)	261 (52,40)	

HRB : Hôpital regional de Bafoussam ; **HCY** : Hôpital central de Yaoundé

Annexe 9 : Associations entre les différentes espèces de *Candida* isolées

Espèces	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
<i>C. albicans</i>	29	26	45	30
<i>C. parapsilosis</i>		13	11	15
<i>C. tropicalis</i>			24	22
<i>C. glabrata</i>				35

Annexe 10 : Fiche antifongigramme Sentitre levure

AP-HM	IHU - Timone Service Bactériologie - Pr. RAOULT	Secteur Parasitologie-Mycologie Stéphane RANQUE
Fiche Antifongigrammes Sensititre Levures		
Date d'application: 2018-03-10 Version : 2		Rédaction : AHED MESSAOUD Mohammed Validation : Stéphane RANQUE

Etiquette	Date : / / 2021 Espèce :	Lu par
-----------	-----------------------------	--------

Le dessous des cupules est lu avec un miroir. La croissance des levures dans les cupules est mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique qui passe du bleu (négatif) au rose (positif).
 Vérifier la croissance dans la cupule T+ (contrôle à croissance positive : A1). Si absence de croissance de la cupule T+, ré-incuber et lire dès que le T+ a viré. La lecture se fait en tenant compte de l'antifongique testé
 En règle, la CMI est donnée par la première cupule bleue. Pour les azolés (PO, VO, IT, FL), il peut exister un effet de traîne, qui se traduit par un virage moins intense, en général identique pour toutes les cupules supérieures à CMI. La CMI sera lue comme la 1ère cupule montrant un virage moins intense comparé à la cupule T+. (En cas de doute faire une bandelette E-test)

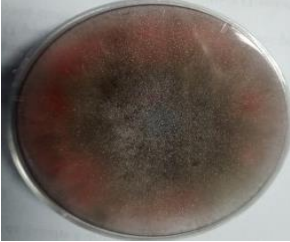
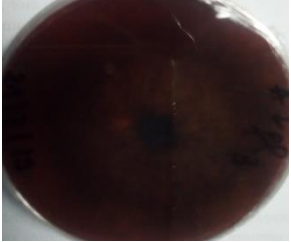


		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 AB
Anidulafungine A1-11	A	T+	AND 0.015	AND 0.03	AND 0.06	AND 0.12	AND 0.25	AND 0.5	AND 1	AND 2	AND 4	AND 8	AB 0.12
Micafungine B1-11	B	MI 0.008	MI 0.015	MI 0.03	MI 0.06	MI 0.12	MI 0.25	MI 0.5	MI 1	MI 2	MI 4	MI 8	AB 0.25
Caspofungine C1-11	C	CS 0.008	CS 0.015	CS 0.03	CS 0.06	CS 0.12	CS 0.25	CS 0.5	CS 1	CS 2	CS 4	CS 8	AB 0.3
Sflurocytosine D1-11	D	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	AB 1
Posaconazole E1-11	E	PO 0.008	PO 0.015	PO 0.03	PO 0.06	PO 0.12	PO 0.25	PO 0.5	PO 1	PO 2	PO 4	PO 8	AB 2
Voriconazole F1-11	F	VO 0.008	VO 0.015	VO 0.03	VO 0.06	VO 0.12	VO 0.25	VO 0.5	VO 1	VO 2	VO 4	VO 8	AB 4
Itraconazole G1-11	G	IT 0.015	IT 0.03	IT 0.06	IT 0.12	IT 0.25	IT 0.5	IT 1	IT 2	IT 4	IT 8	IT 16	AB 8
Fluconazole H1-12	H	FL 0.12	FL 0.25	FL 0.5	FL 1	FL 2	FL 4	FL 8	FL 16	FL 32	FL 64	FL 128	FL 256

