



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences
de la Terre et de l'Univers



Département de Biologie

Laboratoire : Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

MEMOIRE

Présenté par

Melle BAICHE Nihad Fatima Zohra

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Biochimie

Thème

Étude de la résistance à l'amphotéricine B de souches cliniques de *Candida* sp

Soutenu le Novembre 2020, devant le jury composé de :

| | | | |
|------------|------------------------------------|------------|-----------------------|
| Présidente | Boucherit-Otmani Zahia | Professeur | Université de Tlemcen |
| Encadreur | Baba Ahmed -Kazi Tani Zahira Zakia | MCA | Université de Tlemcen |
| Examineur | Seghir Abdelfettah | MCA | C.U. d'Ain Témouchent |

Année universitaire 2020/2021

Dédicaces

Je dédie cet humble mémoire

A

*A notre très cher prophète que Allah prie sur lui et le salue qui
encourage la quête du savoir*

*Aux deux personnes précieuses, et envers lesquelles aucun d'entre
nous ne pourrait s'acquitter de sa dette, pour leur soutien, leur
amour et attention : mes très chers parents.*

A ma très chère sœur Chahinez

A mes très chers et précieux frères Mouad et Abdelnoor

A ma famille et à tous mes amis.

Nihad

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau du « Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques » de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et ma profonde gratitude à Madame Baba Ahmed - Kazi Tani Z.Z., Maître de conférences classe A, au département de Biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour son encadrement, ses encouragements, ses conseils, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Madame Boucherit-Otmani Z., Professeur au département de Biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'assurance de mon profond respect. Je la remercie également pour ses encouragements et ses précieux conseils.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à Monsieur Seghir A., Maître de conférences classe A, au Centre Universitaire de Ain-Temouchent, pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à la doctorante Halimi Amel, ainsi qu'aux techniciennes du laboratoire «Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique» de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen pour leur précieuse aide.

ملخص

ادى الاستعمال المتزايد لمضادات الفطريات من اجل منع ومعالجة داء المبيضات (Candidoses invasives) الى ظهور عينات مقاومة مرتبطة احيانا بفشل سريري .الهدف من هذه الدراسة هو تقييم مستويات المقاومة ل Amphotéricine B , لمجموعة من السلالات السريرية ل *Candida sp* التي تنتمي الى مخبر "المضادات الحيوية ؛ الكيمياء الفيزيائية ؛التوليف ؛والنشاط البيولوجي".السلالات حددت بواسطة تربية في الوسط *Candida* CHROM Agar اختبار Blastèse ,اختبار RAT. التركيزات الدنيا المثبطة (CMI) , حددت باستخدام طريقة التخفيف الجزئي في صفيحة ميكرويسكوبية 96جب , تم انجازها وفقا لتعليمات CLSI(M27-A3). النتائج المتحصل عليها سمحت بتحديد 5 سلالات من نوع *Candida albicans* , 4 سلالات من نوع 4 *Candida tropicalis* , سلالات من نوع *Candida krusei* التركيزات الدنيا المثبطة (CMI) المتحصل عليها سمحت لنا بتصنيف مجموعة السلالات المدروسة ضمن الفئة الحساسة ل Amphotéricine B .

الكلمات المفتاحية: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, Amphotéricine B, CMI

Résumé

L'utilisation croissante des antifongiques dans la prévention et le traitement des candidoses invasives a conduit à l'émergence d'isolats résistants parfois associés à des échecs clinique. Le but de ce travail est d'évaluer les niveaux de résistance à l'amphotéricine B d'une collection de souches cliniques de *Candida sp.* appartenant au laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique ». Les souches sont identifiées par culture sue milieu CHROM Agar *Candida*, test de blastèse et test RAT. Les Concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées par la méthode de microdilution sur microplaque 96 puits selon les recommandations du CLSI (MA-27_A 3). Les résultats obtenus ont permis l'identification de 5 souches de *Candida albicans*, 4 souches de *Candida tropicalis* et 4 autres souches de *Candida krusei*. Les CMI obtenus nous ont permis d'assigner l'ensemble des souches étudiées à la catégorie sensible à l'amphotéricine B.

Mots clés : *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, Amphotéricine B, CMI

Abstract

The increasing use of antifungal agents in the prevention and treatment of invasive candidiasis has led to the emergence of resistant isolates sometimes associated with clinical failures. The aim of this work is to evaluate the levels of resistance to amphotecin B in a collection of clinical strains of *Candida sp.* belonging to the laboratory "Antibiotics, Antifungals: physico-chemistry, synthesis and biological activity". The strains are identified by culture on CHROM Agar *Candida* medium, a blastase test and a RAT test. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) are determined by the 96-well microplate microdilution method according to CLSI recommendations (MA-27_A 3). The results obtained allowed the identification of 5 strains of *Candida albicans*, 4 strains of *Candida tropicalis* and 4 other strains of *Candida krusei*. The MICs obtained allowed us to assign all the strains studied to the amphotericin B sensitive category. Key words *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, Amphotericin B, CMI

Keywords : *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, Amphotericin B, CMI

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| Première partie : Synthèse bibliographique | 1 |
| Deuxième partie : Matériel et méthodes | 5 |
| 1. Identification | 5 |
| 2. Etude de la résistance à l'amphotéricine B | 6 |
| Troisième partie : Résultats et discussion | 7 |
| 1. Identification des levures | 7 |
| 2. Résistance à l'amphotéricine B | 8 |
| Quatrième partie : Conclusion | 12 |
| Cinquième partie : Références bibliographiques | 13 |

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

RAT: Riz-Agar-Tween80

AmB: Amphotéricine B

DMSO: Diméthylesulfoxyde

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute Medium 1640

Liste des photos

Photo 1. Aspect des colonies des souches de *Candida* sur milieu CHROM-Agar.

