

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE, SCIENCE
DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE, STUDIES
IN LIFE HEALTH AND
ENVIRONMENT SCIENCES

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

LABORATORY OF MICROBIOLOGY

Apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons microscopiques et étude de leurs facteurs de risques au Centre Pasteur du Cameroun

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Microbiologie Médicale

Rédigé par :

SOKENG JIOFACK Marie Esther

Licenciée en Analyses Médicales

Bactériologie et Virologie

Matricule : 21U2591



Sous la direction de :

Pr GONSU KAMGA Hortense

Professeur

Microbiologie médicale

FMSB - Université de Yaoundé I

Année académique 2023 – 2024

DEDICACE

A

MES TRÈS CHERS PARENTS

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail de recherche a été rendu possible grâce à la contribution de plusieurs personnes que je tiens à remercier chaleureusement :

- ✓ **Pr GONSU KAMGA Hortense** : en dépit de vos multiples responsabilités, vous avez accepté de guider nos premiers pas dans le monde de la recherche, recevez mes remerciements pour votre encadrement ;
- ✓ **Pr JEAN JUSTIN ESSIA NGANG** : Chef de Département de Microbiologie qui fait fonctionner le département de Microbiologie malgré ses nombreuses occupations ;
- ✓ **Directeur Général du Centre Pasteur du Cameroun** : Vous avez bien voulu autoriser les activités de terrain dans le laboratoire de référence dont vous avez la charge. Je vous exprime par ces mots toute ma gratitude ;
- ✓ **Tout le Personnel Enseignant du Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé 1** : Vos exigences scientifiques m'ont permis d'acquérir de bonnes leçons pour la suite de mon parcours ;
- ✓ **Dr FONKOUA Marie Christine** : Votre accompagnement technique, pédagogique ont facilité la réalisation de cette étude, vous avez à travers ce travail l'expression de mon profond respect ;
- ✓ **Pr NYEGUE Maximilienne Ascension**, Vice-doyenne chargée de la scolarité et du suivi des étudiants: Recevez chère Professeur ma profonde reconnaissance votre rigueur et esprit d'équipe m'ont impressionné pendant ma formation ;
- ✓ **Dr NGOME Rosanne et Tout le personnel du laboratoire de Bactériologie Parasitologie Mycologie du Centre Pasteur du Cameroun** : vous m'avez accueilli ouvertement et mis à ma disposition tout le nécessaire pour le bon déroulement de ces travaux, j'exprime par ces mots ma reconnaissance ;
- ✓ **Les malades** qui ont bien voulu donner leur accord pour participer à cette étude j'exprime ma reconnaissance ;
- ✓ **Les médecins** qui m'ont accompagné dans ce travail de recherche avec leur collaboration ;
- ✓ **Mes camarades de promotion** pour tous les beaux moments partagés ;
- ✓ **Mes amis** pour le soutien tant intellectuel, moral qu'émotionnel ;
- ✓ **Les grandes familles SONKENG et ZANGUE** je vous dis merci pour tous les encouragements.
- ✓ **Dr TCHACHOUANG serge** merci pour votre accompagnement tout au long de ce travail.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	1
REMERCIEMENTS	2
LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	7
RÉSUMÉ.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	3
I.1. Historique des champignons microscopiques	3
I.2. Classification des champignons microscopiques	3
I.3. Classification médicale des champignons	4
I.3.1. Levures.....	4
I.3.2. Champignons filamenteux	4
I.3.3. Champignons dimorphiques	5
I.4. Origine et pouvoir pathogène des champignons microscopiques	5
I.5. Epidémiologie des infections fongiques	6
I.6. Manifestations cliniques des infections fongiques.....	7
I.6.1. Mycoses cutanéomuqueuses	7
I.6.2. Mycoses sous-cutanées	9
I.6.3. Mycoses profondes	10
I.7. Facteurs favorisants	12
I.8. Traitement des mycoses.....	12
I.9. Diagnostic mycologique	13
I.9.1. Prélèvement.....	14
I.9.2. Différentes méthodes de diagnostic	14
I.9.3. Techniques d'identification à l'aide des automates (Vitek 2 et Vitek MS).....	18
I.10. Mesure de la fiabilité des techniques utilisées pour l'identification des isolats des champignons isolés.	20
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	21
II.1. Cadre de l'étude.....	21
II.1.1. Type d'étude	21
II.1.2. Période et site d'étude.....	21
II.1.3. Population d'étude	21

II.1.4. Taille de l'échantillon et justification	21
II.2. Matériels	22
II.3. Méthodes	23
II.3.1. Phase pré-analytique.....	23
II.3.2. Prélèvements et acheminement des échantillons au laboratoire.....	24
II.3.3. Phase analytique	26
II.4. Considérations éthiques.....	33
II.5. Analyses des données	33
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS	34
III. Résultats	34
III.1. Caractères sociodémographiques et cliniques de la population d'étude	34
III.1.1. Caractères sociodémographiques	34
III.1.2. Caractéristiques cliniques de la population d'étude.....	34
III.2. Examen direct à partir des échantillons et culture.....	37
III.2.1. Positivité des examens directs à partir des échantillons.....	37
III.2.2. Positivité de la culture	38
III.2.3. Identification des espèces de champignons par différentes techniques en fonction de leurs morphologies.....	39
III.3. Comparaison des techniques d'identification des champignons : technique classique et MALDI-TOF	46
III.3.1. Evaluation du niveau de concordance entre la technique classique (macroscopie-microscopie) et de Maldi-Tof vis-à-vis des champignons filamenteux.....	46
III.3.2. Evaluation du niveau de concordance entre Vitek 2 et Maldi-Tof pour l'identification des levures.	47
III.4. Comorbidités et facteurs d'exposition associés aux infections fongiques dans la population d'étude.....	48
III.4.1. Comorbidités	48
III.4.2. Facteurs d'exposition associés aux infections fongiques dans notre population d'étude.....	49
III.5. Discussion	52
CONCLUSION	55
Perspectives	56
Suggestions.....	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57
ANNEXES	I

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ATCC	: <i>American Type Culture Collection.</i>
CPC	: Centre Pasteur du Cameroun
CPSS	: <i>Candida parapsilosis Sensus stricto</i>
CRERSH	: Comité Régional d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine du Centre
IFI	: Infection Fongique Invasive
IR	: Infra Rouge
ISO	: <i>Internal Organization for Standardization</i>
ITS	: <i>Internal Transcribed Spacer</i>
KOH	: Hydroxyde de potassium ou potasse
LCR	: Liquide Céphalo-Rachidien
MALDI-TOF	: <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight</i>
McF	: <i>Mc Farland</i>
MS	: <i>Mass Spectrometry</i>
MS- FA	: <i>Mass Spectrometry Matrix Formic Acid</i>
MS-CHCA	: <i>Mass spectrometry Matrix alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid</i>
MS-DS	: Mass spectrometry Target
OCEAC	: Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SIDA	: Syndrome de l'Immuno- Déficience Acquise
UV	: <i>Ultra-Violet</i>
VIH	: Virus de l'Immuno- déficience Humaine
YST	: Carte Vitek 2 pour identification des levures

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Différents antifongiques et mécanisme d'action en fonction de la cible	13
Tableau II: Type d'échantillon en fonction de la localisation de l'infection	25
Tableau III: Mode d'ensemencement des différents produits pathologiques	28
Tableau IV : Présentation des caractères sociodémographiques de la population d'étude.....	34
Tableau V ; Signes cliniques en fonction du type d'infection, des manifestations cliniques et Echantillons	35
Tableau VI : Positivité de l'infection fongique en fonction de la nature de l'échantillon.....	37
Tableau VII : Evaluation de la concordance d'identification des deux techniques vis-à-vis des filamenteux	46
Tableau VIII: Evaluation du degré de concordance des levures par Vitek 2 et par Maldi-Tof.....	48
Tableau IX: Représentation des comorbidités avec l'infection fongique dans la population d'étude.....	49
Tableau X: Différents facteurs associés à l'infection fongique	51

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principe de fonctionnement du MALDI-TOF	20
Figure 2: (a) Cible Vitek MS, (b): Introduction du portoir adaptateur de cible dans Vitek Ms, c : Automate Vitek MS (MALDI-TOF) BioMérieux	32
Figure 3: Manifestations cliniques des mycoses superficielles.....	36
Différents échantillons collectés en fonction des manifestations cliniquesLa figure 6 La	36
Figure 4 : Différents échantillons collectés en fonction du site de l'infection.....	36
Figure 5 : Positivité des examens directs en fonction de la nature de l'échantillon.....	38
Figure 6 : Fréquence des isolats obtenus en fonction de l'examen macroscopique des cultures	38
Figure 7 : Différentes espèces de champignons filamenteux identifiées par macroscopie/microscopie	39
Figure 8 : 1- Aspect macroscopique des colonies de champignons filamenteux sur milieu de Sabouraud et	40
Figure 9 : Différentes espèces de champignons filamenteux identifiées par Maldi-Tof	41
Figure 10 : a) Photo d'un spectre d' <i>Aspergillus fumigatus</i> ; b) Photo du spectre de <i>Trichophyton violaceum</i> (source présente étude).....	42
Figure 11 : a) Observation macroscopique et sotch cutané des lésion pigmentées ;.....	43
Figure 12: Différentes espèces de levures identifiées par Vitek2	44
Figure 13 : Aspect macroscopique d'une culture de levure sur milieu de Sabouraud chloramphénicol (source présente étude)	44
Figure 14: Différentes espèces de levures identifiées par MALDI-TOF jusqu'au rang de l'espèce.....	45
Figure 15 : photo d'un spectre de <i>Candida metapsilosis</i> source présente étude	45
Figure 16: Comparaison de la technique classique et MALDI-TOF vis-à-vis des champignons filamenteux	47

RÉSUMÉ

Le diagnostic des infections fongiques nécessite des techniques successives au laboratoire : le prélèvement, l'examen direct, la culture et l'identification de l'agent pathogène (levures ou champignons filamenteux). Les méthodes classiques d'identification reposent sur des tests phénotypiques lourdes et moins précises. L'objectif de ce travail était de ressortir l'apport de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans l'identification au rang de l'espèce les champignons d'intérêt médical.

Une étude transversale du 1^{er} Septembre au 31 Décembre 2022 a été menée. Le choix de la technique était fonction de la macroscopie de la colonie. L'identification des levures au rang de l'espèce reposait sur la détermination des caractères biochimiques /enzymatiques par Vitek2 et du profil protéomique par Maldi-Tof ; tandis que les filamenteux (dermatophytes, moisissures) ont été identifiés par l'observation macroscopique/microscopique des éléments de fructification au bleu de Lactophénol et par MALDI-TOF. Le coefficient Kappa était utilisé pour l'évaluation du degré d'accord entre les différentes techniques pour chaque cas. Le seuil de significativité des facteurs de risques étudiés était fixé à une valeur de probabilité $P < 0,05$

Au total, 114 isolats étaient obtenus, incluant 81 levures et 33 filamenteux. L'évaluation du degré de concordance avec les levures montrait une concordance à 69,1% entre les deux techniques avec *Candida tropicalis* qui occupait la première place à une fréquence de 21%, suivi de *Candida albicans* 16% et *Cryptococcus neoformans* à 12,3% ; une discordance à 17,3% entre les deux techniques, 8,6% identifiées uniquement par une seule technique et 5,9% non identifiées par aucune des techniques. Les 33 isolats de filamenteux représentaient 33,3% de dermatophytes et 63,7% de moisissures. L'évaluation du niveau de concordance entre la macroscopie/microscopie et Maldi-Tof vis à vis des filamenteux montrait une faible concordance de 27,3%. La discordance à 51,5% et 18,2% d'isolats non identifiées par Maldi-Tof mais identifiées par macroscopie/microscopie. Huit facteurs de risques étaient associés à l'infection fongique avec $P < 0,05$.

L'identification au rang de l'espèce est capitale dans le suivi de la résistance des souches aux antifongiques et l'épidémiologie des souches émergentes pour la recherche. La standardisation de Maldi-Tof favorise l'identification à partir des cultures jeunes, une utilisation facile, une capacité pour un nombre important d'échantillon analysé. Le rendu rapide des résultats facilite la prise en charge et améliore le pronostic vital dans les cas de fongémies et de cryptococcose méningée.

Mots clés : Levure, filamenteux, Maldi-Tof, facteurs de risques

ABSTRACT

Diagnosis of fungal infections requires successive techniques in the laboratory: sampling, direct examination, culture and identification of the pathogen (yeast or filamentous fungi). Conventional identification methods rely on cumbersome and less accurate phenotypic tests. The aim of this study was to highlight the contribution of MALDI-TOF mass spectrometry to the identification of fungi of medical interest.

A cross-sectional study was conducted from 1st September to 31st December 2022. The choice of technique depended on the macroscopy of the colony. The identification of yeasts to species level was based on the determination of biochemical/enzymatic characteristics by Vitek2 and proteomic profiling by Maldi-Tof; while filamentous organisms (dermatophytes, moulds) were identified by macroscopic/microscopic observation of fruiting bodies using Lactophenol blue and MALDI-TOF. The Kappa coefficient was used to assess the degree of agreement between the different techniques for each case. The significance threshold for the risk factors studied was set at a probability value of $P < 0.05$.

A total of 114 isolates were obtained, including 81 yeasts and 33 filamentous. Evaluation of the degree of concordance with yeasts showed concordance of 69.1% between the two techniques, with *Candida tropicalis* occupying first place at a frequency of 21%, followed by *Candida albicans* at 16% and *Cryptococcus neoformans* at 12.3%; discordance of 17.3% between the two techniques, with 8.6% identified by only one technique and 5.9% not identified by any of the techniques. The 33 filamentous isolates represented 33.3% dermatophytes and 63.7% moulds. Assessment of the level of agreement between macroscopy/microscopy and Maldi-Tof with regard to filamentous organisms showed a low agreement of 27.3%. Discordance was 51.5% and 18.2% for isolates not identified by Maldi-Tof but identified by macroscopy/microscopy. Eight risk factors were associated with fungal infection with $P < 0.05$.

Species-level identification is vital for monitoring antifungal resistance and the epidemiology of emerging strains for research purposes. The standardisation of Maldi-Tof makes it easy to identify young cultures, easy to use and capable of analysing large numbers of samples. Rapid results facilitate management and improve vital prognosis in cases of fungemia and cryptococcal meningitis.

Key words: Yeast, filamentous, Maldi-Tof, risk factors



INTRODUCTION

Un champignon microscopique est un organisme unicellulaire et eucaryote défini par une structure filamenteuse ou levuriforme et par l'absence d'organisation tissulaire. La cellule fongique est limitée par une paroi rigide de nature cellulosique ou chitineuse. Il est responsable de maladies appelées infections fongiques ou infections mycosiques qui peuvent avoir plusieurs localisations chez l'hôte, parmi lesquelles les infections superficielles (qui attaquent la peau, les phanères et les muqueuses), les infections sous-cutanées et profondes (qui attaquent les tissus, les organes et les collections) (**Aubry et Gaüzère , 2022**) .

Les maladies provoquées par des champignons sont largement répandues dans le monde entier. En raison du faible nombre des centres de diagnostic et de traitement spécialisés, leur prévalence et leur incidence sont mal connues. Au cours des dernières années, des progrès scientifiques considérables ont été réalisés concernant ces affections, notamment en matière de méthodes diagnostiques et de chimiothérapie (**Alby-Laurent, 2022**). Les infections mycosiques sont causées par les champignons pathogènes d'intérêt médical ou opportunistes selon les cas. En pathologie humaine, les champignons microscopiques peuvent être responsables d'intoxication ou mycotoxicoses, de pathologies de type immun allergique ou de mycoses (**Chloé, 2021**). L'isolement et une identification précise de ces derniers sont d'une importance capitale pour la prise en charge du patient par le clinicien. L'une des priorités majeures du mycologue est de pouvoir identifier au rang de l'espèce l'agent fongique isolé des prélèvements des patients. Ceci n'est pas toujours évident vue la complexité de la structure de ces derniers.

L'identification peut être définie par la morphologie macroscopique et microscopique qui est à la base de l'identification quelle que soit la technique utilisée. Cette identification est rendue possible aussi bien par la culture sur milieux spécifiques, par biologie moléculaire et en fin par analyse du spectre protéique (**Lau, 2013**). Devant l'augmentation de la fréquence de ces mycoses, les avancées technologiques d'identification, l'examen mycologique classique doit être revu et adapté. Les caractères phénotypiques des champignons peuvent ne pas être exprimés correctement, ceci amène à une identification macroscopique et microscopique difficile. Face à ces difficultés, l'identification par spectrométrie de masse a séduit de nombreux laboratoires de Microbiologie pour l'identification des champignons, dans les firmes pharmaceutiques et dans l'agroalimentaire (**Dugat, 2014**).

Dans le contexte actuel avec la pandémie du VIH/SIDA, les maladies émergentes l'antibiothérapie prolongée et les facteurs iatrogènes qui affaiblissent le système immunitaire, les conditions de vie précaires et certains emplois qui exposent les sujets immunocompétents

sont des facteurs de risques associés aux maladies fongiques, leur impact sur la santé humaine n'est pas à négliger. Le nombre de champignons émergents accroît, la difficulté de diagnostic et de traitement se posent et est devenu un problème majeur de santé publique dans le monde et en Afrique (**Dufresne, 2021**). Au Cameroun, l'analyse mycologique pour le diagnostic des infections fongiques est de plus en plus demandée dans divers types de prélèvements notamment : les prélèvements broncho-pulmonaires (expectoration et aspiration bronchique), les biopsies, les LCR, les liquides de ponctions, les hémocultures et les prélèvements urinaires (urine et bouts de sonde). Au laboratoire, une augmentation de la demande mycologique des squames (ongle, peau et cuir chevelu) est observée. Cependant, un problème d'identification se pose et il serait judicieux d'explorer de nouvelles techniques qui permettent d'obtenir une confirmation du diagnostic microbiologique rapide et fiable de ces champignons en considérant divers paramètres tels que le rapport coût-efficacité, la lourdeur de la méthode et la rapidité (**Theel, 2011**).

Question de recherche

L'équipement MALDI-TOF identifie-t-il avec précision toutes les espèces de champignons microscopiques isolées dans les échantillons des patients au Centre Pasteur du Cameroun ?

Hypothèse de recherche

La spectrométrie de masse par MALDI-TOF est une technique standardisée et moins contraignante qui pourrait avoir une performance élevée pour l'identification des champignons microscopiques.

Objectifs de l'étude

- Objectif général :

Ressortir l'apport de la spectrométrie de masse par Maldi-Tof dans l'identification des champignons d'intérêt médical isolés au Centre Pasteur du Cameroun.

- Objectifs spécifiques
- De manière plus spécifique, il s'agissait de :
 1. Déterminer la fréquence des différents champignons identifiés ;
 2. Comparer la méthode d'identification par la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof à la méthode d'identification classique.
 3. Identifier les facteurs de risque associés aux infections fongiques ;

CHAPITRE I :
REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Historique des champignons microscopiques

La mycologie médicale est connue depuis l'antiquité avec l'infection provoquée par *Candida albicans*. Hippocrate, au IV^{ème} siècle avant Jésus-Christ, décrit les lésions buccales caractéristiques et leur association à une altération sévère de l'état général. C'est à partir du XIX^{ème} siècle que la mycologie médicale a connu un grand essor (**Chabasse et Bouchara, 2022**). Schöenlein (1793-1864), après avoir cureté quelques parcelles de godet favique, les plaça sous l'objectif d'un microscope et publia en 1839 un article court dans lequel il indiquait avoir trouvé la cause du favus. Quelques années plus tard, son élève Remak (1815-1865) proposait de nommer ce champignon *Achorion schoenleinii* (1845). En dépit du rôle pionnier de Schöenlein, l'histoire moderne des teignes date pour certains de juillet 1841 lorsque David Gruby, médecin hongrois, publia un mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. En 1910, Sabouraud publia un livre s'intitulant « Les teignes » qui fut considéré pendant plusieurs décennies comme l'ouvrage de référence sur le sujet. En 1938, fut découverte la griséofulvine, premier médicament antimycosique (**Chabasse et Bouchara, 2022**). En 1940, Castellani décrivait d'autres espèces de *Candida* pouvant être pathogènes. Ségrétain établit le rôle de la capsule cryptococcique dans la virulence de *Cryptococcus neoformans*. Il publia ses résultats dans les annales de l'Institut Pasteur entre 1950 et 1958 (**Dromer et al., 2021**). En 1995, Hazené établissait une liste de 17 espèces de *Candida* reconnues pathogènes pour l'homme, tandis que Sullivan et ses collaborateurs identifièrent une espèce proche de *Candida albicans*, qu'ils nommèrent *Candida dublinensis*, en l'honneur de l'Université de Dublin (**Menan, 2008**).

I.2. Classification des champignons microscopiques

Il existe plusieurs classifications des champignons, les classifications phylogéniques à partir d'ancêtres communs, une classification taxonomique et une classification suivant les modalités de reproduction (**Herault, 2021**).

❖ Classification taxonomique

Le règne des champignons comprend les divisions, elles même subdivisée en classes. Ces classes englobent les ordres qui rassemblent les familles. Le nom se termine par mycotina pour les divisions, mycètes pour les classes. Le suffixe -ale est employé pour désigner les ordres, le suffixe -aceae pour les familles, le suffixe -adeae pour les sous familles. Une famille comprend les genres qui englobent les espèces. Une espèce peut se subdiviser en variété.

Chaque champignon porte un nom qui suit le règne de la nomenclature binominale (genre et espèce) énoncée par Carl Von Linné au 18^e siècle.

❖ **Classification selon le mode de reproduction du champignon.**

La classification de Hawksorth, Sutton et Anisworth (1970) modifiée par Kwon Chung et Bennet (1992) puis par De Hoog (1995) est la plus utilisée. Selon les modalités de reproduction, plusieurs divisions sont différenciées (Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina et Basidiomycotina) (**De Hoog et al., 2017**). Lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deutonomycotina ou fungus imperfecti (champignon imparfait).

I.3. Classification médicale des champignons

La classification basée sur l'aspect morphologique des champignons en culture et l'observation au microscope, est la plus utilisée. Elle permet de faire une identification entre différents caractères spécifiques de plus en plus discriminants, basée sur une démarche dichotomique. Cette classification reposant sur la morphologie est celle utilisée en médecine. On distingue trois groupes qui sont : les champignons lévuriforme (levures), les champignons filamenteux (moisissures et dermatophytes) et les champignons dimorphiques (**Neji et al., 2009**).

I.3.1. Levures

Les levures sont petites et se multiplient par bourgeonnement, elles peuvent ou non former des pseudo-filaments voir des filaments mycéliens tel *Candida albicans*. Elles associent les espèces de champignons ayant un certain nombre de caractères morphologiques communs (thalle unicellulaire, reproduction asexuée par bourgeonnement, aspect des colonies plus ou moins crémeux). Les levures d'intérêt médical appartiennent à la classe des blastomycètes et à l'ordre des *Cryptococcales* comprenant plusieurs genres (*Candida*, *Trichosporum*, *Cryptococcus* et *Pityrosporum*...) (**Bouchara et al., 2010**).

I.3.2. Champignons filamenteux

❖ **Moisissures**

Ils se distinguent sur l'aspect microscopique et macroscopique des levures par la formation d'un thalle filamenteux. Celui-ci peut être septé, fin, régulier, avec des ramifications en angle aigue et est appelé Hyphomyces ; ou il peut être plus grossier, épais à bords non parallèles et non septé (il sera alors siphonné) avec un aspect enrubanné et correspondra à la catégorie des Zygomycètes. Parmi ces Hyphomyces on distingue, les Hyalohyphomycètes (champignons

clairs) et les Phaeohyphomycètes (dématiés et champignons pigmentés). Parmi les Hyalohyphomycètes, on distingue plusieurs genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Acremonium*...) (Chabasse *et al.*, 2002).

❖ Dermatophytes

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux kératinophiles. Ils sont caractérisés par leur capacité à se développer en utilisant des substrats kératiniques issus du sol, de l'animal et de l'homme. L'appareil végétatif de ces champignons appelé thalle ou mycélium est constitué par un réseau dense de filaments mycéliens ou hyphes, plus ou moins ramifiés et souvent cloisonnés (**Petinataud, 2016**). Ils se reproduisent par l'intermédiaire de spores, produites selon deux modalités : la reproduction asexuée qui est la plus fréquente et la reproduction sexuée qui s'observe rarement. La formation de ces spores ou conidies correspond à la conidiogénèse et est à la base de la classification actuelle. Les dermatophytes, dans leur forme sexuée, produisent des ascospores et sont ainsi classés au sein du phylum des Ascomycètes, de l'ordre des Onygenales, de la classe des Arthrodermataceae, et du genre *Arthroderma*. Les spores, par leur morphologie et leur abondance, permettent la distinction de trois genres: *Microsporum*, *Trichophyton* et *Epidermophyton* (**Chabasse *et al.*, 2004**).

I.3.3. Champignons dimorphiques

Les champignons dimorphiques sont des champignons qui se présentent sous deux formes différentes : forme levure qui est la forme parasitaire retrouvée dans l'organisme et la forme mycélienne qui est la forme saprophytique retrouvée dans les produits pathologiques du malade en culture, c'est la forme de contamination. Ils sont responsables des mycoses sous cutanées et leur dissémination entraîne les mycoses profondes. L'infection peut être localisée ou généralisée. La contamination se fait par les spores dans le sol, transcutanée par des végétaux contaminés et par les fientes d'oiseaux (**Mandengue *et al.*, 2015**). Plusieurs genres fongiques sont en cause tels que : *Sporothrix*, *Histoplasma* présentant de grosses spores à paroi ornementée après culture, *Pneumocystis* (non cultivables), *Blastomyces* et *Coccidioides*.

I.4. Origine et pouvoir pathogène des champignons microscopiques

La première porte d'entrée des champignons reste l'arbre respiratoire puis les effractions cutanées (**Dugat, 2014**). La pathogénicité du champignon est assurée par le passage de la forme saprophyte à la forme parasite (opportunisme); ils peuvent avoir une origine endogène ou exogène.

❖ Origine endogène

Ils se trouvent habituellement à l'état saprophyte sur les muqueuses et les téguments de sujet sains ; dans les conditions particulières de l'hôte (baisse de l'immunité, diabète, antibiothérapie prolongée), ces champignons saprophytes présents en infime quantité se développent massivement chez le sujet et deviennent pathogènes ; ceci est propre au *Candida*. La survenue des candidoses est due à l'infestation de l'organisme à partir de *Candida* endogènes, la porte d'entrée étant digestive, respiratoire parfois au niveau des muqueuses. Chez le nouveau-né et le nourrisson, la contamination se fait souvent par la mère atteinte d'une vaginite à *Candida* ou par le personnel soignant (maternités, crèches). Chez l'adulte, une origine vénérienne des candidoses urogénitales peut parfois être mise en évidence (**Kone, 2015**).

❖ Exogènes

Ils vivent en dehors de l'homme et de l'animal, certains sont des parasites obligatoires et d'autres comme *Aspergillus* sont très répandus dans la nature et ne deviennent qu'exceptionnellement pathogènes lorsque les conditions de l'organisme-hôte sont défavorables ; ils deviennent dans ce cas avec certaines levures (*Candida*, *Cryptococcus*) des champignons opportunistes, pathogènes facultatifs ou occasionnels. Ces champignons exogènes ont pour la plupart leur habitat normal dans le sol et les fientes des oiseaux (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus*), ou sur les plantes (*Sporothrix schenckii*) et les agents de mycétome (**Dufresne et Guy, 2021**).

Les dermatophytes sont des anthropophiles, soit zoo-anthropophiles, soit géophiles, ils forment ainsi les trois réservoirs qui expliquent les différents modes de contamination chez l'homme. Dans le cas des dermatophytes anthropophiles, la contamination peut être par contact direct ou indirect (vêtement, chaussures, tapis et piscine). Pour les dermatophytes zoophiles, la contamination est directe (contact avec l'animal) ou indirecte (poils d'animaux sur le tapis) (**Petinataud et al., 2014**).