Valeurs critiques	C. albicans		C. glabrata		C. parapsilosis		C. tropicalis		C. krusei		Candida sp.	
	SS	Rz	SS	Rz	SS	Rz	SS	Rz	SS	Rz	SS	Rz
Amphotéricine B	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Anidulafungine	0.25	1	0.12	0.5	2	8	0.25	1	0.25	1	0.25	2
Caspofungine	0.25	1	0.12	0.5	2	8	0.25	1	0.25	1	0.25	2
5-Fluorocytosine	0.5	32	0.5	32	4	32	4	32	4	32	4	32
Fluconazole	2	8	16	64	2	8	2	8	0.12	8	64	
Itraconazole	0.12	1	0.12	1	0.12	1	0.12	1	0.12	1	0.12	1
Micafungine	0.25	1	0.06	0.25	2	8	0.25	1	0.25	1	0.25	2
Posaconazole	0.06	1	0.5	2	0.25	2	0.12	2	0.5	2	0.12	2
Voriconazole	0.12	1	0.5	2	0.12	1	0.12	1	0.5	2	0.12	2

Annexe 11 : Concentrations minimales inhibitrices pour 26 isolats de *C. tropicalis* testés

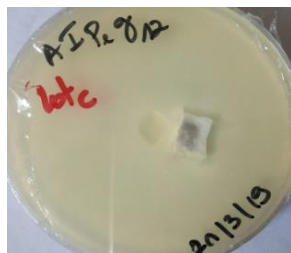
Antifongiques	<i>Candida tropicalis</i> (n=26)			
	Sensible	Sensible à forte posologie	Résistant	Intervalle de CMI
Amphotéricine B	26 (100%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 - 2
5-Fluorocytosine	26 (100 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	4 - 32
Anidulafungine	24 (92,3%)	2 (7,7%)	0 (0,0 %)	0,25 – 1
Micafungine	24 (92,3%)	1 (3,8%)	1 (3,8%)	0,25 – 1
Caspofungine	21 (80,7%)	3 (11,5%)	2 (7,7%)	0,25 – 1
Posaconazole	4 (15,3%)	12 (46,1%)	10 (38,4%)	0,12 - 2
Voriconazole	7 (26,9%)	13 (50,0%)	6 (23,1%)	0,12 - 2
Itraconazole	2 (7,7%)	13 (50,0%)	11 (42,3%)	0,12 – 1
Fluconazole	10 (38,4%)	2 (7,7%)	14 (53,8%)	2 - 8

Annexe 12 : photographies et descriptions des différents champignons endophytes isolés

Photographies des champignons endophytes dans les boîtes de petri		Description	Nombre et liste des champignons endophytes isolés
Vue ventrale	Vue dorsale		
		<p>Vue ventrale : mycélium long, marron au centre et rose aux alentours qui noircit en vieillissant</p> <p>Vue dorsale : bordeau</p>	<p>9 champignons endophytes : <i>A/bfl 12, A/bfl 9, A/fl 11, A/fl 2, A/fl3, A/fl6, A/fl8, A/fl9, A/tr1</i></p>
		<p>Vue ventrale : mycélium court, poudreux vert au centre et blanc aux alentours</p> <p>Vue dorsale : berge fissuré</p>	<p>4 champignons endophytes : <i>A/fe4, A/lex7, A/lex9, A/bfl5</i></p>



C



C

Vue ventrale : pousse blanche et cotonneuse

12 champignons endophytes : *Albfe2*, *Aletr 5*, *Aleti3*, *Alen 12*, *Alen 17*, *Alen22*, *Allex11*, *Allex12*, *Allex13*, *Allex8*, *Allex18*, *Alme3*

Vue dorsale : berge



D



D

Vue ventrale : pousse verte avec des auréoles blanches

7 champignons endophytes : *Alen1*, *Alen6*, *Alen11*, *Alen13*, *Alen14*, *Alfe2*, *Albfl7*

