



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

---

# Les candidoses invasives en réanimation.

---

Présenté et soutenu par : Hamoud Sara  
Fillali Ibtissem

Le : 27/06/2018

Jury d'évaluation :

Président: Mme. ARABET Dallel

M.C.B Univ. Des frères Mentouri Constantine.

Reporteur : Mr. REHMAMNIA Yacine

Assistant au service de parasito à HMRUC.

Examinatrice : Mme BOUCHLOUKH Warda

M.A.A. Univ Des frères Mentouri Constantine.

*Année universitaire*  
*2017 - 2018*

## Remercîment

La construction de ce mémoire qui a été effectué au sein d'hôpital militaire régional universitaire de Constantine, n'aurait été possible sans l'intervention de certaines personnes. Qu'elle trouve ici l'expression de nos plus sincères remerciements pour leurs précieux conseils.

Nos remerciements vont en priorité à notre encadreur Monsieur **REHAMNIA Yacine** assistant au service de parasitologie à l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine pour son aide et son soutien qui nous a été précieux afin de mener notre travail à bon port.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers Madame **ABD ELAZIZ Ouided** pour son aide.

Nous adressons nos remerciements à **Mme. ARABET Dallal**, Maitre de conférences classe B à l'université des frères Mentouri Constantine d'avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions également **Mme. BOUCHLOUKH Warda**, Maitre-assistant classe A à l'université des frères Mentouri Constantine d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## La liste des abréviations :

<b>5-FC</b>	:	5-fluorocytosine
<b>ALS</b>	:	Agglutinin-Lik Séquence
<b>AmB</b>	:	Amphotéricine B
<b>C</b>	:	Candida
<b>CLSI</b>	:	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	:	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>Ddp</b>	:	le délai de positivité
<b>EUCAST</b>	:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FCZ</b>	:	Fluconazole
<b>GAL</b>	:	GALACTOSE
<b>GLU</b>	:	GLUCOSE
<b>H</b>	:	heure
<b>HMRUC</b>	:	l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine
<b>I</b>	:	Intermédiaire
<b>MAL</b>	:	MALTOSE
<b>MALDI-TOF</b>	:	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight MEL
<b>NCCLS</b>	:	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>PCB</b>	:	Pomme de terre, Carotte, Bile
<b>PH</b>	:	Potentiel en hydrogène
<b>R</b>	:	Résistant
<b>RAT</b>	:	Riz, Agar, Tween
<b>RPMI</b>	:	Roswell Park Memorial Institute
<b>S</b>	:	Sensible
<b>SAC</b>	:	SACCHAROSE
<b>SAP</b>	:	Secreted Aspartyl Proteinase
<b>SIDA</b>	:	Syndrome d'immunodéficience acquise
<b>VCZ</b>	:	Voriconazole
<b>VIH</b>	:	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>ARA</b>	:	ARABIOSE

## La liste des figures

<b>Figure 01</b> : Levures .....	02
<b>Figure 02</b> : Blastospores de <i>Candida albicans</i> .....	02
<b>Figure 03</b> : Production de chlamydospores sur milieu RAT par <i>C. albicans</i> .....	03
<b>Figure 04</b> : Mode de formation d'un biofilm à <i>C. albicans</i> .....	04
<b>Figure 05</b> : Intertrigo des grands plis sous mammaires .....	08
<b>Figure 06</b> : La candidose de muguet buccale. ....	08
<b>Figure 07</b> : La candidose de la muqueuse œsophagienne .....	09
<b>Figure 08</b> : La candidose de la muqueuse gastro-intestinale.....	09
<b>Figure 09</b> : Candidose vulvo-vaginale .....	10
<b>Figure 10</b> : Candidose Balanite et balano-posthite .....	10
<b>Figure 11</b> : Physiopathologie des candidoses invasives.....	11
<b>Figure 12</b> : Distribution des espèces responsables de candidémies par service d'hospitalisation.	13
<b>Figure 13</b> : Exemples d'antifongigrammes réalisés avec la méthode E-test ( <a href="http://www.biomerieuxdiagnostic.com">http://www.biomerieuxdiagnostic.com</a> ).....	17
<b>Figure 14</b> : sérum de cheval pour le test de blastèse.....	23
<b>Figure 15</b> : Test de chlamydosporulation.....	24
<b>Figure 16</b> : La galerie AUXACOLOR™ 2 .....	25
<b>Figure 17</b> : Microplaque de type « Auxacolor ».....	25
<b>Figure 18</b> : milieu d'isolement selectif des <i>Candida</i> CHROMagar .....	26
<b>Figure 19</b> : Microplaque de latex Bichro-Dubli Fumouze® .....	27
<b>Figure 20</b> : Schéma d'identification de <i>Candida spp.</i> .....	28
<b>Figure 21</b> : Distributeur automatiques d'antifongiques .....	29
<b>Figure 22</b> : Schéma qui illustre le mode opératoire de Fungitest® .....	31
<b>Figure 23</b> : taux de positivité hémoculture Tableau espèces isolées à partir d'hémocultures positifs .....	33
<b>Figure 24</b> : Pourcentage de <i>C. Albicans</i> et <i>C. parapsilosis</i> isolées à partir d'hémocultures positifs .....	34
<b>Figure 25</b> : Observation microscopique des levures (grossissement x40) .....	35
<b>Figure 26</b> : Examen microscopique de ; <i>C. albicans</i> après le test de blastèse (Grossissement x40) .....	36
<b>Figure 27</b> : Examen microscopique de <i>C. albicans</i> après culture sur PCB (Grossissement x40).....	37
<b>Figure 28</b> : microplaque (auxacolor) .....	37
<b>Figure 29</b> : Détermination des caractéristiques physiologiques de cette espèce .....	40
<b>Figure 30</b> : <i>Candida albicans</i> sur milieu chromagar .....	41
<b>Figure 31</b> : Résultat du test d'agglutination au latex de Bichro-Dubli Fumouze®.....	41

<b>Figure 32</b> : Fungitest de <i>Candida albicans</i> .....	41
<b>Figure 33</b> : examen à l'état frais des levures(x40).....	42
<b>Figure 34</b> : détermination des caractéristiques physiologiques de <i>Candida parapsilosis</i> .....	43
<b>Figure 35</b> : Détermination de SENSIBILITÉ aux antifongiques .....	43
<b>Figure 36</b> : Résistance aux antifongiques de la souche <i>Candida parapsilosis</i> .....	44
<b>Figure 37</b> : fungitest de <i>C. parapsilosis</i> .....	44

## La liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : classification du <i>candidaspp</i> selon la reproduction... ..	05
<b>Tableau 2</b> : Principales localisations et formes cliniques des infections superficielles à <i>Candida</i> .....	07
<b>Tableau 3</b> : Variations géographiques du pourcentage de candidémies communautaires vs nosocomiales entre 2008 et 2009. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program [34] .....	12
<b>Tableau 4</b> : Facteurs de risque de ndidoses systémiques (41, 42,43).....	14
<b>Tableau 5</b> : les sucres contenant dans le test d'assimilation.....	25
<b>Tableau 6</b> : Répartition des prélèvements selon la positivité des cas.....	33
<b>Tableau 7</b> : espèces isolées à partir d'hémocultures positifs.....	33
<b>Tableau 8</b> : représente l'âge moyen.....	34
<b>Tableau 9</b> : caractéristique des levures observé macroscopiquement .....	35
<b>Tableau 10</b> : les caractéristiques microscopiques de l'espèces de <i>Candida albicans</i> .....	36
<b>Tableau 11</b> : Résultat du test de chlamydosporulation.....	37
<b>Tableau 12</b> : Guide d'interprétation des réactions colorées .....	38

## Table des matières

### Remercîment

### Liste des abréviations

### Liste des figures

### Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	1
<b>I-Synthèse bibliographique</b> .....	2
Généralité : Les levures.....	2
1/ Les levures du genre <i>Candida spp</i> .....	2
1-2/ Taxonomie et Morphologie.....	2
1-3/ Caractéristiques globales du genre <i>Candida</i> .....	3
1-4/ Espèces pathogènes et habitat.....	4
1-5/ Classification.....	5
1-6/ Mécanismes de pathogénicité .....	5
2/ Les candidoses.....	6
2-1/ Définition.....	6
2-2/ Agent pathogène.....	6
2-3/ Facteurs prédisposant à l'infection candidosique.....	6
2-3-1/ Facteurs intrinsèques liés à l'hôte.....	6
2-3-2/ Facteurs extrinsèques et / ou iatrogènes.....	7
2-4/ Manifestations cliniques.....	7
2-4-1/ Candidoses superficielles .....	7
2-4-1-1/ Les candidoses cutanées et unguéales.....	8
2-4-1-2/ Les candidoses digestives.....	8
2-4-1-2-1/ La candidose buccale.....	8
2-4-1-2-2/ La candidose au niveau de la muqueuse œsophagienne.....	9
2-4-1-2-3/ La candidose au niveau de la muqueuse gastro- intestinale.....	9
2-4-1-3/ Candidoses génito-urinaires.....	9
2-4-3-1/ Candidose vulvo-vaginale.....	9
2-4-3-2/ Candidose Balanite et balano-posthite.....	10
2-4-2/ Candidoses systémiques.....	10
2-4-2-1/ Les candidémies.....	12
2-4-2-1/ Définition.....	12

2-4-2-2/ Epidémiologie.....	12
2-5/Incidence.....	12
2-6/Populations concernées.....	12
2-7/Mortalité.....	13
2-8/Impact économique.....	14
3/Diagnostic des candidémies.....	15
4/FACTEURS DE RISQUE.....	14
4-1 Prise en charge thérapeutique des candidémies.....	15
4-1-1/Définition des antifongiques.....	15
4-1-2/Cibles des antifongiques.....	15
4-1-3/Classe des antifongiques.....	15
4-1-3-1/Les polyènes.....	15
4-1-3-2/Les azolés.....	15
4-1-3-3/Les dérivés pyrimidiques.....	16
4-1-3-4/Les échinocandines.....	16
4-1-4-1 Méthodes de référence .....	17
4-1-4-2/ Méthode E-test®.....	17
4-1-4-3/ Autres méthodes.....	17
3-1/ Méthode de référence : l'hémoculture .....	17
3-1-1/Sensibilité.....	18
3-1-2/Des performances limitées.....	18
3-1-3/Comment et quelles hémocultures prélever?.....	18
3-1-4/Délai de positivité.....	18
3-1-5/Identification de l'espèce.....	18
3-1-6/ Milieux et techniques classiques d'identification.....	18
3-1-7/MALDI-TOF .....	19
3-1-8/Biologie moléculaire .....	19

## **II. Matériel et methods**

1/Cadre d'étude.....	20
2/Démarche de diagnostic mycologique.....	20
2-1/ Prélèvement.....	20
2-2/ Examen direct.....	21
2-3/ Culture.....	22
2-3-1/ Culture et isolement.....	22
2-3-2/ Identification.....	23
2-4/ Antifongigramme .....	28
2-4-1/ mode opératoire.....	29
2-4-2/ FUNGITEST®.....	30

## **III. Résultats et discussion**

1/ Répartition des prélèvements selon la positivité des cas.....	32
2/ Répartition des cas positifs selon l'agent causal de la candidemie.....	32
2-1/ Identification des candidas albicans.....	33
2-2/ Répartition des candidoses selon les différents paramètres étudiés.....	34

## **Conclusion.....**

Références bibliographiques.....	45
----------------------------------	----

Résumé .....

Abstract.....

ملخص.....

Annexe.....

## **Résumé :**

Les candidoses invasives sont rares dans la population générale (environ 8 épisodes/100 000 personnes-années), mais elles sont une complication redoutée en milieu hospitalier (0,5 cas /1000 admissions) et plus particulièrement en réanimation (10 cas /1000 admissions) où elles représentent de 10 à 15% des infections nosocomiales. Elles sont difficiles à diagnostiquer et leur mortalité globale est comparable à celle du choc septique (40–60%). Une bonne connaissance de leur physiopathologie et la mise à disposition des dérivés triazolés mieux tolérés que l'amphotéricine B ont permis le développement du concept d'un traitement empirique précoce ou présomptif.

La prophylaxie des candidoses invasives, basée sur l'identification précoce de facteurs de risque, s'est révélée très efficace, mais elle doit toutefois être réservée à certains groupes de patients bien identifiés, de manière à tenter de limiter les risques de développement et/ou la diffusion de souches résistantes

## **Mots clés :**

*Candida spp* ; candidémie; candidose disséminée; infection nosocomiale; prophylaxie

## ملخص

داء المبيضات الغازية نادر في عموم السكان (حوالي 8 حلقات / 100.000 شخص-سنة) ، ولكنه يعد تعقيدا مخيفا في المستشفيات (0.1 / 1000) ، وعلى الاخص في العناية المركزة (10/1000 حالة قبول) حيث يمثلون من 10 إلى 11 ٪ من الإصابات المستشفوية. من الصعب تشخيصها ويمكن مقارنة معدل الوفيات بصورة إجمالية بالنسبة للصدمة الإنتقائية (10-10%). معرفة جيدة بالفيزيولوجيا المرضية وتوفير مشتقات تريازول أفضل من ألفوتريسين

سمحت بتطوير مفهوم العلاج التجريبي المبكر أو الافتراضي. وقد تبين أن الوقاية من داء المبيضات B الغازية، القائمة على التحديد المبكر لعوامل الخطر، فعالة للغاية، ولكن يجب حجزها لمجموعات معينة من المرضى الذين تم التعرف عليهم جيدا ، وذلك لمحاولة الحد من مخاطر التنمية و / أو انتشار السلالات المقاومة

## الكلمات المفتاحية

*Candida spp*؛ المبيضات في الدم. داء المبيضات المنتشر عدوى المستشفيات؛ الوقاية من المرض

**Summary:**

Invasive candidiasis is rare in the general population (about 8 episodes/100 000/year), but has a higher incidence in hospitalised patients (0.5/1000 admissions). It complicates about 10 per 1000 admissions in critical care, where it represents 10–15% of all nosocomial infections. Candidiasis remains difficult to diagnose and its mortality is as high as those of septic shock (40–60%). A better knowledge of the pathophysiology of the disease and the availability of triazole compounds that are less toxic than amphotericin have given rise to the concept of early empirical or preemptive treatment. Prophylaxis of invasive candidiasis, which is very effective, is based on risk factor identification. However, prophylaxis must be restricted to carefully selected groups of patients, to avoid the emergence of resistant strains and a shift in the distribution of pathogens from albicans to non-albicans strains under the pressure of antifungal agents.

**Keywords:**

*Candida spp*; candidaemia; candidiasis; e; nosocomial infections; prophylaxis.