Photo 2. Identification d'une souche de *Candida albicans* (Ca1).

Liste des figures

Figure 1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida albicans*.

Figure 2. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida tropicalis*.

Figure 3. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida krusei*.

Liste des tableaux

Tableau 1. Résultats de l'identification des souches de *Candida* sp.



Synthèse bibliographique

Depuis plus de deux décennies, l'incidence des infections à *Candida* n'a cessé de croître. Cette augmentation est, pour une grande part, liée à l'immunodépression induite par les chimiothérapies anticancéreuses, aux traitements immunosuppresseurs, mais aussi aux progrès des techniques médicales **(Grenouillet et coll., 2013)**. Cette tendance, d'autant plus importante en réanimation, est à l'origine d'une augmentation de la durée de séjour, des coûts d'hospitalisation et de la mortalité **(Charles et coll., 2016)**.

Les levures *Candida* sont des saprophytes retrouvées à l'état commensal chez l'Homme sur la peau et les muqueuses. Le passage de l'état saprophyte à l'état pathogène dépend de la balance entre les capacités de colonisation, les facteurs de virulence des *Candida* et le contrôle des défenses du système immunitaire **(Loroux, 2017)**.

Candida albicans est l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans les prélèvements cliniques. Levure diploïde, non capsulée, non pigmentée, et aérobie, son matériel génétique se répartit en huit chromosomes. *Candida albicans* se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère, formant ainsi des colonies blanches crémeuses **(Ene et Bennett, 2014)**.

Au niveau des tissus infectés, cette levure est retrouvée simultanément sous les formes de blastospores et de mycéliums. Alors que la forme blastospore reste non-invasive, la forme mycélienne est capable de pénétrer les muqueuses **(Mavor et coll., 2005)**.

En plus de la transition morphologique et la commutation phénotypique, de nombreux facteurs de virulence sont associés à la pathogénèse de *Candida albicans* dont les principaux sont les adhésines, les protéases aspartiques et les phospholipases **(Karkowska-Kuleta et coll., 2009)**.

L'utilisation des antifongiques dans la prévention et le traitement des candidoses invasives à *Candida albicans* a conduit une pression de sélection et à l'émergence de souches de *Candida* non-*albicans* comme *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* parfois associés à des échecs cliniques **(Toubas, 2013)**.

En effet *Candida glabrata*, est l'espèce non-*albicans* la plus fréquemment isolée en Europe et en Amérique du Nord dans les candidoses invasives. Elle est développée suite à une prophylaxie par antifongiques et sa fréquence augmente avec l'âge **(Pfaller et Diekema, 2010)**.

Candida glabrata est une petite levure haploïde de 13 chromosomes, qui se présente uniquement sous la forme de blastoconidies aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Elle ne présente pas de dimorphisme, se reproduit par bourgeonnements successifs et donne des colonies blanches, crémeuses **(Ahmad et coll., 2014)**. Pour ce qui est de la pathogénicité, *Candida glabrata* possède des gènes codant pour des phospholipases **(Ferreira et coll., 2010)**.

Candida parapsilosis est une espèce souvent retrouvée chez les nouveaux-nés et les enfants de moins de deux ans **(Pfaller et coll., 2010)**. Elle est fréquemment isolée dans les candidémies sur cathéter, en raison de sa capacité accrue à former des biofilms et à se développer sur ces matériaux **(Toubas, 2013)**. Cette levure se présente sous formes variables rondes à allongées. Elle se reproduit par bourgeonnement multipolaire et donne des colonies blanches, crémeuses, lisses, ou finement plissées **(Almirante et coll., 2006)**.

Candida tropicalis est un Blastomycète isolé pour la première fois par Berkhout en 1923. C'est une levure ovoïde de taille variable, qui se reproduit par bourgeonnement multipolaire. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. Il y a parfois présence de vrai mycélium. Les colonies sont de pousse rapide, crémeuse, blanche, lisse ou légèrement plissée **(Moran et coll., 2002)**.

Candida krusei est connu comme un commensal des muqueuses avec une faible pathogénicité. Cependant, l'isolement et l'implication de *Candida krusei* en pathologie humaine ces dernières années a regain un intérêt dans l'étude et la compréhension de cette levure **(Patted et coll., 2009)**. *Candida krusei* est une levure non pigmentée qui se reproduit par bourgeonnement multipolaire et donne des colonies étendues, plates et mates **(Samaranayake et coll., 2005)**.

Le traitement des candidoses repose sur l'utilisation des polyènes (amphotéricine B), les triazolés (fluconazole, voriconazole) et les échinocandines (caspofungine, micafungine) pour les mycoses viscérales et les imidazolés topiques pour les candidoses superficielles (**Dannaoui, 2007**). Dans ce travail, seule l'amphotéricine B est abordée.

L'amphotéricine B (Fungizone®) est l'antifongique de référence pour le traitement des mycoses graves. Elle agit en formant des dimères peu solubles qui interagissent avec l'ergostérol de la membrane plasmique de la cellule fongique pour créer des canaux transmembranaires. Ainsi, cette interaction entraîne une fuite de potassium, de magnésium, de sucres et l'entrée de sodium provoquant alors la mort de la levure (**Calop et coll., 2008**).

Cependant, si l'amphotéricine B possède une forte affinité pour l'ergostérol, c'est également le cas pour certains stérols de mammifères comme le cholestérol entraînant ainsi une certaine cytotoxicité, particulièrement la néphrotoxicité qui est l'effet indésirable majeur (**Chabasse et coll., 2006**).