I.5. Epidémiologie des infections fongiques

Les infections fongiques ne cessent d'augmenter au cours des dernières décennies à cause de la persistance de certains facteurs favorisant (**Nivoix et al., 2018**):

- Le vieillissement des populations et le développement des traitements immunodépresseurs dans les pays occidentaux,
- L'augmentation croissante de la pauvreté, le manque d'hygiène et le déficit en soins de santé dans les pays en voie de développement,

- Et certaines affections débilitantes telles que le diabète, le VIH/SIDA.

Globalement, la prévalence mondiale des mycoses superficielles est estimée entre 2 et 26 % (**Grover *et al.*, 2010**).

En Amérique, les fongémies présentent une prévalence de 15 et de 31% chez les enfants et les adultes respectivement (**Pasqualotto *et al.*, 2007**).

En Europe, la prévalence des infections fongiques était de 8,9 % pour 21 études en milieu hospitalier et de 4,3% sur 11 études communautaires (**Sigurgeirsson et Barran, 2014**).

En Afrique du Nord, les données sont éparées, et la prévalence varie entre 24 et 62% pour les infections superficielles et généralisées selon les régions d'Alger et Tipaza (**Beam *et al.*, 2014**).

En Afrique Centrale, la cryptococcose est plus fréquente avec une prévalence qui atteint 18 % (**Aubry et Gaüzère, 2022**).

Spécifiquement au Cameroun, la prévalence des mycoses superficielles dans les teignes du cuir chevelu était de 21,48% (**Kouotou *et al.*, 2016**) et de 2,8% pour les onychomycoses (**Kouotou *et al.*, 2017**).

Pour la cryptococcose, il existe peu de données épidémiologiques avec une fréquence de 28,08% (**Kammalac *et al.*, 2015**).

I.6. Manifestations cliniques des infections fongiques.

Sur le plan physiopathologique, ces agents fongiques se distinguent par des affinités particulières pour certains tissus ou organes. D'après leur localisation, on distingue dans un premier temps les mycoses superficielles de la peau (dermatophytoses, candidoses, pityriasis versicolor) et des muqueuses (candidoses, géotrichoses); ensuite les mycoses sous-cutanées (sporotrichose, chromomycose, mycétomes) et enfin les mycoses profondes ou disséminées (cryptococcose, aspergillose et histoplasmosis) (**Herault, 2021**).

I.6.1. Mycoses cutanéomuqueuses

I.6.1.1. Dermatoses

Les dermatoses sont des atteintes cutanées, les plus fréquentes qui touchent la peau (épiderme). Les symptômes sont nombreux tels que : boutons, rougeurs, prurit, taches sur le corps, la transpiration excessive, décoloration et les excroissances. La pénétration chez l'homme se fait par excoriation cutanée et progresse de façon centrifuge pour donner une lésion progressivement arrondie. Trois genres (*Microsporum*, *Trichophyton* et *Epidermophyton*) sont en cause dans ces infections et regroupent de nombreuses espèces (**Chabasse *et al.*, 2004**). Ces

espèces donnent des signes cliniques similaires sur la peau glabre (herpès circinés), dans les plis (eczéma marginé), dans les poils (sycosis, kérions), dans les cheveux (teigne, favus) et les onychomycoses au niveau des ongles (**Kone, 2015**).

❖ **Atteintes des phanères**

- **Onychomycoses**

Une onychomycose est une mycose des ongles, des mains ou des pieds, provoquée par des champignons microscopiques qui se développent sur l'ongle et le détruisent en partie ou en totalité. Trois grands groupes de champignons sont responsables tels que les dermatophytes, les moisissures et les levures (**Monod et al., 2013**). Plusieurs facteurs favorisent les onychomycoses, les facteurs généraux (âge, sexe), les facteurs environnementaux et ou comportementaux (facteurs climatiques, profession, port prolongé des chaussures fermées, pratique sportive et fréquentation régulière des douches collectives, facteurs génétiques et immunologiques) (**Chularojanamontri et al., 2021**).

- **Teignes du cuir chevelu et des poils**

Nous distinguons les teignes tondantes microsporiques avec plaque d'alopécie de grande taille (2- 6 cm), qui peuvent fusionner en de vastes placards polycycliques. Les cheveux sont ici cassés courts, engainés au sein de squames blanchâtres. L'examen clinique comportant une observation à la lampe de Wood met en évidence une fluorescence verte correspondant à la gaine de spores entourant les cheveux. Les espèces retrouvées sont *M. canis* et *M. audouinii* (**Chabasse et al., 2004**). Dans les teignes tondantes trichophytiques, les plaques d'alopécie sont nombreuses et petites. Les cheveux sont cassés très courts et donc difficiles à prélever à la pince. L'examen à la lampe de Wood n'est pas contributif dans ces cas. Les espèces en cause sont le plus souvent *T. tonsurans*, *T. soudanense* et *T. violaceum* (**Chabasse et al., 2004**).

❖ **Atteintes de la peau glabre**

Les épidermophyties circinés (peau glabre dépourvu de poils) sont dues à des dermatophytes zoophiles et anthropophiles, la contamination se fait avec les animaux domestiques et inter humaines. Elles se manifestent à tout âge sur les zones découvertes : face, cou, mains, avant-bras, jambes et fesses chez le nourrisson. La lésion débutante prurigineuse est arrondie, avec une croissance centrifuge (**Kone, 2015**).

L'atteinte des grands plis se rencontrent par ordre de fréquence au niveau : du pli inguinal, de façon unilatérale ou bilatérale et symétrique, du pli axillaire, du pli-sous mammaire ou du pli inter-fessier. La lésion consiste en un placard érythémato-squameux et prurigineux. Elle débute au fond du pli, et s'étend de façon centrifuge sur les bords latéraux. Le centre rosé

a tendance à guérir. Il s'agit d'une lésion très bien limitée, avec une bordure inflammatoire, squameuse et vésiculeuse. Au niveau des petits plis, la lésion inter-digito-plantaire est la plus fréquente (Akoua *et al.*, 2019).

I.6.1.2. Atteinte des muqueuses

Les muqueuses sont atteintes par les champignons du genre *Candida* et levures apparentées, on parle de candidose. Les candidoses sont des mycoses cosmopolites, très fréquentes, superficielles ou profondes. Ces levures sont des saprophytes exclusifs des muqueuses (digestives, génitales, buccales ...) qui ne sont pas retrouvées sur la peau normale. La contamination est le plus souvent endogène par le tube digestif avec colonisation des muqueuses, ou exogène par inoculation externe et en fin favorisée par les facteurs locaux (hypersudation et macération) (Djeridane *et al.*, 2006).

I.6.2. Mycoses sous-cutanées

Les mycoses sous-cutanées regroupent la chromomycose, les mycétomes et bien d'autres.

I.6.2.1. Chromomycose

C'est une mycose verruqueuse chronique, à évolution lente. La contamination se fait par piqûres, essentiellement au niveau des pieds et des jambes (trois quarts des cas), dues à la marche pieds nus. Après un traumatisme avec des végétaux ou des débris de bois, apparaissent progressivement des placards hyperkératosiques verruqueux d'aspect tumoral en «chou-fleur», des nodules ou des plaques d'aspect cicatriciel. On observe plusieurs modes de dissémination : lymphatique (adénopathie et éléphantiasis), par contiguïté (musculaire, articulaire ou osseuse) et par voie hématogène atteinte viscérale habituellement mortelle. Elle est provoquée par plusieurs champignons noirs appartenant tous au groupe des dématiés (López et Méndez, 2007). Dans les lésions, les champignons se trouvent dans les squames, le pus et les tissus sous-cutanés. En culture, les champignons responsables sont principalement *Phialophora pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* et *Cladosporium carrionii*. La surinfection bactérienne est fréquente. L'histologie est par conséquent toujours souhaitable (Fatima-Zahra et Tétouan, 2020).

I.6.2.2. Mycétomes

Les mycétomes fongiques sont des tuméfactions sous-cutanées d'évolution chronique et fistulisées. Les fistules produisent du « pus » contenant des grains noirs ou blancs parfois visibles à l'œil nu. L'émission de « pus » est intermittente. Ce sont des mycoses des zones

tropicales sèches (Asie, Amérique et Inde) et Afrique subsaharienne (soudan, Madagascar, Ethiopie et Tchad) en rapport avec la climatologie où la pluviométrie est relativement réduite (**Adoubryn *et al.*, 2010**). L'infection siège dans les membres inférieurs (pied de Madura), peut atteindre les membres supérieurs et le thorax. Les parasites qui causent les mycétomes sont divers. Le diagnostic des mycétomes fongiques est clinique et mycologique par la mise en évidence des grains noirs (*Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea*, *Leptosphaeria senegalensis*) ou blancs (*Pseudallescheria boydii*) (**Déveloux et Enache-Angoulvant, 2011**).

I.6.3. Mycoses profondes

Les mycoses profondes sont cosmopolites et sont des infections opportunistes dues à l'atteinte d'un organe, multi-organique, viscérale, septicémique ; on distingue les candidoses, la cryptococcose, l'aspergillose et l'histoplasmosse).

I.6.3.1. Cryptococcoses

La cryptococcose reste un enjeu majeur de santé publique dans les pays du Sud n'ayant pas accès aux antirétroviraux et est mortelle en absence de traitement. Le diagnostic de la cryptococcose neuro-méningée est fait sur le liquide céphalorachidien. Elle est due à une levure encapsulée, dont la capsule est visible à l'examen direct dans l'encre de chine. En culture, *Cryptococcus neoformans*, présente trois variétés (*neoformans*, *grubii* et *gattii*) (**Bandad *et al.*, 2019**).

I.6.3.2. Aspergilloses

Les aspergilloses sont des infections cosmopolites essentiellement opportunistes dues à la prolifération des champignons de type *Aspergillus* suite à l'inhalation de spores contenues dans n'importe quel débris organique.

❖ Aspergillose invasive

Elle est à l'origine de diverses atteintes respiratoires: aspergillose invasive, aspergillome, asthme aspergillaire (**Berny *et al.*, 2017**). Ce sont surtout les personnes immunodéprimées ayant: des maladies hématologiques malignes, transplantations d'organe, granulomatoses chroniques, VIH et corticothérapie prolongée qui contractent cette maladie. La dissémination à distance par voie hématogène avec formation de thrombose fongique s'explique par l'aptitude angio-invasive des filaments mycéliens. Malgré des hémocultures restantes négatives, la dissémination est réelle avec les nombreuses atteintes secondaires :

cérébrales, rénales, cutanées, endocardiques, et au niveau de la thyroïde ou du tube digestif. L'isolement d'une souche d'*Aspergillus* sp n'est effectif que dans 20 % des cas.

❖ Aspergilloses pulmonaires

Les aspergilloses pulmonaires chroniques nécrosantes sont moins invasives, les filaments envahissent lentement les tissus pulmonaires. Elles surviennent chez des personnes non immunodéprimées présentant des altérations locales ou systémiques des défenses anti-infectieuses de type : éthyisme, tabagisme, diabète, dénutrition, maladie de système, cancer pulmonaire, antécédent d'irradiation pulmonaire et corticothérapie prolongée (inhalee ou systémique). Elles surviennent aussi chez des sujets présentant des maladies broncho-pulmonaires sous-jacentes responsables ou non de cavités pulmonaires ou pleurales résiduelles (tuberculose active ou séquelles tuberculeuses, dilatation des bronches, sarcoïdose) (**Dugat, 2014**).

I.6.3.3. Fusarioses

Les fusarioses sont causées par des champignons cosmopolites, dont nous distinguons environ une quarantaine d'espèces répandues dans la nature et vivant en saprophytes. Le plus souvent il s'agit des infections fongiques invasives chez un patient immunodéprimé, avec des facteurs de risques reconnus comme la neutropénie. Chez l'immunocompétent, nous observons des atteintes cornéennes, cutanées et unguéales. La contamination est aérienne avec une atteinte pulmonaire puis une dissémination, principale forme chez les patients greffés. Au niveau thérapeutique, les *Fusarium* Sp sont très peu sensibles aux antifongiques (**Raad et al., 2006**). L'espèce est importante à connaître pour conduire le traitement des infections invasives. Par exemple, *F. solanii* est résistant aux triazolés (fluconazole, voriconazole et itraconazole) (**Tortorano et al., 2014**).

I.6.3.5. Candidoses invasives

Dans les hémocultures réalisées dans un contexte d'infections nosocomiales, *Candida* Sp représente le pathogène le plus souvent mis en cause avec *Candida albicans* qui est l'espèce la plus fréquemment rencontré suivie des espèces émergentes qui sont *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis* (**Massou et al., 2013**). Les facteurs de risques sont multivariés : l'antibiothérapie à large spectre, la présence d'un matériel étranger (dispositif médical), la corticothérapie, le diabète et la neutropénie.

I.7. Facteurs favorisants

Les facteurs favorisant la survenue de la maladie fongique sont de deux principales catégories à savoir :

❖ Facteurs pathologiques

Certaines affections favorisent l'apparition des mycoses. C'est le cas de l'hypersudation, des troubles de la circulation périphérique, du diabète (**Chegour *et al.*, 2014**). La pandémie du VIH/SIDA contribue à l'émergence des mycoses superficielles et de la cryptococcose (**Bennani *et al.*, 2020**).

❖ Facteurs iatrogènes

L'antibiothérapie, la corticothérapie, les immunosuppresseurs sont les facteurs les plus connus. On note l'allergie médicamenteuse, la pose d'un dispositif médical (cathéter central et sonde) utilisés sur une longue durée qui peuvent altérer l'intégrité tégumentaire et entraînent l'apparition des infections fongiques (**Lindsay, 2015**).

I.8. Traitement des mycoses

❖ Cas de mycoses superficielles

Le traitement est généralement simple et bien toléré. Cependant, il impose sous peine de récurrence ou d'inefficacité, une bonne observance des règles d'hygiène rigoureuses. Le traitement n'a de sens que si les facteurs favorisants sont éliminés dans la mesure du possible et si les autres foyers infectieux sont traités simultanément afin d'éviter une recontamination. Les antifongiques systémiques actuellement utilisés dans le traitement des mycoses superficielles, se répartissent en deux catégories : la griséofulvine et les agents chimiques comprenant toutes les autres molécules, les Allylamines et les dérivés azolés (**Yayé, 2013**).

❖ Cas des mycoses sous-cutanées

Le traitement des mycétomes fongiques est plus décevant et doit souvent être complété par un geste chirurgical. L'antifongique préconisé actuellement est l'itraconazole, les azolés plus récents sont en cours (**Develoux, 2016**).

❖ Cas des mycoses profondes : la cryptococcose

Un traitement antifongique pendant plusieurs semaines doit être mis en œuvre. Il repose dans les formes graves (méningo-encéphalites, pneumopathies sévères) sur l'association d'amphotéricine B et de 5-fluorocytosine, relayée par fluconazole à posologie élevée. En cas

d'hypertension intracrânienne, des ponctions lombaires évacuatrices sont également effectuées (Kammalac *et al.*, 2015).

La sensibilité aux antifongiques est fonction de la classe, l'antifongique, nom commercial, voie d'administration et cibles confère (Tableau I).

Tableau I : Différents antifongiques et mécanisme d'action en fonction de la cible

Classe	Antifongiques	Noms commercial	Administration	Cible et mécanisme d'action
Polyènes	Amphotéricine B	Fungizone	IV	Membrane cellulaire (Interaction avec stérol/ intégrité membranaire)
Azolés (Triazolés)	Fluconazole	Diffucan	PO/ IV	Membrane cellulaire (Inhibition de la synthèse de l'ergostérol)
	Itraconazole	Sporonox	PO /IV	
	Isavuconazole	Cresemba	PO/ IV	
	Posaconazole	Noxafil	PO	
	Voriconazole	Vfend	PO/ IV	
Echinocandines	Anidulafungine	Eraxix	IV	Paroi cellulaire (Inhibition de la synthèse des Beta-D glucanes)
	Caspofungine	Cancidas	IV	
	Micafungine	Mycamine	IV	
Allynamines	Terbinafine	Lamisil	PO/ Topique	Membrane cellulaire (Inhibition de la squalene epoxidase impliquée dans la synthèse de l'ergostérol)
Analogue nucléotidique	5-Fluorocytosine	Ancobon	PO/IV	Synthèse protéines, ADN/ARN
	Griséofulvin	Fulvicin	PO/Topique	Synthèse des microtubules (mitose)
Autres antifongiques : Nystatine, Natamycin, Kétoconazole, Miconazole, Clotrimazole, Terconazole				

I.9. Diagnostic mycologique

Le diagnostic clinique et l'appartenance géographique, peuvent orienter vers une origine fongique au lit du malade et être fait directement à la vue des symptômes. La mise en évidence d'un champignon et son identification dans le but de traiter ou non un patient sont longues. L'identification du champignon ne peut être réalisée au laboratoire que lorsque le prélèvement a été effectué dans de bonnes conditions d'asepsie (Herault, 2021).

I.9.1. Prélèvement

Le prélèvement est l'étape incontournable du diagnostic mycologique. Il est nécessaire de le réaliser avant tout traitement spécifique. La qualité du prélèvement est primordiale, il doit être le plus stérile possible, il est recommandé d'adresser le patient dans un laboratoire expérimenté pour cette analyse. De sa qualité découle celle de l'ensemble de l'examen mycologique (l'examen direct et la culture) (**Chabasse *et al.*, 2004**). Le prélèvement doit être réalisé sur des parties propres afin d'éliminer au mieux les bactéries et les contaminants de l'environnement (cas des prélèvements d'ongles). Il doit également être réalisé de façon à obtenir le champignon vivant pour favoriser la culture c'est-à-dire en recueillant des fragments au plus près de la jonction partie lésée - partie saine pour les lésions superficielles, par meulage ou grattage (**Soorajee, 2012**).

I.9.2. Différentes méthodes de diagnostic

I.9.2.1. Diagnostic antigénique

❖ Recherche du 1,3 bêta-D-glucane du Cryptocoque

Afin de surveiller les patients à risque de développer des mycoses invasives, des techniques d'immuno- diagnostic ont été développées. Ces techniques ont l'avantage d'être peu invasives car elles sont réalisables sur un simple prélèvement sanguin ou dans le LCR. Pour la détection de marqueurs d'infections fongiques, les cibles sont des antigènes fongiques. Cette analyse consiste à détecter l'antigène à savoir le 1,3 bêta-D-glucane du cryptocoque dans le sang lors d'une infection fongique invasive. C'est un constituant quasi ubiquiste des parois fongiques du *Cryptococcus neoformans* et des Zygomycètes (**Thomas, 2017**).

I.9.2.2. Les techniques de Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire se sont considérablement développées en tant qu'outil d'identification des champignons. La technique peut être réalisée immédiatement sur le prélèvement primaire ou après culture du champignon. Elles font intervenir la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) et le séquençage des champignons.

❖ PCR

L'identification moléculaire des champignons se basent sur divers marqueurs génétiques nucléaires, ribosomaux ou mitochondriaux. Un marqueur fiable doit contenir entre 500 et 800 paires de bases (pb), et doit permettre d'identifier toutes les espèces taxonomiques, par exemple du règne des Eucaryotes. Pour cela, les amorces doivent permettre l'amplification

d'une séquence nucléotidique constante et unique de chaque espèce. Ces amorces doivent être courtes (moins de 50 pb), se trouver dans la région d'intérêt et avoir une température d'hybridation comprise entre 45 et 65° (Schoch *et al.*, 2012).

❖ Séquençage

C'est une nouvelle méthode basée sur l'étude moléculaire du génome correspondant au code barre génétique de la séquence du gène ITS des champignons. La région ITS est une région très polymorphe elle inclut ITS1 et ITS2 qui sont séparés par le gène 5,8S qui se trouve lui-même entre le gène 18S (SSU) et 28S (LSU). La région ITS est très intéressante pour le séquençage de substrats contenant une faible quantité d'ADN (Iwen *et al.*, 2002). Ces techniques sont coûteuses et complexe à mettre en œuvre. Elles sont réservées à la recherche et nécessite un plateau technique spécialisé.

I.9.2.3. Diagnostic microbiologique des champignons

A partir du prélèvement, la recherche du champignon pourra immédiatement être mise en évidence dans un premier temps par un examen direct, ensuite une mise en culture dans le but d'isoler le pathogène s'il est présent et viable, enfin l'identification morphologique, (macroscopique et microscopique) pour le cas des filamenteux (Dugat, 2014). Dans le cas des levures, l'identification phénotypique repose sur la détermination des caractères biochimiques à l'aide des galeries Api 20 C et Api 32 C pour auxanogramme (Kone, 2015).

I.9.2.3.1. Examen direct à partir du prélèvement

L'examen direct désigne l'ensemble des techniques de recherche d'un (ou plusieurs) champignon(s) dans les échantillons du patient, il est également un examen très important dans le diagnostic d'une mycose, il est simple et permet d'apporter une réponse rapide au médecin prescripteur. Il a pour objectif l'observation directe, afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des éléments fongiques contenus dans les échantillons biologiques (Herault, 2021). Les liquides biologiques sont examinés au microscope entre lame et lamelle, les squames et biopsies sont prétraités dans une goutte de produit éclaircissant tel que l'hydroxyde de potassium (potasse à 30 %) ou au chloral-Lactophénol d'Amman (Dugat, 2014; Chabasse, 2013). Ces produits permettent de faciliter la lecture et une meilleure visualisation des structures fongiques.

I.9.2.3.2. Mise en culture

❖ Milieux de culture et isolement du champignon

Le milieu Sabouraud-chloramphénicol est un substrat de culture le plus fréquemment utilisé en mycologie. Il est souvent enrichi de glucide simple (glucose, maltose, dextrose), il peut être additionné d'antibiotique (le chloramphénicol ou la gentamicine) avec pour but d'inhiber la croissance bactérienne (**Herault, 2021**). Il peut également être associé à la cycloheximide ou actidione en plus du chloramphénicol ou de la gentamicine. La cycloheximide (actidione) est un antiseptique inhibant la croissance des champignons contaminants de l'ordre des mucorales et des moisissures du genre *Aspergillus* (**Herault, 2021**). Il permet la croissance plus facile des espèces résistantes à l'actidione parmi lesquelles celles pathogènes chez l'Homme. L'ensemencement effectué parallèlement sur milieu Sabouraud-chloramphénicol avec et sans cycloheximide permet une différenciation plus aisée de moisissures, dermatophytes et des levures (**Chabasse et al., 2002**). Certaines levures sont lipophiles, pour leur croissance, le milieu Sabouraud chloramphénicol est supplémenté avec de l'huile d'olive, c'est le cas de *Malassezia*. Les moisissures ne se développent pas en présence de l'actidione alors que les dermatophytes s'y développent.

❖ Méthode d'ensemencement et croissance des champignons

L'ensemencement est fonction de la nature de l'échantillon. Il se fait à l'aide d'une oëse stérile ou d'une spatule. Le produit pathologique est déposé en appuyant légèrement, en plusieurs endroits distincts de la surface de la gélose. Si l'ensemencement est réalisé en tubes, les dermatophytes étant aérobies, il est indispensable de ne pas visser complètement les bouchons. Les tubes sont ensuite placés entre 25 et 30 °C en atmosphère humide pour stimuler le développement des champignons pendant une période maximale de 28 jours. Ils seront examinés une à deux fois par semaine, soit 24 à 48 heures pour la croissance et l'identification des levures, 48h à 5 jours pour le cryptocoque, 3 à 7 jours pour les moisissures, 5 à 21 jours en moyenne pour les dermatophytes et les di morphiques (**Dugat, 2014**). Tous ces critères sont indispensables dans l'identification.

I.9.2.3.3. Identification des champignons après culture

L'identification des champignons est dépendante du délai de développement des cultures, de leur aspect macroscopique au recto et au verso, et de la microscopie des colonies.

❖ Examen macroscopique

A l'examen macroscopique, l'on note l'aspect général des colonies (rondes, étoilées), leur couleur au recto et au verso, leur relief (plat, plissé, bombé ou cérébriforme), les caractéristiques de leur surface (duveteuse, poudreuse, granuleuse ou glabre), mais aussi leur consistance (molle, élastique et cartonnée) et leur taille (réduite ou à l'inverse extensive). On recherche également la présence d'un pigment diffuse dans la gélose (**Chabasse *et al.*, 2002**).

❖ Examen microscopique au Bleu de Lactophénol

L'examen microscopique permet de rechercher la présence d'éléments caractéristiques des espèces fongiques, il se fait à partir d'un fragment de culture dissocié au bleu lactique ou lactophénol, et examiné entre lame et lamelle. On peut aussi s'aider d'un morceau de cellophane adhésive appliqué à la surface de la colonie (drapeau de Roth) (**Kone, 2015**), puis déposé entre lame et lamelle, dans le bleu lactique ou lactophénol. Le montage est ensuite observé au microscope optique aux objectifs X 10 puis X40.

- Cas des dermatophytes :

L'aspect des filaments, la présence de chlamydospores, l'abondance et la morphologie des (microconidies, macroconidies) sont recherchés. Les autres éléments appelés ornements (excroissances triangulaires chez *T. rubrum*, organes pectinés, vrilles, organes perforateurs...) sont signalés (**Chabasse *et al.*, 2004**).

- Cas des moisissures

La taille du conidiophore, la présence ou non d'une pigmentation ou d'échinulation, la taille et la forme de la vésicule, l'aspect général de la tête aspergillaire qui est lié à l'implantation des phialides sur la vésicule (tête en colonne si les phialides sont disposées seulement sur la partie supérieure de la vésicule, tête ronde ou radiée si elles sont insérées sur tout le pourtour de la vésicule), la présence ou non de métule, la pigmentation et la taille des conidies, l'existence ou non d'une reproduction sexuée, la présence ou non de cléistothèces et des aleuries (taille et disposition sur le filament) sont tous pris en compte (**Chabasse *et al.*, 2002**).

- Cas des levures

Le principe du test de blastèse repose sur le fait que *Candida albicans*, incubé pendant 2 à 4h à 37°C, dans du sérum humain ou animal, émet directement un tube de germination, sans constriction à sa base, ce qui le différencie du pseudo-mycélium éventuellement produit dans

ces conditions par d'autres espèces du genre *Candida* (Bouchara *et al.*, 2010). Le test au latex par agglutination est un test qui repose sur la coagglutination des blastospores du complexe d'espèces *Candida dubliniensis*-*Candida albicans* avec des particules de latex (en suspension dans un contre colorant rouge) sensibilisées par un anticorps monoclonal, reconnaissant spécifiquement un antigène à la surface de la levure. Une réaction positive se caractérise par l'apparition d'agglutinats bleus sur un fond rouge/ rose au bout de 3 à 5 mn, visibles à l'œil nu (Coleman *et al.*, 2012).

I.9.3. Techniques d'identification à l'aide des automates (Vitek 2 et Vitek MS)

Cette identification n'est possible qu'après isolement des colonies et purification. La technique automatisée choisie est fonction de la structure du champignon.

I.9.3.1. Cas des levures : Principe du fonctionnement de Vitek 2

L'automate pour identification et antibiogramme/antifongigramme Vitek 2 a un principe qui repose sur la technologie de colorimétrie avancée. Le système fonctionne avec un remplissage automatique par chambre à vide qui assure l'inoculation des cartes Vitek 2; ces dernières sont au préalable identifiées par les codes-barres de type Vitek YST. La traçabilité complète est assurée et les risques d'erreur de transcription sont réduits. Les cartes d'identification contiennent 64 caractères biochimiques et enzymatiques, et sont lues toutes les 15 minutes grâce à trois longueurs d'ondes différentes. Cette technique exige une quantité de données plus importante, ce qui améliore la précision des résultats. Il comprend une base de données d'identification étendues qui permet de détecter davantage de microorganismes et de façon plus discriminante. Toutes les phases d'identification, de la lecture à l'enregistrement des résultats, sont automatisées, optimisant ainsi la standardisation de l'analyse (Barenfanger *et al.*, 1999). Grâce à ce système, la durée de préparation et de réponse est réduite, avec une obtention des résultats après 18 à 48h pour les micromycètes apparentés aux levures.

I.9.3.2. Cas des levures et des filamenteux : Principe de la spectrométrie de masse par MALDI-TOF.