# Introduction

Les candidémies sont des infections à levures relativement fréquentes en réanimation et qui posent des problèmes diagnostiques, thérapeutiques et pronostiques. La prise en charge des candidémies est à considérer dans le cadre plus large des candidoses invasive car les problèmes posés par ces affections sont relativement proches. Du fait de l'édition de nouvelles recommandations Internationales [1].

*Candida* est le genre le plus fréquemment retrouvé au cours des infections fongiques. Les *Candidas* sont généralement classés en quatrième place des infections hématogènes, mais leur prévalence varie selon la population étudiée [2, 3, 4]. L'incidence des candidémies semble plus élevée en réanimation que dans les autres services hospitaliers. Dans une étude conduite en réanimation, les candidémies représentaient 10,1% des infections hématogènes contre 7,93 % dans les autres unités [2]

Le potentiel invasif de *Candida spa* été documenté pour la 1ère fois par Krause et al. en 1969 [4]. De nos jours *Candida sp* est au 4ème rang des pathogènes isolés des hémocultures dans le contexte d'infection nosocomiale aux Etats-Unis et au 7ème rang en Europe [1, 5, 6].

*Candida albicans* est l'espèce la plus fréquemment incriminée mais on remarque une émergence des espèces de *Candida non albicans* avec une distribution différente dans les deux hémisphères [7]. Bien que *Candida albicans* soit l'espèce la plus fréquemment incriminée, on note que l'incidence croissante d'isolats de *Candida non albicans* est de plus en plus décrite. Cet accroissement est attribué à l'usage des antifongiques en prophylaxie chez les patients et les techniques de soins de plus en plus invasives [8].

La prise en charge des candidoses invasives a évolué avec le développement de nouveaux antifongiques : nouvelles formes galéniques de l'amphotéricine B, nouveaux azolés et nouvelles familles d'antifongiques, les échinocandines [9].

Il est donc indispensable de connaître l'épidémiologie des candidoses invasives en service de réanimation qui est l'objectif de notre étude réalisée au niveau du service de réanimation à l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine HMRUC dans lequel on a exercé notre stage pour mieux diagnostiquer les candidémies et déterminer les facteurs de risque et instaurer une conduite à tenir thérapeutique pour éviter l'émergence des souches résistantes .

# Synthèse bibliographique

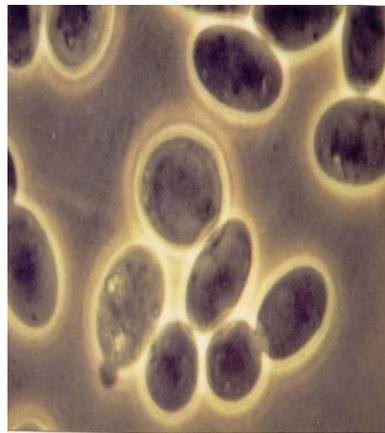
## Généralités

### Les levures

Ce sont des organismes microscopiques, unicellulaires, hétérotrophes [10]. À multiplication asexuée par bourgeonnement (blastospores), qui produisent parfois du mycélium et du pseudo-mycélium

#### Figure 01.

Elles sont représentées essentiellement *par Candida*, mais il y a aussi *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Malassezia* et *Saccharomyces*. [11].



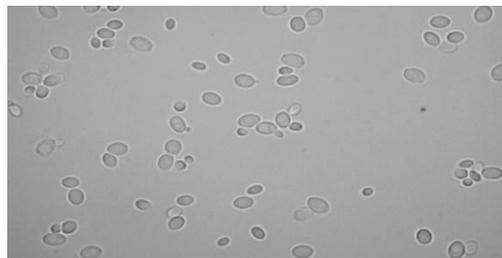
**Figure01** : levures <https://www.abmauri.fr/abmauri/illustrations/documents/photos/Levure%20Gr>

Environ 50% des candidémies sont dues à *Candida albicans*

### 1/ La levure du genre *Candida spp*

#### 1-1/ Taxonomie et Morphologie

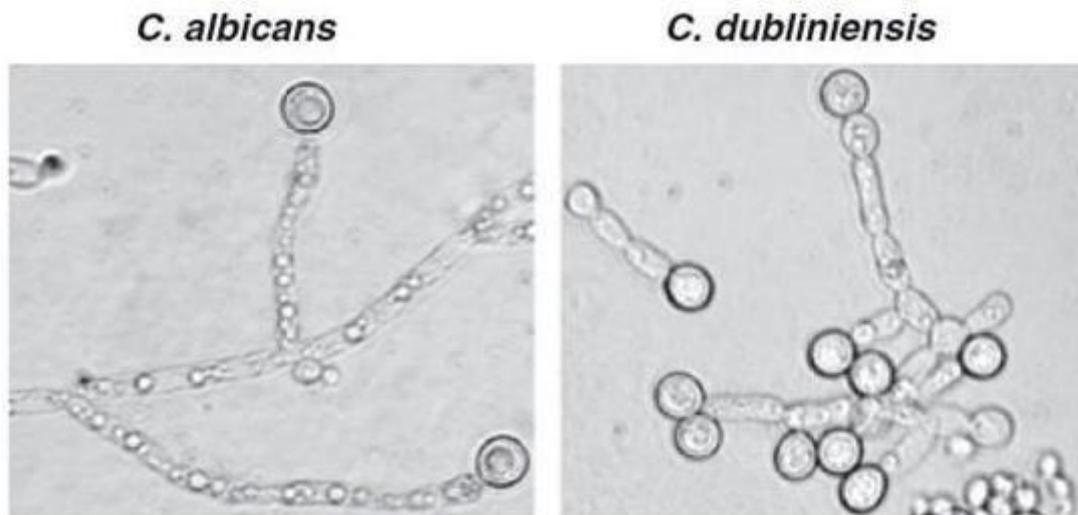
Les espèces de levures du genre *Candida* sont des organismes microscopiques unicellulaires et eucaryotes faisant partie du règne des *Fungi*. Ces levures se reproduisent principalement de façon asexuée par bourgeonnement avec la formation de blastospores facilement observables en microscopie **Figure 02**.



**Figure 02.** Blastospores de *Candida albicans* (x1000; collection personnelle).

*Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, [12], se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) [13], formant ainsi des colonies blanches crémeuses. Leur forme est variable : Globuleuse, ovoïde, cylindrique ou allongée.

Les caractères morphologiques des *Candida* varient selon les espèces et peuvent dépendre du milieu de culture. Certaines espèces sont capables de produire des filaments mycéliens sous la forme de pseudomycélium ou de mycélium vrai. D'autres comme *C. albicans* est capables de produire des formes de résistances appelées chlamydospores lorsqu'elle est en culture dans des milieux pauvres comme le RAT ou le PCB. (Figure 03). Sur les milieux riches (sérum humain ou animal) la formation d'un tube court, le tube germinatif.



**Figure 03** : Production de chlamydospores sur milieu RAT par *C. albicans* et *C. dubliniensis* [14].

### 1-2 / Caractéristiques du genre *Candida*

Les espèces de levures du genre *Candida* présentent des caractéristiques communes, leur membrane cellulaire est essentiellement constituée d'un stérol spécifique, l'ergostérol. La paroi cellulaire des *Candida spp.* est composée de protéines et de polysaccharides dont les  $\beta$ -(1, 3) glucanes. L'ergostérol et les  $\beta$ -(1, 3) glucanes jouent un rôle majeur pour l'intégrité de la membrane et de la paroi fongique.

Les caractéristiques propres au genre *Candida* sont l'absence de capsule et de pigmentation, et l'absence d'activité uréasique. Elles sont capables d'assimiler et de fermenter certains sucres avec des profils différents selon les espèces.

Une autre propriété importante de certaines levures du genre *Candida* est la capacité à former des biofilms. Particulièrement pour les *C. albicans* mais il a été montré que d'autres espèces de *Candida* étaient capables de former du biofilm, telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* [15], *C. dubliniensis* [16], ou encore *C. krusei* [17]. (Figure 04).

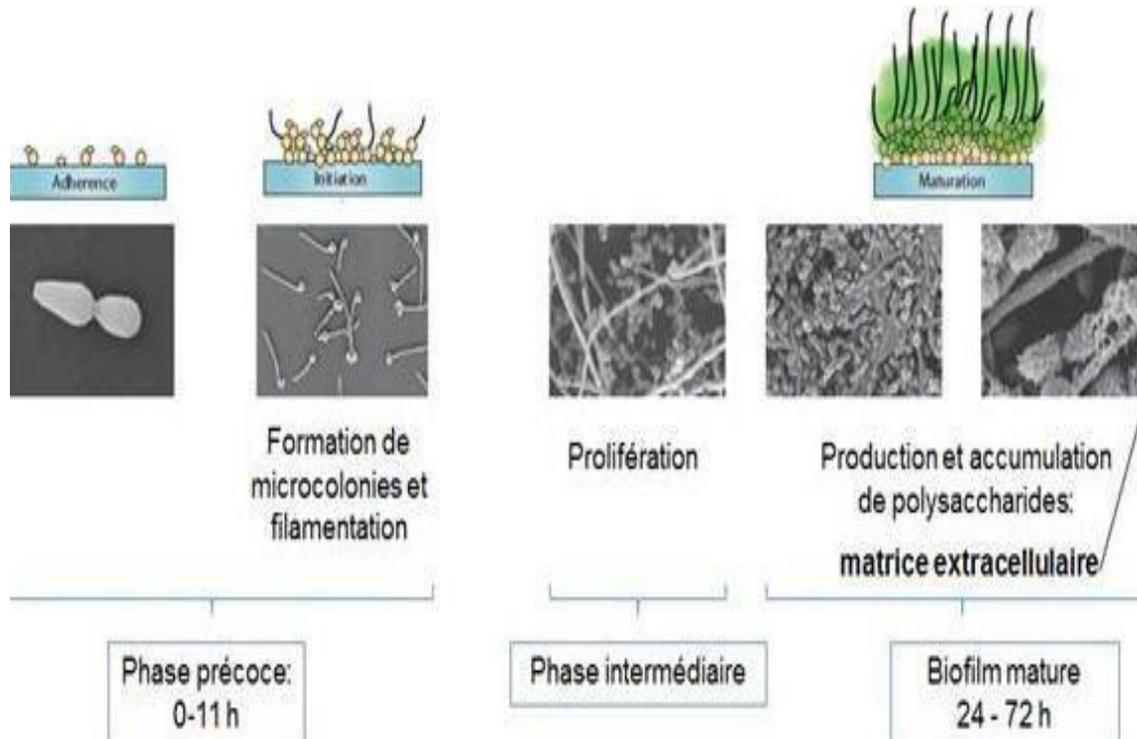


Figure 04 : Mode de formation d'un biofilm à *C. albicans* [18].

### 1-3 /Espèces pathogènes et habitat

Les levures du genre *Candida* sont la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante [19] malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez des patients immunodéprimés [20].

La zone géographique peut fortement influencer la nature de l'espèce retrouvée.

*Candida albicans* est considéré chez l'homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne [21, 22].

Au niveau des muqueuses digestives et vaginales, la levure est considérée comme la forme saprophyte qui vit en symbiose avec l'organisme hôte. En revanche, lorsque il y a rupture d'équilibre entre la forme commensale et les défenses immunitaires, cette symbiose se transforme en parasitisme, se traduisant par une maladie infectieuse appelée candidose.

#### 1-4 /Classification

Les levures d'intérêt médical sont en pratique nommées par leur forme asexuée [23] Le genre *Candida* fait partie du phylum des Ascomycètes, de la classe des Saccharomycètes, de l'ordre des Saccharomycétales.

Le genre *Candida* issu des Deutéromycètes groupe des Blastomycètes appartient à la famille des *Cryptococcaceae*. Il regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, dépourvues d'activité uréase ; incapables d'assimiler l'inositol mais pouvant fermenter les sucres (Tableau 1). [24]

**Tableau 1** : classification du *candida spp* selon la reproduction

Classification	Reproduction Asexuée	Reproduction Sexuée
Règne	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Deuteromycotina</i>	<i>Ascomycotina</i>
Classe	<i>Blastomycètes</i>	<i>Ascomycètes</i>
Ordre	<i>Cryptococcales</i>	<i>Saccharomycétales</i>
Famille	<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Saccharomycétaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>	<i>Candida</i>

#### 1-5 / Mécanismes de pathogénicité

Les infections candidosiques sont probablement initiées par une diminution des défenses de l'hôte qui modifie l'équilibre de commensalisme au profit de la levure, l'atteinte systémique est habituellement associée à une insuffisance des défenses de l'hôte, telle que celle présentée par les patients hospitalisés en réanimation le rôle infectieux de *Candida albicans*, pathogène opportuniste, semble favorisé par une combinaison de facteurs liés aux statuts immunologique et physiologique de l'hôte, ainsi qu'à des facteurs liés au microorganisme. La séquence des événements qui contribuent à l'installation de *Candida albicans* chez son hôte peut se résumer en trois étapes clés :

- adhérence et colonisation.
- invasion au niveau des tissus.
- multiplication et survie chez l'hôte.

Les signes cliniques de candidémie et les perturbations du bilan biologique étant totalement aspécifiques, il est essentiel de suspecter une candidémie et de la rechercher devant une fièvre prolongée résistante à un traitement antibiotique adapté et bien conduit chez un patient à risque.

## 2/ Les candidoses

### 2-1/ Définition

Les candidoses sont des affections fongiques cosmopolites et opportunistes profitant de la déstabilisation du fragile équilibre de commensalisme installé entre le parasite et l'hôte pour se disséminer, provoquées par des levures appartenant au genre *Candida* qui peuvent être responsables de deux types d'infections: les candidoses superficielles ou les candidoses invasives dont font partie les candidémies qui sont favorisées par plusieurs facteurs de risques.

### 2-2 /Agent pathogène

Les levures du genre *Candida* sont les plus fréquentes en pathologie humaine. Elles représentent près de 83% de toutes les levures isolées de l'homme. L'espèce *Candida albicans* est la plus fréquente.

Une dizaine d'autres espèces peuvent se retrouver sur la peau ou dans le tube digestif telle que que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* [*C. dubliniensis* ou encore *C. krusei*][25].

### 2-3 / Facteurs prédisposant à l'infection candidosique

Certains facteurs, propres ou étrangers à l'hôte, favorisent le développement de la forme invasive.

#### 2-3-1 / Les facteurs intrinsèques liés à l'hôte

##### ➤ Les facteurs physiologiques

**Age** : Les candidoses orales sont plus fréquentes aux âges extrêmes de la vie. (Les nouveaux-nés, les personnes âgées)

**Hormones** : La grossesse

##### ➤ Les facteurs locaux

La macération, l'humidité, l'occlusion, la modification de la trophicité des muqueuses favorisent l'installation et le développement des candidoses superficielles.