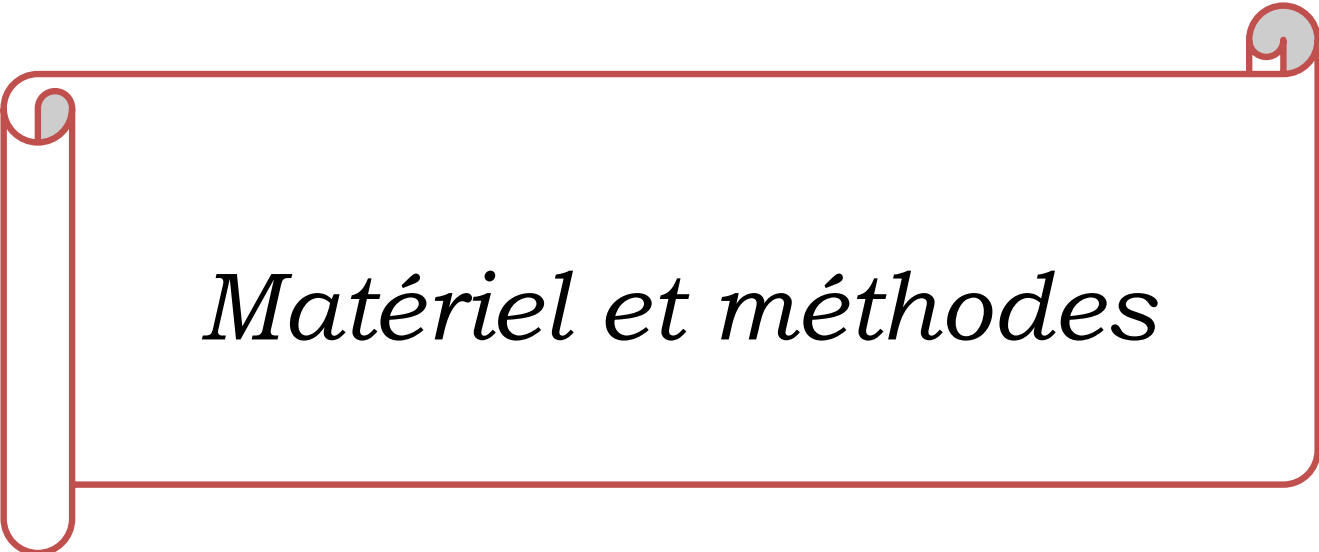
Les formulations lipidiques d'amphotéricine B ont pour but d'améliorer la tolérance et de réduire la toxicité de cette molécule, avec une efficacité comparable à celle de l'amphotéricine B conventionnelle et permettent d'utiliser de plus fortes posologies d'amphotéricine B pour une durée plus prolongée (**Delauny et Fissore, 2006**).

La résistance à l'amphotéricine B reste rare même après 40 ans d'utilisation et ne pose pas de problème majeur dans la pratique clinique. Cependant il est à noter que quelques résistances ont été décrites chez *Candida glabrata*. Ces résistances s'expliquent par une moindre affinité du principe actif avec les stérols membranaires. Ainsi, une diminution en ergostérol diminue la liaison de l'amphotéricine B à la membrane et donc son action (**Kuriyama et coll., 2005**).

Les résistances des isolats de *Candida albicans* peuvent se développer chez les patients traités par chimiothérapie, notamment ceux ayant reçu un traitement antérieur par un polyène ou par un azolé. Il faut garder à l'esprit que des résistances croisées sont possibles et même fréquentes entre des azolés et des polyènes (**Vazquez, 2006**).

Ces résistances soulignent la nécessité d'utiliser des tests d'étude de la résistance *in vitro* bien standardisés qui ont pour objectifs de guider la thérapeutique mais aussi de surveiller l'émergence de résistances dans une population d'isolats initialement sensibles et/ ou l'apparition de souches résistantes aux antifongiques dans des études épidémiologiques (**Piens et coll., 2003**).

C'est dans ce cadre d'idées que nous sommes proposé de réaliser ce travail dont le but est de déterminer les profils de résistance à l'amphotéricine B d'une collection de souches de *Candida* sp isolées au service de réanimation du CHU de Tlemcen et conservées au laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique ».



Matériel et méthodes

Ce travail porte sur l'étude des profils de résistance à l'amphotéricine B d'une collection de souches de *Candida* sp appartenant à Mme Halimi Amel, doctorante au laboratoire "Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique" de l'Université Aboubekr Belkaïd- Tlemcen. Ces souches sont entretenues par repiquage régulier et conservées à 4°C sur Sabouraud gélose. La souche de référence *Candida albicans* ATCC 10231 est utilisée comme contrôle interne.

1. Identification

La revivification et la purification des souches sont réalisées par plusieurs passages successifs alternant Sabouraud liquide et Sabouraud gélose avec des incubations de 48 Heures à 35°C. L'identification est réalisée par la culture sur milieu CHROM-Agar™ *Candida*, le test de filamentation et la recherche de chlamydoconidies.

1.1. Le milieu CHROM-Agar™ *Candida* permet de différencier les espèces *Candida albicans* des autres espèces *Candida* non-albicans par production de colonies de couleur distincte sur la boîte d'isolement après une incubation de 48 Heures à 35°C. Les colonies de *Candida albicans* sont repérées par une coloration vert-turquoise, celles de *Candida tropicalis* par une couleur bleue, *Candida krusei* par une couleur prune et celles de *Candida glabrata* par une couleur rose/blanche. Toutes les autres espèces donnent des colonies blanchâtres.