❖ Définition

Il s'agit d'une technique de spectrométrie de masse *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight mass spectrometry* (Maldi-Tof MS). Par définition, est une technique qui associe une source d'ionisation dite douce assistée par une matrice (Maldi) et un analyseur à temps de vol (Tof). L'instrument Maldi-Tof MS se compose de trois unités ou phases

fonctionnelles : une source d'ionisation, un analyseur de masse (analyseur à temps de vol) et un détecteur. Cette technologie possède de nombreuses applications dans plusieurs domaines notamment le domaine biomédical, pharmacologie, toxicologie et pour l'identification des micro-organismes (Cardot, 2020).

❖ But

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a révolutionné l'identification des microorganismes. Cette technique quantifie avec précision et en peu de temps la masse et l'abondance des protéines comprises entre 2000 et 15000 Da présentes dans le produit testé. Chaque espèce fongique possède son propre spectre, l'identification est obtenue comparant le spectre du produit testé à un spectre préexistant dans la base de données.

❖ Principe

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permet une identification rapide des microorganismes par analyse de leurs protéines totales directement à partir d'une colonie isolée des cultures. L'analyse comporte les étapes suivantes ;

❖ Ionisation et désorption de l'échantillon

Dans cette phase l'échantillon et la matrice sont déposés sur un support métallique (la cible) où ils vont Co cristalliser après l'évaporation des solvants. L'ensemble de mélange est bombardé avec un faisceau laser, généralement d'un nombre pré connu de tirs de laser. Le laser peut avoir une longueur d'onde infrarouge (IR) ou ultraviolet (UV); les lasers UV sont de loin les plus courants (Dekkar, 2022). La matrice a pour but d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui mène à la vaporisation de l'échantillon, cette étape représente l'étape de la désorption. Par conséquent, l'étape de l'ionisation permet de générer des ions de différentes masses (Figure 3).

❖ L'analyse à temps de vol

Les ions générés sont accélérés et entrent dans le tube de vol (l'analyseur à temps de vol). L'étape de l'analyse consiste à la séparation des ions en fonction de leur rapport masse sur charge m/z . (Figure 3).

❖ La détection des ions

A l'extrémité du tube de vol, il existe un détecteur qui peut enregistrer le temps de vol et l'intensité relative des ions individuels. Ce signal des ions est converti en un courant électrique, c'est-à-dire le spectre obtenu en ToF est converti en spectre en masse par calibration des masses

connues (**Dekkar, 2022**). Chaque pic du spectre correspondra à un rapport m/z ayant atteint le détecteur. Le résultat final permet de générer un spectre de masse sous forme graphique où l'axe des abscisses correspondent au rapport masse sur charge (m/z) et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal (Figure 1).

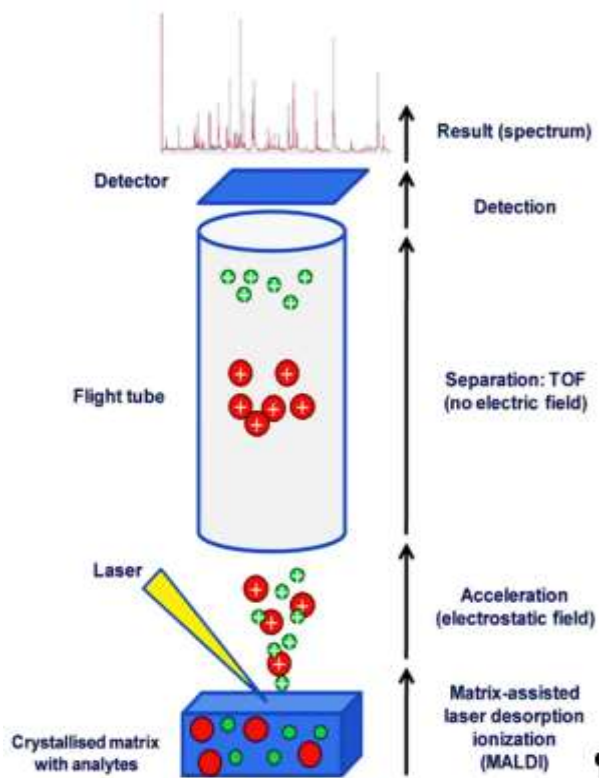


Figure 1 : Principe de fonctionnement du MALDI-TOF

Source (**Perkins *et al.*, 1993**).

I.10. Mesure de la fiabilité des techniques utilisées pour l'identification des isolats des champignons isolés.

La statistique Kappa est utilisé pour tester la fiabilité entre plusieurs évaluateurs (inter-évaluateur). Elle est mesurée en pourcentage de concordance, calculé comme le nombre de score de concordance divisé par le nombre total de scores. Le kappa peut varier de -1 à 1. Il existe toujours des erreurs entre les évaluateurs raison pour quelles dans les études de santé, le kappa et le pourcentage de concordance sont comparés et les niveaux de kappa et de pourcentage de concordance qui devraient être exigés dans les études sont suggérés. Un accord parfait est rarement atteint et la confiance dans les résultats de l'étude dépend en partie du degré de désaccord ou d'erreur introduite dans l'étude par incohérence entre les collecteurs de données. Pour savoir si les deux techniques sont fiables ou non, l'intervalle de confiance (IC) de kappa permet d'inclure les bons et les mauvais accords (**McHugh, 2012**).

CHAPITRE II :
MATERIELS ET METHODES

II.1. Cadre de l'étude

II.1.1. Type d'étude

Il s'agissait d'une étude transversale et prospective.

II.1.2. Période et site d'étude

Cette étude a été menée sur une période de 4 mois allant du 01 Septembre 2022 au 31 Décembre 2022 au laboratoire de Bactériologie Parasitologie Mycologie du Centre Pasteur du Cameroun (CPC). Le CPC est le laboratoire National de référence et de santé publique. Il est sous la tutelle du ministère de la santé publique et est situé au quartier Mesa entre l'hôpital Central de Yaoundé, le Centre Mère -Enfant et l'Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique (OCEAC).

II.1.3. Population d'étude

La population d'étude était constituée de patients de tout âge sans distinction de sexe avec les suspicions d'infections fongiques venant au CPC pour des examens mycologiques.

❖ Critères d'inclusions

Etaient inclus dans cette étude :

- Tout Patient envoyé au CPC pour un diagnostic mycologique et présentant des signes cliniques d'une infection fongique,
- Les patients n'ayant pas été sous traitement antifongique au préalable,
- Les patients ayant consenti de participer à l'étude.

❖ Critères de non inclusion

- Les patients ne présentant pas de signes d'infection fongique ;
- Les patients sous traitement antifongique.
- Tout patient refusant l'utilisation de son/ses prélèvement (s) à but de recherche.

II.1.4. Taille de l'échantillon et justification

Pour la validité des tests statistiques à réaliser lors de l'analyse, la taille requise pour l'échantillon a été calculée par la formule de LORENTZ :

$N = \frac{\epsilon a^2 pq}{i^2}$ soit:

- N : taille de l'échantillon ;
- p : taux de prévalence résultant des études antérieures;

- $q = 1 - p$
- $\epsilon\alpha^2 = 1,96^2$: risque d'erreur accepté
- $i^2 = 0,05$: puissance

Au regard du taux de détection des mycoses superficielles onychomycoses et teignes du cuir chevelu, les travaux antérieurs au Cameroun présentent respectivement 2,8% (**Kouotou *et al.*, 2017**), 21,48% (**Kouotou *et al.*, 2016**) et des infections profondes à *Cryptococcus* 28,1% (**Kammalac *et al.*, 2015**). Ces différentes infections fongiques ci-dessus citées rapporteraient en moyenne un taux de 17,5% en prenant un niveau de confiance de 95% et une marge d'erreur de 5%, la taille minimale d'échantillon est de :

$$N = (1,96)^2 \times 0,175 \times 0,825 / (0,05)^2 = 221,85 \text{ soit } 222 \text{ participants}$$

II.2. Matériels

Pour la réalisation de cette étude, le matériel utilisé voir (annexe 8) était constitué de :

❖ Matériel de collecte de données

Il regroupait : L'autorisation de recherche, la notice d'information, le consentement éclairé, l'assentiment parental et le matériel de bureau (fiches d'enregistrements, registres, stylo et crayon).

❖ Matériel de prélèvement et de transport des échantillons

Il était constitué de blouse, gants, charlotte, masque chirurgical, boîtes de Pétri stériles, lame porte objet, lame de bistouri, vaccinostyle, écouvillons stériles, alcool 70°C, compresse stérile, Cellophane adhésive, papier para film, plateau et bac de transport pour acheminement au laboratoire.

❖ Matériel biologique

Il était constitué de l'ensemble des échantillons (profonds, sous-cutanés et superficiels) prélevés sur les participants suspects inclus dans l'étude.

❖ Matériel d'analyse mycologique :

- **Petit matériel** à savoir les seringues calibrées de 1 et de 10µl, les pipettes Pasteur en verre, tubes Falcon stériles à fond conique de 15ml, tubes Eppendorf à fond conique de 2ml ;
- **Milieux de culture** (Sabouraud + chloramphénicol, Sabouraud + chloramphénicol + Actidione conditionnés en boîtes de Pétri de 90 mm et en tube et le milieu de Sabouraud chloramphénicol + huile d'olive conditionnés en boîtes de Pétri de 90 mm

- **Réactifs pour la microscopie** (potasse 30%, bleu de Lactophénol, eau physiologique à 9 pour 1000 et le kit pour coloration de Gram (violet de gentiane, Lugol, alcool-acétone, fuschine phéniquée et eau coulante) ;
- **Matériel pour analyse Vitek 2 compact** (solution saline à 0,45 pour 1000, tubes non sensibilisés stériles de 5ml, öese stériles de 10µl, cartes Vitek d'identification YST) ;
- **Matériel pour analyse protéomique**
Vitek Pick me nibs et Vitek Pick me Pen ou öese de 1µl, gants sans talc, micropipettes de 0,05-2µl, 100-200µl, 1000µl, embouts de (0,5- 2µl ; 10- 200µl; 1000µl, micro tubes de 2ml et écouvillons stériles tige en bois);
- **Réactifs pour extraction du protéome** (éthanol à 70°C, acide formique à 70°C, acétonitrile à 100%, Vitek-MS FA et Vitek MS CHCA Matrix).

❖ **Matériel de gestion des déchets**

- Portoirs pour échantillons et milieux de cultures ;
- Plateaux pour dépôt des différentes lames montées ;
- Différentes poubelles à déchets (infectieux et non, tranchants et coupants).

II.3. Méthodes

II.3.1. Phase pré-analytique

❖ **Collecte de données**

Au cours d'un entretien confidentiel, l'étude était présentée aux participants et un consentement éclairé ou assentiment parental avait été signé afin d'obtenir une preuve de l'accord de participation à l'étude. Par la même occasion, une fiche de collecte des données préalablement établie avait été renseignée dans le but de recueillir les informations concernant le participant.

❖ **Préparation et contrôle qualité du milieu Sabouraud chloramphénicol**

Le milieu de culture Sabouraud chloramphénicol a été préparé selon les recommandations du fabricant par la technique automatisée sur Masterclave ou par la technique manuelle, les contrôles microbiologiques (tests de stérilités) et les tests de performances microbiologiques (test de sélectivité et test de spécificité/ fertilité) ont été réalisés pour évaluer la qualité du milieu selon la norme ISO :**(11133, 2014)**. Le test de stérilité permettait de soumettre deux boîtes de la série préparée sans aucun champignon aux conditions d'incubation. Tant disque, le test de sélectivité permettait d'utiliser la souche de E coli ATCC 8729 pour confirmer qu'aucune bactérie ne poussera sur le milieu. Quant au test de spécificité/

fertilité, une souche de contrôle de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 a été utilisé et soumis aux conditions de croissance pour les levures en mycologie. Par ailleurs, le milieu Sabouraud Actidione était un milieu près à l'emploi de Biorad.

II.3.2. Prélèvements et acheminement des échantillons au laboratoire.

Pour les mycoses superficielles les prélèvements étaient réalisés au service d'accueil et prélèvement du CPC (écouvillonnage et grattage); concernant les mycoses sous-cutanées et profondes, les prélèvements ont été effectués par le spécialiste ou le personnel médical (LCR, biopsie, liquide biologique et prélèvements broncho-pulmonaires) habilité à le faire et acheminé au CPC par le patient ou la garde malade. Les auto-prélèvements ont été réalisés par les patients pour les échantillons de crachats et urines.

En fonction de la prescription et des renseignements cliniques qui y étaient mentionnés et de son examen clinique, le préleveur s'orientait sur la nature du prélèvement à réaliser. De l'efficacité du geste de prélèvement et de la qualité du matériel biologique prélevé, dépendent le succès des étapes ultérieures du diagnostic mycologique. Les prélèvements ont été effectués avant tout traitement antifongique par voie générale ou en application locale.

Les précautions d'usage d'asepsie visaient entre autre, à utiliser l'alcool à 70°C comme désinfectant (dans le cas des prélèvements d'ongles et sang pour hémoculture) afin d'éviter la contamination du matériel biologique par les bactéries, mais également par les saprophytes présents dans le milieu extérieur (**Dufresne et Guy St-G, 2021**). Les échantillons ont été recueillis dans un contenant stérile et hermétiquement fermé portant les informations du patient et la nature de l'échantillon. La fiche d'enquête a été bien remplie par le préleveur et le patient. Les échantillons et la fiche ont été acheminés au laboratoire dans un bref délai à température ambiante voir (Annexe 9). Les produits biologiques prélevés étaient de nature différente en fonction de la localisation de l'infection (Cf Tableau II).

Tableau II: Type d'échantillon en fonction de la localisation de l'infection

Type d'échantillon		Localisations cliniques	Mode de prélèvement et nature d'échantillon	Conditionnement et volume minimum nécessaire
Superficiels	Lésions cutanées sèches	Peau glabre	Grattage (squames)	Recueil du produit pathologique en boîte de Pétri stérile
			Scotch test cutané	Recueil du produit pathologique à l'aide du ruban adhésif et l'appliquer sur une lame porte objet propre
		Lésions plantaires	Fragments et squames	Recueil du produit pathologique en boîte de Pétri stérile
		Cuir chevelu et cheveux	Grattage (squames) Cheveux (fragments)	Recueil du produit pathologique en boîte de Pétri stérile
		Ongles pieds et mains	Grattage (squames) fragment d'ongle en petits morceaux	Recueil du produit pathologique en boîte de Pétri stérile
	Lésions suintantes	Plis	Ecouvillonnage	Recueil sur 2 écouvillons stériles (1pour examen direct et l'autre pour la culture)
		Pus de pied diabétique		
		Péri onyxis avec pus		
		Nez/gorge		
		Langue		
		Oreilles		
		Pustules cutanées	Ecouvillonnage/ grattage	Recueil du pus cutané en flacon stérile ou sur écouvillon stérile
	Teigne suppurante	Ecouvillonnage/ grattage	Recueil sur 2 écouvillons stériles (1pour examen direct et l'autre pour la culture)	
Sous cutanés		Lésions cutanées	Biopsies*	Recueil en flacon stérile
		Nodules		
Profonds		Sang	Hémoculture	Flacon hémoculture : Enfant (2 à 5ml), adulte (10 ml) de sang total
		Cérébrales	LCR*	Recueil en flacon stérile (1ml)
		Broncho-pulmonaire	AB*, LBA*, expectoration (crachat)	Recueil en flacon stérile
		Dispositif médical	Bout de cathéter* et bout de sonde	
		Liquides biologiques	Liquide pleural* et urine	

NB : * actes strictement médicaux.

II.3.3. Phase analytique

Ces méthodes sont basées sur la mise en évidence du champignon dans les prélèvements par l'examen direct du prélèvement, l'isolement du champignon par culture et l'identification du champignon à partir des colonies fongiques selon la nature du champignon isolé. Au laboratoire, le produit biologique était réparti en deux pour effectuer en parallèle l'examen direct et la culture.

II.3.3.1. Examen direct du prélèvement

Il était de très grande importance, il permettait d'observer le champignon non modifié et d'évaluer la quantité d'éléments fongiques dans le prélèvement. Il portait en quelques minutes la preuve formelle d'une mycose dans certains cas ; mais ne renseignait pas sur l'identification. Cet examen était réalisé d'une part directement à partir du prélèvement et d'autre part après préparation de l'échantillon par des colorations spécifiques en fonction du type d'échantillon. La préparation consistait en l'utilisation d'un artifice à rendre plus visible les éléments fongiques éventuellement présents (Test à l'encre de chine, coloration de Gram et test à la potasse).

❖ Cas des liquides biologiques

Il consistait dans un premier temps à centrifuger un volume donné dans un tube stérile à 2500 tours/mm pendant 10 minutes. Puis une goutte du culot de centrifugation était déposée entre lame et lamelle et observée au microscope à l'objectif X10 puis X 40.

❖ Cas des prélèvements cutanés

Les lames de prélèvement cutané sur Cellophane adhésive étaient immédiatement observées au microscope à l'objectif X 10 puis à l'objectif X 100 avec huile à immersion.

❖ Encre de chine du LCR

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, une goutte du culot de centrifugation de LCR était déposée sur une lame. Puis une goutte d'encre de chine était déposée à proximité sans mélanger les 2 gouttes. La lamelle était posée de façon à avoir une partie sombre et une partie claire ; la lecture se faisait au point d'intersection qui est moins sombre facilitant l'observation de la capsule si elle est présente (**Chabasse, 2013**). La zone claire permettait l'appréciation des autres cellules (hématies et leucocytes).

❖ **Coloration de Gram pour les échantillons à consistance liquide**

L'étalement du prélèvement se faisait sur une lame propre pour les pus, écouvillonnage des muqueuses, crachat et le culot de centrifugation pour les liquides. La fixation du frottis était effectuée par la chaleur de la flamme du bec Bunsen suivie de la coloration différentielle en bactériologie Médicale. La lecture se faisait à l'objectif X 100 à l'immersion (**Microbiologie, 2018**).

❖ **Test à la potasse pour les échantillons à consistance solide**

Une fraction de l'échantillon a été déposée sur une lame contenant une goutte de potasse à 30% à l'aide d'une öese stérile. Le mélange était recouvert avec une lamelle. Un temps d'incubation de 30 mn favorisait le ramollissement et l'éclaircissement de l'échantillon par la potasse en détruisant les débris et autres cellules. La lecture se faisait à l'objectif X 10 puis X 40 (**Chabasse, 2013**).

II.3.3.2. Mise en culture des échantillons

❖ **Mode d'ensemencement des différents produits pathologiques**

En fonction du prélèvement et de l'agent pathogène mis en cause, les milieux de cultures adaptés étaient inoculés suivant les techniques d'ensemencement microbiologiques recommandés en Mycologie médicale voir (Tableau III) (**Aubry et Gaüzère, 2022 ; Microbiologie, 2018 ; Dugat, 2014**).

Tableau III: Mode d'ensemencement des différents produits pathologiques

Echantillons	Prétraitement	Milieux de culture	Techniques d'ensemencement	Champignons recherchés
Liquides biologiques et prélèvements pulmonaire	Centrifugation	SB	Inondation à partir du culot	Levures / moisissures
Crachat, pus superficiels, sécrétion des muqueuses et exsudats	Aucun	SB	Strie en surface	Levures / moisissures
Sang	Détection de la positivité (Bact/alert) et coloration de Gram des hémocultures	SB	Strie en surface	Levures / moisissures
Matériel médical (bout de sonde et cathéter)	Enrichissement dans un bouillon spécifique pendant 4h	SB	Strie en surface	Levures
Squames (peau, ongles, cuir cheveux) et chevelu	Aucun	SB / SA	Ensemencement en profondeur dans la gélose	Levures / Moisissures
Biopsies	Subdiviser la biopsie sans broyage	SB / SA	Ensemencement en profondeur dans la gélose	Levures / dermatophytes / champignons dimorphiques
Pus profonds	Aucun	SB / SA	Stries en surface	Levures / moisissures / dermatophytes / champignons / dimorphiques
Squames des lésions cutanées (suspicion de pityriasis)	Aucun	SB/ huile SB+ d'olive	Ensemencement en profondeur dans la gélose	Levures / Malassezia sp

SB : Sabouraud chloramphénicol ; SA : Sabouraud actidione ; SB+ huile d'olive

❖ Incubation et croissance du champignon

Les milieux de culture Sabouraud chloramphénicol pour la croissance des (levures, moisissures, dermatophytes et champignons dimorphiques), Sabouraud actidione pour la

croissance des champignons filamenteux (dermatophytes et champignons dimorphiques) et Sabouraud chloramphénicol additionné à l'huile d'olive pour la croissance des (levures du genre *Malassezia*) ainsi ensemencés étaient incubés à 30°C pendant au moins trois semaines pour la recherche respectivement 24 à 48h pour les levures (du genre *Candida*), 2 à 5 jours pour les levures du genre *Cryptococcus*, 3 à 10 jours les moisissures, 5 à 21 jours pour les dermatophytes et 7 à 30 jours pour les champignons dimorphiques. Le délai d'apparition de la culture était fonction du type de champignon et le suivi des cultures se faisait tous les 48h. Ce temps de croissance était un véritable critère d'identification des champignons et correspondait au délai de réponse définitive par le laboratoire (**Microbiologie, 2018; Dodds *et al.*, 2012**).

II.3.3.3. Identification du champignon après isolement

L'identification des champignons consistait à déterminer les caractères phénotypiques par plusieurs méthodes à savoir : identification phénotypique (macroscopique et microscopique), métaboliques (biochimiques et enzymatiques par Vitek 2) et protéomique (spectrométrie de masse par MALDI-TOF) des champignons isolés en culture pure. Chaque méthode utilisée était fonction des exigences de l'espèce du champignon (**Lau *et al.*, 2013**).

❖ Identification classique

- Examen macroscopique

L'examen macroscopique consistait à écrire l'aspect, la couleur, la forme et la consistance des colonies obtenue à partir du mycélium des champignons sur milieu de culture. Cette macroscopie est un aspect capital pour la suite de l'identification (**Dugat, 2014**). Elle oriente le diagnostic sur le choix de la technique d'identification à utiliser.

✓ Cas des levures

Les champignons de type levures donnaient des colonies de consistance (lisse, humide et crémeuse) de couleur blanchâtre, brillante ou mate, parfois rugueuse voir (figure 13)(**Bouchara *et al.*, 2010**).

✓ Cas des filamenteux

A l'examen macroscopique, l'aspect en surface des colonies était attentivement observé et constituait un critère d'orientation. On notait la consistance des colonies (glabre, duveteuse, poudreuse, cotonneuse), leur surface (plane, en dôme, plissée, cérébriforme), la couleur du recto et du verso voir (figure 8.1)(**Chabasse *et al.*, 2004**).

- **Examen microscopique**

✓ **Cas des levures**

Une préparation dans une goutte d'eau physiologique était faite entre lame et lamelle et ou au Bleu de Lactophénol pour les cas de *Malassezia*. L'observation se faisait directement au microscope optique à l'objectif X 10 puis X 40 (**Bouchara *et al.*, 2010**).

✓ **Cas des filamenteux**

A la suite de l'observation microscopique, les organes fongiques étaient mis en évidence, ce qui permettait l'identification du champignon au rang du genre ou de l'espèce. L'examen portait sur la caractérisation du thalle ; des spores végétatives et l'appareil reproducteur qui leur donne naissance ; des spores asexuées et enfin de toutes les formations annexes. Pour cette mise en évidence, le test du drapeau et des fragments de culture gélosées étaient utilisés et soumis à l'action colorante et éclaircissante du Bleu de Lactophénol (**Chabasse *et al.*, 2004; Chabasse *et al.*, 2002**). L'observation se faisait au microscope à l'objectif X40 puis à immersion X 100, pour tous les champignons filamenteux.

❖ **Détermination des caractères biochimiques et enzymatiques par Vitek 2**

Cette détermination de caractères biochimiques et enzymatiques s'applique uniquement à l'identification des levures et était faite sur Vitek 2 de BioMérieux.

Après avoir procédé à l'isolement des micro-organismes, la manipulation se résume à une simple étape de standardisation de l'inoculum (1,8 à 2,20 Mc Farland) à partir d'une culture pure de 24 à 48h. L'inoculum est placé dans la cassette Vitek2 de la station Smart Carrier Station dans laquelle la carte Vitek2 et l'échantillon sont reliés virtuellement. Une fois la cassette chargée, le système gère l'incubation et la lecture de chaque carte sans aucune autre intervention. L'enregistrement sur l'identification du patient et l'enregistrement interne de l'échantillon sont capitales et se font manuellement sur un ordinateur. Après chargement automatique de l'inoculum, le transfert de la cassette dans la zone d'analyse se fait immédiatement (**Biomérieux, 2005**).

❖ **Détermination du profil protéomique par spectrométrie de masse : MALDI-TOF.**

Le profil protéomique était déterminé par spectrométrie de Masse MALDI-TOF à l'aide de l'automate Vitek MS de Biomérieux. Les cultures testées avaient entre 2 et 8 jours, en général 5 jours. Les souches provenaient de culture sur milieux de Sabouraud Chloramphénicol ou Actidione. Un plan de travail orientait sur la disposition en fonction de la nature des souches

(levure et ou filamenteux) et les coordonnées propres à chaque identifiant. Au bout de 15 min à une heure maximum, les résultats d'une cible sont disponibles et présentés sous formes de spectre (Perkins *et al.*, 1993; Pasternak, 2012).

✓ Cas des levures

A l'aide d'une oese de 1 µl ou du pick me nibs, une fraction de la bactérie de contrôle *E. coli* ATCC 8739 d'une croissance de 24h est étalée dans le puit central d'une série de 16 puits de la cible comme souche de contrôle qualité interne. A l'aide d'une micropipette calibrée de 0,5-2µl, 1µl de la matrice (VITEK® MS-CHCA) a été immédiatement ajoutée sur l'étalement. Une fraction de colonie (pure et jeune) de levure pour chaque colonie suspecte était prélevée sur le milieu Sabouraud et étalée sur le puit de la cible dans les mêmes conditions que la souche de contrôle. A l'aide d'une micropipette calibrée de 0,5- 2µl un volume de 0,5 µl d'acide formique (VITEK® MS-FA) a été ajouté sur l'étalement après séchage. Un temps d'attente de 1 à 3 minutes selon le taux d'humidité d'air et la température a été respecté pour l'évaporation de l'acide formique. A l'aide de la micropipette de 0,5- 2µl, 1 µL de matrice a été ajouté pour l'ionisation à l'air ambiant. A la fin de l'ionisation, l'échantillon et la matrice étaient co cristallisés et la cible VITEK® MS-DS a été placée sur l'instrument pour analyse protéomique (Qian *et al.*, 2008).

✓ Cas des filamenteux.

Une phase de pré traitement a été nécessaire pour l'extraction du protéome à analyser grâce au dispositif VITEK® MS Mould Kit. A l'aide de la pipette de 100-1000µl, un volume de 900 µL de la solution d'éthanol à 70 % était prélevé et introduit dans un tube à fond rond de 2 ml. Un écouvillon stérile tige en bois a été imprégner dans de l'eau distillée et pressé contre les parois du tube pour éliminer l'excès de liquide et les colonies de champignons filamenteux (moisissures et dermatophytes) étaient prélevées sur un cercle d'environ 1 à 2 cm de diamètre, en sélectionnant si possible des spores (conidies) et des hyphes. Le matériel biologique recueilli était mis dans le tube préparé à la première étape pour inactivation du champignon puis, la suspension était mélangée à l'aide d'un agitateur de type Vortex. Le mélange (éthanol et matériel biologique) était centrifugé entre 10 000 et 14 000 g/mn pendant au moins 2 minutes. Au terme de la centrifugation, le surnageant était éliminé à l'aide de la micropipette de 1000µl en faisant bien attention de ne pas toucher le culot. Un volume de 40 µl d'acide formique à 70 % était ajouté au culot obtenu à l'aide de la micropipette de 20-200µl pour faciliter la lyse chimique de la paroi, le mélange était remis complètement en suspension à l'aide d'un agitateur de type vortex. Un volume de 40 µl d'acétonitrile à 100 % était ajouté pour précipiter les

protéines et mélangé à l'aide de l'agitateur. L'ensemble était par la suite centrifugé entre 10 000 et 14 000 g/mn pendant au moins 2 minutes. Au terme de cette étape, l'inactivation était complète. Un volume de 1µl du surnageant était déposé sur le puit correspondant de la cible à l'aide de la micropipette de 0,5-2µl, le dépôt était séché à l'air ambiant pendant au moins 5 minutes puis un volume de 1ul de la matrice était ajouté après séchage pour cristallisation. La libération des ions par cristallisation mettait en exergue l'ionisation. Le code barre de la cible était scanner au niveau du poste d'acquisition à l'aide de la douchette dédiée, Dans le cas des levures et champignons filamenteux, fungus était sélectionné. Les coordonnées propres de chaque souche en suivant l'ordre de la série étaient enregistrés, Le portoir pour cible était sorti puis la cible était positionné et scannée puis réintroduire dans le système et l'analyse était ainsi lancé (Santos *et al.*, 2009) (Cf figure 2).