### ➤ **Le terrain ou la maladie sous-jacente**

Toute maladie affaiblissant les défenses immunitaires de l'hôte est susceptible d'induire le déclenchement d'une candidose. (SIDA, cancer, diabète et les maladies endocriniennes)

### **2-3-2 / Les facteurs extrinsèques et / ou iatrogènes**

Les facteurs alimentaires et la dénutrition (la consommation de glucides en grande quantité semble propice à l'augmentation du saprophytisme intestinal.)

Les traitements médicamenteux (Antibiotiques, immunosuppresseurs et anticancéreux) Traitements chirurgicaux et accès vasculaire (Les cathéters, sondes et matériaux étrangers, Le traitement chirurgical)

### **2-4 /Manifestation cliniques**

Les formes cliniques des candidoses sont très variées. Pratiquement tous les tissus peuvent être le siège d'une infection. On distingue communément deux grands types :

- Les candidoses superficielles (non invasives).
- Les candidoses profondes ou systémiques (invasives).

#### **2-4-1 /Les candidoses superficielles**

Les candidoses superficielles sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Elles peuvent atteindre les surfaces épidermiques et les muqueuses (cutané- muqueux).les formes cliniques des candidoses superficielles sont citées dans le tableau 2 :

**Tableau 2** : Principales localisations et formes cliniques des infections superficielles à *Candida*

#### **Candidose cutanée et unguéale :**

- intertrigo des plis
- périonyxis et onyxis
- candidose congénitale néo-natale
- candidose génito-fessière du nourrisson

#### **Candidose digestive :**

- **buccale** : - muguet
- glossite érythémateuse
- langue noire
- perlèche, chéilite
- **œsophagienne**
- gastro-intestinale
- recto-anale

#### **Candidose génito-urinaire :**

- vulvo-vaginite
- balanite, balane-posthite
- urétrite, cystite

### 2-4-1-1 / Les candidoses cutanées et unguéales

-Les candidoses des plis sont favorisées par l'obésité, l'humidité et la macération, ainsi que le manque d'hygiène. On distingue classiquement deux grands types :

- **L'intertrigo des grands plis** : concerne les plis inguinaux, axillaires, abdominaux, sous-mammaires, interfessiers... (Figure 05).
- **L'intertrigo des petits plis** : concerne les plis interdigitaux palmaires, plus rarement les plis interdigitaux plantaires.



**Figure 05** : Intertrigo des grands plis sous mammaires d'après

<https://www.doctorette.info/images/sante-beaute/Dermatologie/mycose-sous-les-seins.jpg>

-Les onyxis et périonyxis candidosiques siègent préférentiellement aux mains. *Candida albicans*

### 2-4-1-2 / Les candidoses digestives

C'est au niveau de l'intestin et de l'estomac, les plus importants réservoirs de *Candida albicans*, que se multiplient les levures. Ceci entraîne des troubles digestifs qui peuvent devenir chroniques : aigreurs, douleurs œsophagiennes, douleurs stomacales, diarrhées, constipation, colite intestinale. Parmi les affections digestives on distingue :

#### 2-4-1-2-1 / La candidose buccale (MUGUET)

Manifestation la plus fréquente des candidoses, concerne à la fois les sujets non immunodéprimés et les sujets immunodéprimés, avec un caractère de gravité systématique chez ces derniers. (**Figure 06**).

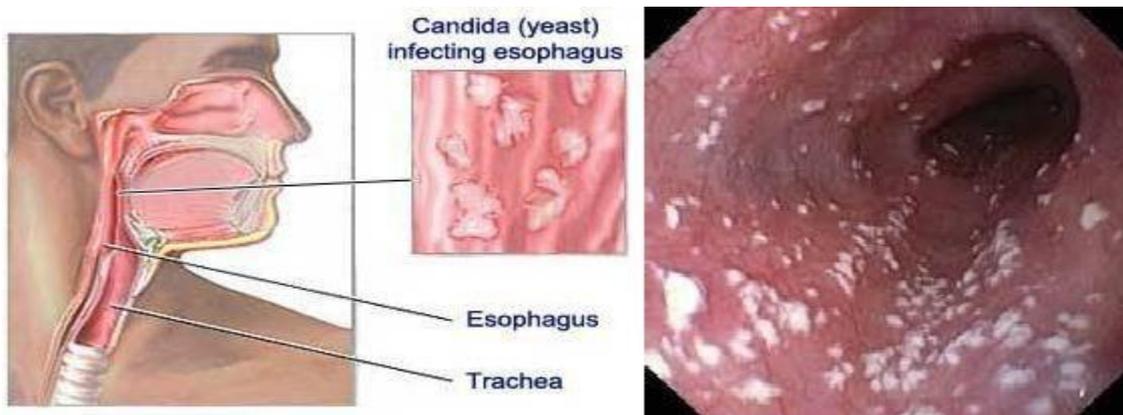


**Figure 06** : La candidose de muguet buccale d'après :

<https://storage.canalblog.com/22/54/1292528/99387464.jpg>

### 2-4-1-2-2 /La candidose au niveau de la muqueuse œsophagienne

Cliniquement, elle se traduit par une dysphagie douloureuse, un pyrosis et une sensation de brûlure au passage des aliments. (Figure 07).



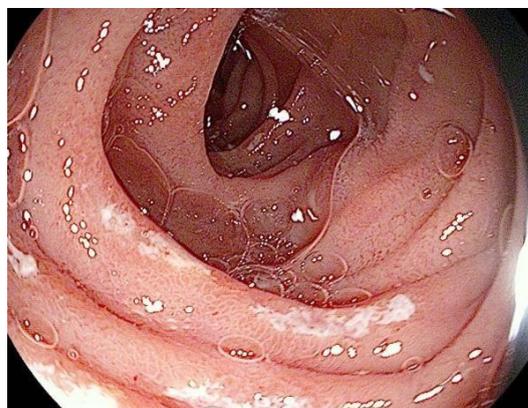
**Figure 07** : La candidose de la muqueuse œsophagienne d'après

<http://healthlifemedia.com/healthy/wp-content/uploads/2016/01/candida.jpg>

<https://i.pinimg.com/originals/c1/e6/2a/c1e62a9483be6162e228ba83460cefe5.jpg>

### 2-4-1-2-3 /La candidose au niveau de la muqueuse gastro-intestinale

Elle intéresse tout l'intestin, de l'estomac au colon. Les lésions se présentent comme un muguet intestinal avec des ulcérations. Elle se manifeste par des douleurs abdominales atypiques, des nausées et des vomissements **Figure 08**.



**Figure 08** : La candidose de la muqueuse gastro-intestinale

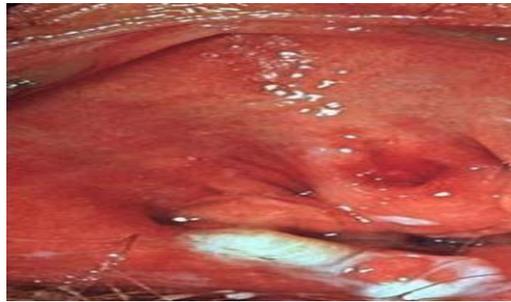
[https://c1.staticflickr.com/9/8064/8183548086\\_9447e3cbaf\\_b.jpg](https://c1.staticflickr.com/9/8064/8183548086_9447e3cbaf_b.jpg)

### 2-4-1-3 /Candidoses génito-urinaires

#### 2-4-1-3-1 /Candidose vulvo-vaginale

Elle est due à *Candida albicans* (80%) et *Candida glabrata* (10%). Elle est très répandue car 75% des femmes font un épisode de

mycose génitale dans leur vie. Elle est déclenchée par une grossesse, une antibiothérapie ou une immunodépression.. **(Figure 09).**



**Figure 09 :** Candidose vulvo-vaginale

<http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/candidoses/site/html/images/figure3.jpg>

#### 2-4-1-3-2 /Candidose Balanite et balano-posthite

Chez l'homme, l'infection débute au niveau du sillon balano-préputial puis s'étend ensuite au gland et au prépuce. Cette mycose se manifeste par un prurit, une irritation et des douleurs de la verge accompagnée d'un œdème, d'un érythème ou d'une excoriation Figure 10.



**Figure 10 :** Candidose Balanite et balano-posthite <http://www.erectionsfortes.com/wp-content/uploads/2017/08/a-38-300x198.jpg>

#### 2-4-2/Les candidoses systémiques

La terminologie appliquée pour décrire ce type d'infections varie selon la littérature.

Les termes de candidoses profondes, systémiques, invasives, viscérales ou disséminées sont employés.

Les candidoses systémiques regroupent les septicémies à *Candida* (ou candidémies) ainsi que l'atteinte de plusieurs sites non contigus, secondaires le plus souvent à une dissémination hématogène [26].

Elles surviennent surtout chez les patients hospitalisés dans les services de réanimation, les unités d'onco-hématologie, de transplantés, de grands brûlés et de néonatalogie.

## Candidoses oculaires

Il s'agit d'endophtalmies endogènes. Elles surviennent dans 10 à 40% des septicémies à *Candida*, et principalement chez les patients non neuroplégiques et les héroïnomanes (toxicomanie intraveineuse). Le fond d'oeil objective un exsudat cotonneux blanchâtre saillant dans le vitré.

## Candidose cardiaque

L'endocardite à *Candida* survient le plus souvent chez des patients ayant des lésions préexistantes sur une valve native ou prothétique. Elle touche aussi des patients porteurs d'un cathéter veineux central (endocardite du coeur droit) et les toxicomanes. Elle est principalement due à *Candida Parapsilosis* (50% des observations) alors que *Candida albicans* n'est retrouvée que dans 15% des cas.

## Candidose ostéo-articulaire

Comme pour les lésions cardiaques, l'ostéo arthrite à *Candida* survient généralement plusieurs mois (2 à 12 mois) après un épisode septicémique. Les atteintes costales et sternales, sont fréquentes. [27].

### 2-4-2-1/Physiopathologie des candidoses invasives

Les levures du genre *Candida* font partie de la flore endogène et sont présentes chez plus de la moitié des êtres humains. La colonisation, qui est un prérequis indispensable au développement ultérieur d'une candidose invasive, se développe à la suite de modifications de la flore endogène favorisant la croissance des *Candida* sur les surfaces cutanées et muqueuses (Figure 11). [28,29]. L'exposition répétée ou continue à plusieurs facteurs de risque favorise dès lors la survenue de micro-invasions [30,31].

La transmission exogène de *Candida*, qui a également été bien démontrée en milieu de réanimation, est plus rare lorsque les mesures d'hygiène et de prévention des infections sont adéquates [32] Figure 11.

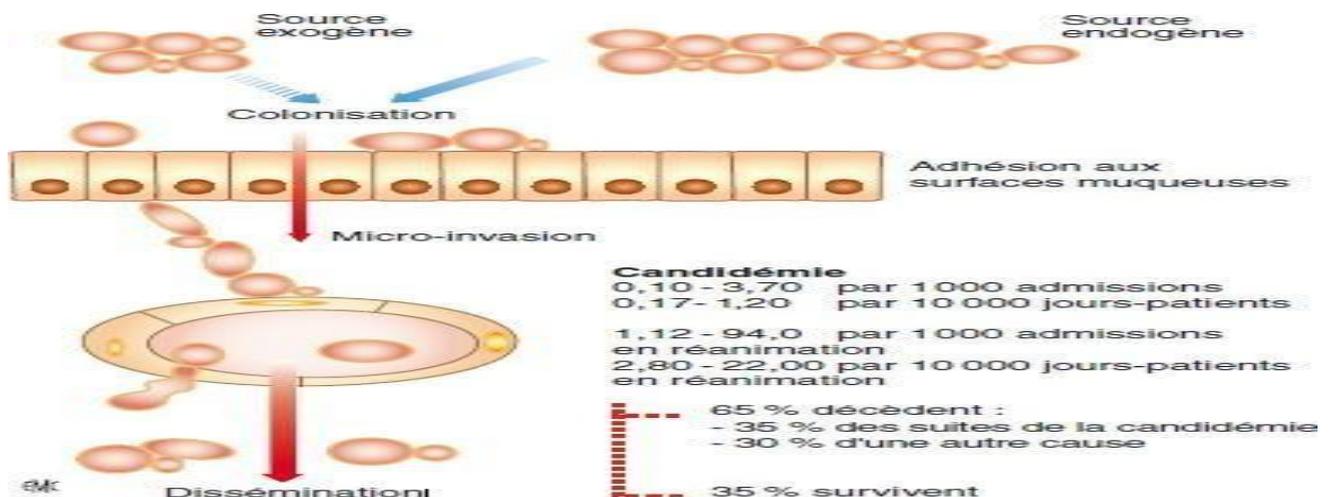


Figure 11 : Physiopathologie des candidoses invasives

## Candidémies

Une candidémie est définie par au moins une hémoculture positive à *Candida*, une candidose invasive par la mise en évidence de *Candida* à partir d'un site normalement stérile [33]. Les levures qui passent dans la circulation sanguine peuvent atteindre différents organes comme l'oeil, le système nerveux central, l'os et les articulations, le coeur avec essentiellement des endocardites. Les localisations viscérales évoluent à bas bruit, découvertes par un dépistage systématique (fond d'oeil) ou se révèlent secondairement plusieurs semaines ou mois après l'épisode de fongémie qui a pu passer inaperçu (spondylodiscite). Ces complications tardives constituent le rationnel des recommandations actuelles de traiter toute candidémie, même asymptomatique.

### II.1.2. Populations concernées

Les candidémies sont majoritairement des infections nosocomiales (après 48h d'hospitalisation), mais peuvent être communautaires, dans des proportions parfois non négligeables. Une étude mondiale réalisée entre 2008 et 2009 [34] rapportait 36.5% d'infections communautaires avec des taux variables selon les régions (tableau 3).

