



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

UNIVERSITE DE TLEMCEN

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

Département de Biologie

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

MEMOIRE

Présenté par

MR Youbi Oussama

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

**Etude de l'effet d'antimicrobiens sur des levures de *Candida albicans*
isolées de la cavité buccale**

Soutenu le 10 /11 / 2020, devant le jury composé de :

Présidente : Kazi Tani-Baba Ahmed Zahira Zakia	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur : Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice : Benhabib-Bekkal Brikci Ouassila	MCB	C.U. Ain Témouchent

Année universitaire 2019/2020

ملخص:

عدوى الخميرة عن طريق الفم شائعة للغاية، عادة بسبب تكاثر خميرة *Candida albicans*، جرثومة متعايشة تصبح انتهازية عندما تكون الظروف المحلية ملائمة لها. الهدف من هذه الدراسة هو معرفة توزيع أصناف الفطريات في تجويف الفم ودراسة حساسيتها لمضاد فطري مرجعي، الأمفوتيرييسين B. تم أخذ العينات في فبراير 2020 من متطوعين أصحاء بدون آفات فموية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنه من بين 18 عينة التي تم أخذها 38.9% عزلت منها فطريات أهمها *Candida albicans* (71.42%)، *Candida krusei* (14.29%) و *Candida glabrata* (14.29%). العمر الأشخاص وكونهم ذكورهما من عوامل الخطر المصاحبة للعدوى. كشفت اختبارات الحساسية المضادة للفطريات أن جميع سلالات *C. albicans* حساسة للأمفوتيرييسين B مع cmi بين 0,125 و 0.5 µg/mL بعد 24 و 48 ساعة من الحضانة عند 35°C.

الكلمات الرئيسية: عدوى الخميرة الفموي، مضاد الفطريات، أمفوتيرييسين B.

Résumé :

Les candidoses buccales sont extrêmement fréquentes. Elles sont habituellement dues à la prolifération de *Candida albicans*, germe saprophyte devenant opportuniste lorsque les conditions locales deviennent favorables à sa croissance. L'objectif de la présente étude est d'établir l'épidémiologie des levures du genre *Candida* dans la cavité buccale et d'étudier leur sensibilité à un antifongique de référence, l'amphotéricine B. Les prélèvements étaient effectués au mois de février 2020 sur des volontaires sains ne présentant aucune lésion buccale.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 18 prélèvements effectués, 38,9% sont altérés par les levures, principalement *Candida albicans* (71,42%), *Candida krusei* (14,29%), et *Candida glabrata* (14,29%). Le sexe masculin et l'âge sont les facteurs de risque qui ont accompagné les cas d'infections.

Les tests de sensibilité à l'amphotéricine B ont révélé que toutes les souches de *C. albicans* sont sensibles à l'amphotéricine B avec des CMI comprises entre 0,125 et 0,5µg/mL après 24 et 48 heures d'incubation à 35°C.

Mots-clés: mycoses buccales, *Candida albicans*, antifongiques, amphotéricine B.

Abstract:

Oral yeast infections are extremely common, usually due to proliferation of *Candida albicans*, a saprophytic germ that becomes opportunistic when local conditions become favorable for its growth. The objective of this study was to make the epidemiology of yeasts of the genus *Candida* in the oral cavity and to study their sensitivity to a reference antifungal, amphotericin B. The samples were taken in February 2020 from healthy volunteers without oral lesions.

The results obtained showed that among the 18 samples taken, 38.9% were altered by yeasts, mainly *Candida albicans* (71.42%), *Candida krusei* (14.29%), and *Candida glabrata* (14.29%), male gender and age are the risk factors that have accompanied cases of infections.

Sensitivity tests revealed that significant all the *Candida albicans* strains are sensitive to amphotericin B with MICs between 0.125 and 0.5µg/mL after 24 and 48 hours of incubation at 35 ° C.

Keywords: Oral yeast infections, *Candida albicans*, antifungal, amphotericin B.

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes	6
1. Prélèvements.....	6
2. Isolement et purification.....	6
3. Identification des souches.....	6
3.1. Test de CHROM-Agar™.....	6
3.2. Test de chlamydosporulation (Drochey et Vieu, 1957).....	7
3.3. Test de Blastèse (Bouchet et coll., 1989).....	7
4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CLSI M27 A3, 2008) .	7
4.1. Préparation de l'antifongique.....	7
4.2. Préparation de l'inoculum.....	8
4.3. Technique de microdilution sur microplaque.....	8
Troisième partie : Résultats et discussions	10
1. Identification des levures.....	10
2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches isolées.....	16
Quatrième partie : Conclusion générale	19
Cinquième partie :Références bibliographiques	21

Dédicace

Je dédie ce travail

*À ma mère, décédée il y a peu et qui serait contente d'apprendre que son fils a
enfin terminé ses études.*

À mon père pour la peine endurée.

*À mon frère Mohamed El Amine et mes sœurs que Dieu vous garde et vous
protège.*

À toute ma famille.

*À mes chers collègues Walid, Abdelillah, Mohamed seddik et à tous ceux qui
sont restés à mes côtés.*

*À tous les membres du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-
chimie, synthèse et activité biologique, pour leur soutien.*

*À toute la promotion du master Biochimie 2019-2020 avec qui j'ai partagé
d'agréables moments.*

Oussama

Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah le tout puissant pour la patience et le courage qu'il m'a donné pour effectuer ce travail et atteindre mon objectif.

Je tiens à remercier chaleureusement mon encadreur, M^{me} Boucherit-Otmani Zahia, Professeur au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour son encadrement, sa disponibilité au cours de cette expérience, sa générosité, ses encouragements et ses précieux conseils qui m'ont permis de réaliser ce travail. Je veux vraiment vous remercier pour votre soutien et votre aide que je ne l'oublierai jamais. Je tiens à vous exprimer également ma profonde gratitude pour votre professionnalisme, confiance, sympathie et votre gentillesse, qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

Mes sincères remerciements à M^{me} Kazi Tani-Baba Ahmed Zahira Zakia, maître de conférences classe A au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Ma gratitude va également à M^{me} Benhabib-Bekkal Brikci Ouassila, maître de conférences classe B au centre universitaire Belhadj Bouchaib de Ain Témouchent pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je remercie chaleureusement M^{me} Halimi Amel, Doctorante au laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique» Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, pour son aide précieuse et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous mes enseignants durant mon cursus universitaire.