Vue dorsale : blanc fissuré



E



E

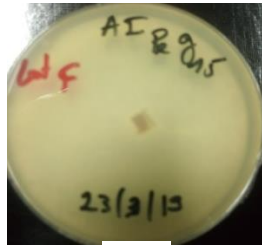
Vue ventrale : pousse cotonneuse blanche avec auréole marron autour

4 champignons endophytes : *Afl11*; *Alti17*, *Aletr5*, *Aletr8*

Dorsal view : berge plissée



F



F

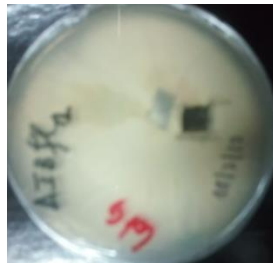
Vue ventrale : pousse cotonneuse
tres blanche

5 champignons endophytes:
AIex3, AIex14, AIex15,
AIex16, AIen15

Vue dorsale : berge



G



G

Vue ventrale : pousse poudreuse
verte avec auréoles blanches

6 champignons endophytes :
AIex1, AIex4, Aibf11,
Aibf12, Aibf14, Aitr6

Vue dorsale : berge



H



H

Vue ventrale : mycelium long
marron

1 champignon endophyte :
AIfl4

Vue dorsale : noire



I



I

Ventral view: pousse verte **11** champignons
poudreuse endophytes: *Aife3*, *Aife6*,

Vue dorsale : berge

Aifl5, *Alen3*, *Alen18*,
Abfl3, *Abfl6*, *Abfl8*,
Alex5, *Alera1*, *Ati5*



J

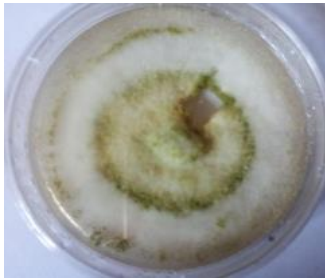


J

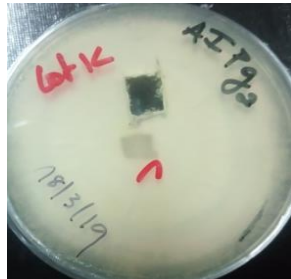
Vue ventrale : pousse noir avec un **4** champignons endophytes :
fond blanc *AIetr10*, *AIetr12*, *Aife5* ;

Vue dorsale : marron fissuré

Abfl11



K

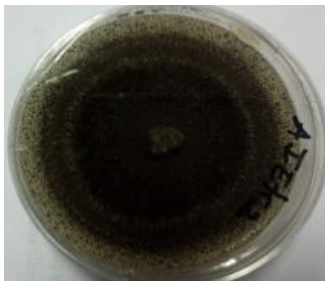


K

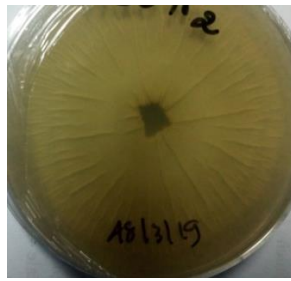
Vue ventrale : pousse verte avec halo blanc

7 champignons endophytes :
AIex2, AIex6, AIen5, AIen7, AIen9, AIen10, AIen21

Vue dorsale : blanc



L

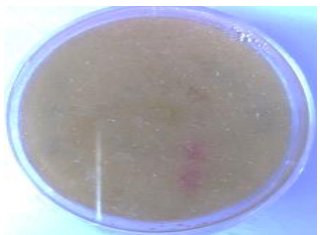


L

Vue ventrale: pousse noir

6 champignons endophytes :
AIen2, AIen20, AIetr1, AIetr2, AIetr3, AIetr4

Vue dorsale: marron fissuré



M

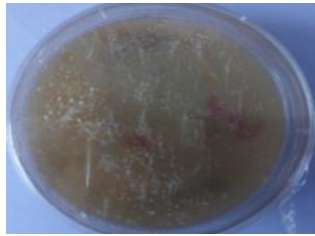


M

Vue ventrale : mycélium long, espacé marron contenant les spores

11 champignons endophytes :
AIera7, AIera10, AIera11, AIera12, AIera13, AIera14, AIeti1, AIr7, AIti6, AIr2, AIti15