1.2. Le test de filamentation (blastèse) est réalisé par ensemencement de la souche à tester dans 0,5 mL de sérum humain et une incubation de 3 à 4 heures à 37°C. La mise en évidence des tubes germinatifs est réalisée par observation au microscope optique (Grossissement X 40) (**Djohan et coll., 2012**).

1.3. Le test de RAT est réalisé par un ensemencement du milieu gélosé RAT (riz, agar, tween 80) par piqûre centrale du culot et stries sur la pente. Après une incubation de 48 heures à 30°C, la zone de piqûre du milieu est prélevée et l'échantillon observé sous microscope optique (grossissement X 40) pour la recherche des chlamydoconidies (spores globuleuses de 10 à 15µm entourées d'une paroi épaisse) (**Ouanes et coll., 2013**).

2. Etude de la résistance à l'amphotéricine B

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches étudiées sont déterminées par la technique de microdilution sur microplaque selon le protocole standard du document M27-A3 du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) publié en 2008.

2.1. Préparation de l'antifongique

La solution mère de l'amphotéricine B (Sigma) est préparée en extemporané par dissolution de l'antifongique dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 1,6 mg/mL.

2.2. Préparation de l'inoculum

Une suspension levurienne de 3.10^3 cellules/mL est préparée à partir d'une culture de 24 heures sur Sabouraud gélose dans de l'eau physiologique stérile par dénombrement sur cellule de Thoma. La suspension est ensuite diluée au 1/50 puis au 1/20 dans le milieu *Roswell Park Memorial Institute*, (RPMI 1640 ; pH 7) (sigma) pour avoir un inoculum final égale à $1,5.10^3$ cellules/mL.

2.3. Technique de microdilution sur microplaque

100µL de la solution mère de l'amphotéricine B sont répartis à des concentrations finales allant de 0,03 à 16 µg/ml dans les puits d'une microplaque contenant 100µl d'inoculum. La microplaque est ensuite scellée puis incubée à 35°C pendant 24 et 48 heures. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'amphotéricine B est définie comme étant la plus petite concentration inhibant toute croissance levurienne visible à l'œil nu.



Résultats et discussion

1. Identification des levures

Une collection de 13 souches de *Candida sp.* a été mise à notre disposition pour la réalisation de ce travail. Les résultats des tests d'identification entrepris ont permis d'assigner 5 souches à l'espèce *Candida albicans* (Ca8, Ca9, Ca22, Ca24 et Ca25), 4 souches à l'espèce *Candida tropicalis* (Ct2, Ct3, Ct8, Ct9) et 4 autres souches à l'espèce *Candida krusei* (Ck4, Ck8, Ck9, Ck11) (Tableau 1).

Tableau 1. Résultats de l'identification des souches de *Candida sp.*

| | CHROM-Agar™ <i>Candida</i> | Test de filamentation | Test de RAT |
|--|-------------------------------|--------------------------|-------------|
| <i>Candida albicans</i> (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4, Ca5) | Colonies vertes | Positif | Positif |
| <i>Candida tropicalis</i> (Ct1, Ct2, Ct3, Ct4) | Colonies bleues | Négatif | Négatif |
| <i>Candida krusei</i> (Ck1, Ck2, Ck3, Ck4) | Colonies roses | Négatif | Négatif |

La croissance sur le milieu CHROM-Agar *Candida* a permis l'identification rapide des souches de *Candida* (**Photo 1**). Ce milieu contient des substances chromogènes donnant aux colonies qui s'y développent une coloration typique de l'espèce avec une spécificité de plus de 99 % pour *Candida albicans*. Cette coloration est fondée sur la mise en évidence d'une activité enzymatique de type hexosaminidase (N-acétyl- β -D-galactosaminidase) (**Leberer et coll., 2001**).

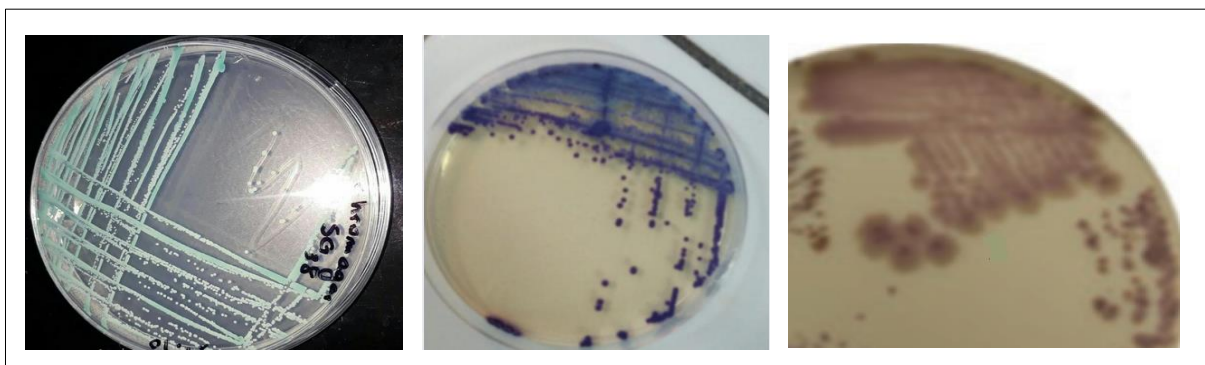


Photo 1. Aspect des colonies des souches de *Candida* sur milieu CHROM-Agar.
A. Photographie de la culture de *Candida albicans* (colonies vertes). **B.** Photographie de la culture de *Candida tropicalis* (colonies bleu). **C.** Photographie de la culture de *Candida krusei* (colonies roses).