Liste des abréviations

RAT : Rice Agar Tween

DMSO : Diméthylsulfoxyde

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

RPMI 1640 : *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*

CA : *Candida albicans*

AmB : Amphotéricine B

Liste des photos

Photo N°1 : Aspect des colonies des levures isolées sur milieu CHROM-Agar.

Photo N°2 : Formation de pseudofilaments par *Candida albicans* sur sérum humain.

Photo N°3 : Formation de chlamydospores par *Candida albicans* sur milieu RAT (Riz-Agar-Tween)

Liste des figures

Figure N°1 : Transitions morphologiques chez *Candida albicans* (Ernest, 2000).

Figure N°2 : Répartition des prélèvements positifs par sexe et par tranche d'âge.

Figure N°3 : Résultats de l'identification des levures isolées.

Figure N°4 Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida albicans*.

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Répartition des prélèvements positifs par sexe.

Première partie

Synthèse bibliographique

Les mycoses sont des infections fongiques causées par des champignons levuriformes ou des micromycètes. Elles peuvent être systémiques ou superficielles touchant l'épiderme et les muqueuses.

Les mycoses superficielles se situent à la quatrième place parmi les infections dermatologiques les plus répandues dans le monde (**Hay, 2017**). Elles affectent 20 à 25% de la population mondiale et leur incidence ne cesse d'augmenter. La part des candidoses est estimée à 80% (**Ameen, 2010**).

Les candidoses superficielles sont des affections cosmopolites causées par des levures appartenant au genre *Candida* qui regroupe de nombreuses espèces. La principale espèce pathogène est *Candida albicans*. Elle est responsable de 54,3% de mycoses superficielles bien que d'autres espèces soient de plus en plus isolées. Il s'agit de *Candida glabrata* (16%), *Candida parapsilosis* (14,9%), *Candida tropicalis* (8,2%) et *Candida krusei* (1,6%) (**Mujica et coll., 2004**).

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobie, diploïde possédant un matériel génétique réparti en huit chromosomes et se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère ou blastospore formant ainsi des colonies blanches crémeuses. Sur le plan morphologique, elle peut mesurer de 3 à 15µm, et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet d'échapper aux défenses liées à l'immunité cellulaire (**Eggimann et coll., 2003**).

C'est une levure commensale qui colonise couramment les revêtements cutanés et les muqueuses humaines telle que les muqueuses de la cavité buccale où elle coexiste avec diverses espèces microbiennes assurant ainsi un équilibre dynamique (**Morales et Hogan, 2010**). Cependant, le passage de l'état commensal à l'état opportuniste relève de divers phénomènes. Certaines modifications de l'écosystème bucco-pharyngée accélèrent le processus (flore, pH, imprégnation hormonale) ; *Candida albicans* possède une remarquable aptitude pour mettre à profit ce déséquilibre et devenir pathogène (**Hube, 2015**). En effet, cette levure possède différents facteurs de virulence qui sont :

-Dimorphisme cellulaire : *Candida albicans* existe sous quatre formes morphologiques : les blastospores ou blastoconidies qui représentent la forme la plus courante de multiplication de *Candida albicans* saprophyte. En présence de conditions favorables, cette levure peut changer de morphotype et passer à la forme mycelium ou pseudo-mycélium nécessaires à l'invasion des tissus et des organes de l'hôte. Ils sont rencontrés dans les tissus infectés. En fin, les chlamydoconidies ou chlamydoconidies qui correspondent à la forme de résistance de *C. albicans* et participent à son identification au laboratoire. Elles sont rarement mises en évidence *in vivo*. Les chlamydoconidies ont la particularité d'être acidophiles et acido-résistantes [(Cole et coll., 1991) ; (Sudbery et coll., 2004)]. (Figure N°1).

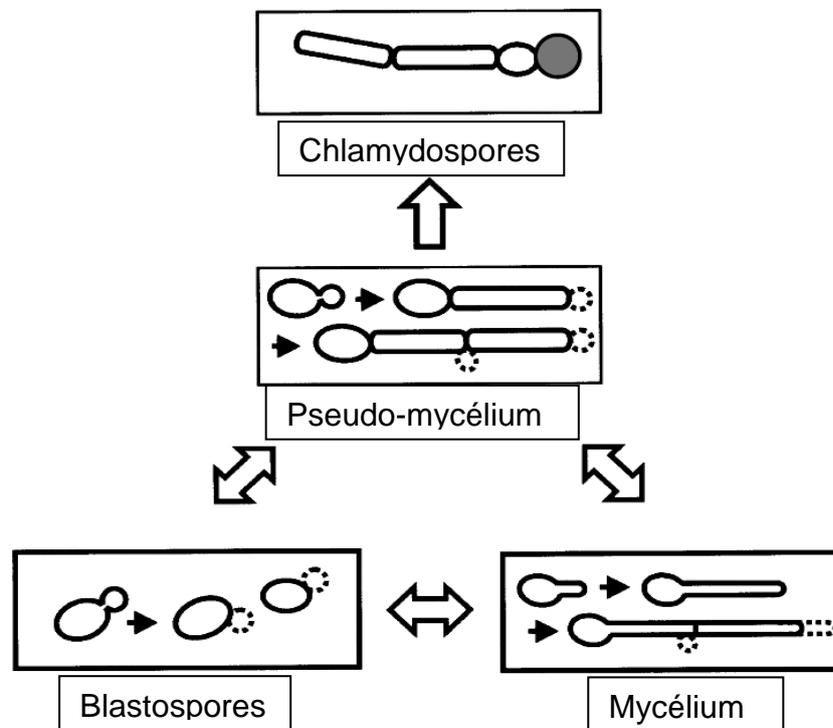


Figure N°1 : Transitions morphologiques chez *Candida albicans* (Ernest, 2000)

-Adhérence aux cellules épithéliales et invasion tissulaire : l'adhésion de *Candida albicans* aux cellules épithéliales est favorisée par la production d'enzymes protéolytiques, alors que l'invasion tissulaire est due à une action combinée des tubes germinatifs et de la sécrétion d'enzymes protéolytiques qui va

provoquer une désorganisation de l'architecture de la muqueuse buccale et la création de brèche où les mycéliums vont s'infiltrer.