Figure 2: (a) Cible Vitek MS, (b): Introduction du portoir adaptateur de cible dans Vitek Ms, c : Automate Vitek MS (Malditof-Tof) BioMérieux (Source présente étude)

II.3.3.4. Mesure de la fiabilité des deux techniques d'identifications vis-à-vis des isolats obtenus.

La mesure de la fiabilité des deux techniques était faite avec le calcul du coefficient Kappa de Cohen en fonction de l'identification d'un même isolat par les deux techniques simultanément. Le niveau d'accord entre les deux techniques était fonction du pourcentage de concordance entre les deux techniques, de la valeur du kappa calculée et de l'intervalle de confiance de ce kappa. Dans la littérature, l'interprétation du résultat Kappa est le suivant :

valeurs < 0 indiquent une absence de concordance ; 0,01-0,20 une concordance nulle ; 0,21-0,40 une concordance faible ; 0,41-0,60 une concordance modérée ; 0,61-0,80 une concordance forte et 0,81-1,00 une concordance presque parfaite (**McHugh, 2012**).

II.4. Considérations éthiques

L'étude a été réalisée en accord avec les principes éthiques qui concourent à assurer le bien-être et les intérêts des patients. Pour cela, une clairance éthique N°1291/CNERSHC/2022 en date du 20/12/2022 du Comité Régional d'Éthique de la Recherche en Santé Humaine du Centre (annexe 1) a été obtenue. Une autorisation de recherche N°001035/2022/CPC/DG/DAF/SRH du 19/08/2022 pour la collecte des données a été fournie par le directeur Général du Centre Pasteur du Cameroun (annexe 2) afin que l'étude puisse être légalement menée. Nous avons informé les participants des objectifs, débouchés de l'étude et de la nature de leur participation à l'étude grâce à la notice d'information (annexe 3). Leur consentement a été obtenu à l'aide d'une fiche de consentement éclairé prévue à cet effet (annexe 4). Les patients mineurs de moins de 21 ans et de plus de 11 ans avaient donné leur assentiment et les représentants légaux avaient donné leur consentement éclairé (parents, tuteurs, ou parrains) voir (annexe 5). Une autorisation parentale a été obtenue auprès des parents ou tuteur légal pour les enfants de moins de 11 ans (annexe 6).

II.5. Analyses des données

Pour chaque participant, les caractéristiques représentées par des variables qualitatives ou quantitatives étaient enregistrées: sexe ; âge (l'âge des participants était repartis en groupes d'âge et couvrait les nourrissons et enfants [0-12 ans], les adolescents [13-17ans] , les jeunes adultes [18-35 ans], les adultes âge moyens [36-55 ans] et les adultes plus âgés 56 et plus)) (**Galland et al., 2012 ; Lu et al., 2015; Nancy et Petry, 2002**) ; renseignements cliniques multivariés; facteurs d'exposition (diabète, tuberculose, VIH, chimiothérapie, corticothérapie, brûlure, antibiothérapie, pose d'un dispositif médical, statut social, attitude vestimentaire, nombre de personnes par chambre...) ; types d'échantillons ; analyse mycologique : examen microscopie, culture et identification (macroscopie-microscopie pour les filamenteux, Vitek 2 pour les levures et la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof pour les levures et les filamenteux). Les données étaient saisies sur une feuille Excel (**Microsoft 2007**), puis analysées avec le logiciel SPSS (**Statistical Package for Social Science 22.0**). Les tests statistiques : le test de **Khi 2 de Pearson** était utilisé pour comparer les résultats de chaque caractéristique selon les variables concernées et le **coefficient kappa de Cohen** était utilisé pour comparer le niveau de concordance entre les deux techniques d'identification.

A large, horizontal, purple oval with a thin black outline, centered on the page. It serves as a background for the chapter title.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. Résultats

III.1. Caractères sociodémographiques et cliniques de la population d'étude

III.1.1. Caractères sociodémographiques

Au total, 370 patients ont été reçus, au service « accueil et prélèvement » du CPC parmi lesquels 245 participants ont été inclus car ces derniers remplissaient les critères d'inclusion de cette étude (66,2% du taux de d'inclusion). De l'ensemble des participants de l'étude, 145 étaient de sexe masculin avec un sex ratio homme/femme de 1,45 en faveur des hommes. L'âge moyen des patients enrôlés était de 45,08 ans allant de 03 mois à 88 ans. 5 groupes d'âge ont été définis, Le groupe d'âge de 36-55 ans était le plus représenté, soit 36,3% (89/245) suivi des personnes âgés 33,5% (82/245). Le statut social était constitué de 35,5% (87/245) de travailleurs non fonctionnaires suivi de 17,6% d'élèves/étudiants. Ces résultats sont présentés dans le Tableau IV.

Tableau IV : Présentation des caractères sociodémographiques de la population d'étude

Caractéristique de la population	Modalités	Effectifs	Fréquence %
Classe d'âge (ans)	[0-12[	24	9,8
	[13-17 [	7	2,8
	[18-35[	43	17,5
	[36-55 [	89	36,3
	[56 et plus	82	33,5
Sexe	Homme	145	59
	Femme	100	41
Statut social	Enfants moins de 4ans	9	3,7
	Elève/étudiant	43	17,6
	Fonctionnaire	31	12,7
	Non fonctionnaires	87	35,5
	Retraité	41	16,7
	Sans emploi	34	13,8

III.1.2. Caractéristiques cliniques de la population d'étude

❖ Signes cliniques en fonction du type d'infection et des manifestations cliniques

Les patients inclus dans l'étude présentaient des signes cliniques caractéristiques et variés en fonction du type d'infection fongique. Le (Tableau V) présente les résultats détaillés des signes cliniques : les infections fongiques profondes étaient observées chez 141 participants ; les infections sous-cutanées chez 4 participants et les infections superficielles présentant des poly-infections où 81 participants présentaient une seule manifestation clinique,

18 participants deux atteintes cliniques différentes et un participant montrait trois atteintes. La (Figure 3) illustre quelques manifestations cliniques superficielles. Un ensemble de 265 échantillons a été collecté voir (Figure 4).

Tableau V ; Signes cliniques en fonction du type d'infection, des manifestations cliniques et Echantillons

Types d'infection	Localisation	Signes cliniques	Echantillons	
			Nature	Effectifs
Superficielles	Atteintes de la Peau	Eruptions cutanées et lésions sèches (glabre)	Squames	24
		Lésions cutanées humides (plis)	Ecouvillonnages	26
		Tâches dépigmentées	Scotch cutané	5
	Atteintes des phanères	Ongles (colorés, friables, douloureux)	Squames	40
		Plaques du cuir chevelu et cheveux cassants	Squames et cheveux	5
	Atteintes des muqueuses	Ecoulement nasal	Ecouvillonnage	3
		Douleur à la gorge	Idem	4
		Langue blanchâtre et fissurée	Idem	3
		Ecoulement et douleurs auriculaires	Idem	10
	Atteintes sous-cutanées	Tuméfactions et nodules	Biopsie	4
Profondes	Atteintes méningées	Fièvre, vertige, céphalées, asthénie	LCR	56
	Atteintes pulmonaires	Toux, essoufflement, douleurs thoraciques, asthénie	Crachat	12
			Aspiration bronchique	31
			Lavage bronchoalvéolaire	7
	Septicémie	Fièvre persistante	Hémoculture	16
	Atteinte pleurale	Fièvre et douleurs thoracique	Liquide pleural	1
	Atteinte de l'appareil urinaire	Urine trouble et douleurs à la miction	Urine	1
	Dispositifs médicaux	Port de sonde et de cathéter	Bout de sonde	9
			Cathéters	8



Atteintes des ongles orteil et doigts



Atteintes du cuir chevelu



Atteintes de la peau glabre



Atteintes des muqueuses

Figure 3: Manifestations cliniques des mycoses superficielles. (Source présente étude)

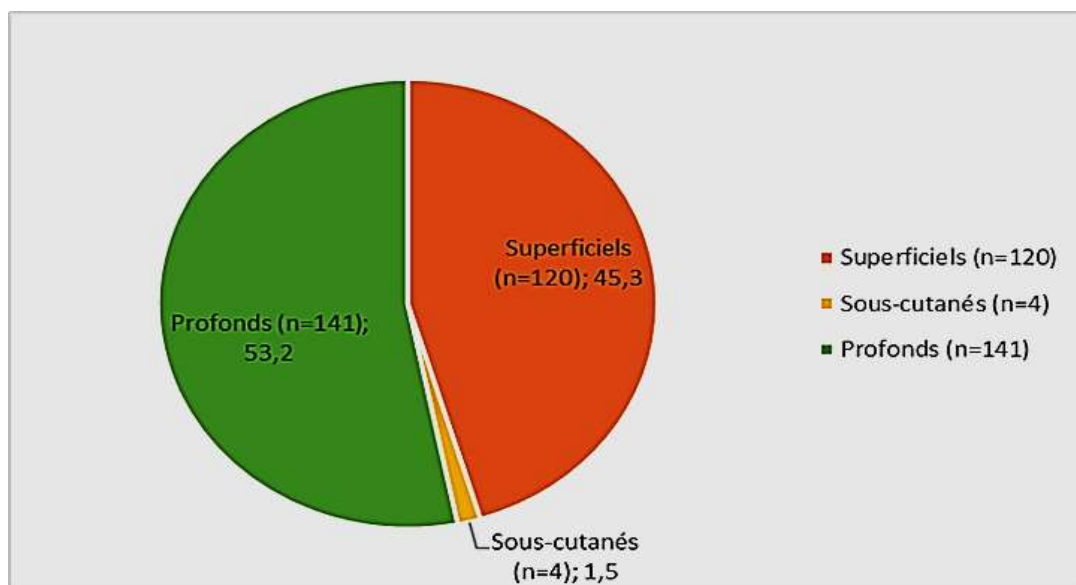


Figure 4 : Différents échantillons collectés en fonction du site de l'infection

Tableau VI : Positivité de l'infection fongique en fonction de la nature de l'échantillon

Types d'infection	Localisation	Nature de l'échantillon	Positifs (N=101)	Fréquence (%)
Superficielles	Phanères	Squames ongles (n=40)	29	28,71
		Squames cuir chevelu et cheveux (n=5)	4	3,96
	Peau	Tâches dépigmentées (n=5)	4	3,96
		Squames paume des mains et plante des pieds (n=7)	4	3,96
		Squames Peau sans poils (n=14)	7	6,93
		exsudat plis (n=3)	1	0,99
		pus pied diabétique (n=24)	5	4,95
	Muqueuses	Sécrétion de gorge (n=4)	2	1,98
		Sécrétion de la langue (n=3)	1	0,99
		Ecoulement auriculaire (n=10)	6	5,94
Sous-cutanée	Sous-cutané	Biopsie (n=4)	1	0,99
Invasives	Broncho-pulmonaire	Crachat (n=12)	10	9,90
		Lavage broncho-alvéolaire (n=7)	2	1,98
		Aspiration bronchique (n=31)	8	7,92
	Sang	Hémoculture (n=16)	3	2,97
	Méningée	LCR (n=56)	10	9,90
	Dispositifs médicaux	Bouts de cathéter (n=8)	1	0,99
		Bouts de sonde urinaire (n= 9)	2	1,98
	Liquides biologiques	Urine (n=1)	1	0,99

III.2. Examen direct à partir des échantillons et culture

III.2.1. Positivité des examens directs à partir des échantillons

Des 265 échantillons collectés, l'examen direct du prélèvement a présenté une positivité de 23,4% (62/265). Des 62 examens directs positifs à partir du prélèvement la coloration de Gram pour les échantillons liquides (liquides biologiques, expectorations sécrétion, exsudat et pus) représentait 48,4% (30/62). Le test à la potasse (KOH à 30%) utilisé pour l'éclaircissement des échantillons de squames et biopsies représentait 27,4% (17/62). La coloration à l'encre de chine dans le LCR représentait 17,7% (11/62) et les lames de scotch test cutané étaient observées directement sans aucune coloration avec 6,4% (4/62) de cas. Les différentes proportions sont présentées par la (Figure 5)

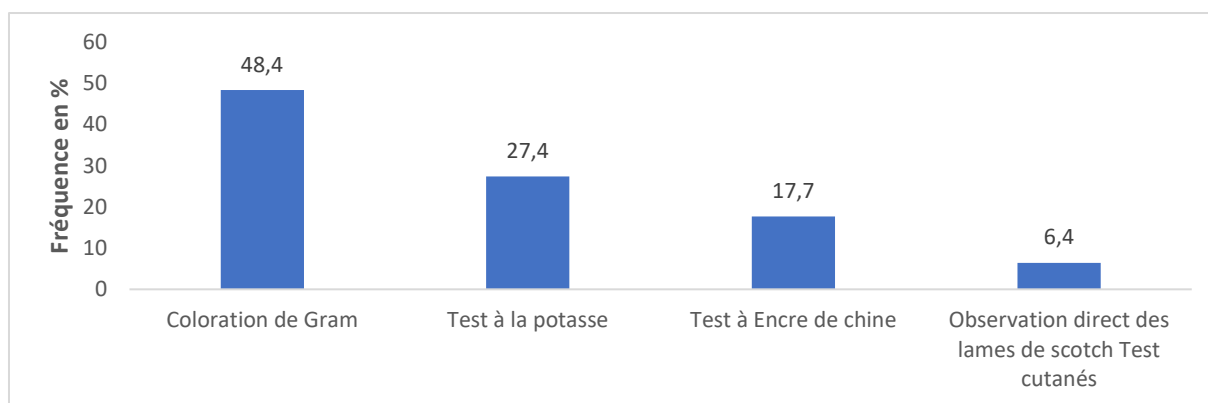


Figure 5 : Positivité des examens directs en fonction de la nature de l'échantillon

III.2.2. Positivité de la culture

L'examen macroscopique des cultures montrait que 101 échantillons avaient une culture positive. Ces échantillons à cultures positives provenaient de 87 patients et incluaient 14 patients qui présentaient des coinfections avec d'une part 4 patients ayant une association entre les levures et les filamenteux et d'autre part 10 patients ayant une association entre deux levures d'espèces différentes. Un total de 114 isolats a été obtenu et comprenait 33 champignons filamenteux contre 81 levures voir (figure 6). Aucun champignon dimorphique n'a été isolé de tous les échantillons suspects destinés à cette étude.

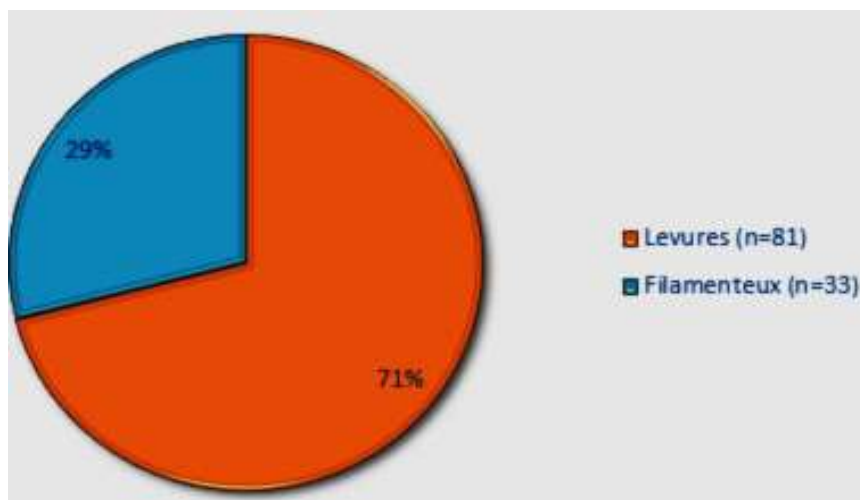


Figure 6 : Fréquence des isolats obtenus en fonction de l'examen macroscopique des cultures

III.2.3. Identification des espèces de champignons par différentes techniques en fonction de leurs morphologies.

III.2.3.1. Identification des espèces de champignons filamenteux

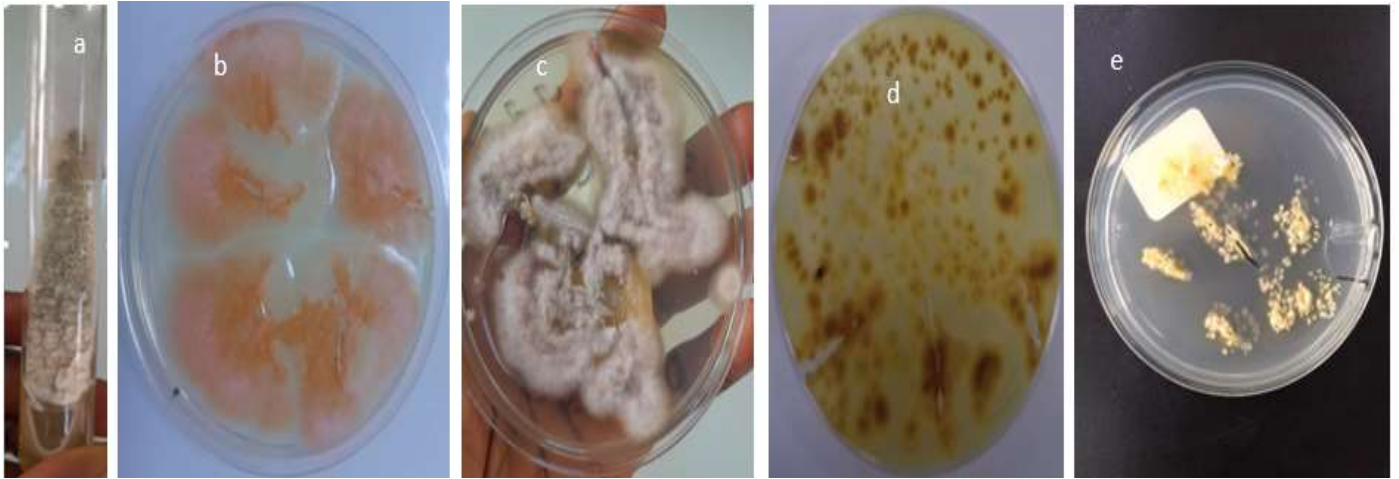
Des 33 champignons filamenteux isolés, 97% (32/33) souches (moisissures et dermatophytes) avaient été toutes identifiées au rang du genre par les deux techniques pour la plupart. Les moisissures avaient une fréquence de détection de 65,6% (21/32) et les dermatophytes représentaient un taux de 34,3% (11/32). Une souche n'avait pas été identifiée.

❖ Technique classique (macroscopie/microscopie)

Au total, 13 espèces appartenant à 6 genres étaient identifiés, les moisissures (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* et *Chrysosporium*) et les dermatophytes (*Trichophyton* et *Microsporum*). Les moisissures avaient une croissance rapide (3 à 7 jours) et les dermatophytes une croissance plus ou moins lente (5 à 15 jours) afin de présenter toutes les caractéristiques macroscopiques (couleur, topographies) et les fructifications (tête aspergillaire, hyphes septés ou non, aleuries, conidies) ci-dessous observées. Chez les dermatophytes, l'espèce la plus identifiée avait une fréquence de 12,5% *Trichophyton soudanense*. Les moisissures les plus fréquentes 15,6% *Fusarium solanii* suivi de 12,5% *Aspergillus niger*. Les différentes proportions pour chaque espèce sont illustrées par la (figure 7) et les images par la (figure 8).

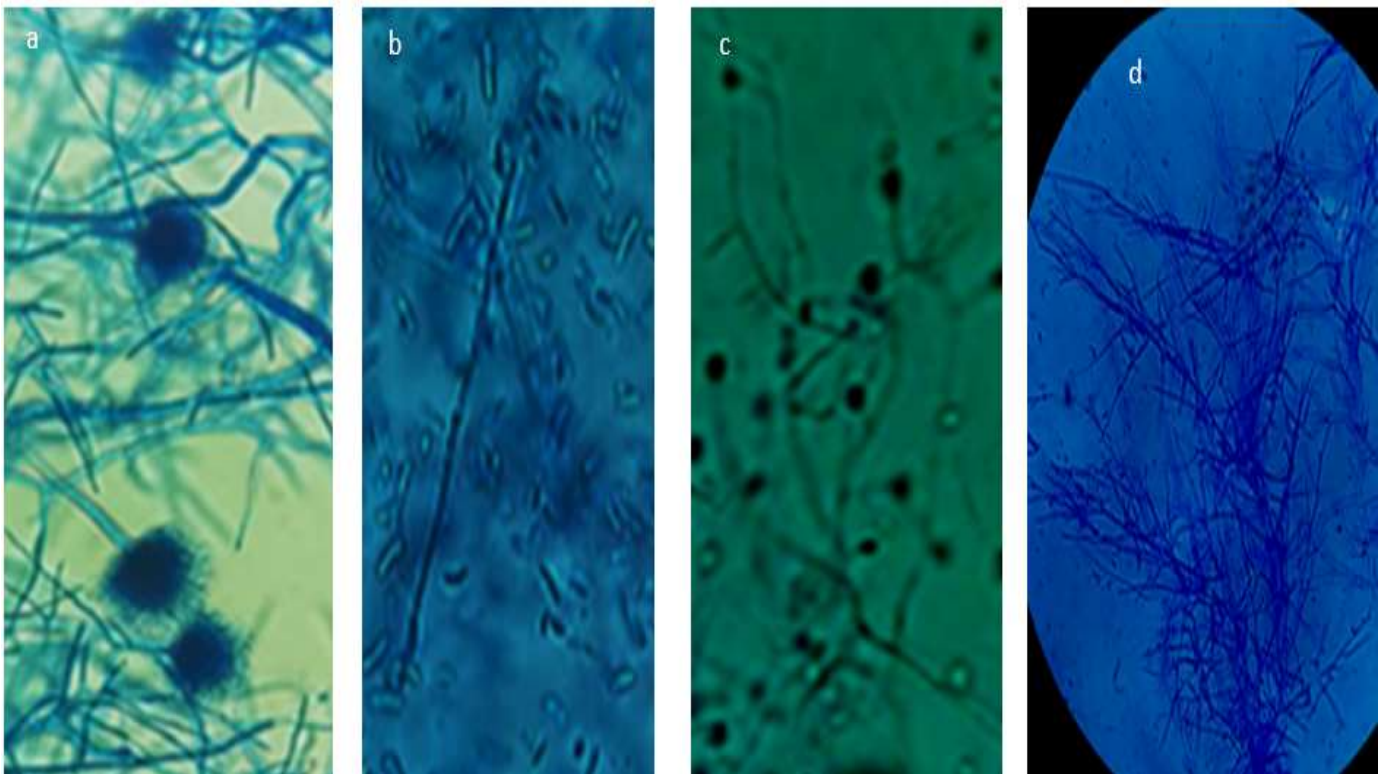


Figure 7 : Différentes espèces de champignons filamenteux identifiées par macroscopie/microscopie



1- Aspect macroscopique des colonies de champignons filamenteux sur milieu de Sabouraud :

a) cérébriforme et blanc-vert ; b) plat et orangé ; c) cotonneuse et violacé ; d) duveteuse ; e) étoilé et jaune



2- Observation microscopique d'une préparation de filamenteux au Bleu de Lactophénol à l'objectif X 40 :

a) tête aspergillaire ; b) filaments septés et microconidies en grains de riz ; c) filaments septés et aleuries intercalaires et terminales ; d) filaments mycéliens septés et microconidies en alcadium

Figure 8 : 1- Aspect macroscopique des colonies de champignons filamenteux sur milieu de Sabouraud et

2- Observation microscopique d'une préparation de filamenteux au Bleu de Lactophénol à l'objectif X 40

(Source présente étude)

❖ Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

Les cultures jeunes de 3 jours étaient suffisantes pour l'extraction du protéome sans aucune distinction. Maldi-Tof a identifié 16 espèces différentes appartenant à 5 genres. *Trichophyton violaceum* était l'espèce la plus suivie de *Fusarium solanii* et *Aspergillus niger* avec les fréquences respectives 19% et 12%. Par ailleurs, aucun isolat du genre *Chryseosporium* et l'espèce *Trichophyton terrestre* n'a été identifiée. La (figure 9) illustre les proportions d'identification au rang de l'espèce et la (figure10) quelques spectres produits par Maldi-Tof.