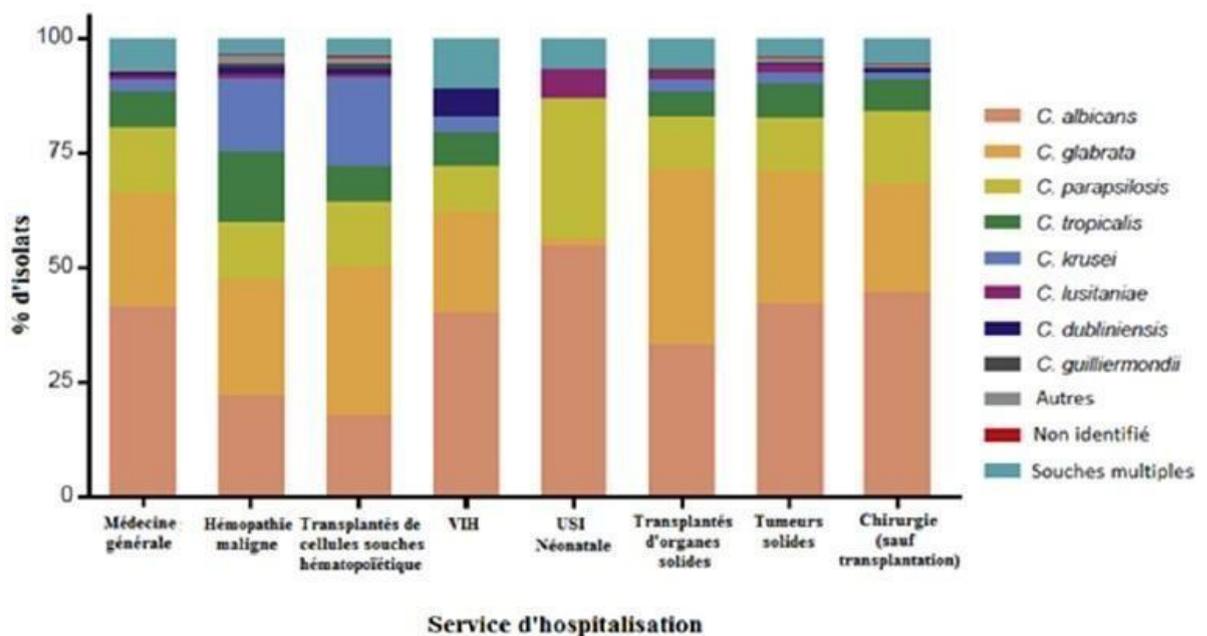
**Tableau 3 :** Variations géographiques du pourcentage de candidémies communautaires vs nosocomiales entre 2008 et 2009. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program [34].

Région	% d'origine Communautaire	% d'origine Nosocomiale
Europe	22,4	77,6
Amérique Latine	28	72
Amérique du Nord	50,8	49,2

Concernant les candidémies nosocomiales, certains services d'hospitalisation sont plus concernés, les patients cumulant les facteurs de risque. Globalement, les services de chirurgie, d'hématologie et les USI, regroupent la majorité des épisodes de candidémies.

## Distribution des espèces

Globalement, le nombre de *Candida non albicans* isolé du sang est en constante augmentation. Une étude récente réalisée aux USA entre sur 4067 isolats de *Candida spp.* [1]. a mis en évidence que, même si l'espèce la plus fréquemment isolée est toujours *C. albicans* (42.1%), la proportion de candidémies dues à des espèces non-*albicans* est majoritaire (57.9%) dans la quasi-totalité des services d'hospitalisation **Figure 12**.



**Figure 12** : Distribution des espèces responsables de candidémies par service D'hospitalisation [35].

### II.1.4. Mortalité

IL est très difficile d'évaluer la mortalité attribuable à un épisode de candidémie. C'est une donnée peu précise puisqu'elle diffère beaucoup en fonction de la sévérité de la pathologie sous-jacente. À titre d'exemple, une revue publiée à ce sujet relevait une mortalité attribuable variant de 5 à 71 % [36]. Ainsi, on retrouve généralement des taux de mortalité plus élevés chez les patients atteints d'un cancer et dans les USI, en lien avec la gravité du terrain. [37].

Certaines études notent une amélioration de la survie des patients ces dernières années [38], tandis que d'autres ne voient aucune évolution [39]. La tendance est tout de même à une absence d'augmentation du nombre de décès en dépit d'un nombre plus important de patients infectés. L'explication serait la meilleure prise en charge thérapeutique préventive et curative des patients à risques, associée à une proportion importante de candidémies liées aux cathéters intra-vasculaires, de meilleur pronostic.

### II.1.5. Impact économique

Les candidémies nécessitent des traitements antifongiques coûteux, associés à une surveillance biologique, des examens paracliniques complémentaires et éventuellement des actes invasifs. L'ensemble de la prise en charge d'une candidémie implique donc des coûts supplémentaires, ainsi qu'une durée d'hospitalisation plus longue [40]. Cet impact médico-économique des candidémies sur le système de santé est un argument supplémentaire pour intensifier les efforts à réaliser en matière de prévention, de diagnostic, et de traitement des candidémies.

Facteurs de risques d'infection à *Candida spp* :

De nombreux facteurs de risque prédictifs du développement ultérieur d'une candidose invasive ont été identifiés au cours des trois dernières décennies qui sont résumés au tableau ci-dessous :

**Tableau 4 :** Facteurs de risque de candidoses systémiques (41, 42,43) Injury Severity Score (score de sévérité du trauma) ; APACHE II : *acute* physiology and chronic health status evaluation II ; cfu : colony

Facteurs de risque importants	Facteurs de risque non spécifiques
Colonisation de sites corporels multiples	Âges extrêmes
Antibiothérapie à large spectre	Diabète
Immunosuppression	Insuffisance rénale
Neutropénie	Chirurgie récente
Brûlures (> 50 %)	Sondage urinaire
Lésion du tractus digestif	Accès vasculaire
Chirurgie digestive majeure	Séjour prolongé en réanimation (> 7 jours)
Chirurgie des voies urinaires (en présence de candidurie)	Transfusions multiples
Traumatisme majeur (ISS > 20)	
Nutrition parentérale	
Dialyse	
Score APACHE II > 20	
Voie veineuse centrale	
Candidurie > 10 <sup>5</sup> cfu/ml	

formingunits.

## **Diagnostic des candidémies**

Le diagnostic précoce des candidoses invasives demeure un véritable défi [44-45, 46, 47].

Les hémocultures se positivent d'habitude tardivement dans le cours de l'évolution [48, 49]. Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire, les techniques disponibles ne sont pas encore standardisées [50]. Bien que de nombreux résultats préliminaires soient prometteurs quant aux mesures liées aux composés spécifiques de la paroi fongique, tels que les mannanes ou leurs anticorps spécifiques, les seuils de détection permettant de différencier une colonisation d'une infection restent à définir [51]. La détermination des taux circulants de bêta-D-glucans semble être actuellement la méthode la plus prometteuse [52].

## **Prise en charge thérapeutique des candidémies**

### **Définition des antifongiques**

Les antifongiques sont des molécules capables de détruire spécifiquement les différents champignons impliqués en mycologie médicale (fongicide), ou au moins de réduire leur prolifération (fongistatique) (Gales.; 2009).

### **Classe des antifongiques**

Il n'existe à ce jour que quatre classes d'antifongiques : les polyènes, les dérivés azolés, les dérivés pyrimidiques et les échinocandines.

#### **1-3-1 / Les polyènes**

Dans cette classe on trouve:

- L'amphotéricine B (Fungizone®): cet antifongique a un spectre large comprenant les levures, les champignons filamenteux et les champignons, dimorphiques. Elle est utilisée par voie intraveineuse pour traiter les mycoses systémiques ou profondes.
- La nystatine (Mycostatine®): cet antifongique a une absorption digestive quasi nulle, ce qui en fait un traitement de choix pour les mycoses buccales pouvant être étendues au restant du tube digestif.

#### **1-3-2 / Les azolés**

Ce sont des molécules synthétiques, utilisées en applications locales ou par voie systémique ; elles trouvent leurs indications aussi bien dans les mycoses superficielles que profondes.

## Les imidazolés

On distingue :

- Le miconazole (Daktarin®) en applications buccales.
- Le kétoconazole (Nizoral®) a été le premier dérivé azolé actif par voie systémique, réservé aux mycoses buccales sévères.
- Les triazolés
- Le fluconazole (Triflucan®) utilisé par voie orale ou systémique est très actif sur la plupart des levures, notamment *Candida albicans*.
- L'itraconazole (Sporanox®) utilisé par voie intraveineuse dans certaines mycoses exotiques comme l'histoplasmosse.

### 1-3-3 / Les dérivés pyrimidiques

- Le 5-fluorocytosine (Ancotil®) est le seul analogue structural des bases pyrimidiques. La 5-Fluorocytosine inhibe la biosynthèse d'ADN ou interfère avec la traduction des ARNm en protéines fongiques.

La 5-Fluorocytosine est fongicide et sélective des champignons car les cellules des mammifères ne possèdent pas la cytosine désaminase, enzyme cible de cet anti métabolite, de la voie de métabolisation des pyrimidines. (Gales.; 2009).

### 1-3-4 / Les échinocandines

Les échinocandines sont une nouvelle classe d'antifongiques systémiques présentant un mode d'action innovant, spécifique et original.

Ces molécules interfèrent avec la synthèse de la paroi fongique par inhibition non compétitive de la 1, 3  $\beta$ -D-glucanesynthétase, système enzymatique présent chez la plupart des champignons pathogènes.

Leur spectre d'action est étendu, englobant les *Candida spp.*, les *Aspergillus spp.* et *Pneumocystis carinii* (Lacroix et al.; 2003).

. Méthodes de détermination de la sensibilité :

La détermination de la sensibilité aux antifongiques est réalisée de façon systématique pour les levures isolées de prélèvements profonds, notamment les hémocultures. Comme nous l'avons vu précédemment, l'acquisition de résistances reste peu fréquente chez les levures du genre *Candida* mais l'étude de la CMI est indispensable, notamment en cas d'isolement d'espèces rares, d'échec thérapeutique, chez les patients traités par un traitement antifongique au long cours, mais également à titre épidémiologique pour surveiller l'émergence de résistances

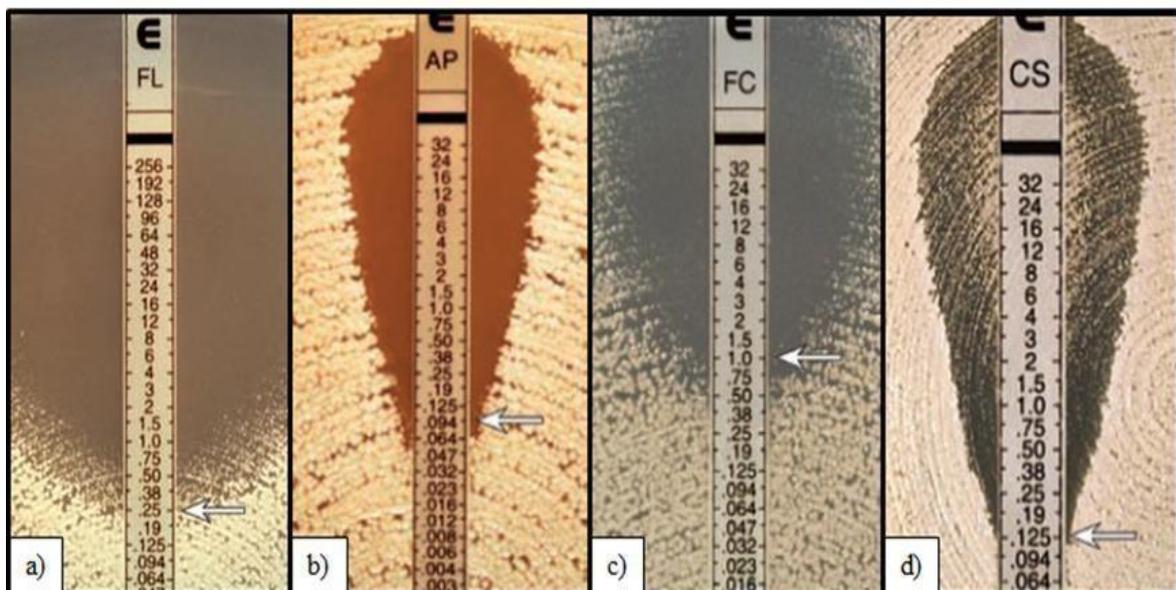
### Méthodes de référence

Deux comités d'experts, le CLSI pour les Etats-Unis et l'EUCAST pour l'Europe, proposent des méthodes standardisées qui servent de référence pour les autres tests.

Ces techniques reposent sur le principe de microdilution en milieu liquide[61]

#### III.2.2.2. Méthode E-test®

Cette méthode repose sur le principe de diffusion en milieu gélosé. En pratique, un milieu gélosé est ensemencé avec un inoculum standardisé de la souche de levure à tester. La bandelette E-test®, imprégnée d'un gradient d'antifongique, est déposée sur le milieu de cette gélose puis l'ensemble est incubé 24 à 48 heures à 37°C. La lecture de la CMI se fait à l'intersection entre la bandelette et l'ellipse d'inhibition de la croissance fongique. La lecture ne doit pas tenir compte de certains artéfacts de croissance et ne se fait pas de la même manière selon l'antifongique utilisé (figure 13).



**Figure 13 :** Exemples d'antifongigrammes réalisés avec la méthode E-test  
(<http://www.biomerieux-diagnostic.com>)

- a) Fluconazole : lecture à 80% d'inhibition. Ne pas tenir compte de la pousse de petites colonies au sein de la zone d'inhibition (effet de traîne).
- b) Amphotéricine B : lecture à 100% d'inhibition.
- c) 5-FC : lecture à 90% d'inhibition.
- d) Caspofungine : lecture à 80% d'inhibition. Ne pas tenir compte de la repousse paradoxale aux concentrations plus élevées.

**La méthode E-test®** est bien corrélée avec les méthodes de référence pour tous les antifongiques (tableau XV). Malgré un coût non négligeable, c'est la technique la plus largement utilisée dans les laboratoires de mycologie médicale.

### **Interprétation de l'antifongigramme**

L'interprétation d'un antifongigramme reste délicate, les valeurs de CMI *in vitro* n'étant pas toujours corrélées à la réponse clinique au traitement antifongique. Cette discordance *in vitro/in vivo* est parfois appelée la « règle du 90-60 » qui illustre le fait qu'une infection à une souche sensible répondra à un traitement adapté dans 90% des cas, une infection à une souche résistante dans 60% des cas (Rex & Pfaller, 2002). [62].

## **IV.1. Méthode déréférence**

### **L'hémoculture**

La réalisation d'hémocultures est la seule méthode permettant d'isoler la levure et par conséquent est la méthode de référence de diagnostic des candidémies. Plusieurs paramètres vont intervenir dans le délai entre le prélèvement du patient, et le début du traitement antifongique : la sensibilité de l'hémoculture, et son délai de positivité. Par ailleurs, le délai d'identification de la levure pourra retarder la prise en charge adaptée.

### **Comment et quelles hémocultures prélever ?**

Les dernières recommandations de l'ESCMID concernant le diagnostic des candidémies préconisent la réalisation de (2 à 4) séries d'hémocultures par jour pendant au moins 5 jrs, comprenant à chaque ponction un flacon aérobie et un flacon anaérobie (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012) [65]. Les volumes recommandés sont de 40 à 60 mL chez l'adulte et de 2 à 4 mL, 6 mL et 20 mL pour les enfants de moins de 2 kg, de 2 à 12 kg, et de 12 à 36 kg respectivement. Une fois le diagnostic de candidémie posé, le prélèvement d'hémocultures devrait être réalisé chaque jour jusqu'à négativation (Cornely *et al.*, 2012) [66].