La survenue et le devenir d'une candidose reflètent souvent l'état de santé du patient. En effet, *Candida albicans* a été isolé de la cavité buccale de nouveau-nés (45%) (**Manning et coll., 1985**), d'enfants sains (45 à 65%) (**Berdicevsky et coll., 1984**), d'adultes sains (30 à 45%) (**Lucas, 1993**), de porteurs de prothèses amovibles (50 à 65%) (**Arendorf et coll., 1980**), de patients hospitalisés (65 à 88%) (**Cumming et coll., 1990**), et de patients leucémiques traités par chimiothérapie (90%) (**Rodu et coll., 1988**).

La prise en charge des candidoses buccales est basée en première intention, sur l'utilisation d'antifongiques topiques. Les antifongiques systémiques peuvent être utilisés pour traiter des candidoses buccales plus étendues. Trois principales classes d'antifongiques sont utilisées :

-L'amphotéricine B (Fungizone®) : c'est un antifongique de la famille des polyènes. Il représente le traitement topique de référence des candidoses oropharyngées malgré sa toxicité et ses effets secondaires bien connus (**Laniado-Laborín et coll., 2009**).

Son spectre d'action couvre la plupart des espèces pathogènes pour l'homme (**Canuto et coll., 2002**), son efficacité est très élevée sur *C. albicans*, en revanche elle n'est pas établie pour *Candida guilliermondii*, qui lui est naturellement résistant (**Kettani, et coll., 2006**). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis de *C. Glabrata* et *C. krusei* sont supérieures à celles de *C. albicans* (**Ellis, 2002**).

-Les dérivés azolés : Il s'agit d'antifongiques issus de la synthèse chimique. Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol et la modification de la perméabilité membranaire aboutissant à une accumulation de lanostérol conduisant à un ralentissement de la croissance suivi de la mort cellulaire. Les dérivés azolés peuvent inhiber également d'autres enzymes telles que la cytochrome C peroxydase et la catalase ce qui induit une accumulation de concentrations toxiques d'eau oxygénée dans les cellules fongiques (**Masia et Gutierrez, 2002**).

Les dérivés azolés utilisés pour le traitement des mycoses superficielles sont exclusivement représentés par les imidazolés en raison de leur efficacité et de leur innocuité. Ils agissent sur l'ensemble des agents responsables de mycoses cutanéomuqueuses, *Candida sp.*, dermatophytes et *Malassezia sp.* Ils agissent également sur les bactéries Gram positif ce qui est une propriété intéressante pour les mycoses surinfectées. Les résistances sont rares pour ces antifongiques **(Coudoux, 2006)**.

-Les échinocandines : c'est une classe d'antifongiques faisant partie des polypeptides. Ils agissent en inhibant de façon non compétitive la β -1,3-glucane synthétase, impliquée dans la polymérisation et la synthèse des glucanes de la paroi des champignons. Cette diminution de glucanes entraîne une fragilisation de la paroi aboutissant à une instabilité osmotique et donc la mort cellulaire **(Chabasse et coll., 2006)**.

Il est à noter que la surutilisation des antifongiques à large spectre pour le traitement des mycoses cutanéomuqueuses peut être à l'origine de l'émergence de souches de *Candida* moins sensibles **(Srivastava et coll., 2018)**. Cette résistance constitue une menace sérieuse pour l'homme, elle est liée à un taux de mortalité supérieur à 80% dans le monde **(Alanio, et coll., 2014)**.

La prise en charge de ces infections nécessite une rigueur dans la démarche diagnostique et thérapeutique. De plus, le traitement probabiliste sans diagnostic biologique avec des molécules à large spectre en première intention pourrait être à l'origine d'une résistance aux antifongiques.

Par ailleurs, De nombreuses études se sont intéressées aux candidoses invasives ou profondes qui entravent directement le pronostic vital, contrairement aux candidoses cutanéomuqueuses qui n'ont pas suscitées beaucoup d'attention et dont l'épidémiologie reste mal connue et est basée sur des études anciennes. C'est pourquoi, nous avons entrepris cette étude dont l'objet est de rechercher les levures du genre *Candida* dans la cavité buccale des volontaires sains (ne présentant pas de pathologies bucco-dentaires apparentes), et étudier le profil de sensibilité des souches isolées à l'amphotéricine B.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab) » de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

1. Prélèvements

Les prélèvements sont effectués au cours du mois de février 2020 sur des volontaires sains, ne présentant pas de mycoses buccales apparentes, par écouvillonnage de la langue, des dents et de la paroi buccal.

Après prélèvement, les écouvillons sont introduits dans des tubes stériles contenant 5mL de bouillon Sabouraud puis placés dans une étuve à 35°C pendant 24, 48 voire 72 heures.

2. Isolement et purification

A partir des tubes présentant un trouble, des boîtes de Pétri contenant de la gélose Sabouraud sont ensemencés, puis incubées pendant 24 à 48 heures à 35°C afin de rechercher les levures. La purification des souches se fait par passages successifs sur gélose Sabouraud.

3. Identification des souches

L'identification des souches isolées est réalisée par CHROM-Agar™ *Candida*, par test de Blastèse ou test de filamentation des levures dans le sérum humain et la recherche de chlamydospores sur milieu RAT (Rice Agar Tween).

Les levures identifiées sont conservées sur gélosé Sabouraud inclinée en tube à 4°C.

3.1. Test de CHROM-Agar™

Le CHROM-Agar™ *Candida*, est un milieu sélectif qui colore spécifiquement les trois principales classes de levures du genre *Candida*. Les colonies de *Candida albicans* sont ainsi repérées par une coloration vert-turquoise sur ce milieu. *Candida tropicalis* donne sur CHROM-Agar™ *Candida*, des colonies avec une couleur bleue, *Candida krusei* des colonies couleur prune de grande taille avec un relief irrégulier, *Candida glabrata* des colonies roses/blanches et toutes les autres espèces des colonies blanchâtres.

Des boîtes de Pétri contenant du CHROM-Agar™ *Candida* sont ensemencées par stries puis placées dans une étuve à 35°C pendant 48 heures.