L'identification de l'espèce *albicans* est facilitée par la présence de caractéristiques qui lui sont propres. En effet, c'est une espèce capable de former des tubes germinatifs dans des conditions de culture très précises, en particulier en présence de sérum. D'autre part, elle peut former des spores de résistance, appelées chlamydozoïdes, lorsque les conditions de culture ne sont pas favorables (Grillot, 1996).

Ces différentes formes sont mises en évidence par les tests blastèse et le test de chlamydozoïdation (Photo 2).

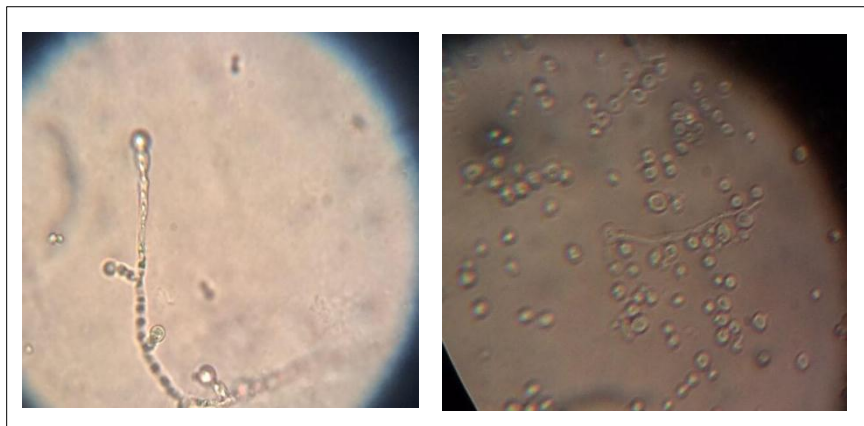


Photo 2. Identification d'une souche de *Candida albicans* (Ca1).

A. Photographie des chlamydozoïdes de *Candida albicans* (microscope optique Grossissementx40) ; **B.** Photographie des tubes germinatifs de *Candida albicans* (microscope optique Grossissementx40).

2. Résistance à l'amphotéricine B

L'émergence de nouvelles espèces et l'apparition de résistances aux antifongiques requièrent l'utilisation de tests de sensibilité *in vitro* bien standardisés. Dans ce travail, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la collection de souches étudiées à l'amphotéricine B.

Par définition, la CMI est la plus faible concentration d'antifongique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation.

La figure 1 regroupe les résultats relatifs aux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis de la souche de référence *Candida albicans* ATCC10231 et des souches cliniques de *Candida albicans* (N=5) obtenues après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C.

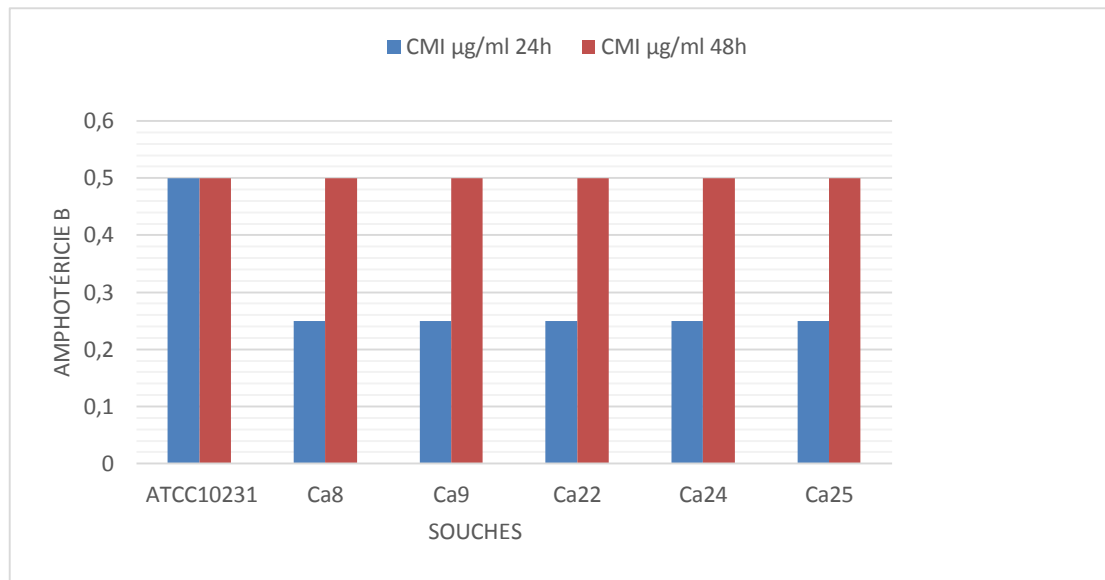


Figure 1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B ($\mu\text{g}/\text{mL}$) vis-à-vis des souches de *Candida albicans*

Les concentrations minimales inhibitrices enregistrées après 24 heures d'incubation sont de $0,25\mu\text{g} / \text{ml}$ pour les souches (Ca1 Ca2, Ca3, Ca4, Ca5). Au bout de 48 heures d'incubation, les CMI des souches ont augmenté à $0,5\mu\text{g}/ \text{mL}$. Selon les normes du CLSI 2008, ces résultats nous ont permis de classer les souches de *Candida albicans* dans la catégorie sensible.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Seghir et coll., (2014)** et de **Lahfa-Hasaine et coll., (2017)** qui ont rapporté la sensibilité des souches *Candida albicans* isolées au service de réanimation du CHU de Tlemcen à l'amphotéricine B.

Les figures 2 et 3 regroupent les résultats relatifs aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches cliniques de *Candida tropicalis* (N=4) et de *Candida krusei* (N=4) obtenues après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C.