Vue dorsale : marron



N



N

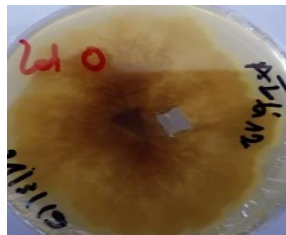
Vue ventrale : mycélium court et espacé, peu marron

Vue dorsale : marron claire

21 champignons endophytes : *Alr1*, *Alr6*, *Alti2*, *Altr3*, *Alti14*, *AIfe8*, *AIera9*, *AIfe9*, *AIetr9*, *AIetr11*, *Alti7*, *AIfe10*, *Alti1*, *Alti13*, *Alti3*, *AIera8*, *Alti8*, *AIera13*, *AIeti2*, *Altr5*, *AIen4*



O

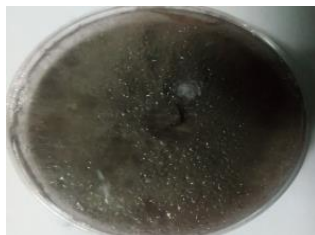


O

Vue ventrale : pousse étalée berge pale

Vue dorsale : marron avec halo

2 champignons endophytes : *Alti11*, *Alti12*



P



P

Vue ventrale : mycélium long noir

Vue dorsale : noir

1 champignon endophyte : *AIfi12*



Q



Q

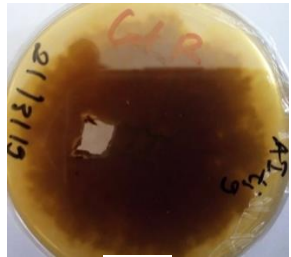
Vue ventrale : mycélium long blanc au centre et noir autour

2 champignons endophytes :
A/f110, A/f113

Vue dorsale : noir



R



R

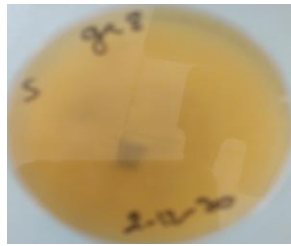
Vue ventrale : pousse étalée rose pale au centre et berge pale aux alentours

1 endophyte fungus: *ATI9*

Vue dorsale : marron



S

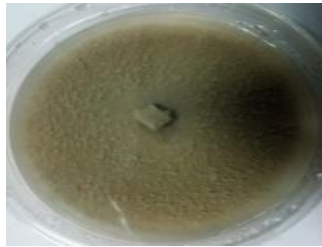


S

Vue ventrale : pousse poudreuse au centre et berge

1 champignon endophyte :
ATI8

Vue dorsale : marron



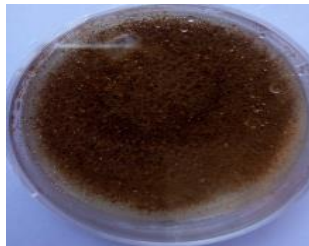
T



T

Vue ventrale : pousse de couleur terre poudreuse **2 champignons endophytes :**
A/me1, A/me2