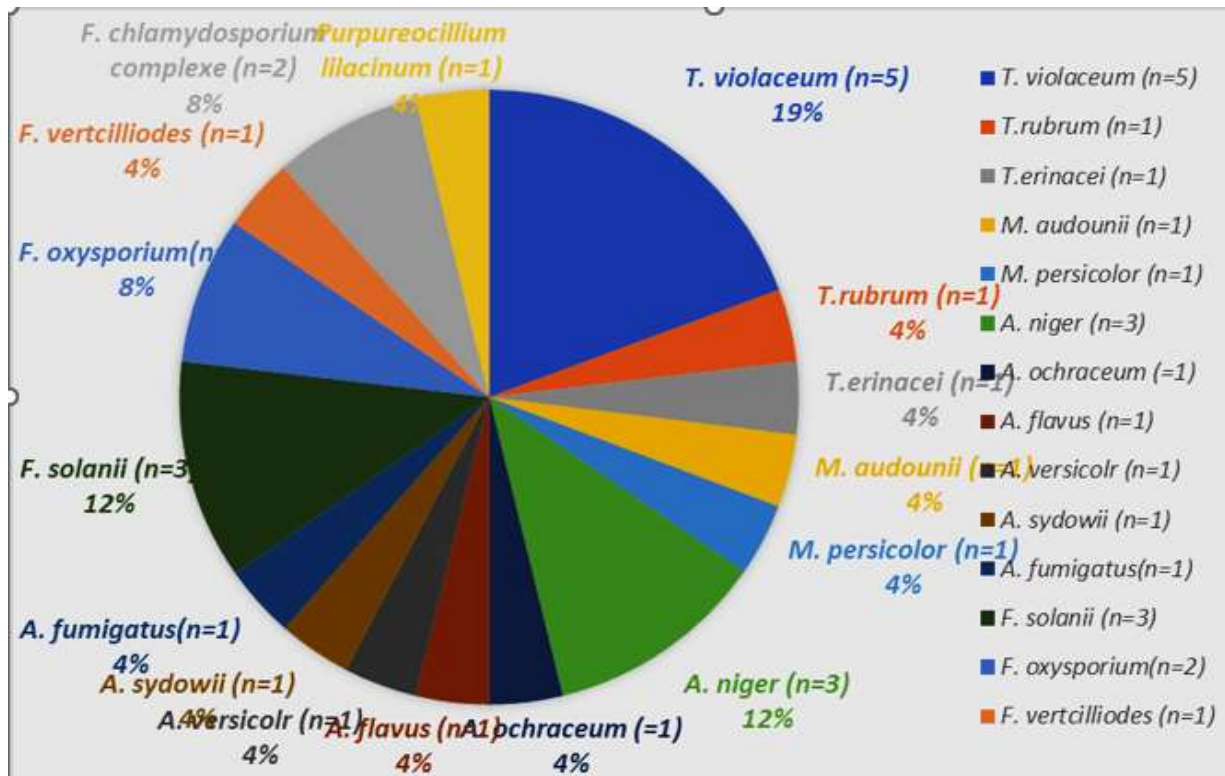


Figure 9 : Différentes espèces de champignons filamenteux identifiées par Maldi-

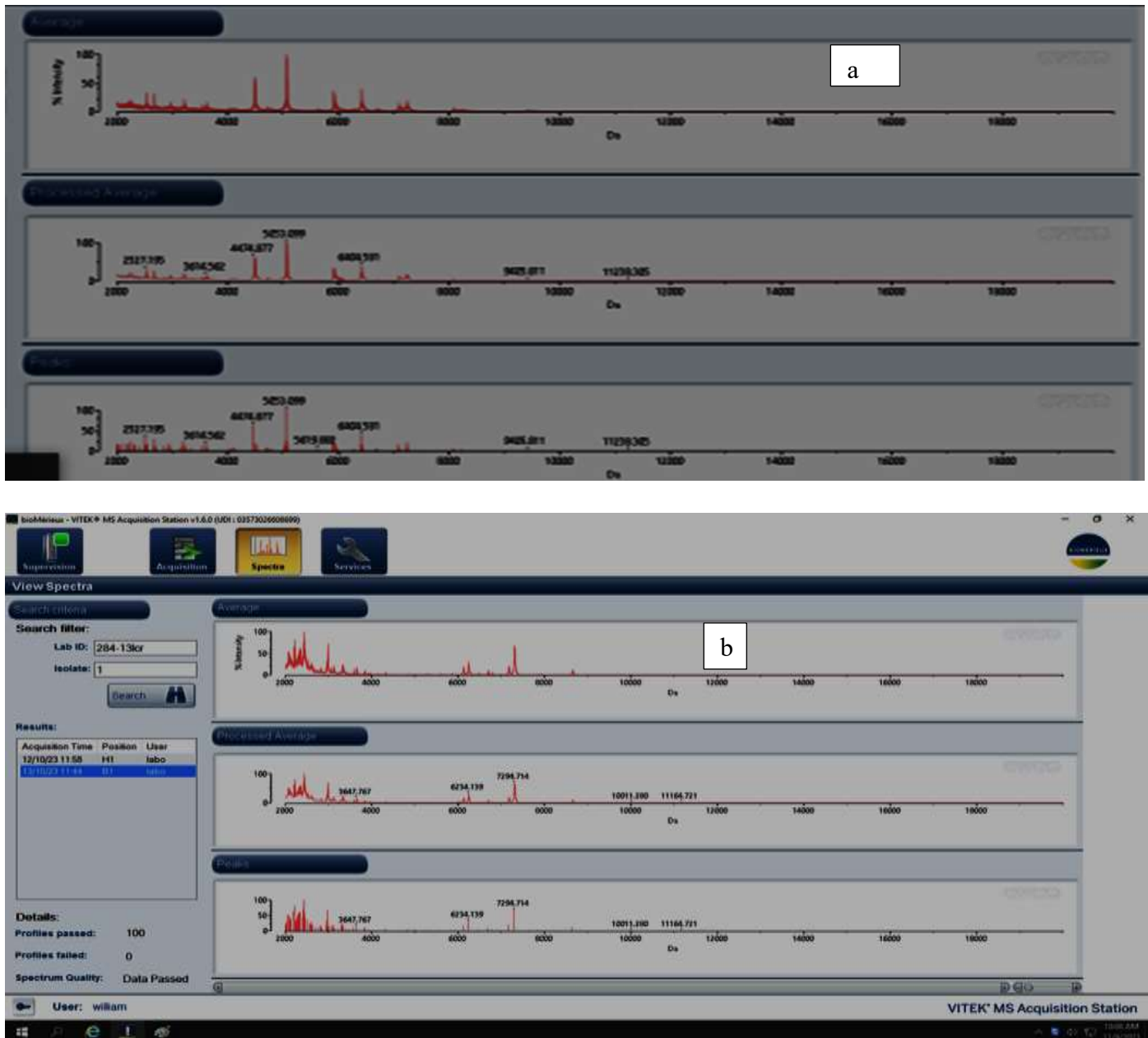


Figure 10 : a) Photo d'un spectre d'*Aspergillus fumigatus* ; b) Photo du spectre de *Trichophyton violaceum* (source présente étude)

III.2.3.2. Identification des espèces de levures

La culture a permis d'obtenir 81 isolats de levures. Trois techniques (examen macroscopique/microscopies, caractères biochimiques par Vitek2 et protéomique par Maldi-Tof) ont été utilisées pour identifier au rang de l'espèce les différentes souches.

❖ Technique classique (examen macroscopie/microscopie).

La technique classique (macroscopie/microscopie) a permis d'identifier 4,9% (4/81) souches de levures non identifiables par les caractères biochimiques et la protéomique. Ces

derniers étaient des isolats de *Malassezia furfur*. Leur identification a été possible grâce à l'observation macroscopique des lésions cliniques lors du prélèvement qui orientaient sur le type de champignon en cause. Ce diagnostic a été confirmé par l'observation directe de levures en amas et bourgeonnantes à l'objectif X100 immersion dans le produit pathologique. Après culture sur milieu de Sabouraud chloramphénicol additionné à l'huile d'olive, les colonies obtenues ont été observées au Bleu de Lactophénol à l'objectif X40 et présentaient de petites levures allongées. La (figure 11) illustre l'aspect des lésions caractéristiques lors du prélèvement et l'observation microscopique du produit pathologique.

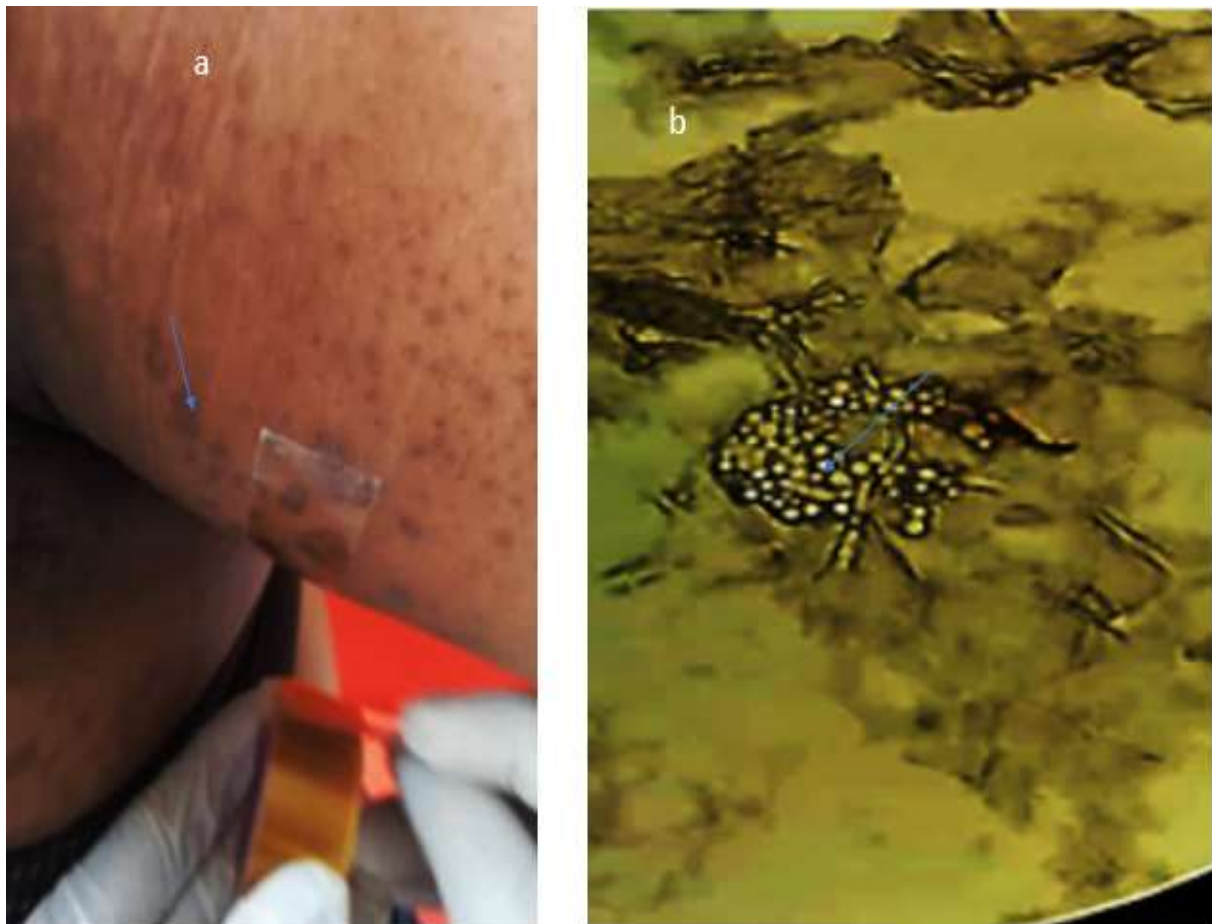


Figure 11 : a) Observation macroscopique et sotch cutané des lésion pigmentées ;
b) Observation microscopique des levures bourgeonnantes et en amas à l'objectif X100 à l'immersion
(Source présente étude)

❖ Vitek2 pour la détermination des caractères biochimiques et enzymatiques

Des 81 isolats de levures, 93,82% (76/81) étaient identifiés par Vitek2 jusqu'au rang de l'espèce. Quatre genres (*Candida*, *Kodamaea*, *Trichosporum* et le *Cryptococcus*) étaient identifiés avec 13 espèces. Les résultats détaillés sont illustrés par la (figure 12) et l'aspect

macroscopique d'une culture de levure sur milieu de Sabouraud chloramphénicol par la (figure 13).

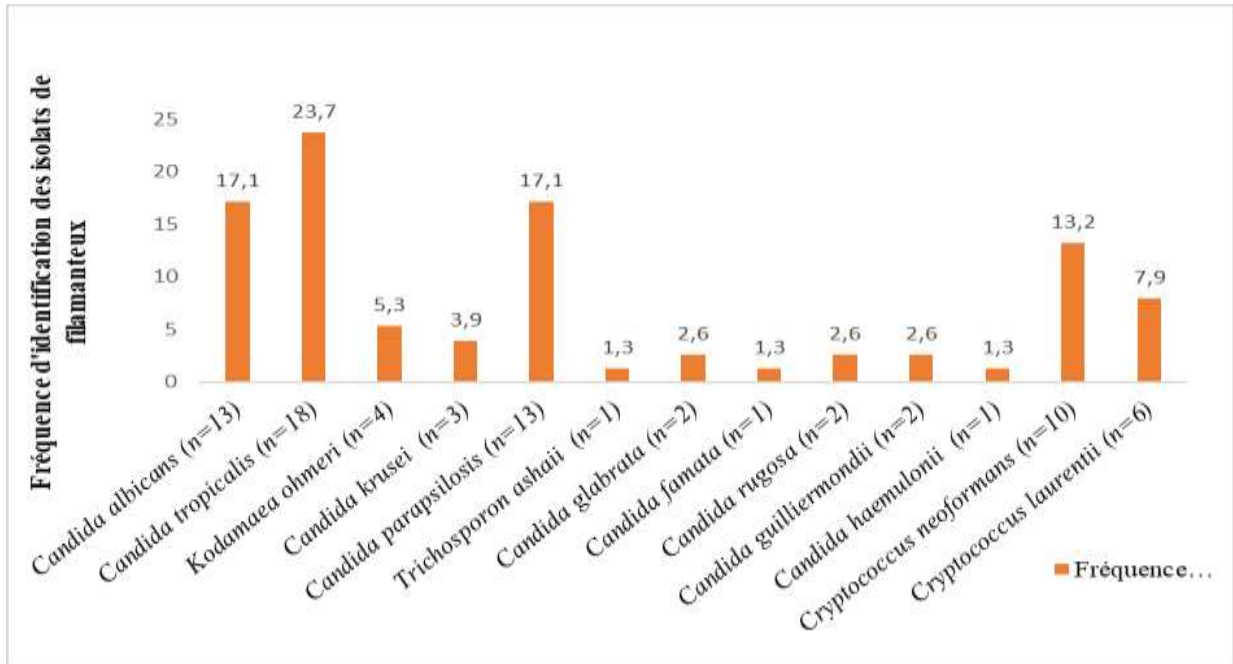


Figure 12: Différentes espèces de levures identifiées par Vitek2



Figure 13 : Aspect macroscopique d'une culture de levure sur milieu de Sabouraud chloramphénicol (source présente étude)

❖ Identification par spectrométrie de masse de type Maldi-Tof

La spectrométrie de masse avait permis d'identifier 86,4% (70/81) et rapportait, 16 espèces appartenant à 5 genres (*Candida*, *Kodamaea*, *Cryptococcus*, *Trichosporum* et *Geotrichum*). L'identification à partir des protéines a permis de différencier certaines espèces ayant des caractères biochimiques et enzymatiques très proches et non distinguables par Vitek2.

à savoir : *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis* et *Candida orthopsilosis* qui forme un complexe identifié par Vitek2 comme *Candida parapsilosis*. Une souche de *Candida tropicalis* a été identifiée comme *Candida norvegensis*. Pour des isolats de *Cryptococcus neoformans* identifié par Vitek2, Maldi-Tof avait identifié une souche comme *Cryptococcus gattii*. Une souche de levure non identifiée par Vitek2 a été identifiée comme *Geotrichum candidum*. La (figure 14) présente les résultats d'identification des isolats de levures par Maldi-Tof et la (figure 15) la photo d'un spectre de *Candida metapsilosis*.

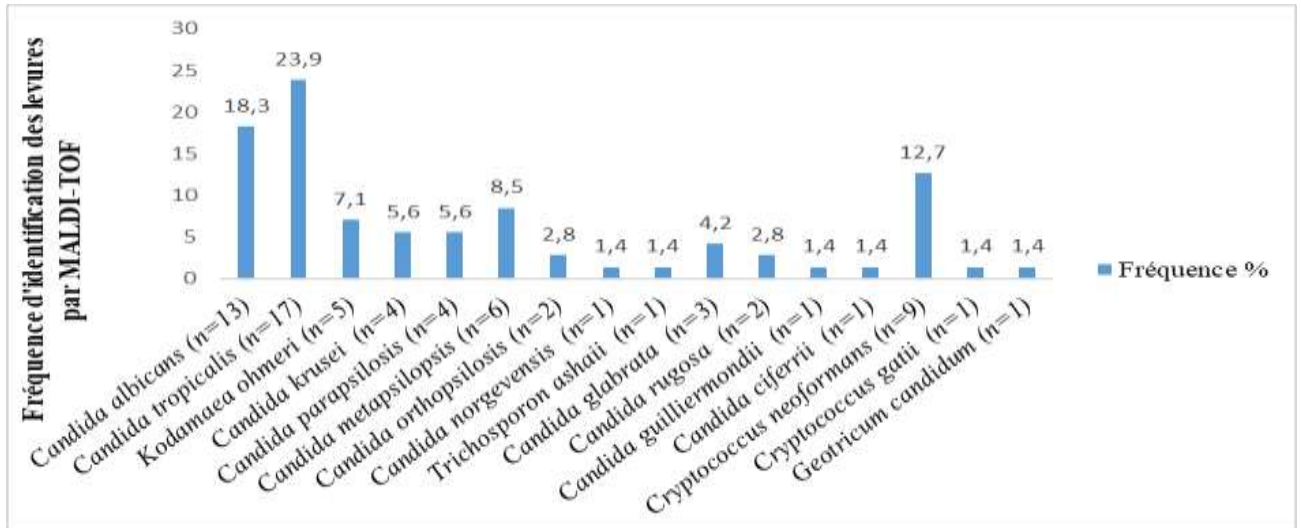


Figure 14: Différentes espèces de levures identifiées par MALDI-TOF jusqu'au rang de l'espèce.

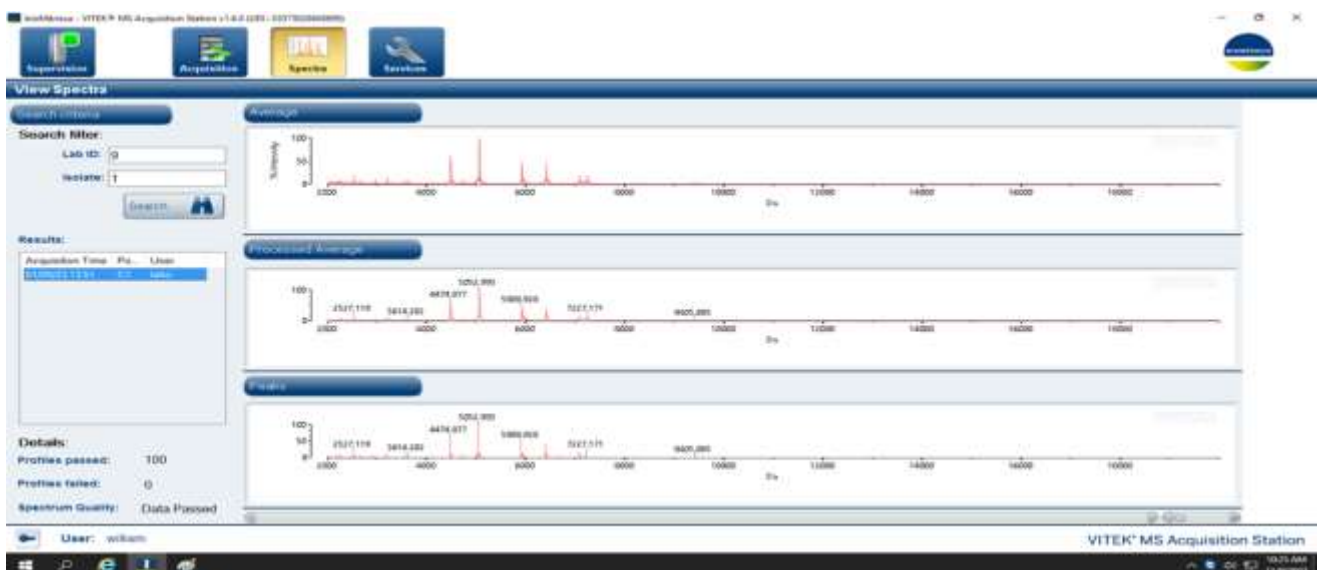


Figure 15 : photo d'un spectre de *Candida metapsilosis* source présente étude

III.3. Comparaison des techniques d'identification des champignons : technique classique et MALDI-TOF

III.3.1. Evaluation du niveau de concordance entre la technique classique (macroscopie-microscopie) et de Maldi-Tof vis-à-vis des champignons filamenteux

L'identification des champignons filamenteux a présenté une différence significative entre la technique classique et Maldi-Tof avec un accord faible (Coefficient K = 0.322 $\in$ [0.21 – 0.39] et p=0.016). A la suite de cette évaluation, les 33 champignons filamenteux isolés en culture, montraient que les deux techniques avaient présentées le même accord au rang du genre et de l'espèce dans 30,3% (10/33). Parmi lesquelles 10% (1/10) étaient non identifiables par les deux techniques (Aucun accord); et 90% (9/10) étaient identifiés au rang du genre et de l'espèce accord presque parfait). Par ailleurs, 69,7% (23/33) avaient présenté une concordance au rang du genre et une discordance au rang de l'espèce avec les deux techniques. Pour ces derniers, 26,1% (6/23) étaient identifiés par la technique classique jusqu'au rang de l'espèce mais non identifiés par MALDI-TOF (accord minimal); 73,9% (17/23) étaient tous identifiés au rang du genre par les deux techniques mais d'espèces différentes (accord faible) (Cf Tableau VII).

Tableau VII : Evaluation de la concordance d'identification des deux techniques vis-à-vis des filamenteux

Résultats Maldi-Tof				
Résultats Technique classique	Identification	Discordant	Concordant	Total
	Discordant	1	17	18
	Concordant	6	9	15
	Total	7	26	33

Coefficient Kappa=0,322 ; avec P < 0,05 ; il existe une différence significative.

La (figure 16) présente les résultats de la comparaison de la technique classique (macroscopie/microscopie) et Maldi-Tof vis-à-vis des espèces de champignons filamenteux.

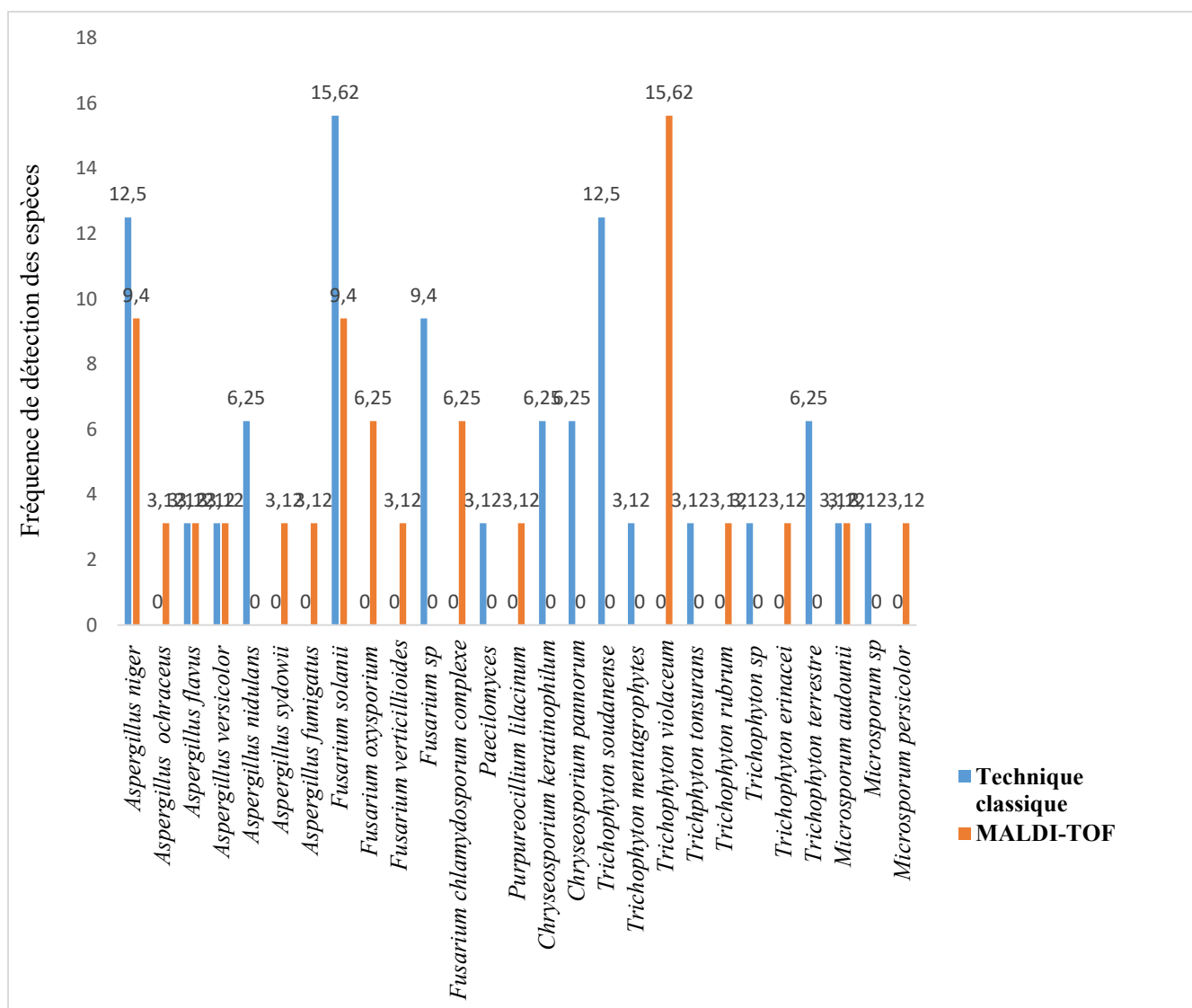


Figure 16: Comparaison de la technique classique et MALDI-TOF vis à vis des champignons filamenteux

III.3.2. Evaluation du niveau de concordance entre Vitek 2 et Maldi-Tof pour l'identification des levures.

Des 81 souches de levures, les deux techniques avaient présentées le même accord au niveau du genre et de l'espèce avec 74,1% (60/81). Parmi lesquelles 6,7% (4/60) étaient des isolats non identifiés par aucune des deux techniques (absence d'accord) et 93,3 (56/60) étaient des isolats identifiés au rang de l'espèce par les deux techniques (accord presque parfait). Par ailleurs, 25,9% (21/81) des isolats avaient présentés une concordance au rang du genre et une discordance au rang de l'espèce. Parmi ces derniers, 33,3% (7/21) avaient été identifiés jusqu'au rang de l'espèce par une seule technique (accord minimal) et 66,7% (14/21) étaient identifiés par les deux techniques avec le genre concordant et espèce discordant (accord modéré) (Cf

Tableau VIII). Il n'existe pas de différence significative entre les deux techniques d'identification car ($p=0,225 > 0,05$).

Tableau VIII: Evaluation du degré de concordance des levures par Vitek 2 et par Maldi-Tof

Résultat Maldi-Tof : levures				
Résultat Vitek 2 : levures	Identification	Discordant	Concordant	Total
	Discordant	4	14	18
	Concordant	7	56	63
	Total	11	70	81

$P < 0,05$ il existe une différence significative ; $P > 0,05$ il n'existe pas de différence significative

La figure 17 présente les résultats de la comparaison de Vitek2 et Maldi-Tof vis-à-vis des isolats de levures

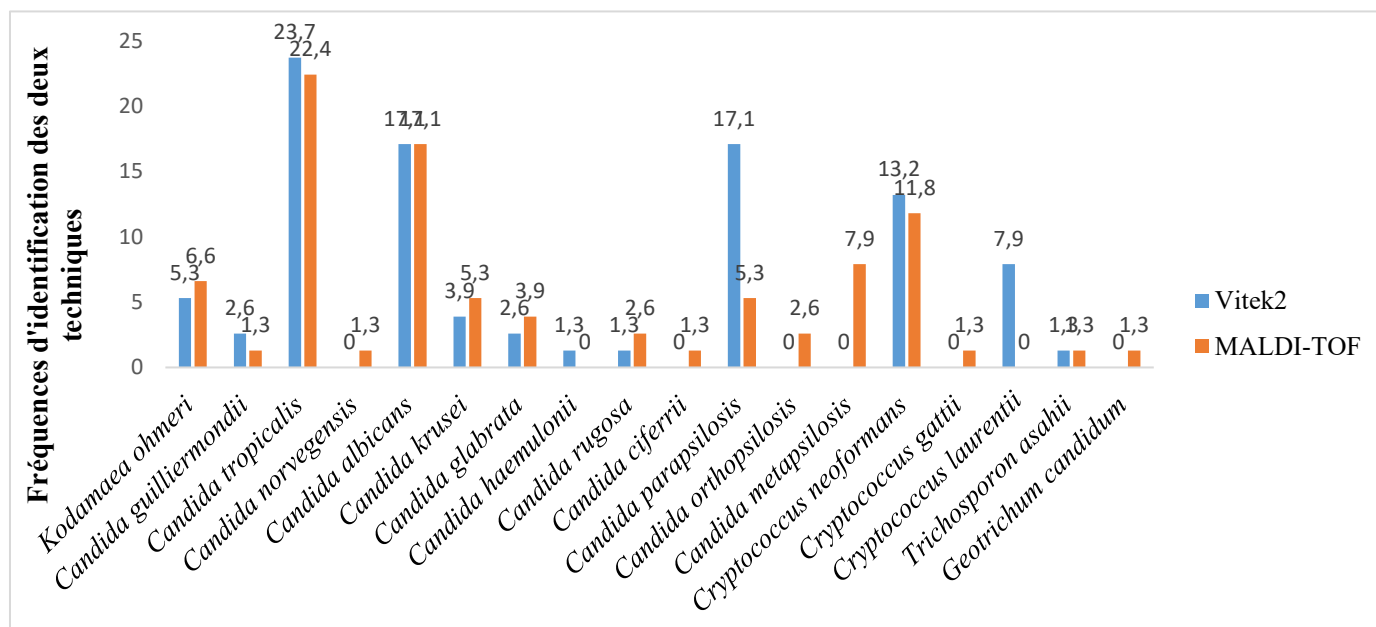


Figure 17: Comparaison de Vitek2 et MALDI-TOF vis à vis des levures

III.4. Comorbidités et facteurs d'exposition associés aux infections fongiques dans la population d'étude

III.4.1. Comorbidités

Dans cette population d'étude, certains patients présentaient des pathologies sous-jacentes et des facteurs iatrogènes. De ces pathologies : 25,7 % (63/245) étaient diabétiques ; 6,1% (15/245) présentaient une tuberculose ; et 31,8% (78/245) étaient séropositifs. La fréquence des facteurs iatrogènes observée était de : 7% (17/245) dispositifs médical, 6% (14/245) corticothérapie, 4% (9/245) chimiothérapie et 1,8% (4/245) de brûlure. Après analyse

statistique, aucune association significative entre l'infection fongique et les différentes comorbidités n'a été observée. ($P > 0,05$) voir (Tableau IX).