3.2. Test de chlamydosporulation (Drochey et Vieu, 1957)

Une colonie de levure est prélevée puis ensemencée par stries sur gélose Rice Agar Tween (RAT) en créant de fentes dans la surface de la gélose à l'aide d'un fil de platine. La zone ensemencée est recouverte d'une lamelle couvre-objets stérile puis incubée à 30 °C pendant 48 heures. La présence de chlamydozoospores (spores globuleuses de 10 à 15µm entourées d'une paroi épaisse) est mise en évidence par observation au microscope optique au grossissement x40.

3.3. Test de Blastèse (Bouchet et coll., 1989)

La souche à tester est ensemencée dans 1mL de sérum humain, puis incubée à 37°C pendant 3 à 4 heures. Une observation de la suspension au microscope optique (Objectif 40x) est réalisée pour mettre en évidence la formation des tubes germinatifs.

4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CLSI M27 A3, 2008)

4.1. Préparation de l'antifongique

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

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 de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* publié en 2008 dans le document M27-A3 qui recommande le milieu *Roswell Park Memorial Institute*, (RPMI 1640) (sigma) tamponné à pH 7.

4.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture de 24 heures sur gélose Sabouraud, nous avons préparé une suspension levurienne de 3.10^6 cellules/mL dans l'eau physiologique stérile à 8,5‰ par dénombrement sur cellule de Thoma. Cette dernière est ensuite diluée au 1/50 puis au 1/20 dans le RPMI pour avoir une concentration finale de l'inoculum égale à $1,5.10^3$ cellules/mL.

4.3. Technique de microdilution sur microplaque

Dans les 96 puits d'une microplaque contenant 100µL de l'inoculum (la suspension levurienne), nous avons ajouté 100µL de la solution d'amphotéricine B à des concentrations finales allant de 16 à 0,03µg/mL. La microplaque est ensuite scellée puis incubée à 35°C pendant 24 et 48 heures. Les CMI sont déterminées à l'œil nu.

Troisième partie

Résultats et discussion

La cavité buccale est la porte d'entrée de nombreux antigènes, mais elle est également le lieu d'établissement de niches microbiennes. C'est le cas de la levure dimorphique, *Candida albicans*, qui y réside de manière symbiotique et asymptomatique. Cependant, *C. albicans* est également l'agent étiologique des candidoses buccales (**Décanis, 2009**).

En 1991, **Soll et ses collaborateurs** ont montré que plusieurs surfaces du corps pouvaient être colonisées chez un patient asymptomatique, notamment la muqueuse buccale.

La présence de levure du genre *Candida* dans la cavité orale n'est pas synonyme de pathologie. Chez de nombreuses personnes, *Candida*, et tout particulièrement *Candida albicans*, est un composant mineur de la flore commensale de la muqueuse buccale saine (**Laurent et coll., 2011**).

Cependant, elle peut devenir systémique sous différentes conditions, ce changement génère la pathogénicité de la levure, on parle alors de candidémie.

C'est pourquoi, nous avons entrepris cette étude qui consiste à rechercher, dans un premier temps, les levures du genre *Candida*, responsables de mycoses superficielles dans la cavité buccale et de déterminer, dans un second temps, le profile des levures isolées à un antifongique de référence, l'amphotéricine B.

1. Identification des levures

Au cours du mois de février 2020, 18 prélèvements sont effectués sur des volontaires sains dont 9 hommes et 9 femmes. La mise en culture des prélèvements sur milieu Sabouraud a montré que 7 étaient positifs soit un taux de 38,8%.

La répartition des prélèvements positifs par sexe est représentée sur le **tableau N°1**.

Tableau N°1 : Répartition des prélèvements positifs par sexe

	Nombre de Prélèvements positifs	Taux d'altération
Homme (N=9)	5	55,5%
Femme (N=9)	2	22,2%
Total (N=18)	7	38,8%

La **figure N°2**, représente la répartition des prélèvements positifs par sexe et par tranche d'âge.

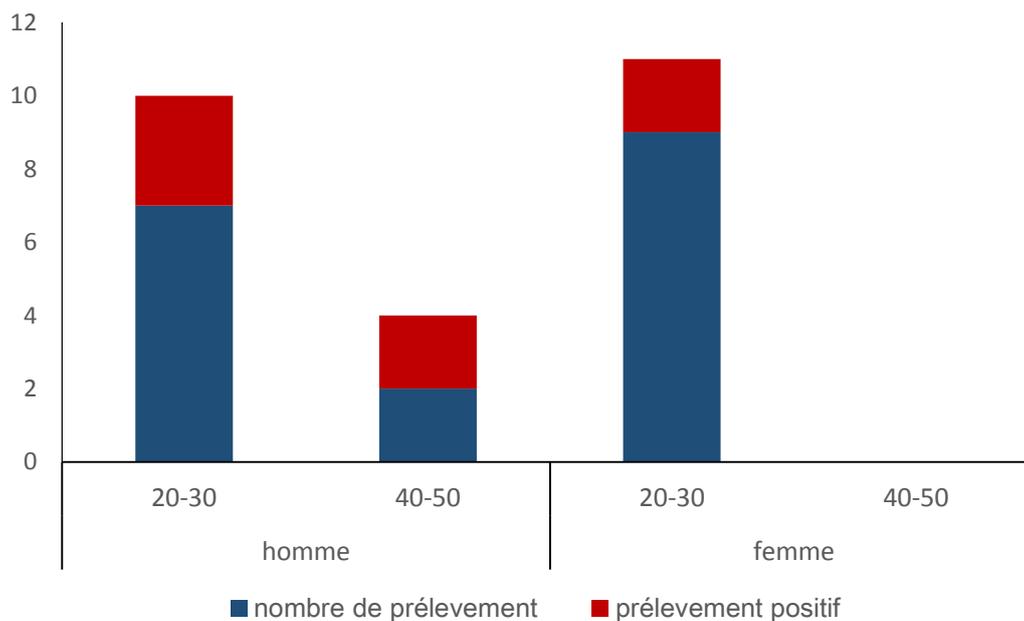


Figure N°2 : Répartition des prélèvements positifs par sexe et par tranche d'âge

Le tableau N°1 montre que le taux d'altération est de 55,5% chez les hommes et de 22,2% chez les femmes. De plus, la figure N°2 révèle que le taux d'altération dépend du sexe et de l'âge des volontaires prélevés. En effet, chez les hommes, le taux d'altération est de 42,85% et de 100% pour les tranches d'âge de 20-30

ans et 40-50 ans respectivement. En revanche, pour la tranche d'âge 20-30 ans, le taux d'altération chez les femmes est de 22,22%.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Rudelle (2018)** et de **Bakama et coll., (2020)** qui ont montré que l'altération dépend du sexe mais aussi de l'âge. En effet, les candidoses buccales sont très fréquentes, et apparaissent le plus souvent aux âges extrêmes de la vie (nouveau-né et sujet âgé). La cavité buccale est colonisée par des levures du genre *Candida* chez près de 48% des sujets sains adultes (**Bendel, 2003**).