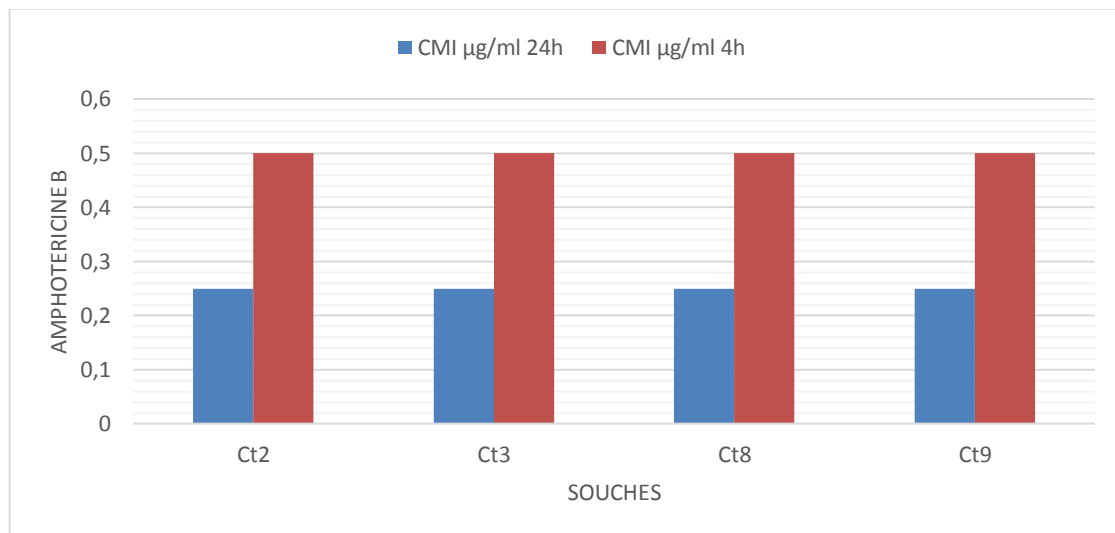


Figure 2. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B (µg/mL) vis-à-vis des souches de *Candida tropicalis*

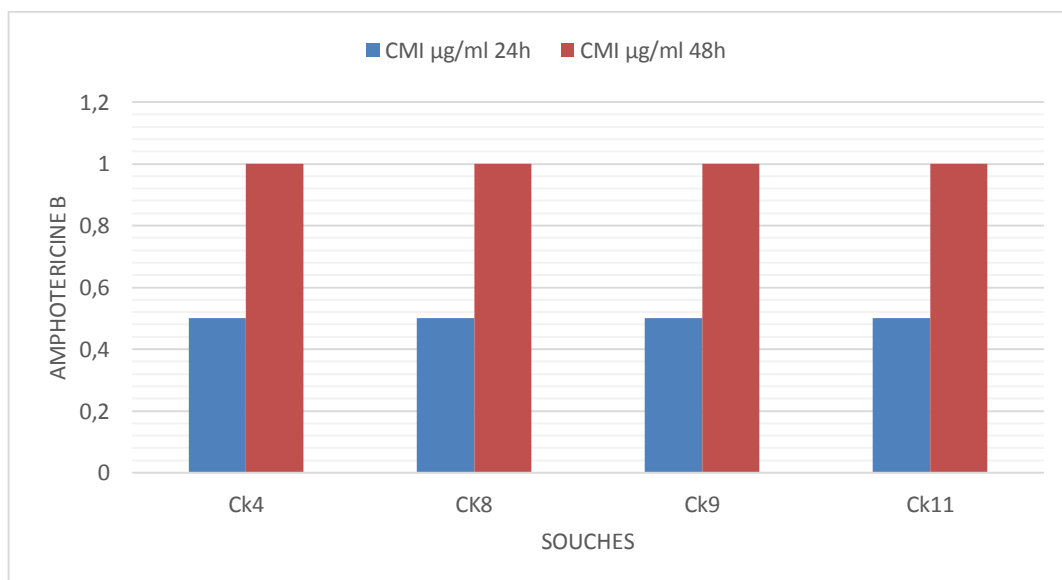


Figure 3. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B (µg/mL) vis-à-vis des souches de *Candida krusei*

Les concentrations minimales inhibitrices obtenues après 24 heures d'incubation sont de 0,25µg/ml pour les souches (Ct1, Ct2, Ct3, Ct4). Après 48 heures d'incubation les CMI de l'amphotéricine B passent à 0,5µg/ml.