Tableau IX: Représentation des comorbidités avec l'infection fongique dans la population d'étude

Comorbidités	Participants à culture positive (n=87)	Fréquence %	P-value
Diabète			
Non diabétique (n=180)	73	83,9	0,075
Diabétique (n=63)	13	14,9	
Non connus (n=2)	1	1,2	
Tuberculose			
Non tuberculeux (n=230)	79	90,8	0,137
Tuberculeux (n=15)	8	9,2	
HIV			
HIV négatif (n=150)	59	67,8	0,140
HIV positif (n=78)	21	24,1	
Non connus (n=17)	7	8,1	
Facteurs iatrogènes			
Brûlure (n=4)	0	0	0,609
Chimiothérapie (n=9)	3	3,5	
Corticothérapie (n=14)	3	3,5	
Pose dispositif médical (n=17)	3	3,5	
Non connus (n=199)	78	89,5	

N : nombre de participant ; $P > 0,05$

III.4.2. Facteurs d'exposition associés aux infections fongiques dans notre population d'étude

Le Tableau VI illustre huit facteurs d'expositions qui ont présenté une association statistiquement significative avec l'infection fongique ($P < 0,05$).

❖ Groupe d'âge

La détection des champignons présentait une association significative ($P = 0,033$). La tranche d'âge la plus exposée était celle comprise entre [36-56]ans représentés par les adultes d'âge moyen (fréquence de 40,2%).

❖ **Statut social**

Il était lié à la survenue des mycoses avec $P=0,016$; les non fonctionnaires (en majorité des cultivateurs et éleveurs) étaient plus susceptibles d'être exposés aux infections fongiques à 34,5% suivi des élèves/étudiants (19,5%).

❖ **Type de patient**

Une corrélation significative ($P<0,001$) a été observée avec le type de patient, notamment chez les patients ambulatoires ou le taux de positivité en culture 67,8% qui présentaient essentiellement des infections superficielles telles que les mycoses cutanéomuqueuses.

❖ **Attitude vestimentaire**

Une association significative de la détection des champignons en fonction de l'attitude vestimentaire $P=0,033$ était remarquable, le port des chaussures fermées et prolongées était le facteur de risque le plus remarqué avec 10,3% suivi du partage des vêtements à 7% dans les infections superficielles.

❖ **Contact avec les animaux domestiques**

La contamination par contact avec les animaux domestiques était vérifiée avec $P=0,041$, le chat avait été l'animal domestique avec le taux de transmission le plus élevé pour les espèces zoophiles responsables d'infections fongiques, plus particulièrement dans les atteintes superficielles (12,6%).

❖ **Contact avec l'eau**

Les participants ayant eu un contact prolongé et régulier avec l'eau ont présenté un rapport statistiquement favorable $P=0,007$ avec la présence des mycoses.

❖ **Nombre de personne par chambre**

Le nombre de personne par chambre était un facteur de risque très élevé avec une fréquence 80,4% et $P=0,016$ dans la transmission des mycoses superficielles (dermatoses) et les infections profondes (infections pulmonaires).

❖ **Antibiothérapie prolongée**

Les participants étant sous traitement antibiotique depuis une longue période avaient présenté une liaison statistiquement significative avec la survenue des mycoses dans notre population avec $p=0,006$ avec une fréquence de 28,7% voir (Tableau X).

Par ailleurs, le sexe et la notion de piqûre transcutanée par un végétal n'avaient statistiquement aucun rapport avec l'infection fongique dans la présente étude.

Tableau X: Différents facteurs associés à l'infection fongique

Caractéristiques de la population (N=245)	Participants à culture positive (n2=87)	Fréquence %	P-value
Groupe d'âge			
[0-13[(n1=24)	12	13,8	0,044
[13-18[(n1=7)	2	2,3	
[18-36[(n1=43)	19	21,8	
[36-56[(n1=89)	35	40,2	
≥56 (n1=82)	19	21,8	
Sexe			
Masculin (n1=145)	48	55,2	0,346
Féminin (n1=100)	39	44,8	
Statut social			
Enfants moins de 4ans (n1=9)	6	7	0,016
Elève/étudiant (n1=43)	17	19,5	
Fonctionnaires (n1=31)	16	18,4	
Non fonctionnaires (n1=87)	30	34,5	
Retraité (n1=41)	7	8	
Sans emploi (n1=34)	11	12,6	
Type de patients			
Ambulatoire (n1=114)	59	67,8	0,000
Hospitalisé (n1=131)	28	32,2	
Attitude vestimentaire			
Port des chaussures fermées (n1=13)	9	10,3	0,033
Marche pied nu (n1=13)	4	4,6	
Partage des vêtements (n1=7)	6	7	
Non renseignés (n1=212)	68	78,1	
Contact avec les animaux domestiques			
Chat (n1=16)	11	12,6	0,041
Chien (n1=3)	2	2,3	
Volaille (n1=6)	1	1,1	
Non renseignés (n1=220)	73	83,9	
Contact avec l'eau			
Contact (n1=20)	13	14,9	0,007
Pas de contact (n1=219)	73	83,9	
Non renseignés (n1=6)	1	1,2	
Nombre de personne par chambre			
1 à 2 (n1=35)	7	8	0,016
3 à 5 (n1=191)	70	80,4	
> 5 (n1=13)	9	10,3	
Non renseignés (n1=6)	1	1,2	
Piqûre transcutanée par un végétal			
Non exposés (n1=233)	82	94,3	0,725
Exposés (n1=9)	4	4,6	
Non renseignés (n1=3)	1	1,1	
Antibiothérapie prolongée			
Non exposé (n1=143)	62	71,3	0,006
Exposés (n1=98)	25	28,7	
Non renseignés (n1=4)	0		

N : nombre total de participant ; n₁ : nombre de participant par caractéristique ; n₂ : nombre de participant positif par caractéristique ; P< 0 ,05 il existe une association statistiquement significative

III.5. Discussion

L'identification au rang de l'espèce avec les deux techniques était fonction du temps d'apparition des différentes caractéristiques propres à chacun. La technique classique (macroscopie/microscopie) nécessitait un temps plus long (3 à 5 jours pour les moisissures et 5 à 15 jours pour les dermatophytes). La protéomique par Maldi-Tof était faite à partir d'une croissance visible du champignon (2 à 5 jours). Au total la culture a révélé 33 isolats de filamenteux avec 34,6% de dermatophytes et 65,4% de moisissures. Aucun champignon dimorphique n'a été retrouvé dans cette étude. Ce résultat est inférieur à celui trouvé dans les travaux de Kouotou (2016) dans une étude au Cameroun qui montraient que les dermatophytes représentaient 91,3% (**Kouotou et al., 2016**). Cette discordance observée serait due à la diversité des échantillons superficiels collectés dans la présente étude.

Les moisissures identifiées au rang de l'espèce avec les deux techniques montraient que Maldi-Tof avait identifié plus d'espèce que la technique classique. Les travaux antérieurs de **Lau (2013)** réalisés en France ont permis la distinction par spectrométrie de masse de différentes espèces d'*Aspergillus* de la section fumigatus non distinguables en microscopie optique. Ces résultats sont en accord avec les résultats de la présente étude, où les deux souches d'*Aspergillus nidulans* identifiées avec les caractères phénotypiques ont présenté deux espèces d'*Aspergillus* différentes avec MALDI-TOF *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus sydowii*. La spectrométrie de masse identifie à partir de la protéine (**Lau et al., 2013**), alors que l'identification classique utilise les caractères morphologiques de la conidiogénèse.

Le genre *Trichophyton* était majoritairement représenté avec en tête 12,5% de souches identifiées comme *Trichophyton soudanense* par technique classique et comme *Trichophyton violaceum* par Maldi-Tof. Ces résultats sont similaires à ceux de **Dugat (2014)** obtenus dans une étude antérieure en France où *T. soudanense* identifié par Maldi-Tof comme étant *T. violaceum*. Cette identification erronée par Maldi-Tof trouverait son explication dans l'absence de spectres de *T. soudanense* dans la base de données du fabricant (**Dugat, 2014**).

L'identification des champignons filamenteux a présenté une différence significative entre la technique classique et Maldi-Tof avec un accord faible (Coef K = 0.325 $\in$ [0.21 – 0.40] et p=0.016). L'évaluation du niveau de concordance entre la macroscopie/microscopie et Maldi-Tof vis à vis des filamenteux montrait une concordance presque parfaite de 27,3% (9/33) par les deux techniques. Une concordance au rang du genre et discordance au rang de l'espèce

51,5% (17/33), et 18,2% (6/33) d'isolats non identifiées par Maldi-Tof mais identifiées par macroscopie/microscopie.

Nos résultats sont en désaccord avec les résultats de L'Olivier (2017) qui ressortent que des isolats cliniques de dermatophytes ont été identifiés avec un score de 97,8% dans une étude antérieure par MALDI-TOF (L'Ollivier et Ranque, 2017). Les résultats de Taghi (2019) en Iran montrent que pour 93 isolats cliniques de dermatophytes isolés des échantillons (peau, ongles et cheveux), l'identification au niveau de l'espèce et du genre présentait 40,9 et 83,9% respectivement (Taghi *et al.*, 2019). Le taux de concordance réduit dans la présente étude pourrait s'expliquer par le nombre réduit d'isolat de dermatophytes soumis à l'analyse spectrale, à la différence géographique vu la variabilité climatique et épidémiologique, ou serait dû, à la faible quantité du protéome obtenue pendant la phase de prétraitement d'extraction induit par la consistance élastique de certaines souches qui n'ont pas été identifiées par Maldi-Tof.

La spectrométrie de masse a permis de réaliser l'identification après obtention de la colonie de levure avec un temps d'analyse de 5 min à 1 heure contre 24 à 72h avec Vitek2. Pour ce qui est des levures identifiées simultanément avec les deux techniques au rang de l'espèce, *Candida tropicalis* occupait la première place, suivi de *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. Néanmoins quelques discordances ont été relevées avec des souches de levures identifiées par Vitek2. Le taux d'identification des levures avec MALDI-TOF était de 86,4% contre 80% avec Vitek 2, malgré que le taux de MALDI-TOF soit supérieur à celui de Vitek 2, il n'existe pas de différence statistiquement significative. Les travaux de Maenchantrath (2020) montrent des résultats similaires concernant l'utilisation des deux méthodes pour l'identification des levures avec un taux d'identification 100% MALDI-TOF et 93,2% Vitek2 (Maenchantrath *et al.*, 2020). Les travaux antérieurs de Meng (2016) en Chine montrent une identification erronée de *Cryptococcus laurentii* par Vitek 2 et non identifiable par MALDI-TOF. Ces résultats sont en accord avec les résultats de la présente étude. Ces résultats similaires démontrent la limite des caractères biochimiques pour l'identification des levures rares et fait appel aux techniques de biologie moléculaire et de séquençage pour la caractérisation des levures émergentes qui possèdent aussi bien un pouvoir de dissémination car isolées dans différents types d'échantillons. (Meng Xiao *et al.*, 2016). La performance de MALDI-TOF dans l'identification des levures permet la discrimination des souches possédant des espèces cryptiques réunies au sein de complexes d'espèces. Les travaux récents de Samantary (2022) réalisés au Sud de l'Inde présentaient une fréquence de détection 89/114(78,1%) *Candida*

Parapsilosis, 15, 8% (18/114) *Candida orthopsilosis* et 6,1% (7/114) *Candida metapsilosis* pour les souches de *Candida parapsilosis* (**Samantary, 2022**). Ces résultats sont en désaccord avec ceux trouvés dans la présente étude. La faible fréquence obtenue pourrait s'expliquer avec l'incidence des infections à *Candida parapsilosis* complexe qui varie selon de multiples facteurs tels que l'âge, la maladie sous-jacente des patients et les conditions climatiques et même socioéconomiques décrit dans la littérature.

Les facteurs de risques des maladies fongiques étudiés étaient intrinsèques et extrinsèques. Le groupe d'âge le plus exposé était [36-56[ans avec une fréquence de 40,2% suivi des personnes âgées >56 ans de 21,8%, Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Herault (2021)** qui avait trouvé des données similaires chez les personnes âgées. Ceci est dû au fait que l'âge avancé affaiblit l'organisme en entraînant la baisse de l'immunité chez ces derniers et les rend plus exposés aux infections fongiques. De même, cet âge est celui de la responsabilité ou les activités sont intenses. Le constat est observé avec le statut social ou les non fonctionnaires étaient le plus exposés, le contact avec les animaux domestiques, les attitude vestimentaires (port des chaussures fermées). Leur exposition était causée par les activités agricoles et d'élevages ; qui pourraient expliquer les sources de contamination par des champignons zoophiles, telluriques et de l'environnement. Les conditions de vie précaire (3 à 5 personnes par chambre) étaient le moyen de transmission de ces infections (**Herault,2021**), L'analyse statistique avec $P= 0,346$ montre que le sexe n'était pas un facteur d'exposition aux infections fongiques dans notre étude. Kone (2015) avait obtenu les mêmes résultats en Côte d'Ivoire dans une étude sur les mycoses superficielles (**KONE, 2015**). L'analyse statistique avec $P>0,05$ montre que les maladies sous-jacentes n'étaient pas des facteurs de risque aux infections fongiques. A l'inverse, les travaux de Kammalac (2015) au Cameroun menés chez des patients VIH+ présentaient une corrélation entre le VIH et les infections fongiques invasives (**Kammalac et al., 2015**). Ce désaccord serait dû au fait que l'étude était réalisée dans une population ciblée chez les patients VIH+ bien connue par contre notre échantillonnage prenait en compte tout patient quel que soit le statut sérologique.

CONCLUSION

Arrivé au terme de cette étude, les levures représentaient 71% et les champignons filamenteux 29%. La plupart des levures ont été identifiées au rang de l'espèce par les deux techniques et quelques discordances ont été observées. Pour ce qui est des souches identifiées simultanément avec les deux techniques, *Candida tropicalis* occupait la première place avec une fréquence de 23,7%, suivi de *Candida albicans* 16% et *Cryptococcus neoformans* à 12,3%. Les souches de *Malassezia furfur* étaient non identifiées par les deux techniques mais plutôt par macroscopie/microscopie. Il ressort dans la littérature qu'une identification au rang de l'espèce est capitale dans le suivi de la résistance des souches aux antifongiques lorsqu'un traitement précoce et approprié est administré. Elle permet sur le plan de la recherche de suivre l'épidémiologie de levures émergentes. Chez les champignons filamenteux, les moisissures représentaient 65,4%. Parmi les isolats identifiés simultanément par les deux techniques, *Fusarium solanii* et *Aspergillus niger* avaient une même fréquence d'identification 9,4%. Les dermatophytes avaient une fréquence de 34,6% représentés majoritairement par 12,5% *Trichophyton soudanense* identifié par macroscopie/microscopie.

L'évaluation du degré de concordance montre que la détermination des caractères biochimiques donne des résultats similaires à ceux de la protéomique pour une grande proportion d'isolats de levures. Il demeure une proportion considérable de discordance entre les deux techniques. Vitek2 réussit tout de même à identifier certaines souches non identifiées par le Maldi-Tof ; mais la biologie moléculaire n'a pas totalement confirmé ces identifications dans d'autres études. Nous observons une similitude faible entre l'identification par la macroscopie/microscopie et le Maldi-Tof vis-à-vis des champignons filamenteux. Toutefois, Maldi-Tof possède un temps d'analyse raccourci dû à la possibilité qu'il a de permettre l'identification à partir d'une culture jeune, ce qui nécessite parfois plusieurs semaines avec la macroscopie/microscopie. La grande discordance révèle la nécessité de l'étude comparée au résultat d'un gold standard (analyse moléculaire). L'ajout de nouveaux spectres dans la base de données de Maldi-Tof permettra de pallier aux problèmes de discordances et de non identifications observées. Il en ressort des études antérieures avec la biologie moléculaire que cette discordance serait en faveur de MALDI TOF. La rapidité, la fiabilité, le faible coût à long terme et l'utilisation facile de MALDI-TOF pourront faire de cette technique une méthode de référence dans l'identification des champignons microscopiques en routine au laboratoire de Mycologie.

Les facteurs de risques des maladies fongiques sont diversifiés parmi lesquels (âge, statut social, contact avec les animaux domestiques, attitude vestimentaire, nombre de personne par chambre, antibiothérapie prolongée) étaient significativement associés à la survenue de l'infection avec une Plus-value ($P < 0,05$). Les facteurs intrinsèques et extrinsèques affaiblissent l'organismes et l'expose aux multiples infections fongiques quel que soit la localisation. Par ailleurs aucune comorbidité n'a été observée entre les maladies sous-jacentes et l'infection fongique dans cette étude.

Perspectives

Dans l'avenir, il serait utile de poursuivre cette étude afin de :

- Réaliser les tests de sensibilités aux antifongiques des souches isolées.
- Utiliser la spectrométrie de masse pour la détermination de la fréquence des levures isolées à partir des échantillons de l'hémoculture et d'urine respectivement dans les cas de fongémies et de candiurie.
- Rechercher d'autres facteurs de risques responsables d'infections fongiques.
- Augmenter le nombre d'isolats par genre afin d'avoir une meilleure représentativité des différents types de champignons et faire une caractérisation par biologie moléculaire.

Suggestions

Au terme de notre travail et au vu de nos résultats, nous suggérons :

❖ Aux autorités sanitaires ;

- D'organiser des activités de sensibilisation sur les facteurs de risque et d'aggravation des mycoses ;
- De renforcer les capacités du personnel médical pour le diagnostic et la prise en charge des mycoses.

❖ Aux chercheurs microbiologistes

- De multiplier les recherches à but diagnostic pour obtenir de nouveaux champignons émergents.
- D'enrichir les bases de données Maldi-Tof afin de faciliter l'identification des champignons filamenteux et levures dans les laboratoires de mycologie pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients par les cliniciens.

❖ A la population :

- De se faire consulter en cas de toute suspicion d'infections mycosiques,
- D'avoir une bonne hygiène corporelle et vestimentaire afin d'éviter la survenue de mycoses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barenfanger, J., Drake, C., Kacich, G. (1999). Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology*, 37(5), 1415-1418. doi: 10.1128/jcm.37.5.1415-1418.1999
- Chabasse, D., Bouchara, J., Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. (2002). Les Moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale*, (25), 161.
- Iwen, P., Hinrichs, S., Rupp, M. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40, 87-109.
- Chabasse, D., Bouchara, J., Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. (2004). Les Dermatophytes. *Cahier de Formation Biologie Médicale*, (31), 159.
- Djeridane, A., Djeridane, Y., Ammar-Khodja, A. (2006). Epidemiological and aetiological study on tinea pedis and onychomycosis in Algeria. *Mycoses*, 49(3), 190-196. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01230.x.
- Raad, I., Hachem, R., Herbrech, R., Graybill, J., Hare, R., Corcoran, G., Kontoyiannis, D. (2006). Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin Infect Dis*, 42(10), 1398-1403. doi: 10.1086/503425.
- López, M., Méndez, T., (2007). Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol*, 25(2), 188-194. doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.05.007.
- Pasqualotto, A., De Moraes, A., Zanini, R., Severo, L. (2007). Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 28(7), 799-804. doi: 10.1086/516658.
- Menan, H., Ekaza, E., Messou, E. (2008). Recherche de *Candida dubliniensis* chez des patients VIH+ à Abidjan (Côte d'Ivoire) Search for *Candida dubliniensis* in HIV+ patients in Abidjan (Ivory Coast). *Mycologie Médicale*, 18(4), 228-233.
- Neji, S., Makni, F., Cheikhrouhou, F., Sellami, A., Sellami, H., Marreckchi, S., Turki, H., Ayadi, A. (2009). Epidemiology of dermatophytoses in Sfax, Tunisia. *Mycoses*, 52(6), 534-538. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01651.x.
- Bouchara, J., Pihe, t M., Gentile, L., Cimon, B., Chabasse, D. (2010). Les Levures et Levuroses. *Cahier de Formation Biologie Médicale*, 44, 201.

- Grover, C., Arora, P., Manchanda, V. (2010). Tinea capitis in the pediatric population: a study from North India. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology*, 76(5), 527-532. doi: 10.4103/0378-6323.69078.
- Déveloux, M., Enache-Angoulvant, A. (2011). Le diagnostic biologique des mycétomes. Biological diagnosis of mycetoma. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011(430), 61-67. doi: [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)70826-7](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)70826-7).
- Theel, E., Hall, L., Mandrekar, J., Wengenack, N. (2011). Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4067-4071. doi: 10.1128/jcm.01280-11.
- Qian, J.E., Cutler, J.E., Cole, R.B., Cai, Y. (2008). Maldi-Tof mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal Bioanal Chem*, 392 (3), 439-49. doi:10.1007/s00216-008-2288-1.
- Coleman, D., Sullivan, D., Moran, G. (2012). Candida albicans versus Candida dubliniensis: why is C. albicans more pathogenic. *International Journal of Microbiology*, 2012(17), e205921. doi: 10.1155/2012/205921.
- Dodds, A., Drew, E., Johnson, R., Dann, M., Dabrowski, Walker, D., Prasad, V., Alexander, M., Papadopoulos, B., Perfect, G. (2012). Cost of invasive fungal infections in the era of new diagnostics and expanded treatment options. *Pharmacotherapy*, 32(10), 890-901. doi: 10.1002/j.1875-9114.2012.01124.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(16), 6241-6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109.
- Clark, A. K., E., Arora, A., Wolk, D. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Revu*, 26(3), 547-603. doi: 10.1128/cmr.00072-12.
- Lau, A., Drake, S., Calhoun, L., Henderson, C., Zelazny, A. (2013). Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3), 828-834. doi: 10.1128/jcm.02852-12.
- Massou, S., Ahid, S., Azendour, H., Bensghir, M., Mounir, K., Iken, M., Lmimouni, B.E., Balkhi, H., Drissi, K.N., Haimeur, C. (2013). Les candidoses systémiques en réanimation médicale : analyse des facteurs de risque et intérêt de l'index de colonisation. Systemic candidiasis in medical intensive care unit: Analysis of risk

- factors and the contribution of colonization index de colonisation. *Pathologie Biologie*, 61(3), 108-112. doi: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.010>.
- Monod, M., Baudraz-Rosselet, F., Lurat, M. (2013). Diagnostic des onychomycoses à moisissures et importance pour le traitement. *Médecine Suisse*, 9, 730-733.
- Beam, A., Djazerndjaballah-Lali, H. (2014). Épidémiologie des teignes du cuir chevelu de la banlieue de Tipasa, Algérie Epidemiology of Tinea capitis in the suburbs of Tipasa, Algeria. *Mycologie Médicale*, 24(2), 141-143.
- Chegour, H., El Ansari, N., El Mghari, G., Tali, A., Zoughaghi, L., Sebbani, M., Amine, M. (2014). What agents incriminated in athlete's foot? Survey of consulting diabetic patients in CHU Mohammed VI Marrakech. *Pan African Medical Journal*, 17, 228. doi: 10.11604/pamj.2014.17.228.3131.
- Petinataud, D., Berger S., Contet-Audonneau, N., Machouart, M. (2014). Molecular diagnosis of onychomycosis. *Journal de Mycologie Médicale*, 24(4), 287-295. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.10.008.
- Sigurgeirsson, B., Baran, R. (2014). The prevalence of onychomycosis in the global population: a literature study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 28(11), 1480-1491. doi: 10.1111/jdv.12323.
- Tortorano, A., Prigitano, A., Esposto, M., Arsic Arsenijevic, V., Kolarovic, J., Ivanovic, D., Paripovic, L., Klingspor, L., Nordøy, I., Hamal, P., Arikan, S., Ossi, C., Grancini, A., Cavanna, C., Lo Cascio, G., Scarparo, C., Candoni, A., Caira M., Drogari, M. (2014). European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(9), 1623-1630. doi: 10.1007/s10096-014-2111-1.
- Kammalac, T., Dongtsa, J., Kouanfack, C., Tonfack, C., Fomena, S., Mallié, M., Delaporte, E., Boyom, F., Bertout, S. (2015). Cryptococcal meningitis in Yaoundé (Cameroon) HIV infected patients: Diagnosis, frequency and *Cryptococcus neoformans* isolates susceptibility study to fluconazole. *Journal of medical mycology*, 25(1), 11-16. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.10.016.
- Mandengue, C., Takuefou, B., Nouédoui, C., Atangana, P. J. (2015). Histoplasmosse disséminée traitée par bolus de fluconazole. *Médecine et Santé Tropicales*, 25, 110-111. doi: 10.1684/mst.2014.0332.
- Develoux, M. (2016). Les mycétomes et leur traitement. Mycetoma and their treatment. *Mycologie Médicale*, 26(2), 77-85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.03.005>.