#### **. Délai de positivité :**

Compte tenu de la nécessité de mettre en place le plus rapidement possible un traitement antifongique, le délai de positivité (ddp) des hémocultures est un élément extrêmement important. Une étude de 2010 rapporte que chaque heure d'incubation supplémentaire multiplie par 1,025 la mortalité hospitalière (Taur *et al.*, 2010) [67].

Identification de l'espèce

Classiquement, l'identification de l'espèce de *Candida* responsable de la septicémie est réalisée à partir de colonies isolées issues de la subculture de l'hémoculture positive, c'est-à-dire de son ensemencement sur d'autres milieux de culture.

#### **IV.1.3.2. Biologie moléculaire MALDI-TOF**

Sur le plan biologique, ces dix dernières années ont été marquées par les progrès et apports de la biologie moléculaire et de nouvelles méthodes d'identification telle la spectrométrie de masse (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of fly* [MALDITOF]).

L'analyse de séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) a individualisé certaines espèces proches phénotypiquement, impliquées dans des épisodes de fongémies. L'analyse de marqueurs génétiques au sein d'une espèce a permis de progresser dans les connaissances de l'épidémiologie des candidoses en constante évolution. La spectrométrie de masse est en train de supplanter les méthodes classiques d'identification en raison de sa simplicité d'utilisation et de sa rapidité [1–4].

Matériels

Et

Méthodes

## 1/ Cadre d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée sur une période de deux ans (2016-2018) au laboratoire de HMRUC sur 106 prélèvements d'hémocultures réalisés chez les malades hospitalisés au niveau du service de réanimation dont l'âge moyen se situe entre 32 à 60 ans , parmi ces prélèvements seulement 2 cas sont positifs.

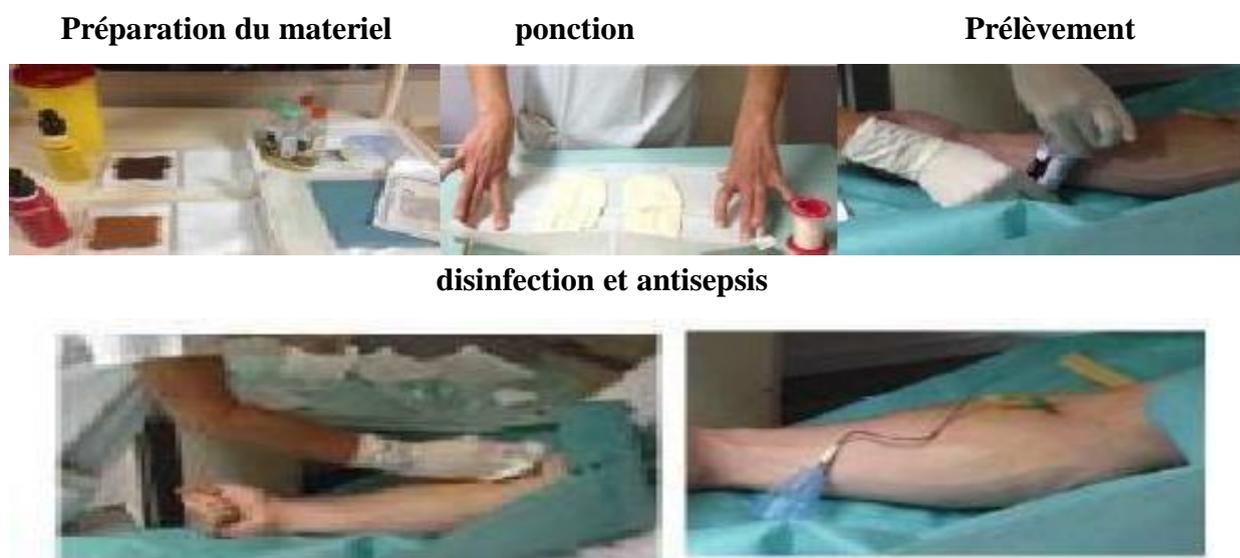
2/ Démarche de diagnostic :

La démarche de diagnostic d'une candidémie comporte les étapes successives suivantes :

- Le prélèvement
- L'examen direct
- La mise en culture
- L'interprétation des résultats par l'antifongogramme

## 1/ Prélèvement

Le prélèvement est une étape essentielle ; qui conditionne la réussite de l'analyse pour cela le prélèvement sanguin sur deux flacons d'hémocultures a été effectué au niveau du service de réanimation dont l'un des flacons est aérobie et l'autre est anaérobie dans des conditions d'asepsie.



Les prélèvements sont acheminés au laboratoire de parasitologie unité de mycologie afin d'identifier la levure en cause sont accompagné d'une fiche de renseignement

- Le nom, le prénom, l'âge et le sexe du patient.
- La date et le type du prélèvement.
- Les renseignements cliniques.
- Le traitement antifongique s'il existe.



## 2/ Examen direct

Permet de donner un premier résultat immédiatement et d'affirmer donc le diagnostic de Candidose par la mise en évidence du levure.

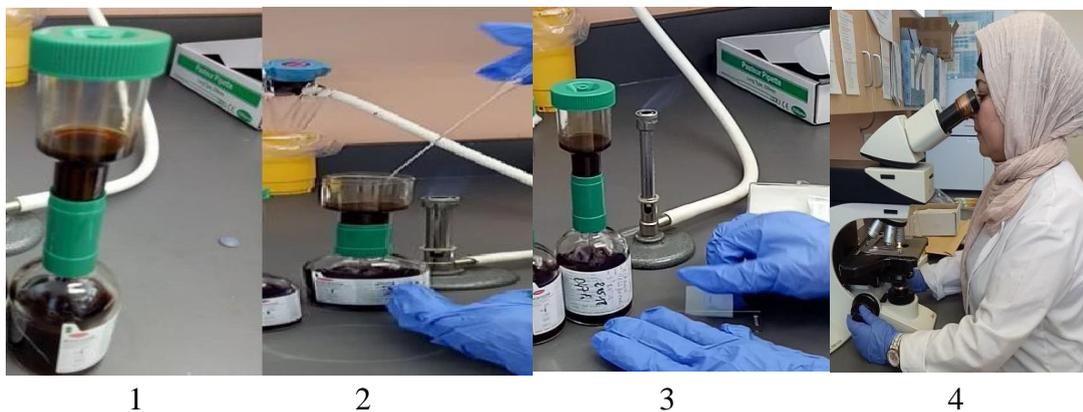
L'observation de blastospores avec pseudo-mycéliums oriente vers une

Candidose. (Chabasse et *al.*; 2008, Chabasse et *al.*; 2009, Cointe.; 2010, Chabasse.; 2013).. Après incubation de 24 h à 37°C L'examen direct a été effectué à l'état frais

❖ A l'état frais

**La technique est la suivante :**

1. Déposer quelques gouttes de prélèvement sur une lame microscopique stérile
2. Recouvrir d'une lamelle microscopique neuve et stérile.
3. Observer au microscope à l'objectif (×40).



1

2

3

4

Dans le cas positif ou présence de levures (blastospore pseudo-filaments) on procède la mise en culture

### **3/ la mise en Culture :**

L'ensemencement se fait habituellement sur milieux Sabouraud–chloramphénicol avec et sans actidione après 2 jours et incubation à 37 °C. La lecture se fait au bout de 24 à 48 heures.

Technique :

- Prélever 02 gouttes de sang a l'aide d'une pipette sterile
- Ensemencer l'inoculum sur les deux milieux (technique des stries pour le milieu(SAC))
- Incuber à 37°C pendant 24à48h.

L'observation des colonies après incubation indique une croissance levurienne qui nous oriente vers l'identification de l'espèce

## **Identification**

### **1-2/ Identification des levures**

□ Identification du genre *Candida*:

➤ Examen macroscopique:

Les caractéristiques des colonies sur les milieux Sabouraud- chloramphénicol (SC) et Sabouraud - Chloramphénicol- Actidione (SCA) qui sont prises en considération incluent : la couleur, la pigmentation, le diamètre, la forme, l'aspect de la surface, la consistance et l'opacité.

➤ Examen microscopique

Technique :

Prélever à la pipette un fragment de colonie et le déposer dans une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame microscopique, bien émulsionner avant de recouvrir d'un lamelle et observer a grossissement (x40).

❖ Identification de l'espèce

L'identification des espèces de levures s'effectue à l'aide de critères phénotypiques

et de critères physiologique et finalement des critères immunologiques (Poulain et *al.*; 1995).

▪ Critères phénotypiques:

Test de filamentation en sérum (test de blastèse) :

Ce test décrit par Taschdjian en 1960 et inspiré des travaux de Reynolds et Braune (1956), qui ont montré que les constituants du sang favorisent la formation de filaments par certaines levures. [1]



**Figure 14:** Sérum de cheval pour le test de blastèse

*Candida albicans* et *Candida dubliniensis* produisent ces tubes germinatifs (Khelif et al.; 2008).

**Principe :**

Il consiste à rechercher l'apparition de tubes germinatifs (filaments vrais) après 01 à 03 heures de mise en suspension d'un fragment de colonie (après purification sur le milieu Sabouraud-chloramphénicol SC) dans du sérum de cheval à 37C° (Figure n°14)



**Test de chlamydosporulation :**

L'objectif est de favoriser la pseudofilamentation des levures qui sont caractéristiques de deux espèces: *C. albicans* et *C. dubliniensis*. (Khlif et al.;2008).

Le milieu PCB favorise aussi la formation de pseudo-filaments ce qui élimine *C.famata* et *C.glabrata* qui n'en produisent pas.

Pour réussir ce test; il faut suivre les étapes suivantes:

- Couler le milieu Pomme de terre, Carotte, Bile (PCB) en boîte de Pétri (l'épaisseur sur milieu doit être d'environ 05mm).
- Déposer 02 gouttes d'une suspension de levure à l'aide d'une pipette stérile.
- Déposer dessus deux lamelles neuves.
- Recouvrir du couvercle (Figure n°15).

Incuber à 27°C, pendant 24 à 48 heures



**Figure 15 :** Test de chlamydosporulation

La lecture se fait directement sur la platine du microscope; à l'objectif (×40).

**Critères physiologiques :****La galerie AUXACOLOR™ 2**

Un système d'identification dont le principe repose sur l'assimilation des sucres. La croissance des levures est visualisée par le virage d'un indicateur de pH.Elle comporte également 3 tests enzymatiques dont un test de détection de l'activité phénoloxidasique de *Cryptococcus neoformans*.



**Figure 16 :** La galerie AUXACOLOR™ 2

**Composition de la galerie : La galerie comprend :**

- un témoin négatif pour faciliter la lecture des résultats d'assimilation (cupule de couleur bleue).
- 13 tests d'assimilation comportant les sucres suivants :

(GLU.) : témoin	(MAL.)	(SAC.)	(GAL.)	(LAC.)	(RAF.)	(INO.)
Positif						
(CEL.)	(TRE.)	(ADO.)	(MEL.)	(XYL.)	(ARA.)	

**Tableau 5 :** les sucres contenant dans le test d'assimilation

Chaque sucre est deshydraté en présence d'un milieu de base et d'un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol. La croissance d'une levure se traduit par le virage de l'indicateur du bleu au jaune et par l'apparition d'un trouble dans la cupule.



**Figure 17 :** Microplaque de type « Auxacolor »

### Technique de l'inoculation de la microplaque :

- Préparer l'inoculum à partir d'une culture de 24 à 48h réalisée sur milieu de Sabouraud chloramphenicol(SC). Dans des conditions stériles, ensemercer le milieu de suspension avec des colonies de souche pure (1 à 3 colonies identiques).
- Homogénéiser la suspension à l'aide d'un vortex.
- Prélever et distribuer, à l'aide d'une pipette, 2 gouttes de l'inoculum dans chacune des cupules de la microplaque.
- Recouvrir la microplaque avec l'adhésif en s'assurant que l'adhésion est parfaitement uniforme. Incuber pendant 24h à 48h à 35°C.



### TEST CHROMAGAR :

Est un milieu servant à l'isolement et à la différentiation des *Candida albicans*, *C. tropicalis* et *C. krusei* à partir d'échantillons cliniques.

Il inhibe les bactéries et peut aussi être employé comme milieu d'isolement sélectif pour d'autres espèces de levure et pour les champignons filamenteux.



**Figure 18 :** milieu d'isolement sélectif des *Candida* CHROMagar

**Mode opératoire :**

- Strier l'échantillon sur la surface du milieu afin de créer l'isolement.
- Incuber les boîtes en position retournée et en conditions aérobies à 35 .2 °C

pendant 20 à 48 h. Une période d'incubation de 42 h est nécessaire pour que les colonies de *Candida* atteignent leur coloration complète.

- Maintenir à l'abri de la lumière avant et pendant l'incubation.

**Critères immunologique :****Test d'agglutination au latex de Bichro –Dubli FUMOUIZE®**□ **Principe**

Le test BICHRO-DUBLI FUMOUIZE® est basé sur le principe de la coagglutination des blastospores de *Candida dubliniensis* avec des particules de latex bleues (en suspension dans un contre colorant rouge) sensibilisées par un anticorps monoclonal, reconnaissant spécifiquement un antigène à la surface de cette levure (Figure 19).



**Figure 19 :** Microplaque de latex Bichro-Dubli Fumouze®.

❖ **Mode opératoire**

Pour cela, il faut suivre les étapes suivantes :

- Déposer 02gouttes de réactif latex, préalablement homogénéisé, dans un cercle de la carte, pour chaque culture à tester.
- À l'aide d'une pipette Pasteur prélever 2 ou 3 colonies de 24 à 48 heures
- Dissocier l'échantillon de culture dans la goutte de réactif latex et l'étaler sur toute la surface du cercle jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Imprimer à la carte un lent mouvement oscillant circulaire pendant 3 à 5 minutes et observer l'apparition éventuelle d'agglutinats bleus sur fond rose ou rouge ou violet.