La croissance sur milieu CHROM-Agar *Candida* a montré que toutes les levures isolées appartiennent au genre *Candida* (**Photo N°1**)

Le milieu CHROM-Agar *Candida* peut différencier les cultures mixtes et identifier les levures du genre *Candida*.

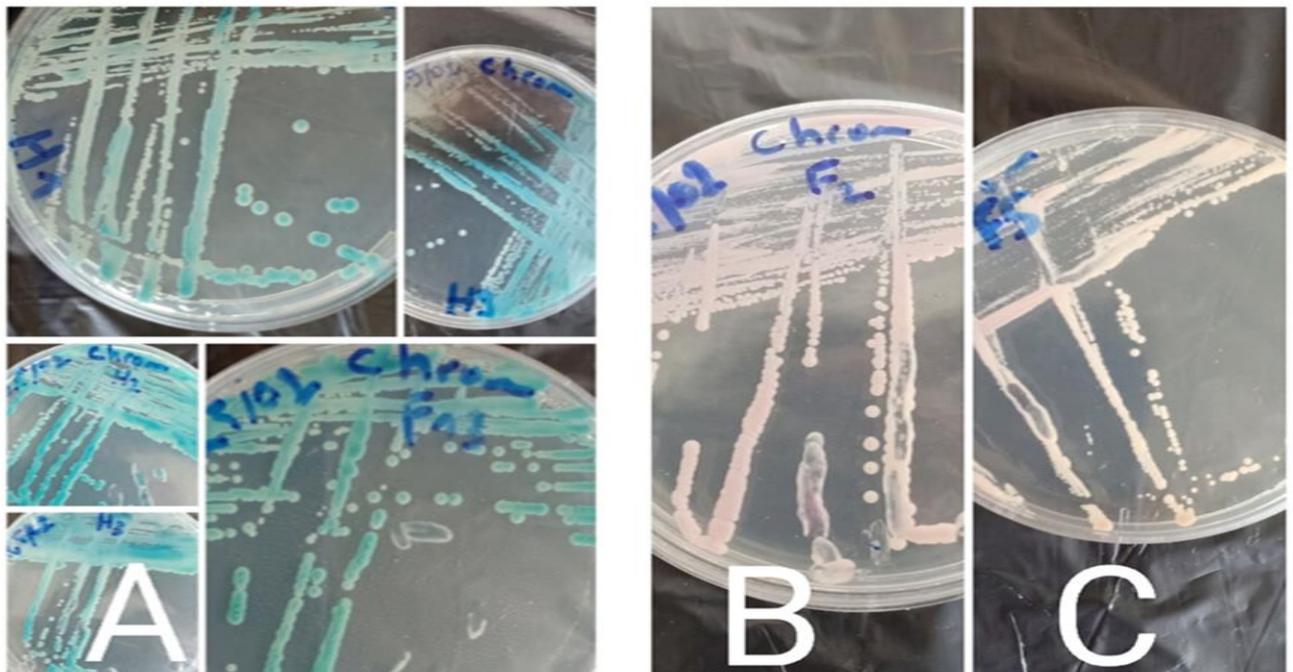


Photo N°1 : Aspect des colonies des levures isolées sur milieu CHROM-Agar

Après incubation à 35°C pendant 48 heures des cultures sur milieu CHROM-Agar a permis d'assigner 5 souches à l'espèce *Candida albicans* (colonies vertes, A), une souche à l'espèce *Candida krusei* (colonies roses pâles, B) et une souche à l'espèce *Candida glabrata* (colonies blanches, C).

Selon **Willinger et coll., 2001**, la spécificité de ce test dépasse 99% pour chaque espèce et une sensibilité de 98,9%.

Pour confirmer l'identification de l'espèce *Candida albicans*, nous avons utilisé deux tests supplémentaires, la formation de chlamydozoaires (test de RAT) et la pseudofilamentation sur sérum humain (test de balstèse). Les résultats obtenus sont regroupés sur les **photos N°2 et N°3**