- Kouotou, E., Fokoua, D., Kechia, F., Somo, M. (2016). Teigne du cuir chevelu : profil épidémiologique en milieu scolaire camerounais. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 143(4), 542.
- Meng Xiao., X.-X., He Wang., Li Zhang., Zhi-peng Xu., Timothy Kudinha., Fanrong Kong., et Ying-Chun Xu. (2016). Erreur d'identification d'une espèce rares, *Cryptococcus laurentii*, par des méthodes biochimiques commerciales couramment utilisées et des matrices de désorption laser assistée par matrice-temps des systèmes de spectrométrie de masse en vol: défis pour les laboratoires de mycologie clinique. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), P226-229. doi: doi:10.1128/JCM.01830-15.
- Petinataud, D., Berger, S., Ferdynus, C., Debourgogne, A., Contet-Audonneau, N., Machouart, M. (2016). Optimising the diagnostic strategy for onychomycosis from sample collection to FUNGAL identification evaluation of a diagnostic kit for real-time PCR. *Mycoses*, 59(5), 304-311. doi: 10.1111/myc.12471.
- Spatafora, J., Chang, Y., Benny, G., Lazarus, K., Smith, M., Berbee, M., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T., O'Donnell, K., Roberson, R., Taylor, T., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M., Stajich, J. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046. doi: 10.3852/16-042.
- Berny, L., Benjelloun, H., Zaghba, N., Yassine, N. (2017). Les différents aspects radiologiques de l'aspergillose pulmonaire. *Revue des Maladies Respiratoires*, 34, 103.
- De Hoog, G., Duki, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrick, M., Kupsch, C., Stielow, J., Freeke, J., Göker, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., Gräser, Y. (2017). Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182(1-2), 5-31. doi: 10.1007/s11046-016-0073-9.
- Kouotou, E., Kechia, F., Iwewe, Y., Nguena, U., Nansseu, J., Somo, R. (2017). Profil mycologique des onychomycoses vues en consultation de dermatologie à Yaoundé, Cameroun mycological profile of onychomycosis in Yaoundé, Cameroon. *Mycologie Médicale*, 27(2), 238-244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.03.002>.
- Santos, C., Parterson, R.R., Venância, A., Lima, N. (2010). Filamentous fungal characterization by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol.* 108 (2). 375-85. doi: 10.1111/j.1365-262672.2009.04448.x.
- Nivoix, Y., Levêque, D., Herbrecht, R., Ubeaud-Séquier, G. (2018). Traitement des infections fongiques invasives et superficielles. *Pharmacie clinique et thérapeutique*, 32.
- Akoua, V., Kiki-Barro, P., Konaté, A., Kpongbo, E., Kondo, F., Bosson-Vanga, H., Asouhoun, J., Vincent, D., Yavo, W., Eby, I. (2019). Clinical and etiological aspects of intertrigos

- caused by fungal infections in Abidjan (Cote d'Ivoire). *Pan African medical journal*, 33, 198. doi: 10.11604/pamj.2019.33.198.19090.
- Bandad, F., Raiss, C., Moustachi, A., Lyagoubi, M., Aoufi, S. (2019). Forty cases of neuromeningeal cryptococcosis diagnosed at the Mycology-Parasitology Department of the Ibn Sina hospital in Rabat, over a 21-year period. *Pan African Medical Journal*, 33, 249. doi: 10.11604/pamj.2019.33.249.18011.
- Pasternak, J. (2012). New methods of microbiological identification using Maldi-Tof. *Einstein* (Sao Paulo), 10(1),118-9.
- Bennani, R., Elboukhari, K., Oudrhiri, S., Benjabbor, F., Elloudi, S., Baybay, H., Mernissi, F., Rabhi, S., Alami, N., khammar, Z., Berrady, R., Tlemçani, Z. (2020). Un cas de cryptococcose disséminée avec manifestations cutanées inaugurales révélant une infection par le VIH. *Pharmacy And Biological Sciences*, 15(1), 61-64.
- Cardot, M. (2020). Identification des micro-organismes pathogènes par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale. *Planete et vie*.
- Fatima-Zahra, A., Tétouan, M. (2020). Chromomycose au Maroc: un nouveau cas. *Pan African Mycology Journal-Clinical Medecine*, 2.
- Maenchantraratn, C., Nutalai, D., Samosornsuk, W., Sakoonwatanyoo, P. (2020). Identification of yeasts from clinical samples using Maldi-Tof MS. *Vajira Medical journal: journal of Urban Medicine*, 64(4), P297-310.
- Chloé, B. (2021). Syndromes mycotoxiques de latence courte : des syndromes à ne pas négliger. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 33(3). doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2021.06.070>.
- Chularojanamontri, L., Pattanaprichakul, P., Leeyaphan, C., Suphatsathienkul, P., Wongdama, S., Bunyaratave, S. (2021). Overall prevalence and prevalence compared among Psoriasis Treatments of onychomycosis in patients with nail psoriasis and fungal involvement. *Biomedical research international*, 2021, 12. doi: <https://doi.org/10.1155/2021/9113418>.
- Dromer, F., Lortholary, O., Bretagne, S. (2021). Centre National de Référence Mycoses Invasives et Antifongiques. *Rapport annuel d'activité*, 102.
- Dufresne, P., Guy St-G. (2021). Identification des champignons d'importance médicale. *Institut national de santé publique du Québec*, 1-61.
- Alby-Laurent., F. (2022). Infections fongiques invasives chez l'enfant immunodéprimé en hématologie pédiatrique : recommandations de prise en charge au sein des centres de la SFCEInvasive fungal infections in immunocompromised children in paediatric

- haematology: Recommendations for management in SFCE centres. *Bulletin du Cancer*, 109(11), 1109-1124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2022.08.004>
- Aubry, P., Gaüzère B-A. (2022). Mycoses profondes *Médecine tropicale*.
- Chabasse, D., Bouchara, J. (2022). Taxonomie des dermatophytes: de Raymond Sabouraud à nos jours. . *Revue Francophone des Laboratoires*, 2022(539), 22-30. doi: [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(22\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(22)00061-2).
- Sammantary, S. (2022). Evaluation of MALDI-TOF MS for identification of species in the *Candida parapsilopsis* complex from candidiasis cases. *The journal of Applied Laboratory Medicine*, 7(4), P889-900. doi: <https://doi.org/10.1093/jalm/jfac005>.
- Chabasse, D. (2013). Apport de l'examen direct dans les mycoses superficielles et profondes. *Biologie Médicale* 1(4), 250-255.
- Soorajee, A. (2012). Rôle du Pharmacien d'officine dans la prise en charge des *onychomycoses*. *Adaptation des Stratégies selon L'origine Géographique*. "Thèse de doctorat", Université de Lorraine, Nancy.
- ISO: 11133 (2014). Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture.
- Dugat, M. (2014). Apport de la spectrométrie de masse et de la biologie moléculaire à l'identification des champignons filamenteux au laboratoire de mycologie médicale. "Thèse de doctorat", Université de Limoges.
- Kone, M. (2015). Aspects Epidémiologiques des Mycoses Superficielles chez les patients Reçus à l'institut Pasteur de Cote D'Ivoire (1990-2009). "Thèse de doctorat", Université Felix Houphouët-Boigny, Cote D'Ivoire (1732/15).
- Thomas, B. (2017). Etude épidémiologique des infections à *Fusarium* au CHRU de Nancy sur 10 ans et identification moléculaire d'espèces. "Mémoire du Diplôme d'étude spécialisées en Biologie Médicale", Université de Lorraine, Nancy. Retrieved from <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931918/document>.
- Microbiologie., S. F. d. (2018). Bactériémie et fongémie-hémoculture in: *Référenciel de microbiologie*: Société française de microbiologie ed., pp. 965.
- Perkins, J.R., Smith.B.,Gallagher, R.T., Jones, D.S., Dvis, S.C., Hoffman,A.D., Tomer, K.B. (1993). Application of electrospray mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization time -of-flight mass spectrometryfor molecular weight assignment of peptides in complexesmixtures. *J Am Soc Mass Spectrom.* 4(8). 670-84 doi: 10.1016/1044-0305(93) 85032-s.

- Herault, E. (2021). Mise en place du séquençage en routine dans le service de mycologie du CHU de Limoges pour le diagnostic de champignons d'identification difficile. "*Thèse de doctorat*", Limoges.
- Dekkar, K. (2022). La spectrométrie de masse MALDI TOF et ses applications dans la mycologie clinique. "*Master*", Université Frères Mentouri Constantine, République Algérienne Démocratique et Populaire.
- Lindsay, B. (2015). La Corticothérapie : Précautions d'emploi et conseils à L'officine: Étude sur la qualité de vie de patients sous corticothérapie prolongée. "*Thèse de doctorat*", Université de Lorraine.
- Lu, P., Yankey, D., Jeyarajah, J., O'Halloran, A., Elam-Evans, L., Greby, S., Singleton, J., Murphy, T. (2015). *Hepatitis B vaccination among adolescents 13-17 years, United States, 2006-2012*, Vaccine, 33(15), 1855-64.
- McHugh. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem medicinal (Zagreb)*, 22(3), 276-82.
- Nancy, M., Petry, A. (2002). Comparison of young, middle-aged, and older adult treatment-seeking pathological Gamblers. *The Geoontologist*, 42(1), 92-99.
- Galland, B., Taylor, B., Elder, D., Herbison, P. (2012). Normal sleep patterns in infants and children: a systematic review of observational studies. *Sleep medicinal revue*, 16(3), 213-22.

ANNEXES

Annexe 1 : Clairance Ethique CEN° 1291 / CRERSHC/2022

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix – Travail – Patrie

MINISTRE DE LA SANTE PUBLIQUE

SECRETARIAT GENERAL

COMITE REGIONAL D'ETHIQUE DE LA
RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE DU CENTRE

Tél : 222 21 20 87/ 677 94 48 89/ 677 75 73 30



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace – Work – Fatherland

MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

SECRETARIAT GENERAL

CENTRE REGIONAL ETHICS COMMITTEE
FOR HUMAN HEALTH RESEARCH

CE N° **1291** /CRERSHC/2022

Yaoundé, le **20 DEC 2022**

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: « **Evaluation de deux méthodes d'identification des champignons : caractérisation classique et détermination du profil protéomique** », soumis par Madame/Mademoiselle **SOKENG JIOFACK Marie Esther**.

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'Ethique 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'Ethique pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé;
- et soumettre le rapport final de l'étude au Comité Régional d'Ethique 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.

Ampliations:
CNERSH



LE PRESIDENT,

Dr. J. J. J. J. J.
Pharmacien

www.minsante.gov.cm

Annexe 2 : Autorisation de Recherche N°001035 /2022/CPC/DG/DAF/SRH



AUTORISATION DE RECHERCHE

N° 001035 /2022/ CPC/DG/DAF/SRH

Nous soussignés, le Centre Pasteur du Cameroun (CPC), autorisons par la présente, **Madame SONKENG JIOFACK Marie Esther, Matricule interne 1292**, d'effectuer, à des fins de recherche académique, des collectes de données à caractère scientifique dans le laboratoire de Bactériologie, Parasitologie et Mycologie du Centre Pasteur du Cameroun, sous l'encadrement direct du Dr NGOME Rosanne, Médecin Biologiste, Chef dudit laboratoire.

La présente autorisation qui encadre les activités de l'intéressée, effectuées en dehors de ses heures normales de travail, a une durée de validité de quatre (04) mois courant du 1^{er} septembre au 31 décembre 2022. Et, cette dernière est astreinte au strict respect des règles relatives à la propriété intellectuelle, aux inventions et aux brevets applicables au Centre Pasteur du Cameroun. A ce titre :

- *Tous les résultats et découvertes, obtenus dans le cadre de cette recherche, sont la propriété du CPC,*
- *Les logiciels créés par elle, dans le cadre de ses activités de recherche, appartiennent en copropriété au CPC auquel sont dévolus tous les droits reconnus aux auteurs de logiciels,*
- *Toutes les inventions brevetables ou non, et en général toutes découvertes, modifications, perfectionnements, procédés nouveaux de fabrication, dont l'intéressée sera l'auteure, à titre individuel ou collectif, direct ou indirect, soit dans le cadre ou le cours de l'exécution de ses fonctions, soit dans le domaine des activités du Centre Pasteur de Cameroun, seront une copropriété du CPC.*

En foi de quoi la présente autorisation lui est délivrée, dans le cadre de ses études académiques en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie de la Faculté des Sciences, Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I, pour servir et valoir ce que de droit.

Copie :
Dr NGOME Rosanne

Fait à Yaoundé, le 19/08/2022

Pour le Directeur Général,
Et par ordre,

Dr Suzanne Claudia BELINGA,
Directeur Général Adjoint

CENTRE PASTEUR DU CAMEROUN Laboratoire National de Référence et de Santé Publique
Membre du Réseau International des Instituts Pasteur
BP 1274 YAOUNDE, 451, Rue 2005, Yaoundé 2 - CAMEROUN – site Internet: www.pasteur-yaounde.org
Tel : (237) 222 23 10 15 / 222 23 18 03 - Télécopie : (237) 22 23 15 64 – email : cpc@pasteur-yaounde.org

Annexe 3 : Notice d'information destinée au patient

Titre de l'étude :« **Apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons microscopiques et étude de leurs facteurs de risques au Centre Pasteur du Cameroun.** »

L'investigateur principal : **SOKENG JIOFACK Marie Esther**

M., Mme, Mlle,Technicien
/Infirmier..... Vous invite à participer
au protocole de recherche intitulé :« **Apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons microscopiques et étude de leurs facteurs de risques au Centre Pasteur du Cameroun** ». Nous vous proposons de lire attentivement ce formulaire d'information ; le but est de répondre aux questions que vous pouvez nous poser avant de prendre la décision de participer. Pendant l'essai, vous pouvez vous adresser au médecin ou à l'infirmier(e) qui vous a proposé(e) en lui posant toute question complémentaire.

Objectifs de la recherche

Ce projet de recherche consiste à présenter l'apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons d'intérêt médicale au Centre Pasteur du Cameroun.

De manière plus spécifique, il s'agira de :

1. Déterminer la fréquence des infections fongiques ;
2. Identifier les facteurs associés aux infections fongiques ;
3. Comparer la méthode d'identification par spectrométrie de masse de type Maldi-Tof à la méthode d'identification classique.

La population d'étude sera constituée de patients suspects d'infections fongiques envoyés au CPC pour examen microbiologique enfants et adultes ; l'étude se déroulera sur une période de 4 mois allant du 01 Septembre 2022 au 31 Décembre 2022.

Quelle est la méthodologie et comment se déroulera l'expérimentation ?

Les modalités de l'expérimentation ont été soumises pour avis et autorisation au Comité Régional d'Ethique de la Recherche en Santé Humaine du Centre, dont la mission est de vérifier que les conditions requises pour la protection et le respect des droits des patients sont respectés. Cette étude est réalisée chez tout patient suspect d'infection fongique envoyé au CPC pour examen microbiologique, enfants et adultes. Après consentement, chaque patient devra répondre au questionnaire qui lui sera remis ou plutôt soumis par le clinicien lors des prélèvements relevant d'un acte médical obligatoire (différents liquides de ponction, biopsies

sous-cutanées, et aspiration bronchique) en milieu hospitalier ; ou le technicien chargé du prélèvement au laboratoire CPC pour les autres prélèvements (hémoculture, grattage pour squames et écouvillonnage des muqueuses).

S'il s'agit d'un prélèvement d'urine ou de crachat, le patient recevra un pot de prélèvement et des instructions pour collecter lui-même les échantillons. S'il s'agit d'un écouvillonnage des muqueuses ou grattage des parties superficielles pour obtention des squames, le clinicien ou le technicien s'occupera de lui dans la stricte intimité et le respect de sa sensibilité.

A la fin de l'étude, tous les échantillons seront détruits conformément aux normes en vigueur et les isolats seront conservés à -80°C dans de l'eau physiologique glycérolé à 20%. Pourquoi cette recherche ?

Les infections causées par des champignons sont appelées mycoses et peuvent être moins graves si elles sont superficielles. La sévérité des infections profondes a considérablement augmenté et leurs agents étiologiques se sont diversifiés au cours des dernières années. Ceci est dû en grande partie au nombre croissant de patients aux défenses immunitaires amoindries par une maladie ou son traitement et ou encore par des conditions de vie précaire avec une hygiène inadéquate. Le diagnostic microbiologique des champignons est toujours difficile en pratique courante ou très peu réalisé dans la majorité des infections.

Nous proposons d'évaluer ces deux techniques afin de rendre accessible les résultats de qualité à un moindre coût et dans un délai relativement raisonnable pour permettre aux cliniciens de mieux prendre en charge le patient.

Bénéfices et risques de l'étude pour le patient

Il s'agit d'une étude interventionnelle ; elle apportera un changement dans la prise en charge médicale du patient. Il y a un bénéfice direct pour le patient. En effet, plus tôt le diagnostic est fiable et rapide, plus vite le patient pourra retrouver sa santé. Dans les cas de fongémies en pédiatrie ou devant une fièvre persistante, la première demande d'analyse d'hémoculture est à la recherche d'une bactérie et non d'une étiologie mycosique. Devant une pneumonie, très peu de cultures mycologiques sont réalisées pour confirmer une mycose invasive.

Les risques potentiels pour le participant peuvent être liés au prélèvement. Le participant pourra ressentir une gêne légère lors du prélèvement mais ne sera exposé à aucun produit chimique et agent toxique ou drogue.

Limite de l'étude

Cette étude ne sera réalisée que chez les patients venus au CPC pour analyse mycologique ce qui sous-estime le poids réel des infections mycosiques au Cameroun.

Quels sont vos droits en tant que participant à cette recherche ?

Vous pouvez refuser de participer à cette recherche sans aucune justification.

Nature et montant de toute indemnité ou compassion versée

Le patient bénéficiera d'une prime de transport d'un montant à la hauteur qui lui permettra de partir de chez lui pour le prélèvement et d'y retourner après.

Adresse de l'investigateur principal

SOKENG JIOFACK Marie Esther

Etudiante en Master II Recherche Option Microbiologie médicale

Faculté des Sciences Université de Yaoundé I

Année Académique 2022-2023

Email : sokengesther@gmail.com

Tél : (+237) 6 98811579

Adresse du directeur du mémoire :

Pr GONSU KAMGA Hortense

Professeur

Microbiologie médicale

FMSB - Université de Yaoundé I

Email : hgonsu@gmail.com

Tél : (+237) 677933270

Adresse détaillée du CRERSHCe : Tél : 222 21 20 87 / 677757330

Mail : crersh_centre@yahoo.com

Appendix 3: Patient information leaflet

Title of study: “Contribution of Maldi-Tof mass spectrometry to the identification of microscopic fungi and study of their risk factors at the Centre Pasteur in Cameroon. Centre Pasteur du Cameroun”.

Principal investigator: SOKENG JIOFACK Marie Esther

Mr., Mrs

Technician / Nurse.....

We invite you to take part in the research protocol entitled: **“Contribution of Maldi-Tof mass spectrometry to the identification of microscopic fungi and study of their risk factors at the Centre Pasteur du Cameroun”**. Please read this information form carefully; the aim is to answer any questions you may have before deciding to take part. During the trial, you can contact the doctor or nurse who suggested you and ask any further questions.

Research objectives

The aim of this research project is to present the contribution of Maldi-Tof mass spectrometry to the identification of fungi of medical interest at the Centre Pasteur in Cameroon.

More specifically, this will involve:

1. Determine the frequency of fungal infections;
2. Identify the factors associated with fungal infections;
3. To compare the Maldi-Tof mass spectrometry identification method with the conventional identification method.

The study population will consist of patients with suspected fungal infections sent to the CPC for microbiological examination, both children and adults. The study will take place over a 4-month period from 01 September 2022 to 31 December 2022.

What is the methodology and how will the trial be conducted?

The terms and conditions of the experiment were submitted for approval to the Centre's Regional Ethics Committee for Human Health Research, whose task is to check that the conditions required for the protection and respect of patients' rights are met.

This study is carried out on all patients suspected of having a fungal infection, both children and adults, who are sent to the CPC for microbiological examination. After consent has been

obtained, each patient will be asked to complete a questionnaire, which will be given to them or submitted to them by the clinician for samples taken as part of a compulsory medical procedure (various puncture fluids, subcutaneous biopsies and bronchial aspirates) in a hospital setting; or by the technician in charge of sampling at the CPC laboratory for other samples (blood cultures, skin scrapings and mucous membrane swabs).

In the case of urine or sputum samples, the patient will be given a collection jar and instructions on how to collect the samples themselves. In the case of mucosal swabs or surface scrapings to obtain scales, the clinician or technician will treat the patient in strict privacy and with respect for his or her sensitivity.

At the end of the study, all the samples will be destroyed in accordance with current standards and the isolates will be stored at -80°C in 20% glycerol physiological water.

Why this research?

Infections caused by fungi are called mycoses and can be less serious if they are superficial. The severity of deep-seated infections has increased considerably in recent years, and their aetiological agents have diversified. This is largely due to the growing number of patients whose immune defences have been weakened by an illness or its treatment, or by precarious living conditions with inadequate hygiene. The microbiological diagnosis of fungi is still difficult in current practice, and is rarely carried out in the majority of infections.

We propose to evaluate these two techniques in order to make quality results available at a lower cost and within a relatively reasonable timeframe to enable clinicians to better manage the patient.

Benefits and risks of the study for the patient

This is an interventional study; it will bring about a change in the medical management of the patient. There is a direct benefit for the patient. The sooner the diagnosis is reliable and rapid, the sooner the patient will be able to regain his or her health. In the case of fungal infections in pediatrics or persistent fever, the first request for blood culture analysis is to look for a bacterial rather than a mycotic etiology. In the case of pneumonia, very few mycological cultures are taken to confirm an invasive mycosis.

Potential risks for the participant may be related to the sampling. The participant may experience slight discomfort during sampling but will not be exposed to any chemicals, toxic agents or drugs.

Limitations of the study

This study will only be carried out on patients who come to the CPC for mycological analysis, which underestimates the real burden of mycotic infections in Cameroon.

What are your rights as a participant in this research?

You may refuse to take part in this research without any justification.

Nature and amount of any compensation or compassion paid

The patient will receive a transport allowance of an amount sufficient to enable him or her to leave home for the sampling and to return afterwards.

Address of principal investigator

SOKENG JIOFACK Marie Esther

Student in Master II Research Option Medical Microbiology

Faculty of Science University of Yaoundé I

Academic Year 2022-2023

Email : sokengesther@gmail.com

Tel : (+237) 6 98811579

Address of dissertation supervisor :

Pr GONSU KAMGA Hortense

Professor

Medical Microbiology

FMSB - University of Yaoundé I

Email : hgonsu@gmail.com

Tel: (+237) 677933270

Detailed address of CRERSHCe: Tel: 222 21 20 87 / 677757330

Mail: crersh_centre@yahoo.com

Annexe 4 : Fiche de consentement éclairé

Je soussigné, Mr/Mme/Mlle Nom(s) et Prénom(s).....

Avoir été invité à participer au travail de recherche intitulé « **Apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons microscopiques et étude de leurs facteurs de risques au Centre Pasteur du Cameroun** »

Investigateur principal : SOKENG JIOFACK Marie Esther

Email : sokengesther@gmail.com

Tél (+237) 698811579/ (+237) 673929397.

Etudiante en Master II Option Microbiologie médicale à l'Université de Yaoundé I Faculté des Sciences année académique 2021-2022 :

J'ai bien compris la notice d'information qui m'a été remise concernant cette étude

Ou bien on m'a lu et expliqué la notice de cette étude

J'ai bien compris le but et les objectifs de cette étude

J'ai reçu toutes les réponses aux questions que j'ai posées

Les risques et les bénéfices m'ont été présentés et expliqués

J'ai bien compris que je suis libre d'accepter ou de refuser d'y participer

Mon consentement ne décharge pas les investigateurs de la recherche de leurs responsabilités, je conserve tous mes droits garantis par la loi

J'accepte librement de participer à cette étude dans les conditions précisées dans la notice de l'information, c'est-à-dire par exemple :

- Répondre aux questions d'enquête
- Communiquer les informations médicales
- Donner un prélèvement en fonction de la nature de mon affection et de coopérer lors du dit prélèvement

Je donne mon accord pour que le reste des échantillons prélevés pour cette étude soient utilisés dans les études ultérieures.

Fait àLe.....

Numéro d'inclusion :

Participant

Investigateur principal

Noms et Prénoms :

Noms et Prénoms :

Tél :

Signature :

Signature :

(Précédée de la mention : Lu, compris et approuvé)

Annex 4: Informed consent form

I, the undersigned, Mr/Mrs/Ms Surname(s) and
Forename(s).....

Have been invited to take part in the research project entitled “**Contribution of Maldi-Tof mass spectrometry to the identification of microscopic fungi and study of their risk factors at the Centre Pasteur du Cameroun**”.

Principal investigator: **SOKENG JIOFACK Marie Esther**

Email: sokengesther@gmail.com

Tel (+237) 698811579/ (+237) 673929397.

Student in Master II Option Medical Microbiology at the University of Yaoundé I Faculty of Science academic year 2021-2022:

I have fully understood the information leaflet I was given about this study.

Or the instructions for this study have been read and explained to me

I have fully understood the aims and objectives of this study

I have received all the answers to my questions

The risks and benefits have been presented and explained to me

I understand that I am free to accept or refuse to take part.

My consent does not relieve the research investigators of their responsibilities; I retain all my rights guaranteed by law

I freely agree to take part in this study under the conditions specified in the information leaflet, i.e. for example:

- Answering survey questions
- Communicating medical information
- To give a sample according to the nature of my condition and to cooperate during the sampling.

I give my consent for the rest of the samples taken for this study to be used in subsequent studies.

Signed inthe.....

Inclusion number:

Participant:

Principal Investigator

Full name:

Full name:

Tel:

Signature:

Signature: (Preceded by the words: Read, understood and approved)

Annexe 5 : Fiche d'autorisation parentale pour enfants de moins de 11ans

Je, soussigné(e).....Parent ou responsable de l'enfantCertifie avoir reçu toutes les informations en relation avec l'étude « **Apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons microscopiques et étude de leurs facteurs de risques au Centre Pasteur du Cameroun** ». L'objectif de ce projet de recherche consistera à présenter l'apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons d'intérêt médical au Centre Pasteur du Cameroun

J'ai lu la notice d'information m'expliquant le protocole de recherche cité ci-dessus. J'ai posé toutes les questions que je souhaitais et j'ai reçu des réponses.

Je suis conscient(e) que toutes les données recueillies au cours de cette recherche sont strictement confidentielles et anonymes. Le questionnaire et les échantillons seront codifiés avant leur transfert au laboratoire du Centre Pasteur du Cameroun (CPC), seul le médecin, ou l'infirmier ou le technicien qui remplira ce formulaire connaîtra mon identité.

J'ai bien compris que ces échantillons serviront à la recherche. Le résultat des analyses microbiologiques des mycoses me sera communiqué et les frais de cette analyse seront à ma charge. Je comprends que je peux refuser que mon enfant participe à cette étude sans que cela n'ait de conséquences pour lui, et que je peux retirer mon consentement à tout moment (avant et pendant l'étude) sans avoir à me justifier, et sans conséquence.

Compte tenu des informations qui m'ont été transmises, j'accepte librement et volontairement que mon enfant participe à cette étude dans les conditions précisées dans la notice d'information c'est-à-dire :

- Répondre aux questions d'enquête
- Communiquer les informations médicales pour mon enfant
- Accepter qu'un prélèvement soit effectué à mon enfant

Fait à....., le.....

Participant

Noms et Prénoms :

Signature :

Technicien/Infirmier

Noms et Prénoms :

Signature :

Annex 5: Parental authorisation form for children under 11 years of age

I, the undersignedParent or person responsible for the childCertify that I have received all the information relating to the study “**Contribution of Maldi-Tof type mass spectrometry in the identification of microscopic fungi and study of their risk factors at the Centre Pasteur in Cameroon**”. The aim of this research project is to present the contribution of Maldi-Tof type mass spectrometry to the identification of fungi of medical interest at the Centre Pasteur du Cameroun.

I read the information leaflet explaining the above research protocol. I have asked all the questions I wanted and received answers.

I am aware that all data collected in the course of this research is strictly confidential and anonymous. The questionnaire and samples will be coded before being transferred to the laboratory of the Centre Pasteur du Cameroun (CPC). Only the doctor, nurse or technician who fills in this form will know my identity.

I understand that these samples will be used for research purposes. The results of the microbiological analyses of the mycoses will be communicated to me and the cost of this analysis will be my responsibility. I understand that I can refuse to allow my child to take part in this study without any consequences for him/her, and that I can withdraw my consent at any time (before and during the study) without having to justify myself, and without any consequences.

In view of the information I have been given, I freely and voluntarily agree to my child taking part in this study under the conditions specified in the information leaflet, i.e. :

- Answer the survey questions
- To provide medical information about my child
- Agreeing to a sample being taken from my child

Signed in....., the.....

Participant

Full names:

Signature:

Technician / Nurse

Full names:

Signature:

Annexe 6 : Fiche d'assentiment pour enfants de 11-20 ans

Projet de recherche «**Apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons microscopiques et étude de leurs facteurs de risques au Centre Pasteur du Cameroun**».

Je, soussigné(e).....Parent ou responsable
de l'enfantCertifie avoir reçu toutes les
données en relation avec le titre de l'étude « Apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-
Tof dans l'identification des champignons d'intérêt médical au centre Pasteur du Cameroun ».
L'objectif de ce projet de recherche consistera à ressortir l'**apport de la spectrométrie de
masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons d'intérêt médical au
Centre Pasteur du Cameroun**

J'ai lu la notice d'information m'expliquant le protocole de recherche cité ci-dessus. J'ai posé
toutes les questions que je souhaitais et j'ai reçu des réponses.

Je suis conscient(e) que toutes les données recueillies au cours de cette recherche sont
strictement confidentielles et anonymes. Le questionnaire et les échantillons seront codifiés
avant leur transfert au laboratoire du Centre Pasteur du Cameroun (CPC), seul le médecin,
l'infirmier ou le technicien qui signera ce formulaire connaîtra mon identité.

J'ai bien compris que ces échantillons serviront à la recherche. Le résultat des analyses
microbiologiques des mycoses me sera communiqué et les frais de cette analyse seront à ma
charge. Je comprends que je peux refuser de participer à cette étude sans que cela n'ait de
conséquences pour moi, et que je peux retirer mon consentement à tout moment (avant et
pendant l'étude) sans avoir à me justifier, et sans conséquence.

Compte tenu des informations qui m'ont été transmises, j'accepte librement et volontairement
de participer à cette étude dans les conditions précisées dans la notice d'information c'est-à-
dire:

- Répondre aux questions d'enquête ;
- Communiquer les informations médicales ;
- Accepter qu'un prélèvement soit effectué à mon enfant.

Fait à....., le.....