## Identification de candida

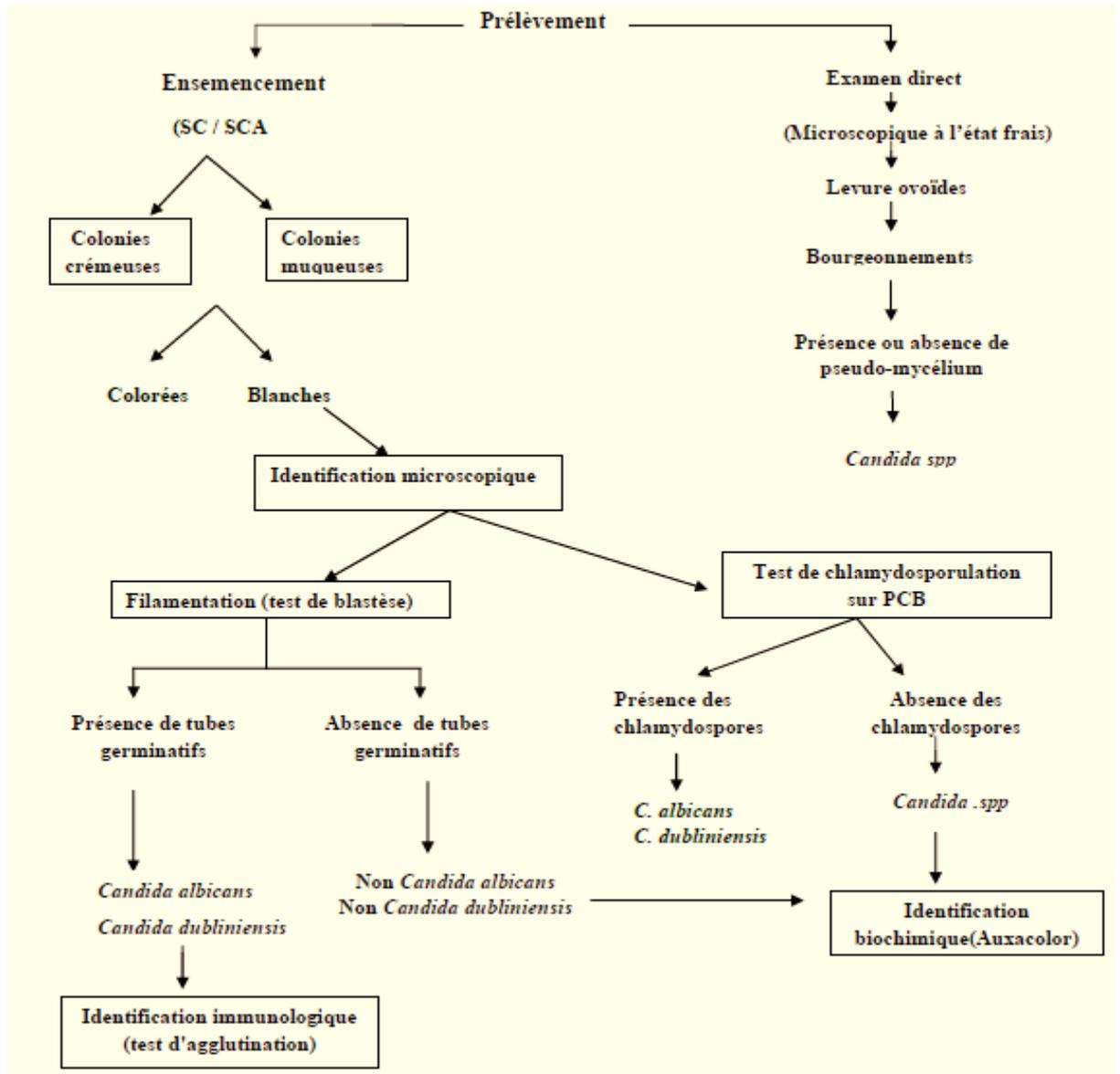


Figure 20 : schéma d'identification de *Candida spp* (Guillaume.; 2009)

### 4/ Antifongigramme :

Pour déterminer la résistance et/ou la sensibilité des souches fongiques isolées et L'identifiées ; aux agents antifongiques nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques et le fungitest).

Nous nous sommes limitées à l'étude d'une seule souche de *Candida*, vu que l'antifongigramme ne s'applique au laboratoire de mycologie qu'à la demande du médecin traitant et qu'en cas de candidoses profondes.

#### 4-1/ Mode opératoire

##### Méthode des disques sur gélose:

- ✓ Milieu de culture: Le milieu Sabouraud est coulé dans une boîte de Pétri jusqu'à une épaisseur de 04 mm (25ml).
- ✓ Préparation de l'inoculum: L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 24 heures, obtenue sur un milieu de purification (Sabouraud - Chloramphénicol). Pour ce fait, 05 colonies bien isolées de 01m de diamètre sont raclées à l'aide d'une anse de platine et mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile.

L'inoculum ainsi préparé est homogénéisé au vortex de façon à obtenir une suspension dense.

- ✓ Ensemencement: Un écouvillon de coton est plongé dans la suspension. L'excès de liquide est éliminé en pressant fortement l'écouvillon contre la paroi du tube au-dessus du niveau du liquide.

Après séchage du milieu 15 minutes à 37°C, la totalité de la surface estensemencée à l'aide de l'écouvillon selon la méthode standard. L'écouvillonnage est répété plusieurs fois en tournant la boîte de 60°, de manière à s'assurer de l'homogénéité de la répartition de l'inoculum sur toute la surface, y compris sur les bords.

La boîteensemencée est laissée ouverte pendant 3 à 5 minutes dans l'étuve à 37°C

de manière à laisser absorber l'excès d'humidité avant de déposer les disques sur le milieu.

Application des disques :

Les disques d'antifongiques sont appliqués à l'aide d'un distributeur automatique (figure21)



**Figure 21 :** Distributeur automatiques d'antifongiques

✓ Incubation : La boîte est incubée à 28°C dans un délai de 15 minutes. La durée d'incubation est de 24 heures.

après incubation Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision, à l'aide d'une règle à l'extérieur de la boîte fermée.

Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture suivante

25/05/2017 Etude de la sensibilité des champignons aux antifongiques, antifongogramme par la méthode de diffusion en milieu

Diamètre de la zone d'inhibition en mm	CMI en µg/mL	Interprétation	
<b>Pour les levures (<i>Candida albicans</i> et autres champignons levuriformes)</b>			
5FC1	= 20	1,56	Sensible
	20-10	1,56-25	Intermédiaire
	= 10	25	Résistant
AB100	> 10	< 1	Sensible
	= 10	1	Intermédiaire ou résistant
NY100	>10	-	Sensible
	= 10	-	Résistant
EC50, CTR50, MCZ50, KET50 (imidazolés)	= 20	1,56	Sensible
	20-10	1,56 – 6,4	Intermédiaire
	=10	6,4	Résistant
<b>Pour <i>Aspergillus fumigatus</i></b>			
5FC1	>10	-	Sensible
	=10	-	Intermédiaire ou résistant

Permettant ainsi de classer les souches fongiques dans l'une des catégories : Sensibles (S) ; Intermédiaires (I) ou Résistantes (R).

## **FUNGITEST® [96,97]**

### **PRINCIPE :**

Fungitest® permet d'étudier la croissance des levures en présence de 6 antifongiques à 2 concentrations. La méthode est dérivée de la dernière recommandation CLSI, le milieu de culture est le RPMI glucosé à 2% et tamponné, additionné d'un indicateur d'oxydo- réduction. L'inoculum est dilué à 10<sup>6</sup> levures par ml, et le temps d'incubation est de 48h. La croissance des levures se traduit par un virage du milieu du bleu au rose.

La microplaque Fungitest comporte 16 puits : deux puits réservés aux témoins négatifs, deux puits pour les témoins négatifs et 12 puits restant contiennent les six antifongiques à deux concentrations différentes :

L'amphotéricine B (2 et 8 mg / ml), le fluconazole (8 et 64 mg / ml), itraconazole (0,5 et 4 mg / ml), kétoconazole (0,5 et 4 mg / ml), miconazole (0,5 et 8 mg / ml) et la 5- fluorocytosine (2 et 32 mg / ml).

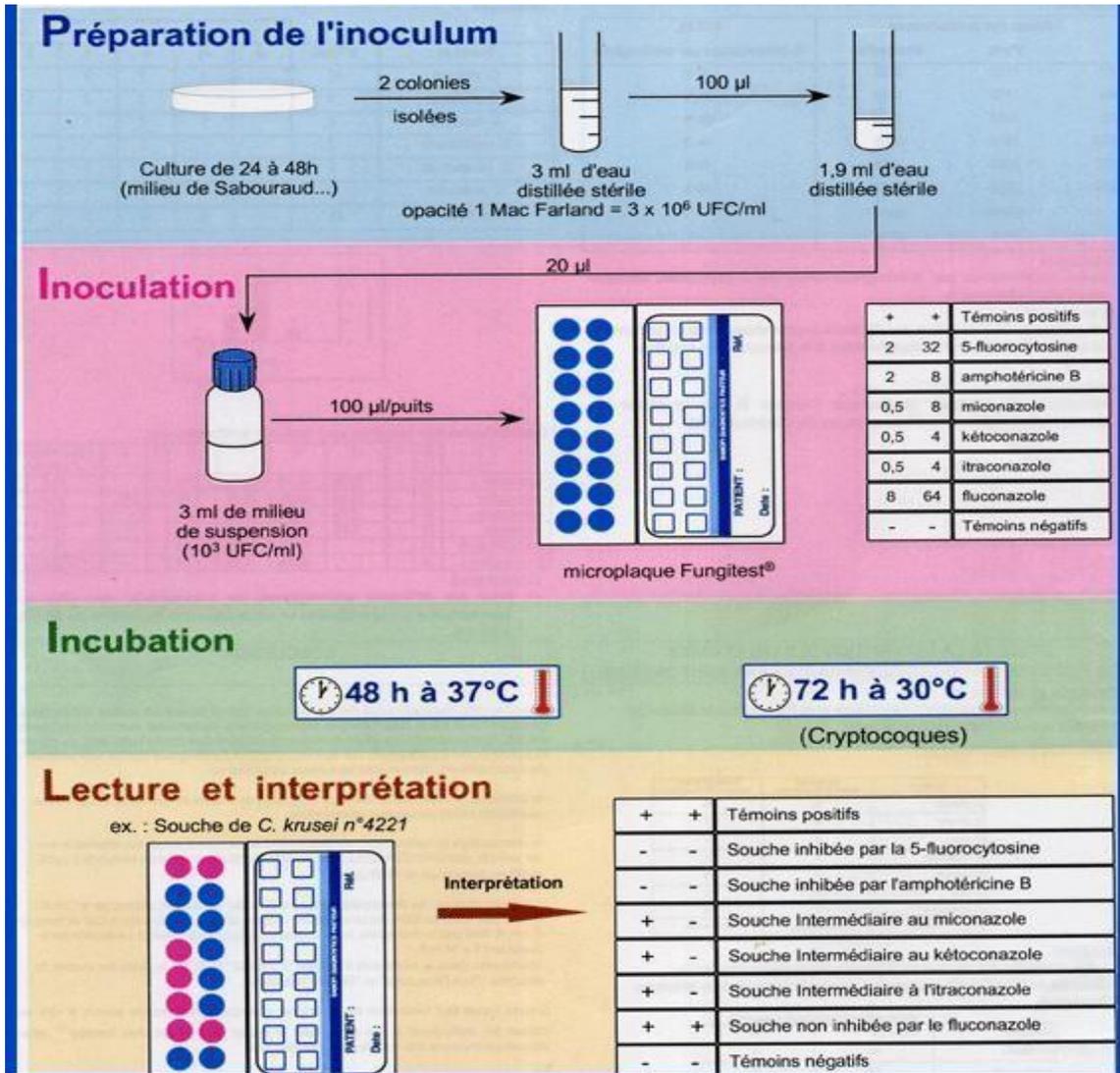


Figure 22 : Schéma qui illustre le mode opératoire de Fungitest®

Résultats  
Et  
Discussion

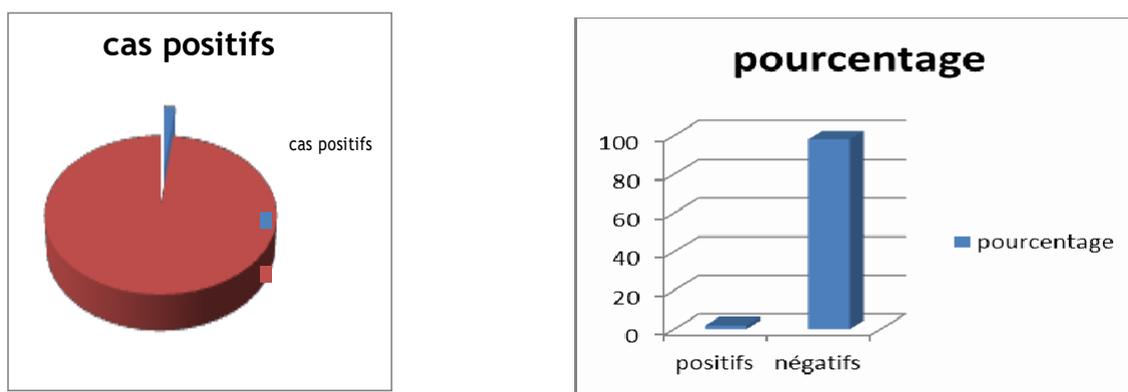
Nos statistiques de l'étude rétrospective des prélèvements sanguins au cours de ces deux dernières années dont seulement 2 cas sont positifs sont représentées au-dessous

### 1/ Répartition des prélèvements selon la positivité des cas

Sur les 106 patients inclus dans notre étude, 106 prélèvements d'hémocultures ont été réalisées parmi ces prélèvements 2 sont revenus positifs à *Candida spp*, soit un taux de positivité de 1,88 % La répartition des prélèvements selon la positivité des cas est présentée dans le tableau n°06 et la figure n°34 et n ° 35

**Tableau 06** : Répartition des prélèvements selon la positivité des cas

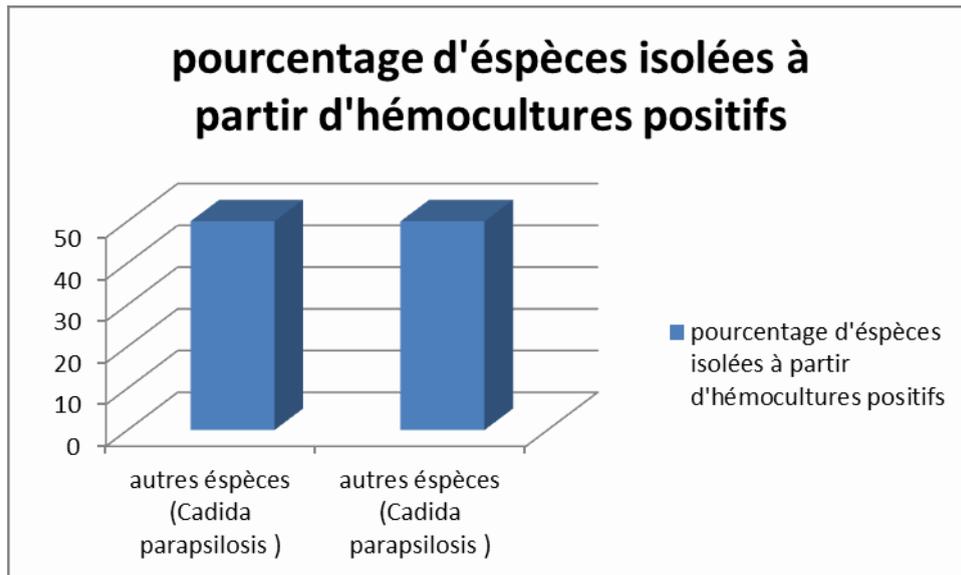
Cas	Nombre de prélèvement d'hémoculture	Porcentage (%)
positif	2	1.88
négatif	104	98.12
totale	106	100



**Figure 23** : taux de positivité hémoculture

**Tableau 07** : espèces isolées à partir d'hémocultures positifs

espèces isolées	nombre d'hémocultures	taux de positivité (%)
<i>Candida albicans</i>	1	50
autres espèces ( <i>Candida parapsilosis</i> )	1	50
Totale	2	100



**Figure 24 :** Pourcentage de *C.Albicans* et *C.parapsilosis* isolées à partir d'hémocultures positifs

Etant donné quand a trouvé 2 cas positifs on a procédé le même protocole pour les deux cas.