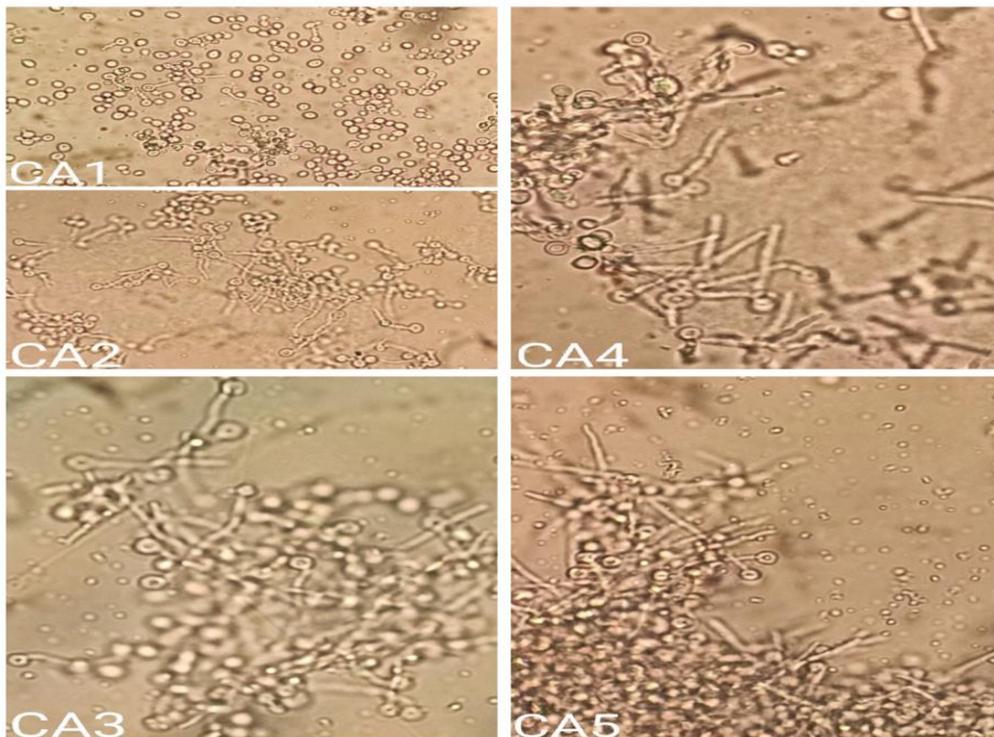


Photo N°2 : Formation de pseudofilaments par *Candida albicans* sur sérum humain

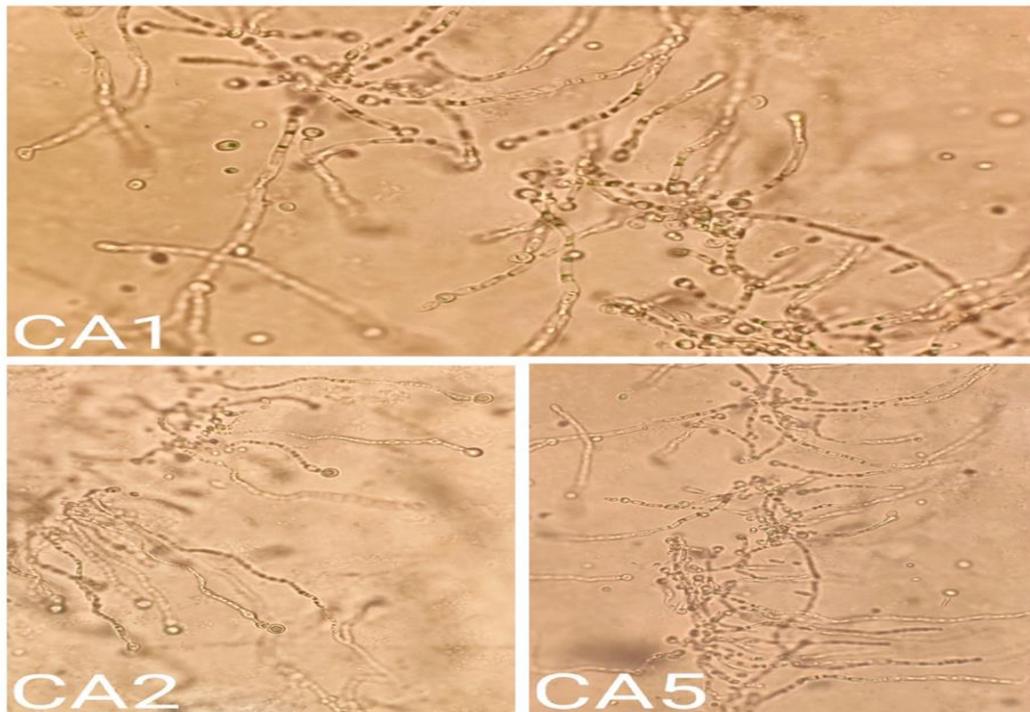


Photo N°3 : Formation de chlamydospores par *Candida albicans* sur milieu RAT (Riz-Agar-Tween)

Après 4 heures d'incubation à 37°C, seules les cinq levures assignées à l'espèce *Candida albicans* (CA1, CA2, CA3, CA4, CA5) ont formé des tubes germinatifs, ce qui nous a permis de confirmer l'identification de ces souches.

La **figure N°3** représente les résultats de l'identification des levures que nous avons isolés.

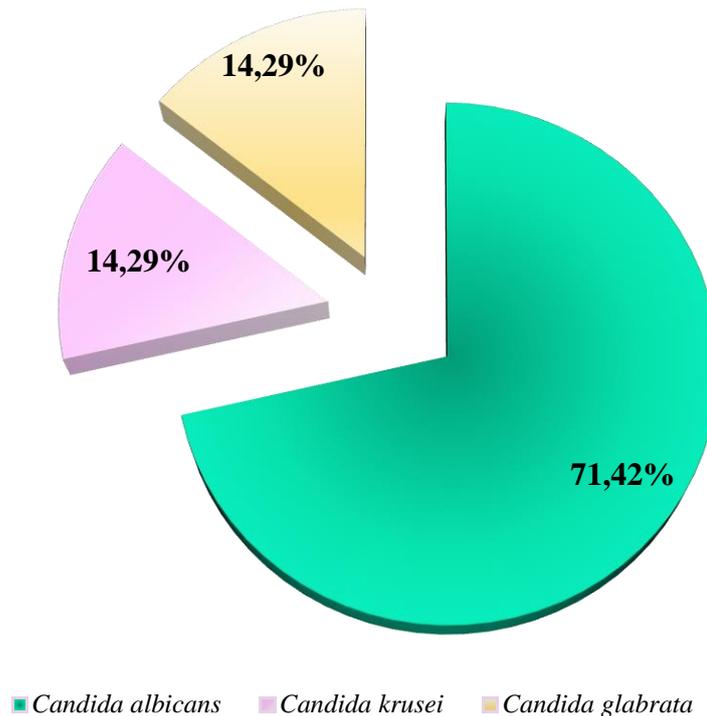


Figure N°3 : Identification des levures isolées

Toutes les levures isolées appartiennent au genre *Candida* dont *Candida albicans* (5), *Candida krusei* (1) et *Candida glabrata* (1).

L'espèce *Candida albicans* est l'espèce dominante, ce résultat est en accord avec les travaux de **Arendrup et coll., (2011)** de **Djohan et coll., (2012)** et celui de **Yapo-Kouadio et coll., (2017)** qui ont montré que *Candida albicans* est le principal agent pathogène responsables des candidoses buccales avec un taux qui dépasse les 50%. De plus, l'espèce *Candida albicans* fait partie de la flore commensale buccale.

2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches isolées

Les résultats relatifs aux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B vis-à-vis des levures de *Candida sp.* isolées des cavités buccales et de la souche de référence de *Candida albicans* ATCC10231 obtenues après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C sont représentés sur la **figure N°4**.