Participant

Médecin/Infirmier

Noms et Prénoms :

Noms et Prénoms :

Signature :

Signature :

Annex 6: Consent form for children aged 11-20

Research project **“Contribution of Maldi-Tof mass spectrometry to the identification of microscopic fungi and study of their risk factors at the Centre Pasteur du Cameroun”**.

I, the undersignedParent or person responsible for the childCertify that I have received all the information relating to the title of the study **“Contribution of Maldi-Tof type mass spectrometry to the identification of fungi of medical interest at the Centre Pasteur du Cameroun”**. The objective of this research project is to highlight **the contribution of Maldi-Tof type mass spectrometry in the identification of microscopic fungi and study their risk factors at the Centre Pasteur du Cameroun**.

I read the information leaflet explaining the above research protocol. I have asked all the questions I wanted and received answers.

I am aware that all data collected in the course of this research is strictly confidential and anonymous. The questionnaire and samples will be coded before being transferred to the laboratory of the Centre Pasteur du Cameroun (CPC). Only the doctor, nurse or technician who signs this form will know my identity.

I understand that these samples will be used for research purposes. The results of the microbiological analyses of the mycoses will be communicated to me and the costs of this analysis will be borne by me. I understand that I can refuse to take part in this study without any consequences for me, and that I can withdraw my consent at any time (before and during the study) without having to justify myself, and without any consequences.

In view of the information I have been given, I freely and voluntarily agree to take part in this study under the conditions specified in the information leaflet, i.e.:

- To answer the survey questions;
- To provide medical information;
- Agree to a sample being taken from my child.

Signed in....., the.....

Participant

Doctor / Nurse

Full names:

Full names:

Signature:

Signature:

Annexe 7 : Questionnaire + fiche de paillasse

Projet de recherche : « Apport de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof dans l'identification des champignons microscopiques et étude de leurs facteurs de risques au Centre Pasteur du Cameroun »

7.1. Questionnaire

A. Identification de la formation sanitaire du malade

1. Région : / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ /
2. Hôpital / Centre de santé / Laboratoire:.....
3. Nom du prescripteur:.....
4. Tél : / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ /

B. Aspects sociodémographiques du malade

5. N° d'identification du patient : / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ /
6. Nom et prénoms (2 premières lettres) : / _ / _ / - / _ / _ /
7. Date de naissance : / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / Age : ans (>1) / _ / _ / mois (<1 an) / _ / _ /
8. Sexe : Masculin (M)/ _ / Féminin (F) / _ /
9. Nationalité :.....
10. Statut social : Enfants <4ans non scolarisés / _ / Elèves/étudiants / _ / Fonctionnaires/ _ /
Non fonctionnaires / _ / Retraités / _ / Sans emplois / _ /

C. Renseignements cliniques

11. Motif de la consultation :.....
12. Date du début des symptômes :.....
13. Type de patient: Ambulatoire / _ / Hospitalisé / _ /
14. Le patient a-t-il pris un traitement antibiotique ? : Oui / _ / Non / _ /
15. Si oui lequel ?.....

D. Facteurs d'exposition

17. Diabète: oui /___/ non /___/non connu /___/

18. Tuberculose : oui /___/ non /___/

19. VIH: oui /___/ non /___/non connu /___/

20. Le patient a-t-il subi : Chimiothérapie /___/ Brûlure /___/Corticothérapie /___/

Pose d'un dispositif médical /___/

Piqure transcutanée par végétal /___/

21. Attitude vestimentaire : port-t-il des chaussures fermées pendant de longues durées : oui /___/ non /___/ ; marche pied nu : oui /___/ non /___/ ; partage des vêtements : oui /___/ non /___/

22. Le patient est-il en contact avec les animaux domestiques : oui/___/ non /___/ non connu /___/ si oui lequel:

23. Le patient a-t-il subi une piqûre transcutanée par un végétal : oui/___/ non /___/

24. Le patient est-t-il en contact prolongé et régulier avec de l'eau : oui /___/ non /___/

25. Combien de personnes dorment par chambre ? 1 à 2 /___/ 3 à 5 /___/ >5/___/

E. Prélèvements réalisés

26. Date du prélèvement /___/___/___/ /___/___/___/ /___/___/___/___/

27. Echantillon (nature) :

28. Si lésions ou autres atteintes cutanées décrire l'aspect.....

29. Acceptez-vous qu'une photo de la lésion soit faite si nécessaire ?oui /___/ non/___/

Questionnaire rempli parFonction.....

Fait à..... le

Signature :

7.2. Fiche de paillasse

Date d'analyse de l'échantillon / _ / - / _ / - / _ / _ / _ /

Code échantillon / _ _ / - / _ _ / - / _ _ / _ _ /

7.2.1. Examen macroscopique de l'échantillon

Nature de l'échantillon.....

Préciser la localisation des lésions.....

Décrire l'aspect des lésions.....

7.2.2 Examen microscopique de l'échantillon

❖ Examen Direct :

- Liquides biologiques : levures / _ / filaments / _ / Levures+ filaments / _ / absence / _ /
- Scotch test cutané : levures bourgeonnantes en amas / _ / absence / _ /

❖ Examen après préparation du prélèvement

- Coloration à l'Encre de chine du LCR: positive / _ / négative / _ /
- Préparation avec mélanges éclaircissants (potasse à 30%) pour les squames (ongles, peau, cuir chevelu et biopsie) : levures / _ / filament / _ / levure + filament / _ / absence / _ /
- Coloration de Gram :(pus, expectoration et écouvillonnage, liquides biologiques) : levure isolée / _ / filament / _ / levure + filament / _ / absence / _ /

7.2.3. Identification du champignon après culture

❖ Croissance du champignon sur différents milieux de culture

- Gélose Sabouraud Chloramphénicol : négative / _ / positive / _ / NA / _ /
- Gélose Sabouraud Actidione : négative / _ / positive / _ / NA / _ /
- Gélose Sabouraud Chloramphénicol + huile d'olive : négative / _ / positive / _ / NA / _ /

❖ Caractérisation classique : Description macroscopique des colonies après Culture à 30 °C

Temps de croissance de la colonie en jours (J) : 1 à 2J / _ / 2 à 5J / _ / 5 à 10J / _ /

10 à 15J / _ / 15 à 21J / _ / 21J et plus / _

Aspect de la colonie :

- Levure : plate / _ / bombée / _ / couleur / _ / blanchâtre / _ / rosée / _ /
- Filamenteux décrire la morphologie macroscopique (recto / verso).

Couleur colonie : blanc-cassé /_/ brune /_/ jaune /_/ grise/_/ noire/_/

Verte/_/ violette/_/ orange /_/

Forme colonie : ronde /_/ étoilée/_/ autre /_/

Relief : plan /_/ stries radiés/_/ surélevé /_/ dôme /_/

Consistance : laineuse /_/ poudreuse/_/ duveteuse/_/ glabre/_/ cotonneuse/_/

Crémeuse /_/ sèche /_/

❖ **Cas des levures**

- Observation microscopique de la culture à l'eau physiologique :

Forme levure /_/ filament /_/ Arthrospore /_/

- Identification sur Vitek 2 Compact :
- Détermination du profil protéomique sur MALDI TOF :

❖ **Cas des filamenteux**

- Observation microscopique de la colonie au Bleu de Lactophénol :

Conidiophore :

Vésicule :

Phialides :

Conidies :

Tête Aspergillaire.....

Aleuries.....

Filaments mycéliens :

Chlamydospores : intercalaires. /_/.....terminales /_/.....Triangulaires./_/.....

Macro conidies.....

Micro conidies.....

Résultats :

- Détermination du profil protéomique par MALDI TOF

Annex 7: Questionnaire + bench sheet

Research project: “**Contribution of Maldi-Tof mass spectrometry to the identification of microscopic fungi and study of their risk factors at the Centre Pasteur du Cameroun**”.

7.1. Questionnaire

A. Identification of the patient's health facility

1. Region: / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ /
2. Hospital / Health centre / laboratory:
3. Name of prescriber:
4. Tel: / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ /

B. Socio-demographic aspects of the patient

5. Patient identification number: / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ /
6. Surname and forenames (first 2 letters): / _ / _ / - / _ / _ / _ /
7. Date of birth: / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ // Age: years (>1) / _ / _ / months (<1 year) / _ / _ /
8. Sex: Male (M) / _ / Female (F) / _ /
9. Nationality:
10. Social status: Children <4 years old not at school / _ / Pupils/students / _ / Civil servants / _ /
Non-civil servants / _ / Retired / _ / Unemployed / _ /

C. Clinical information

11. Reason for consultation:
12. Date of onset of symptoms:
13. Type of patient: Outpatient / _ / Inpatient / _ /
14. Has the patient been treated with antibiotics? Yes / _ / No / _ /
15. If yes, which one?

D. Exposure factors

17. Diabetes: yes / _ / no / _ / unknown / _ /

18. Tuberculosis: yes /__/ no /__/

19. HIV: yes /__/ no /__/ unknown /__/

20. Has the patient undergone: Chemotherapy /_/ Burns /_/Corticosteroid therapy /_/

Placement of a medical device /_/ transcutaneous sting by plant /_/

21. Clothing: wear closed shoes for long periods? Yes /_/ no /_/; walking barefoot? Yes /_/ no /_/; sharing clothes? Yes /_/ no /_/

22. Does the patient come into contact with pets: yes/__/ no /_/ not known /_/ if yes which?

23. Has the patient received a transcutaneous sting from a plant: yes/__/ no /_/

24. Is the patient in prolonged and regular contact with water: yes /_/ no /_/

25. How many people sleep in each room? 1 to 2 /_/ 3 to 5 /_/ >5/__/

E. Samples taken

26. Date of sample /_/ /_/ /_/ /_/ /_/ /_/ /_/ /_/ /_/

27. Sample (type):

28. If lesions or other skin damage, describe appearance.....

29. Do you agree to a photo of the lesion being taken if necessary? Yes /_/ no/__/

Questionnaire completed byFunction.....

Signed in..... the.....

Signature:

7.2. Bench sheet

Sample analysis date / _ / _ / - / _ / - / _ / _ / _ / _ /

Sample code / _ / _ / - / _ / - / _ / _ / _ / _ /

7.2.1 Macroscopic examination of the sample

Nature of specimen.....

Specify the location of the lesions.....

Describe the appearance of the lesions.....

7.2.2 Microscopic examination of the sample

❖ Direct examination:

- Biological fluids: yeasts / _ / filaments / _ / Yeasts + filaments / _ / absence / _ /
- Scotch skin test: budding yeasts in clusters / _ / absence / _ /

❖ Examination after sample preparation

- CSF staining with India ink: positive / _ / negative / _ /
- Preparation with lightening mixtures (30% potash) for scales (nails, skin, scalp and biopsy): yeast / _ / filament / _ / yeast + filament / _ / absence / _ /
- Gram staining: (pus, sputum and swabs, biological fluids) : isolated yeast / _ / filament / _ / yeast + filament / _ / absence / _ /

7.2.3 Identification of the fungus after cultivation

❖ Growth of the fungus on different culture media

- Sabouraud Chloramphenicol agar: negative / _ / positive / _ / NA / _ /
- Sabouraud Actidione agar: negative / _ / positive / _ / NA / _ /
- Sabouraud Chloramphenicol + olive oil agar: negative / _ / positive / _ / NA / _ /

Classical characterisation: macroscopic description of colonies after culture at 30°C

Colony growth time in days (D): 1 to 2D / _ / 2 to 5D / _ / 5 to 10D / _ /

10 to 15 days / _ / 15 to 21 days / _ / 21 days and over / _ / Colony appearance:

- Yeast: flat / _ / curved / _ / colour / _ / whitish / _ / pink / _ /

- Filamentous describe macroscopic morphology (recto / verso).

Colony colour: off-white / _ / brown / _ / yellow / _ / grey / _ / black / _ /

Green / _ / violet / _ / orange / _ /

Colony shape: round / _ / star-shaped / _ / other / _ /

Relief: flat /_ / radiating striations /_ / raised /_ / domed /_ /

Consistency: woolly /_ / powdery /_ / fluffy /_ / hairless /_ / cottony /_ /

Creamy /_ / dry /_ /

❖ **Yeasts**

- - Microscopic observation of the culture in physiological water:
- Yeast form /_ / filament /_ / Arthrospore /_ /
- Identification on Vitek 2 Compact:
- Proteomic profiling on MALDI TOF:

❖ **Filamentous bacteria**

- Microscopic observation of the colony using Lactophenol Blue:

Conidiophore:

Bladder:

Phialides:

Conidies :

Aspergillus head

Flowers.....

Mycelial filaments:

Chlamydospores : intercalary. /_ /terminal /_ /Triangular. /_ /

Macro conidia.....

Micro conidia.....

Results:

- Determination of proteomic profile by MALDI TOF

Annexe : 8 Matériel utilisé

Différents Matériels utilisé dans l'étude



Equipement de protection et de transport d'échantillon



Matériel de prélèvement



Milieux de culture et matériel de mise en culture



Matériel et réactif pour observation microscopique



Matériel pour Vitek2 et identification



Matériel pour extraction du protéome et analyse spectrométrique



Annexes 9 : Quelques Images des prélèvements cutanés et conditionnement des échantillons (superficiels, sous-cutanés et profonds); mise en culture; examens macroscopiques et microscopiques des colonies isolées

Recueil des échantillons cutanés



(a) à l'aide de la cellophane adhésive, (b) par grattage; (c) Prélèvement des fragments ongles des mains

Conditionnement des différents échantillons



1- Echantillons superficiels:
(a) lames de scotch test cutané, (b) squames et © écouvillonnage



2- Echantillon sous-cutané:
biopsie

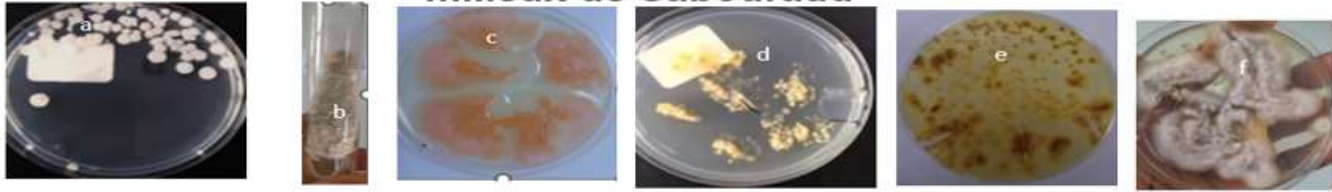


3- Echantillons profonds:
(a) Aspiration bronchique, (b) Lavage broncho-alvéolaire, © liquide pleural, (d) LCR, (e) Crachat, (f) Bout de sonde urinaire, (g) Urine et (h) Hémoculture



Différentes techniques d'ensemencement: profondeur et en surface

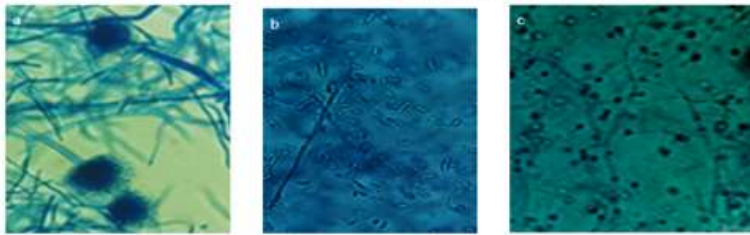
Examens macroscopiques des colonies isolées après cultures sur milieux de Sabouraud



(a) colonies crémeuses et blanchâtres de levures ; (b) colonies cérébriformes et blanc-gris; (c):colonies plates et oranges; (d): colonies étoilées et jaunes; (e): colonies duveteuse et glabres; (f): colonies cotonneuse.

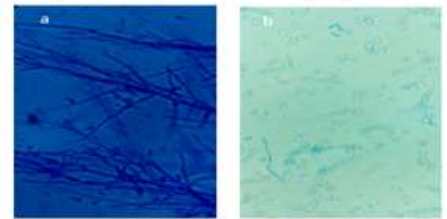
Examens microscopiques des colonies au Bleu de Lactophénol

1- Observation microscopique d'une préparation des moisissures



(a) : tête aspergillaire ; (b) : filaments septés, microconidies en grains de riz et macroconidies bisériés; (c): filaments septés et aleuries intercalaires et terminales.

2- Observation microscopique d'une préparation des dermatophytes et levures



(a): filaments mycéliens septés et microconidies en alcalium; (b): levures et arthrospores.

Source : Présente étude

Annexes 10 : Quelques spectres de filamenteux (*Aspergillus* et dermatophytes)

❖ Exemples de quelques spectres de champignons filamenteux obtenus par MALDI-TOF

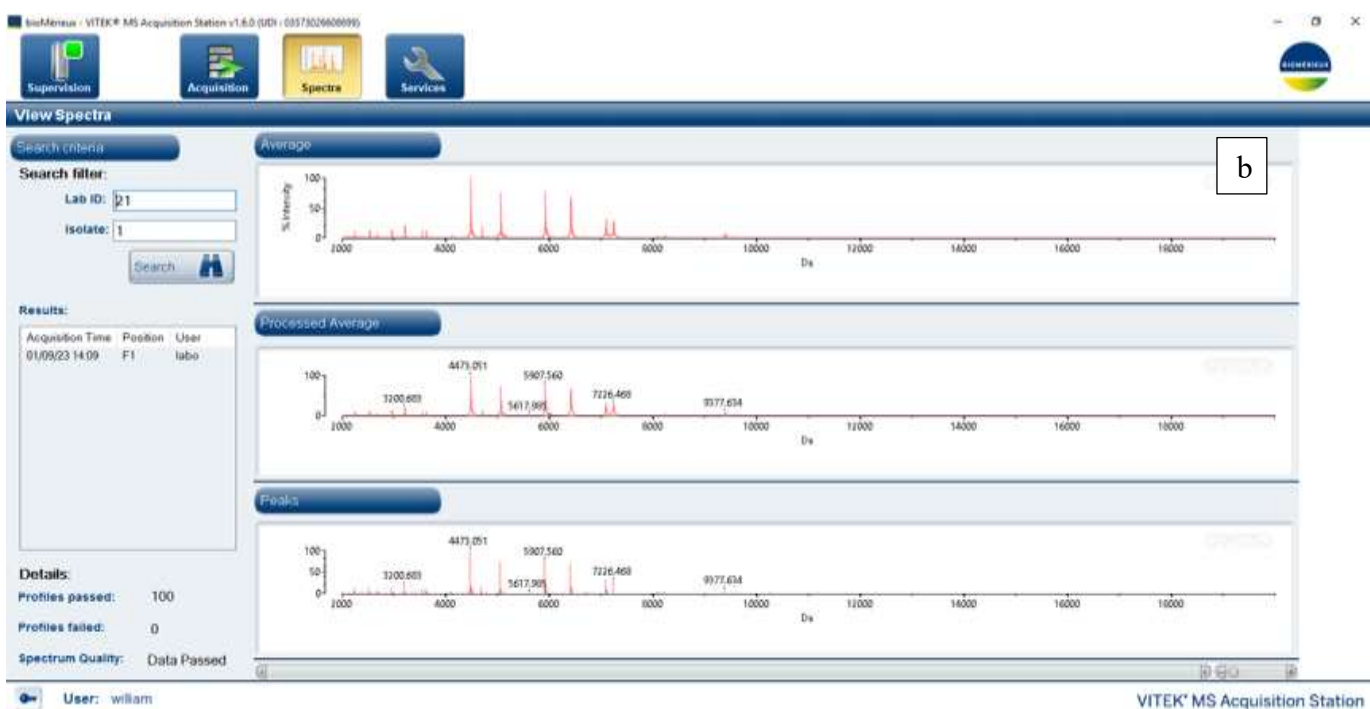
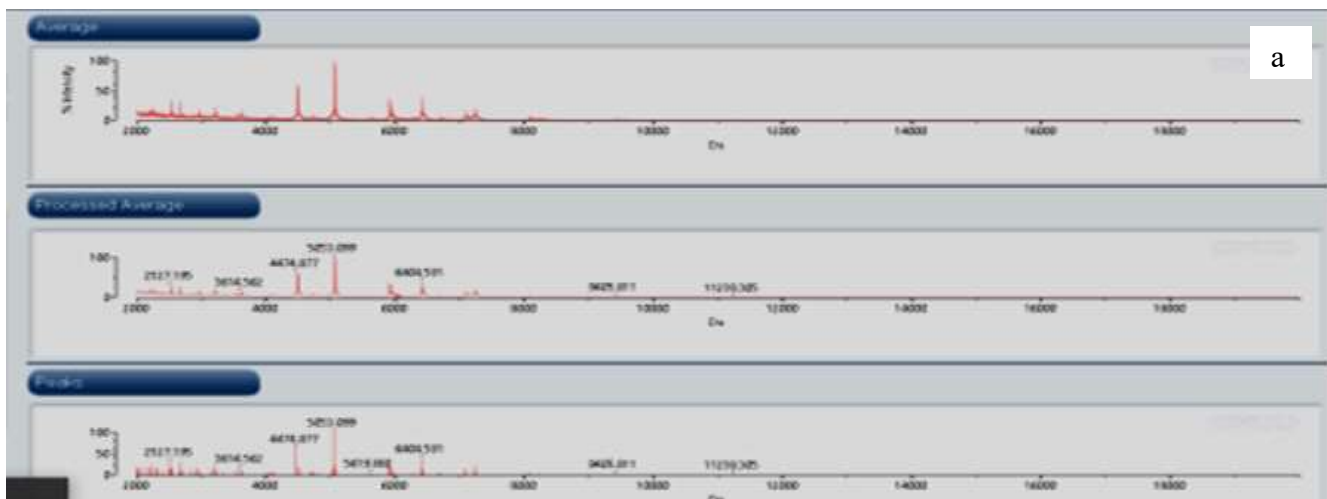
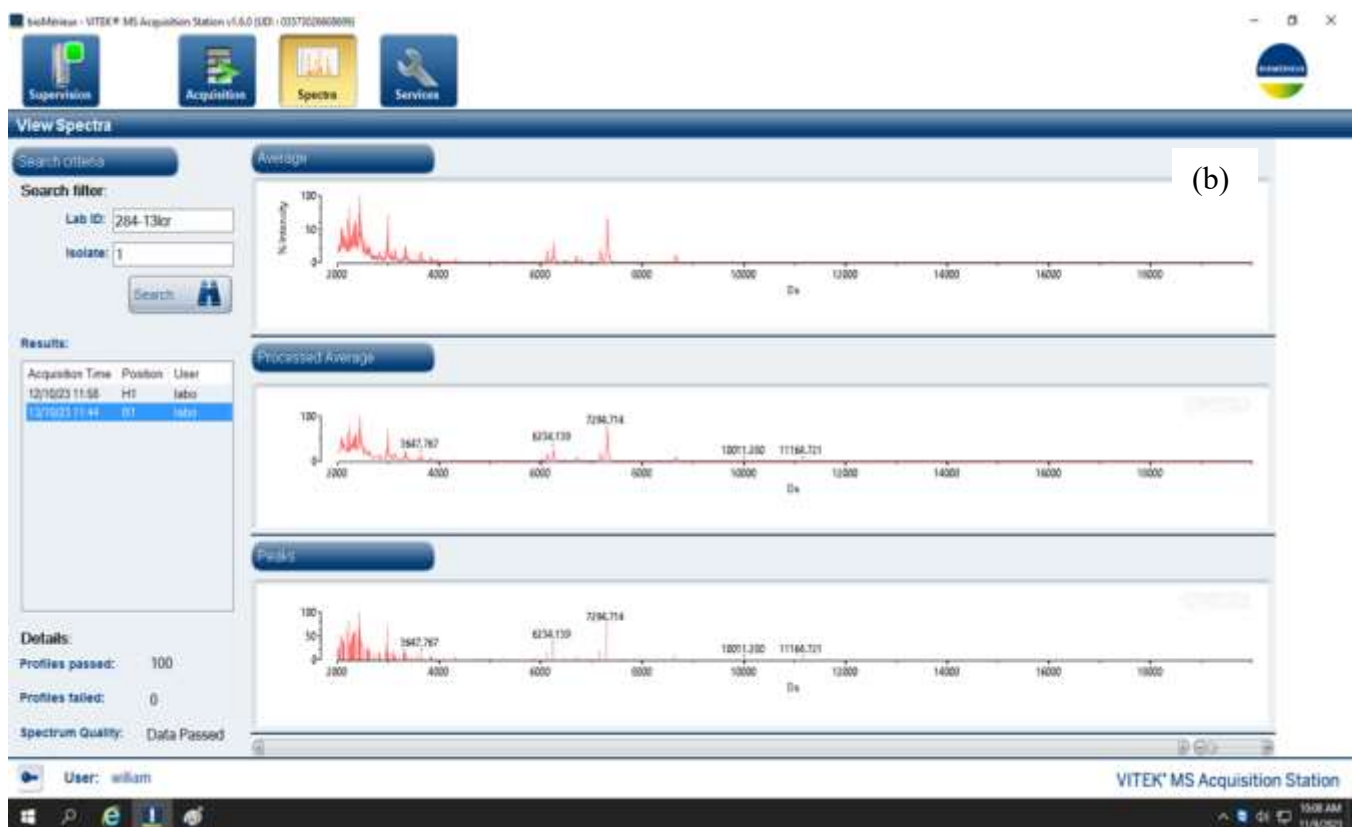
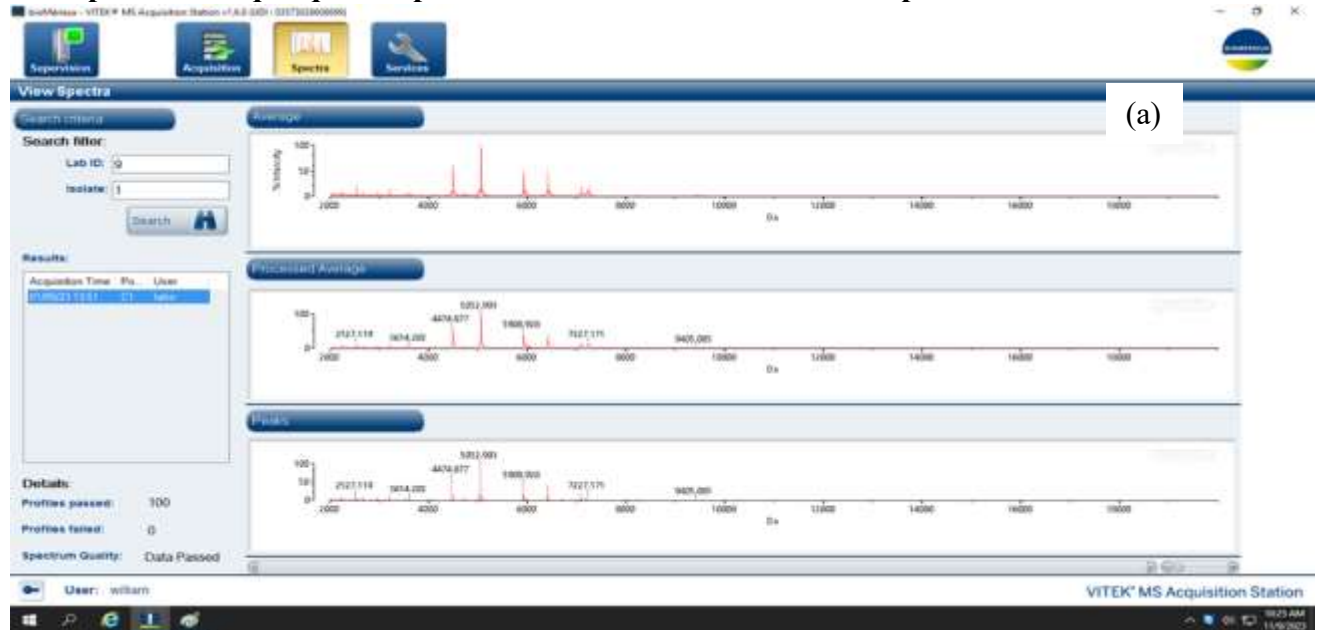


Photo d'un spectre (a) d'*Aspergillus fumigatus* ; (b) de *Trichophyton violaceum*

Source : présente étude

❖ Exemples de quelques spectres des levures obtenus par MALDI-TOF



(a) Spectre de *Candida metapsilosis* ; (b) Spectre de *Cryptococcus neoformans*

Source : présente étude