## 2/ Répartition des candidoses en fonction du sexe :

### 1 / sexe ratio :

Les sexes ratio H /F de notre population est de : 2,4 (H : 75 / F : 31) Tableau A : age moyen de la population

L'âge moyen de la population est de 61 ans.

**Tableau 08:** représente l'âge moyen

Age (ans)	Min	Moyen	Max
Population	32	61	90

## Interprétation des résultats :

Concernant le 1<sup>er</sup> cas 01 : Examen direct :

On observe la présence de cellules ovoïdes, blastospores, un bourgeonnement une vrai au pseudo\_filamentaion (**Figure 01**) donc il y a présence de levures dans cet hémoculture.



**Figure 25 :** observation microscopique des levures (grossissement x40)

**La culture :** après incubation pendant 24 h à 37 °c

Les souches fongiques isolées ont présenté une croissance facile sur les deux milieux utilisés : le Sabouraud Actidione (SCA).et (SC)

### Lecture macroscopique

**Tableau 9 :** caractéristique des levures observé macroscopiquement

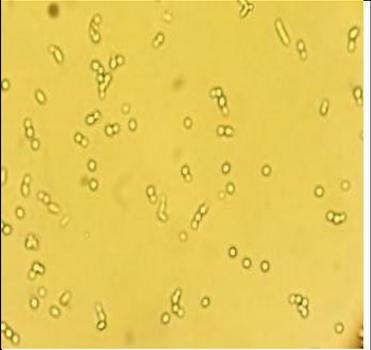
Type de colonies	Vitesse de croissance	Aspect de colonies	Photo	
Colonies de levures	Croissance rapide Apparition des colonies après 24 h d'incubation.	Colonies de : Surface : lisse et cremeuse .  Relief: bombé . Bordure: nette . Couleur / blanche .		
			Milieu SAC	Milieu SC

L'identification a permis d'obtenir 01 espèce : *Candida*

### Lecture microscopique :

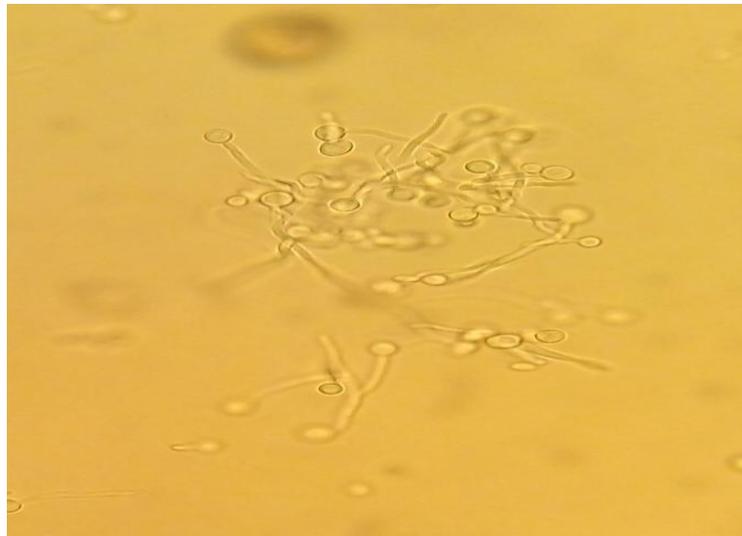
Les caractéristiques microscopiques de cette espèce sont présentées dans le tableau n° 11 et la figure n°37 ci-dessous :

**Tableau n°10** : les caractéristiques microscopiques de l'espèce de *Candida albicans*.

Espèce	Caractères microscopique après culture	Photo
Candida	Cellules ovoïdes , petite taille et bourgeonnantes	

**Test de blastèse :**

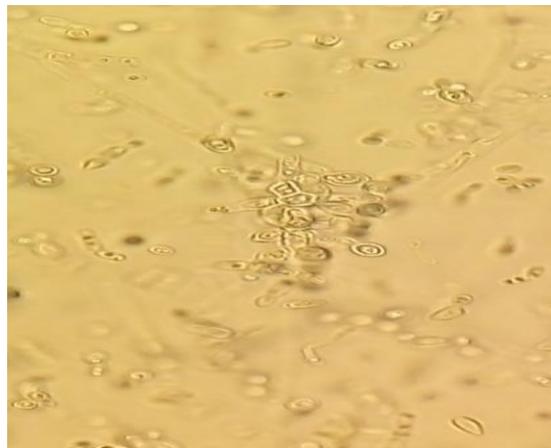
Après 4h à 37 °C on observe l'apparition au grossissement(x40) des tubes germinatifs donc cette candida est *C. albicans* ou bien *C. dublinensis* (figure26).

**Figure 26** : Examen microscopique de ; *C. albicans* après le test de blastèse (Grossissement x40).**Test de chlamydosporulation :**

L'apparition des chlamydospores ce qui indique que cette espèce soit *C. albicans* ou Anssi que la formation des pseudo-filaments ce qui élimine *C. glabrata* et *C. famata*.

**Tableau n°11** : Résultat du test de chlamydosporulation

Espèce	Caractéristiques microscopiques
<i>C. albicans</i> <i>C. dublinensis</i>	Présence de blastospores en bouquet. Filamentations bien développés et longs. Chlamydo-spores.

**Figure 27** : Examen microscopique de *C. albicans* après culture sur PCB (Grossissement x40).**L'Auxacolor :****Figure 28** : microplaque (auxacolor)

La lecture définitive doit s'effectuer à 48H. Même si une première lecture à 24H peut déjà donner un code correct et permettre l'identification de certaines levures.

- un test enzymatique de détection de l'activité N-acétyl-galactosaminidase (hexosaminidase : HEX.). Une réaction positive se traduit par une coloration jaune de la cupule ; un test négatif reste incolore.
  - un test phénoloxydase (POX.) permettant de détecter l'activité phénoloxydasique de *Cryptococcus neoformans* associé à un test de détection de l'activité proline-arylamidase (PRO.) :
    - une coloration marron de la cupule traduit une activité phénoloxydasique (POX) positive.
    - une coloration jaune traduit une activité proline-arylamidase (PRO) positive.
    - une absence de coloration ou une coloration grise correspond à une réaction négative pour ces deux tests. La co-existence des tests POX et PRO dans la même cupule se justifie par le fait que ces deux tests ne sont jamais positifs en même temps. Les seuls profils possibles sont : POX négatif / PRO négatif ; POX positif / PRO négatif ; POX négatif / PRO positif, ce qui permet l'interprétation colorimétrique décrite précédemment
- Interprétation des résultats :
- L'interprétation des résultats se fait selon le Tableau suivant :

**Tableau 12 :** Guide d'interprétation des réactions colorées

Témoin Négatif	Cupule	Test	Couleur/Interprétation	
	C. Neg	Contrôle négatif	Bleu	///
			Négatif	Positif
Tests d'assimilation des sucres	GLU	Glucose (Témoin positif)	Bleu (a) ou Vert	Jaune (b) ou Incolore
	MAL	Maltose		
	SAC	Saccharose		
	GAL	Galactose		
	LAC	Lactose		
	RAF	Raffinose		
	INO	Inositol		
	CEL	Cellobiose		
	TRE	Trehalose		
	ADO	Adonitol		
	MEL	Melezitose		
	ARA	Arabinose		
Tests enzymatiques	HEX	Détection de l'activité N-acétyl-galactosaminidase (hexosaminidase)	Incolore	Jaune
	POX/PRO	Détection de l'activité phénoloxydase de <i>Cryptococcus neoformans</i> (POX)	Incolore ou Gris (c)	Marron
		Détection de l'activité proline-arylamidase (PRO)		Jaune (b)

- (a) Bleu-gris et bleu-vert sont considérés comme négatifs.
- (b) Jaune pâle et jaune-vert sont considérés comme positifs.
- (c) Quelques souches de *Geotrichum capitatum*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon spp* et *Cryptococcus laurentii* peuvent entraîner une coloration gris-marron de la cupule. Dans ce cas, la réaction est négative et lors du codage, il faut attribuer la valeur «zéro» à ce puits.

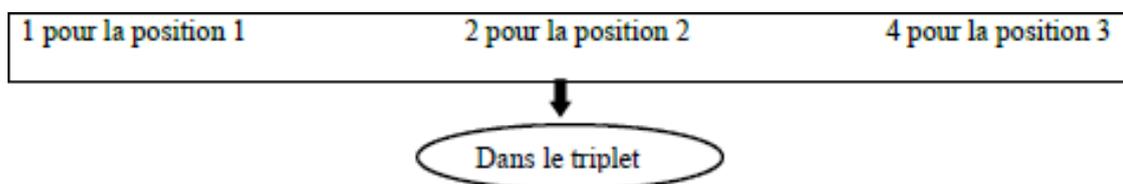
Remarque : le témoin ou le contrôle négatif a la couleur bleue

Les 16 caractères biochimiques, répartis dans 15 cupules (les tests POX et PRO, étant associés dans une même cupule), sont utilisés pour l'identification.

Un profil numérique de "05 chiffres" est obtenu en regroupant par 03 les valeurs b des 15 tests suivants :

1 <sup>er</sup> chiffre	Glucose	Maltose	Saccharose
2 <sup>er</sup> chiffre	Galactose	Lactose	Raffinose
3 <sup>er</sup> chiffre	Inositol	Cellobiose	Trehalose
4 <sup>er</sup> chiffre	Adonitol	Melezitose	Xylose
5 <sup>er</sup> chiffre	Arabinose	Hexosaminidase	Phenoloxidase

On attribue à chaque réaction négative la valeur zéro et à chaque réaction positive une valeur en rapport avec sa position dans le triplet :



L'addition des trois valeurs donne un chiffre qui permet l'obtention d'un profil numérique à 5 chiffres. Exemple : Glucoses (+), Maltose (+) et Saccharose (+) 1+2+4= le premier chiffre est 7.

L'activité proline - arylamidase (PRO : cupule POX/PRO) sera notée + ou - selon la couleur observée :

- Cupule jaune ou jaune pâle ou jaune –vert : test PRO positif.
- Cupule incolore ou grise ou gris –marron : test PRO négatif.

Deux chiffres supplémentaires sont calculés selon la méthodologie décrites cidessus et complètent le code .Ils représente les caractères suivants :

Pigmentation (PI)	Arthrospores (AR)	Capsule (CA)
-------------------	-------------------	--------------

Mycélium/pseudo-mycélium (MY.PS-MY)	Chlamydo-spores (CHL)	Croissance à 37°C
-------------------------------------	-----------------------	-------------------

L'identification finale repose donc sur le résultat des tests biochimiques, morphologiques et métaboliques ; qui permettent de déterminer un profil numérique.

Ce dernier est recherché dans la base de données figurant dans le livre d'Auxacolor. (En Annexe).

Il est demandé de se rapporter à un tableau d'interprétation dans le cas d'obtention d'un profil numérique non référencié.

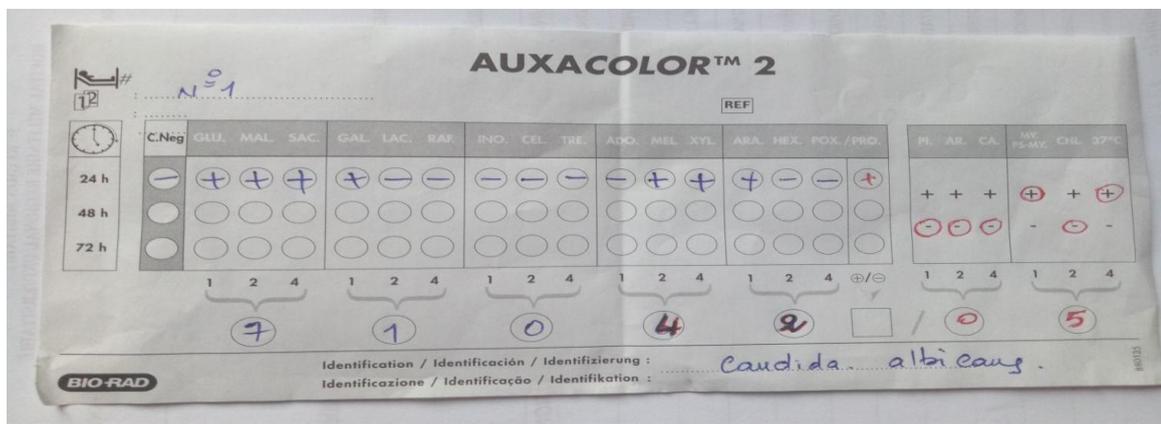


Figure 29 : Détermination des caractéristiques physiologiques de cette espèce

Les caractéristiques physiologiques de l'espèce : *C. albicans* déterminées par l'usage de la microplaque (Auxacolor) sont montrées dans les figures n°39

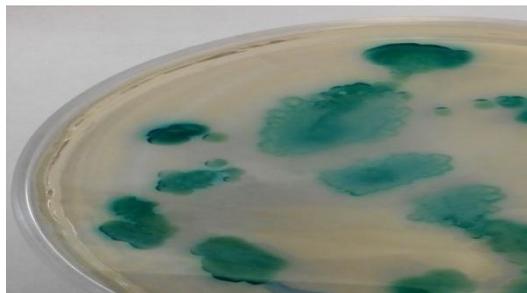
*C. albicans* assimile 07 sucres: le glucose, le maltose, le saccharose, le galactose, le melezitose, l'xylose et l'arabinose.