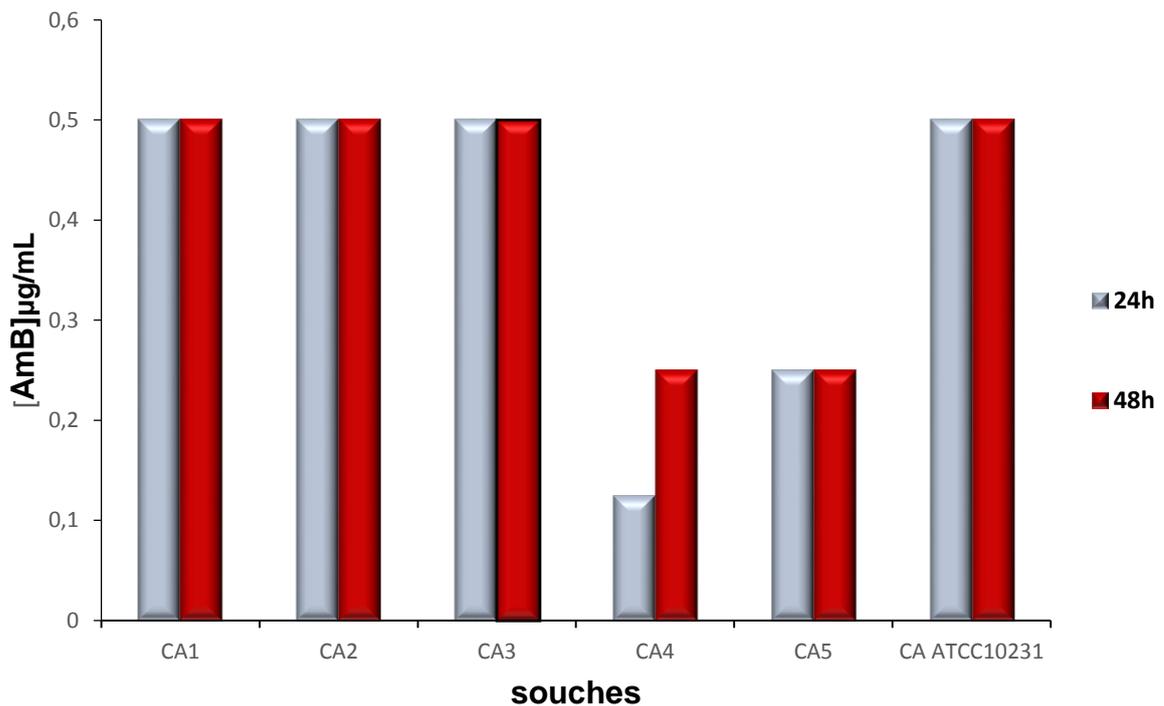


Figure N°4: Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida albicans*

Nous remarquons qu'après un temps d'incubation de 24 heures à 35°C, les CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *Candida albicans* testées sont de 0,125µg/mL pour CA4, de 0,25µg/mL pour CA5 et de 0,5µg/mL pour CA1, CA2 et CA3. Ces CMI restent inchangées lorsque le temps d'incubation est prolongé à 48 heures à 35°C, à l'exception de la souche CA4 dont la CMI passe de 0,125 à 0,25µg/mL. Selon les normes du CLSI 2008, les souches de *Candida albicans* que nous avons isolés sont sensibles à l'amphotéricine B.

Ce résultat est en accord avec ceux de **Seghir et coll., (2014)** de **Bendjelloul et coll., (2016)** et de **Lahfa-Hasaine et coll., (2017)** qui ont montré que toutes les souches de *Candida albicans* isolées sont sensibles à l'amphotéricine B. **Ellepola et coll., (2015)** ont montré ainsi que l'amphotéricine B inhibe complètement (100%) la croissance de *Candida albicans* isolée de la cavité buccal avec des CMI qui varie entre 0,002 à 0,125µg/mL.

La résistance à l'amphotéricine B est très rare chez *Candida albicans* (**Scorzoni et coll., 2017**).

Quatrième partie

Conclusion générale

L'étude que nous avons réalisée avait pour objectif de :

- Identifier les différents types d'infectivités fongiques de la cavité buccale.
- Déterminer les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B vis-à-vis de souches de *Candida albicans* isolées.

Les résultats obtenus, nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- Parmi les 18 prélèvements effectués, 38,9% sont altérés par les levures.
- A partir de 7 prélèvements altérés par les levures, 5 espèces de *C. albicans* sont identifiées soit (71,42%), une espèce de *C. krusei* (14,29%), et une espèce de *C. glabrata* (14,29%).
- *Candida albicans* est l'espèce dominante dans les prélèvements effectués
- Toutes les souches testées sont sensibles à l'amphotéricine B avec des concentrations minimales inhibitrices allant de 0,125 à 0,5µg/mL.

Le traitement antifongique en monothérapie est insuffisant ce qui rend nécessaire le développement de nouvelles formulations et de thérapies alternatives pour la prévention et le traitement.

Pour continuer dans la voie de la recherche ouverte par cette étude, il serait intéressant de :

- ❖ Tester la combinaison entre l'amphotéricine B et la Chlorhexidine vis-à-vis des souches de *Candida albicans*.
- ❖ Evaluer le pouvoir de formation des biofilms fongiques par l'espèce *Candida albicans*.
- ❖ Etudier l'efficacité de l'amphotéricine B seul et associé à la Chlorhexidine vis-à-vis des biofilms fongiques.