Vue dorsale : berge



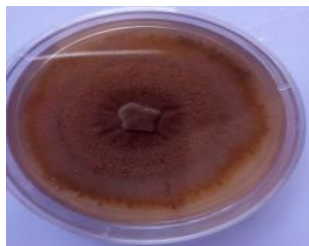
U



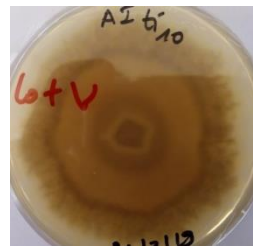
U

Vue ventrale : pousse de couleur jaunâtre **1 champignon endophyte :**
A/era3

Vue dorsale : marron



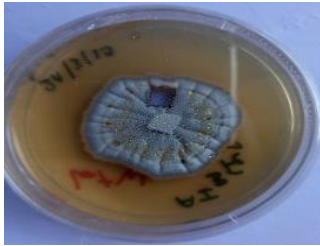
V



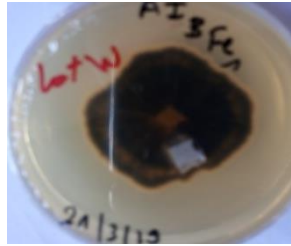
V

Vue ventrale : pousse étalée marron avec halo **1 champignon endophyte :**
A/ti10

Vue dorsale : marron avec halo



W



W

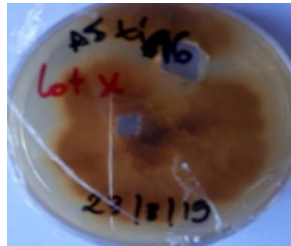
Vue ventrale : pousse noire fissuré, 1 champignon endophyte:
aspect cimenté avec une difficulté à pousser

Vue dorsale : noir avec halo

A/bfe1



X

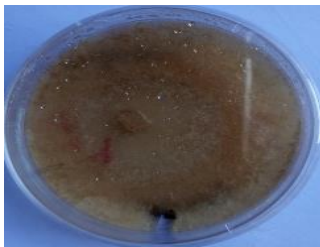


X

Vue ventrale : pousse berge pale

1 champignon endophyte :
A/ti16

Vue dorsale : marron



Y

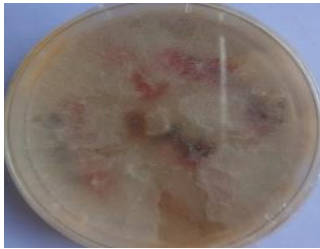


Y

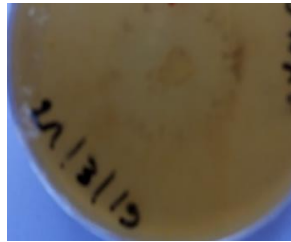
Vue ventrale : pousse marronne 1 champignon endophyte:
avec auréole transparente

A/ra3

Vue dorsale : marron clair



Z



Z

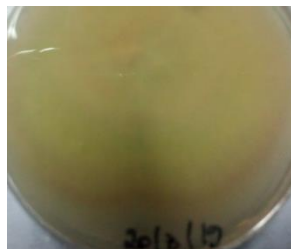
Vue ventrale : mycélium long, blanc
poudreux

1 champignon endophyte :
A/tr3

Vue dorsale : marron



AA

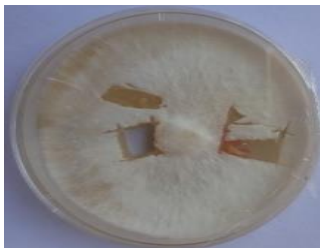


AA

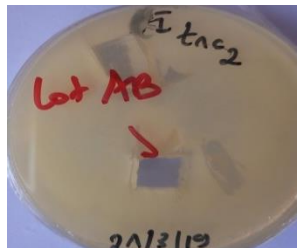
Vue ventrale : pousse marron foncé

1 champignon endophyte:
A/etr7

Vue dorsale : marron



AB



AB

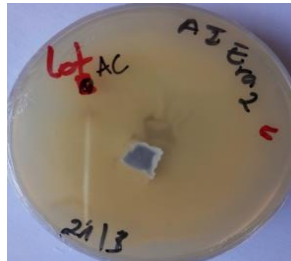
Vue ventrale : mycélium long, blanc
fibreux

1 champignon endophyte:
A/tr2

Vue dorsale : blanc



AC



AC

Vue ventrale : pousse cotonneuse verte avec halo blanche
1 champignon endophyte : *A/era2*