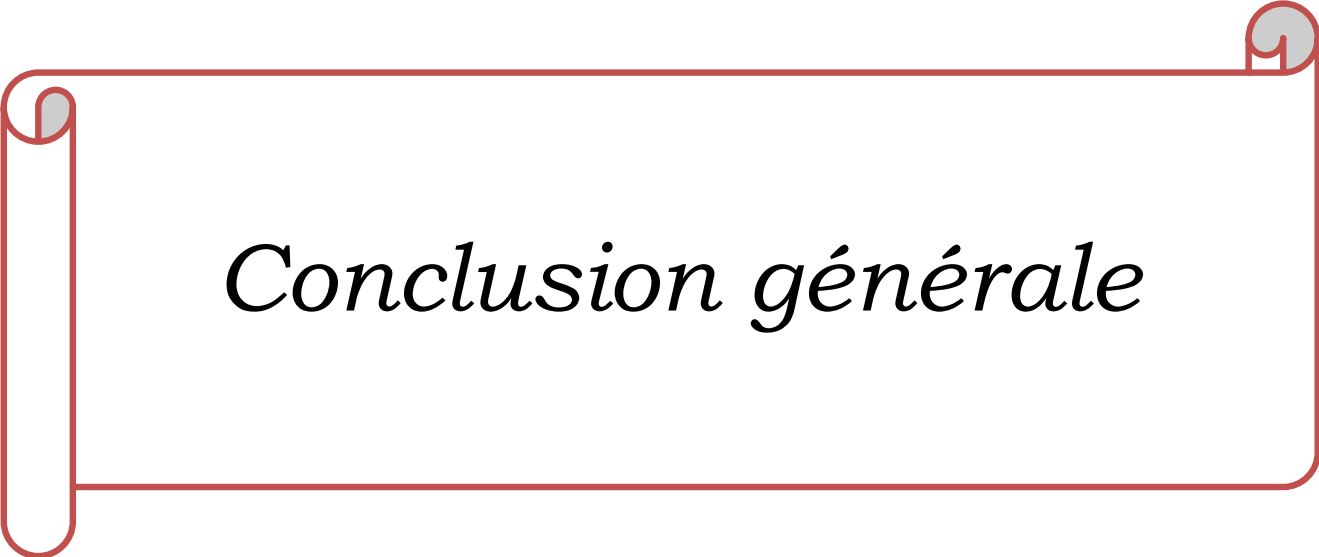
Les concentrations minimales inhibitrices enregistrées après 24 heures d'incubation sont de 0,5 µg/ml pour les souches (Ck1, Ck2, Ck3, Ck4). Ces CMI ont augmenté à 1µg/ml après 48 heures d'incubation.

De ce fait, selon les normes de CLSI 2008, les isolats cliniques de *Candida tropicalis* et *Candida krusei* sont catégorisées sensibles à l'amphotéricine B.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Tortorano et ses collaborateurs, 2006 ; Sellami et ses collaborateurs, 2011 et Le Govic et ses collaborateurs, 2015** qui ont rapporté la sensibilité des levures du genre *Candida* à l'amphotéricine B au cours de ces dernières années en Tunisie et en Europe.

En effet, très peu de mécanismes de résistance aux polyènes ont été décrits à ce jour et leur impact clinique est limité (**Vandeputte et coll., 2012**).

L'absence de résistances acquises à l'amphotéricine B chez les souches cliniques de *Candida* semble indiquer que la pression de sélection antifongique au service de réanimation du CHU de Tlemcen est bien gérée



Conclusion générale

Dans le traitement d'une candidose, le rôle du laboratoire est d'isoler et d'identifier la souche impliquée puis de détecter *in vitro*, les souches résistantes ou de sensibilité diminuée aux antifongiques à l'aide de tests phénotypiques (détermination des CMI) effectués en routine.

Les seuils spécifiques, d'un couple levure/antifongique donné, établis par le CLSI permettent la discrimination entre les souches dites « sauvages » et les souches « non-sauvages » (ayant acquis des mutations ou des mécanismes de résistance aux antifongiques).

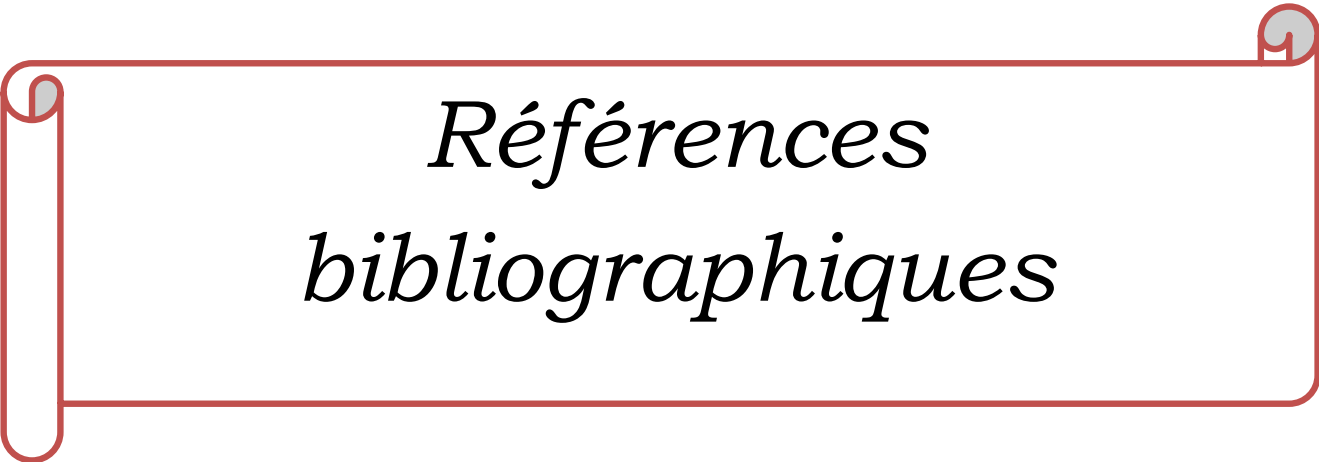
Dans ce travail, nous nous sommes proposé d'identifier une collection de souches de *Candida sp* isolées au service de réanimation du CHU de Tlemcen et conservées au laboratoire "Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique" de l'Université Aboubekr Belkaïd- Tlemcen puis de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B par la technique de microdilution selon les recommandations du CLSI 2008.

Les résultats d'identification obtenus nous ont permis d'identifier 5 souches de *Candida albicans*, 4 souches de *Candida tropicalis* et 4 autres souches de *Candida krusei*.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices résultats nous ont permis de classer l'ensemble des souches étudiées (n=13) dans la catégorie sensible à l'amphotéricine B.