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. Alanio A., Renaudat C. and Bretagne S. (2014). Épidémiologie de la résistance des champignons: impact de nos prescriptions d'antifongiques. *Journal des Anti-infectieux*, 16(1), 2-7.
2. Ameen M. (2010) Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology*. 28(2):197-201.
3. Arendorf T. M. and Walker D. M. (1980). The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archives of oral biology*, 25(1), 1-10.
4. Arendrup M. C., Sulim S., Holm A., Nielsen L., Nielsen S.D., Knudsen J.D. and ohansen H.K. (2011). Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *Journal of clinical microbiology*, 49(9), 3300-3308
5. Bakama L; Dilu F., Lelo, P., Kowe N., Bakambana G. and Songo F. (2020). Manifestations buccales chez les enfants et adolescents infectés par le VIH à Kinshasa (RDC) et facteurs associés. *Rev Mali Infect Microbiol*, 15 (1),34-43.
6. Bendel C. (2003) Colonization and epithelial adhesion in the Pathogenesis of Neonatal Candidiasis. *Seminars in Perinatology* ; 27 :357-564.
7. Bendjelloul M., Boucherit-Otmani Z. and Boucherit K. (2016). Study of strains of *Candida spp.* isolated from catheters in UHC of Oran (Algeria): Identification and antifungal susceptibility. *Journal de mycologie medicale*, 26 (3), 212-216.
8. Berdicevsky I., Ben-Aryeh H., Szargel R. and Gutman D. (1984). Oral *Candida* in children. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 57(1), 37-40.
9. Bouchet P., Guignard J.L., Madulo-Leblond G. and Regli P. (1989) Mycologie générale et médicale. Ed Masson. Paris; 107-120.
10. Canuto M.M. and Rodero, F.G. (2002). Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet infectious diseases*, 2(9), 550-563.
11. Chabasse D., Robert R., Marot A. and Pihet M. (2006), *Candida* pathogènes. Paris, Lavoisier, Editions TEC et DOC.
12. CLSI. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. (C. document, Éd.) *Clinical and Laboratory Standards Institute*, M27-A3.

13. Cole G.T., Seshan K.R., Phaneuf M. and Lynn K.T. (1991), Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can J Microbiol.* 37: 637-646.
14. Coudoux S. (2006) Les mycoses superficielles cutané-muqueuses: Enquête à l'officine et propositions de conseils aux patients. *Thèse de doctorat. Université Grenoble I Joseph Fourier. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (France).*
15. Cumming C.G., Wight C., Blackwell C.L. and Wray D. (1990). Denture stomatitis in the elderly. *Oral microbiology and immunology*, 5(2), 82-85.
16. Décanis N. (2009). Implication du farnesol et des cellules épithéliales gingivales dans le contrôle de la candidose buccale.
17. Djohan V.A., Vanga-Bosson A.H., Konaté A.K., Yavo W. and Kone, M. (2012). *In vitro* susceptibility of vaginal *Candida albicans* to antifungal drugs in Abidjan (Ivory Coast). *Journal de mycologie médicale*, 22(2), 129.
18. Drochey E. and Vieu M. (1957) Biology of *Candida* infections: Laboratory diagnosis; study of 342 strains of *Candida* isolated from pathological specimens. *Sem Hop*; 33: 793 - 807.
19. Eggimann P, Garbino J. and Pittet D (2003). Epidemiology de *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 3: 685-702.
20. Ellepola A.N., Chandy R. and Khan Z U. (2015). Post-antifungal effect and adhesion to buccal epithelial cells of oral *Candida dubliniensis* isolates subsequent to limited exposure to amphotericin B, ketoconazole and fluconazole. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 6(3), 186-192.
21. Ellis D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(suppl_1), 7-10.
22. Ernst J.F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146:1763-1774.
23. Hay R. (2017) Superficial fungal infections. *Medicine*; 45(11):707-10.

24. Hube B., Hay R., Brasch J., Veraldi S. and Schaller M. (2015) Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. *Journal de Mycologie Médicale*. 25(1):e44-58.
25. Kettani A., Belkhadir Z. H., Mosadik A. F., Ababou A., Lazreq C. and Sbihi A. (2006). Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de mycologie médicale*, 16(1), 16-25.
26. 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.
27. Laniado-Laborín R. and Cabrales-Vargas M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista iberoamericana de micología*, 26(4), 223-227.
28. Laurent M., Gogly B., Tahmasebi F. and Paillaud E. (2011) Les candidoses oropharyngées des personnes âgées. *Gériatrie et Psychologie Neuropsychiatrie du Vieillissement*, 9(1), 21-28.
29. Lucas V. S. (1993). Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community dentistry and oral epidemiology*, 21(5), 313-316.
30. Manning D. J., Coughlin R.P. and Poskitt E.M. (1985). *Candida* in mouth or on dummy *Archives of disease in childhood*, 60(4), 381-382.
31. Masia C.M. and Gutierrez R.F. (2002), Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet Infect Dis*; 2: 550-63.
32. Morales D.K and Hogan D.A. (2010) *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog.*, 6: e1000886
33. Mujica M.T., Finkelievich J.L , Jewtuchowicz V. and Iovaniiti C.A. (2004) Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999-2001. *Revista Argentina de Microbiologia* 36: 107-112.
34. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report. (2002) Data summary from January 1992- June 2001. *Am J Infect control*; 29: 404-421.

- 35.** Rodu B., Carpenter J.T. and Jones M.R. (1988). The pathogenesis and clinical significance of cytologically detectable oral *Candida* in acute leukemia. *Cancer*, 62(9), 2042-2046.
- 36.** Rudelle N. (2018). Pathologies de la muqueuse buccale chez la personne âgée: études de cas cliniques.
- 37.** Scorzoni L., de Paula e Silva, A.C., Marcos C.M., Assato P.A., De Melo W.C. De Oliveira H.C. and Fusco-Almeida A.M. (2017). Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Frontiers in microbiology*, 8, 36.
- 38.** 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.
- 39.** Soll D.R. (1991). The developmental biology of the white-opaque transition in *Candida albicans*. *Springer, Berlin, Heidelberg*. 20-45.
- 40.** Srivastava V., Singla R.K. and Dubey A.K. (2018). Emerging virulence, drug resistance and future anti-fungal drugs for *Candida* pathogens. *Current topics in medicinal chemistry*, 18 (9), 759-778.
- 41.** Sudbery P., Gow N. and Berma J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*; 12: 317-324.
- 42.** Tortorano A.M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C.C., Faure O., Biraghi E., Canton E., Zimmermann K., Seaton S. and Grillot R. (2004) Epidemiology of candidemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 23:317-322.
- 43.** Willinger B., Hillowoth C., Selitsch B. and Manafi M. (2001). Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3793-3795

44. Yapo-Kouadio C., Bonouman-Ira A.V., Aka N.D., Zika K., Cissé S. and Dosso M. (2017). Profil de résistance de *Candida albicans* d'origine vaginale aux antifongiques usuels. *Revue Bio-Africa* (16), 7-12.