Vue dorsale : berge



AD



AD

Vue ventrale : pousse verdâtre taché de blanc, poudreuse
1 champignon endophyte : *A/eti4*

Vue dorsale : blanc fissuré



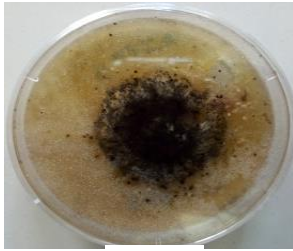
AE



AE

Vue ventrale : pousse poudreuse et cotonneuse verte
1 champignon endophyte : *A/me5*

Vue dorsale : noir / marron



AF



AF

Vue ventrale : pousse noire au 1 champignon endophyte :
centre avec auréole berge *Aira5*

Vue dorsale : marron plissée avec
halo

AI : *Azadirachta indica* ; **ti** : tige ; **eti** : écorce tige ; **tr** : tronc ; **etr** : ecorce tronc ; **en** : endocarpe ; **me** : mésocarpe ; **ex** : exocarpe ; **ra** : racine ; **era** : écorce racine ; **fl** : fleurs ; **bfl** : brindille fleurs ; **fe** : feuilles ; **bfe** : brindille feuilles.

Annexe 13 : Logarithmes du nombre de cellules en fonction du temps

Temps (heures)	A/bfl11	Contrôle négatif
0	3,69	3,69
2	3,5	3,7
4	3,45	3,8
6	3,4	3,85
8	3,37	3,99
10	3,35	3,92
12	3,32	4
24	3,3	4,05

PUBLICATION

Multilocus sequence typing (MLST) analysis reveals many novel genotypes and a high level of genetic diversity in *Candida tropicalis* isolates from Italy and Africa. Aude Ngueguim Dougue, Mohammed A. El-Kholy, Letterio Giuffrè, Grazia Galeano, Francesco D'Aleo, Cyrille Levis Kountchou, Claude Nangwat, Jean Paul Dzoyem, Domenico Giosa, Ida Pernice, Sherine M. Shawky, Thierry Kammalac, Ngouana Fabrice Fekam Boyom Orazio Romeo (2022). *Mycoses*. 00:1–12. DOI: 10.1111/myc.13483

Abstract

Background: *Candida tropicalis* is a human pathogenic yeast frequently isolated in Latin America and Asian-Pacific regions, although recent studies showed that it is also becoming increasingly widespread throughout several African and south-European countries. Nevertheless, relatively little is known about its global patterns of genetic variation as most of existing multilocus sequence typing (MLST) data come from Asia and there are no genotyped African isolates.

Objectives: We report detailed genotyping data from a large set of *C. tropicalis* isolates recovered from different clinical sources in Italy, Egypt and Cameroon in order to expand the allele/genotype library of MLST database (<https://pubmlst.org/ctropicalis>), and to explore the genetic diversity in this species.

Methods: A total of 103 *C. tropicalis* isolates were genotyped using the MLST scheme developed for this species. All isolates were also tested for in vitro susceptibility to various antifungals to assess whether certain genotypes were associated with drug-resistance.

Results and Conclusions: A total of 104 different alleles were detected across the MLST-loci investigated. The allelic diversity found at these loci resulted in 51 unique MLST genotypes of which 36 (70.6%) were novel. Global optimal eBURST analysis identified 18 clonal complexes (CCs) and confirm the existence of a specific Italian cluster (CC36). Three CCs were also statistically associated with fluconazole resistance, which was elevated in Cameroon and Egypt.

Our data show high genetic diversity in our isolates suggesting that the global population structure of *C. tropicalis* is still poorly understood. Moreover, its clinical impact in Italy, Egypt and Cameroon appears to be relevant and should be carefully considered.

Key words

Candida tropicalis, fluconazole resistance, genetic diversity, non-albicans *Candida* species, candidiasis, multilocus sequence typing (MLST), population structure.