L'absence de résistances acquises à l'amphotéricine B chez les souches cliniques de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* semble indiquer que la pression de sélection antifongique au service de réanimation du CHU de Tlemcen est bien gérée.

Pour compléter ce travail il serait intéressant de réaliser une étude épidémiologique visant à identifier l'écologie du service de réanimation et la détection des souches résistantes ainsi que les mécanismes sous-jacents à l'aide des tests de sensibilité basés sur les seuils cliniques mis en place par le CLSI afin de permettre de mieux orienter le choix de l'antifongique.



*Références
bibliographiques*

1. **Ahmad K.M., Kokosar J., Guo X., Gu Z., Ishchuk O.P. and Piskur J. (2014).** Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*; 1–7
2. **Almirante B, Rodriguez D et al., (2006).** Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 44: 1681-1685.
3. **Andriole VT. Current and future therapy of invasive fungal infections. (1998).** *Curr Clin Top Infect Dis*.18:19-36
4. **Butler G, Rasmussen MD et al., (2009).** Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247): 657-662.
5. **Calop J., Limat S., Fernandez C. (2008).** Pharmacie clinique et thérapeutique. 3e Edition ELSEVIER/MASSON. 1094-1123.
6. **Chabasse D, Robert R, Marot A and Phiet M, (2006).** *Candida pathogènes*. Monographies de microbiologie. Lavoisier, Pp158-178.
7. **Charles P.E., Large A., Quenot J.P., Dalle F. (2016).** Épidémiologie des candidoses invasives en France. *Réanimation* 25 : S37-S43
8. **Dannaoui E. (2007).** Principaux antifongiques systémiques : mécanismes d'action et de résistances, spectres, indications : DIU Stratégies thérapeutiques en maladies infectieuses. 2.
9. **Delauny P., Fissore C. (2006).** Interactions médicamenteuses des antifongiques systémiques. *J. Mycol. Med.* 16 : 152-158
10. **Ene I.V., et Bennett R.J. (2014).** The cryptic sexual strategies of human fungal pathogens. *Nat Rev Microbiol* 12, 239-251.
11. **Ferreira N, Belloch C, Querol A, Manzanares P, Vallez S and Santos A, (2010).** Yeast microflora isolated from brazilian cassava roots: taxonomical classification based on molecular identification. *Curr Microbiol*, 60(4): 287-93.
12. **Grenouillet F., Hénon T., Kaiser J.D., Limat S., Million L., Leroy J. (2013).** Usage, impact écologique et économique des antifongiques systémiques en milieu hospitalier en France. *BEH* 12-13
13. **Grillot R. (1996).** Les mycoses humaines : démarche diagnostique. Elsevier, Paris.

- 14.Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M and Kozik A, (2009).** Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochimica Polonica*, 56 :211-224.
- 15.Lahfa-Hassaine I., Boucherit-Otmani Z., Sari-Belkherroubi L. and Boucherit K. (2017).** Retrospective study of *Candida* sp. contaminations of endoscopes at the University Hospital of Tlemcen (Algeria). *Journal de Mycologie Médicale*, 27 (2), 127-132.
- 16.Le Govic Y., Miossec C., Courdurié C., Mehdaoui H., Desbois N (2015).** Épidémiologie des candidémies en réanimation : étude observationnelle rétrospective au CHU de la Martinique (2001-2013). *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 106-107
- 17.Leberer E., Harcus D., Dignard D., Johnson L., Ushinsky S., Thomas D., Schroppel K. (2001).** Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and AMPc signalling in the pathogenetic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol* ; 42 : 673-687.
- 18.Loraux C. (2017).** Caractérisations génotypique et phénotypique de souches de *Candida glabrata* développant des résistances aux antifongiques
- 19.Mavor A. L., Thewes S., andHube B. (2005).** Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets*, 6:863-874
- 20.Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, (2002).** Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens. In: Calderone RA. *Candida* and Candidiasis. 4th Edition (ASM Press, Washington, chap. 4, Pp: 37-53.
- 21.Patted SV, Halkati PC, Yavagal ST and Patil R, (2009).** *Candida krusei* infection presenting as a right ventricular mass in a two-month-old Infant. *Ann Pediatr Cardiol*, 2(2): 170–172.
- 22.Pfaller M. A., Diekema D.J. (2010).** Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit. Rev. Microbiol.* 36(1):1–53.
- 23.Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. (2010).** Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68(3):278–83.

- 24.Piens M.A., de Monbrison F., Picot S. (2003).** Étude de la sensibilité des levures aux antifongiques en pratique médicale. *La Lettre de l'Infectiologue - Tome XVIII - n° 6* – 222-226
- 25.Samaranayake YH, Ye J, Yau JY, Cheung BP, Samaranayake LP, (2005).** *In vitro* method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. *J Clin Microbiol*, 43(2):818-825.
- 26.Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Belkherroubi-Sari L. and Boucherit K. (2014).** Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen: épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. *Journal de Mycologie Médicale*, 24(4), e179-e184.
- 27.Sellami A.H., Sellami S. Néji F., Makni S., Abbes F., Cheikhrouhou H., Chelly M., Bouaziz B., Hammami M., Ben Jemaa S., Khaled A., Ayadi. (2011)** Antifungal Susceptibility of Bloodstream *Candida* Isolates in Sfax Hospital: Tunisia. *Mycopathologia*,171, 417–422.
- 28.Tortorano A.M., Kibbler C., Peman J., et al., (2006)** *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 27,359-66.
- 29.Toubas D. (2013).** Epidémiologie des candidoses invasives. *Rev. Française Lab.* (450) :27–36.
- 30.Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. (2012).** Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int. J. Microbiol.*713687.