Le code d'identification est : 710642 +\_ 05 se qui nous indique que c'est *C. albicans* (en annexe)

### Chromagar :

Les résultats de l'identification de *candida* responsable de candidémie par chromagar sont comparés avec le tableau de référence dans ci-dessous :

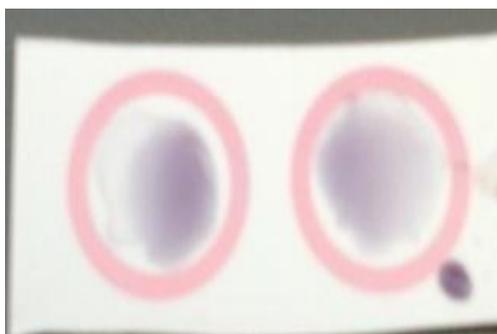
Apparition des colonies vertes se qui signifie que cette espèce est du genre *C.albicans*



**Figure 30 :** *Candida albicans* sur milieu chromagar

### Test d'agglutination :

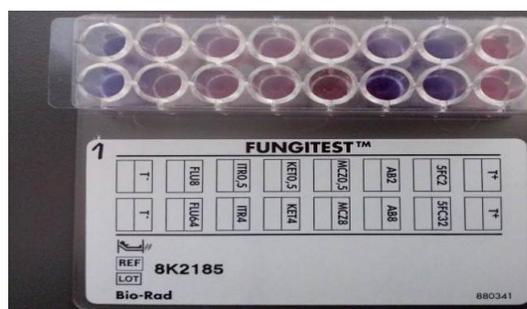
Le résultat de différenciation entre *C. albicans* et *C. dubliniensis*; par le test d'agglutination au latex de Bichro-Dubli FUMOUCHE<sup>®</sup> est mentionné dans la **figure 31**.



**Figure 31 :** Résultat du test d'agglutination au latex de Bichro-Dubli Fumouze<sup>®</sup>.

La figure montre une absence d'agglutination car la suspension reste homogène et violette, d'où l'espèce testée n'est pas *C. dubliniensis* mais *C. albicans*.

### Fungitest :



**Figure 32:** Fungitest de *Candida albicans*

L'obtention d'un couleur Bleu-Bleu indique une absence de croissance donc la souche est inhibée par l'antifongique

Dans ce cas la *Candida albicans* est sensible à l'AB2 AB8 aussi 5FC2 ,5FC32

La croissance aura lieu. Lorsque la couleur est Rose-Rose donc la souche est non inhibée par l'antifongique in vitro

Est par consequence *Candida albicans* présente une résistance au MCZ, KET, ITR, FLU Le 02<sup>ème</sup> cas :

L'examen direct montre des levures ovoides bourgenantes

### **Culture :**



**Figure 33 :** examen à l'état frais des levures(x40)

### Examen macroscopique :

Apparition des colonies blanches à crèmes crémeuses sur le milieu SC et non sur le milieu SAC.

### L'examen microscopique

La présence des cellules ovoides mesurant de( 3-4)x(3-7mm) indique que cette espèce est *Candida*.

Identification de cette espèce selon la caractéristique phénotypique :

### **Test de chlamydosporulation :**

Présence de pseudofilamentation gréles relativement courtes très ramifié avec peu de blastospores à l'endroit des constriction

### **Test de blastèse :**

Absence de tubes germinatifs nous permet de dire que le genre C. non albicans et non dublinensis.

Identification de cette espèce selon les caractéristiques physiologiques

### **Test d'auxacolor :**



**Figure 34** : détermination des caractéristiques physiologiques de candida parapsilosis

Cette espèce assimile 6 sucres GLU, MAL SAC, GAL, MEL, ARA.

Son code d'identification est : 71061 +\_05 don cette espèce est *Candida parapsilosis*(en annexe)  
*Antifongigramme* .:

❖ Étude de profil de résistance et de sensibilité de la souche responsable de la candidémie aux antifongiques testés (n=2)

Ces deux boîtes montre l'absence du zone de lisse autour des disques d'ATF



**Figure 35** : Détermination de SENSIBILITÉ aux antifongiques

Au total des ATF sont utilisés pou déterminer les profils de sensibilité qui sont représenté dans la figure

ANTIFUNGIQUE		INTERPRETATION
KETONAZOLE	KTC	R
METRONIDAZOLE	MET	R
ECONAZOLE	ECO	R
FLUCONAZOLE		
CLOTRIMAZOLE	CLO	R
MICONAZOLE	MCZ	R
GRISEFULVINE	GRS	R
NYSTATINE	NY	R
AMPHOTERICINE B	AMB	R
5 FLUOROCYTOSINE	AFY	R
ITRACONAZOLE	ITC	R

S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistant

**Figure 36** : Résistance aux antifongiques de la souche *Candida parapsilosis*.

### Fungitest



**Figure 37** : fungitest de *C. parapsilosis*

La méthode de disque et le fungitest montrent que *Candida parapsilosis* est résistante au KET , MET , ECO , CLO , MCZ , GRS , NY ,AMB ,AFY , ITC

# Conclusion

## Conclusion

Malgré les progrès continus réalisés au cours des dernières décennies dans la compréhension des mécanismes d'infection par les levures du genre *Candida*, le pronostic des infections sévères demeure sombre, comparable à celui du choc septique.

D'intenses recherches destinées à améliorer leur diagnostic laissent entrevoir des progrès qui doivent être appliqués dès maintenant dans la pratique quotidienne, au lit des patients. De nouveaux agents antifongiques, y compris de nouvelles classes d'agents aux mécanismes d'action différents, font l'objet de larges études multicentriques à l'origine de nombreuses recommandations nationales et internationales. Il existe moult preuves indirectes de l'efficacité de la prophylaxie dans des groupes de patients bien identifiés.

Enfin, une approche pragmatique fondée sur la combinaison de facteurs de risque et d'une appréciation de la dynamique de colonisation permet d'envisager un traitement antifongique empirique présomptif précoce, susceptible de prévenir et d'améliorer le pronostic des candidoses invasives.

# Référence bibliographique

- [1] **Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr., Calandra TF, Edwards JE Jr, et al.** Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 503-35.
- [2] **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-17.
- [3] **Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Rued C, Garbino J, et al.** Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: Secular trends, 1991–2000. *Clin Infect Dis* 2004; 38:311–320. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 311-20.
- [4] **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
- W. Krause, H. Matheis, K. Wulf.** Fungaemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*. *Lancet* (London, England), 1 (1969) 598-599.
- [5] **J. Garbino, L. Kolarova, P. Rohner, D. Lew, P. Pichna, D. Pittet.** Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine*, 81 (2002) 425-433.
- [6] **P. Eggimann, D. Pittet.** Candidémie et Candidoses généralisés. *Anesthésie-Réanimation*, 1 (2010) 25.
- [7] **G. Martin, D. Mannino, S. Eaton, M. Moss.** The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* (2003).
- [8] **D.A. da Matta, L.P. de Almeida, A.M. Machado, A.C. Azevedo, E.J. Kusano, N.F. Travassos, R. Salomao, A.L. Colombo.** Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 57 (2007) 399- 404.
- [9] **H.W. Boucher, A.H. Groll, C.C. Chiou, T.J. Walsh.** Newer systemic antifungal agents: pharmacokinetics, safety and efficacy. *Drugs*, 64 (2004) 1997-2020.
- [10] **Bouchara J-P., Pihet M., De Gentile L et Chabasse D. (2010).** Les levures et levuroses. Cahier de bioformation Biologie médicale. N° 44. Pages 14-34.
- [11] **Chevrant-Breton J et Chevrier. S. (2007).** Infections fongiques systémiques. In : **Bessis D, Francès C, Guillot B et Guillou JJ**, édés, *Dermatologie et médecine*, vol. 2 Manifestations

- [12] **W. Krause, H. Matheis, K. Wulf.** Fungaemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*. *Lancet* (London, England), 1 (1969) 598-599.
- [13] **J. Garbino, L. Kolarova, P. Rohner, D. Lew, P. Pichna, D. Pittet.** Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine*, 81 (2002) 425-
- [14] **Staib, P., & Morschhauser, J. (2007).** Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50(1), 1-12.
- [15] **Silva, S., et al. (2011).** Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*, 19(5), 241-247.
- [16] **Samaranayake, Y. H., et al. (2005).** In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. *J Clin Microbiol*, 43(2), 818-825.
- [17] **Ramage, G., et al. (2001).** Biofilm Formation by *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3234-3240.
- [18] (Photographies tirées de Ramage *et al*, 2009 ; illustrations tirées de Finkel & Mitchell, 2011).
- [19] **Pfaller, M. A. and Diekema, D. J.,** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007. **20**: 133-163.
- [20] **Benedict, S. and Colagreco, J.,** Fungal infections associated with malignancies, treatments, and AIDS. *Cancer Nurs* 1994. **17**: 411-417.
- [21] **Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Messer, S. A., Houston, A., Coffman, S. and Hollis, R. J.,** Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000. **44**: 747-751.
- [22] **Bouchara, J. P, et al. (2010).** Les levures et levuroses (Vol. 44): Bioforma.
- [23] **Mavor, A. L., Thewes, S. and Hube, B.,** Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* 2005. **6**:863-874.
- [24] **Bouchara, J. P, et al. (2010).** Les levures et levuroses (Vol. 44): Bioforma.
- [25] **EGGIMANN P., PITTET D.** Candidoses invasives en réanimation. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 2000, **130**: 1525-1537.

- [26] **Cole, G. T., Halawa, A. A. and Anaissie, E. J.,** The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* 1996. **22 Suppl 2**: S73-88.
- [27] **Bouchara J-P., Pihet M., De Gentile L et Chabasse D.** (2010). Les levures et levures. Cahier de bioformation Biologie médicale. N° 44. Pages 14-34.
- [28] **Eggimann P, Garbino J, Pittet D.** Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patient. *Lancet Infect Dis* 2003;**3**:685-702.
- [29] **Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R.** Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994;**220**:751-8.
- [30] **Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP.** Risk factors for hospital-acquired candidemia. A matched case- control study. *Arch Intern Med* 1989;**149**:2349-53.
- [31] **Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM.** Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* 2001;**33**:177-86.
- [32] **Pfaller MA, Messer SA, Houston A.** National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of Candida species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;**31**:289-96.
- [33] **De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al.** Revised definitions of invasive fungal disease from the Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;**46**:1813–21.
- [34] **Pfaller, M. A., et al. (2011e).** Candida bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(2), 561-566.
- [35] **Pfaller, M. A., et al. (2012c).** Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004- 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(4), 323-331.
- [36] **Falagas, M. E., et al. (2006).** Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25(7), 419-425.
- [37] **Tortorano, A. M., et al. (2006).** Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 27(5), 359-366.

- [38] **Pfaller, M. A., et al. (2012c).** Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004- 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(4), 323-331.
- [39] **Fortun, J., et al. (2012).** Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect*, 65(1), 64-70.
- [40] **Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007).** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 20(1), 133-163.
- [41] **Wingard JR.** Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995;**20**:115-25.
- [42] **Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA.** British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003;**3**:230-40.
- [43] **Garbino J, Lew PD, Romand JA, Hugonnet S, Auckenthaler R, Pittet D.** Prevention of severe *Candida* infections in non-neutropenic, high-risk, critically ill patients. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in SDD-treated patients. *Intensive Care Med* 2002;**28**:1708-17.
- [44] **Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA.** British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003;**3**:230-40.
- [45] **Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte.:** 2004.
- [46] **PfallerMA, Messer SA, HoustonA.** National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;**31**:289-96.
- [47] **Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R.** *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994;**220**:751-8.
- [48] **EggimannP, Garbino J, PittetD.** Management of *Candida* species infections in critically ill patient. *Lancet Infect Dis* 2003;**3**:772-85.
- [49] **Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D.** New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999;**37**:1510-7.
- [50] **Prella M, Bille J, Pugnale M.** Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;**51**:95-101.
- [51] **Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M.** Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol* 2008;**57**:287-95.

- [52] **Herbrecht R, Berceanu A.** Beta-D-glucan detection test: a step toward preemptive therapy for fungal infections in leukemic patients? *Clin Infect Dis* 2008;**46**:886-9.
- [34] **Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P. A., Poulain, D. and Jouault, T.,** *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* 2003. **278**: 13086-13093
- [35] **Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C. and Hube, B.,** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005. **48**: 365-377.
- [36] **Monod, M. and Borg-von Zepelin, M.,** Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol* 2002. **81**: 114-128.
- [37] **Ghannoum, M. A.,** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000. **13**: 122-143, table of contents.
- [38] **Fu, Y., Ibrahim, A. S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C. F. and Ghannoum, M. A.,** Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast
- [39] **Koenig H.** (1995).Guide de mycologie médicale. Édition marketing S.A. Paris. 268 Pages.
- [40] **EGGIMANN P., PITTET D.** Candidoses invasives en réanimation.*Schweiz. Med. Wochenschr.*, 2000, **130**: 1525-1537.
- [41] **Cole, G. T., Halawa, A. A. and Anaissie, E. J.,** The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* 1996. **22 Suppl 2**: S73-88.
- [42] **Nucci, M.,** Candiduria in hospitalized patients: a review. *Braz J Infect Dis* 2000. **4**: 168-172.
- [43] **Andrutis, K. A., Riggle, P. J., Kumamoto, C. A. and Tzipori, S.,** Intestinal lesions

associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. *J Clin Microbiol* 2000. **38**: 2317-2323.

[44] Castaldo, P., Stratta, R. J., Wood, R. P., Markin, R. S., Patil, K. D., Shaefer, M. S., Langnas, A. N., Reed, E. C., Li, S. J., Pillen, T. J. and et al., Clinical spectrum of fungal infections after orthotopic liver transplantation. *Arch Surg* 1991. **126**: 149-156.

[45] Paya, C. V., Prevention of fungal and hepatitis virus infections in liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2001. **33 Suppl. 1**: S47-52.

[46] PITTET D. Candidémie et candidose généralisée.

*Encycl. Méd. Chir.* (Elsevier, Paris), Anesthésie-Réanimation, 36-983-D-1 0, 2000, 13p.

[47] P. Montravers\*, M. Desmard, G. Dufour, 52Congrès National D'anesthésie Médecins, Candidémies En Réanimation

[48] Pfaller, M. A., et al. (2011e). *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(2), 561-566.

[49] Kollef, M. H., et al. (2008). Health care-associated infection (HAI): a critical appraisal of the emerging threat-proceedings of the HAI Summit. *Clin Infect Dis*, 47(2), S55-99; quiz S100-1.

[50] Eggimann, Philippe, et al. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(11), 685- 702.

[51] Pfaller, M. A., et al. (2012c). Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004- 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(4), 323-331.

- [52] **Witthuhn F, Toubas D, Beguinot I et al.** Evaluation of the Fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infected patients: study of azole drug susceptibility. *J Clin Micro* **1999**;37:864-6.
- [53] **Linac MD, Cassaing S.** Méthodes d'évaluation des antifongiques : étude comparative des différents tests. *Revue française des Laboratoires* **2001**; 2001(332):49-56.
- [54] **Falagas, M. E., et al. (2006).** Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25(7), 419-425.
- [55] **Tortorano, A. M., et al. (2006).** Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 27(5), 359-366.
- [56] **Pfaller, M. A., et al. (2012c).** Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004- 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(4), 323-331.
- [57] **Fortun, J., et al. (2012).** Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect*, 65(1), 64-70.
- [58] **Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007).** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 20(1), 133-163.
- [59] **Hassan, I., et al. (2009).** Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. *J Infect*, 59(5), 360-365.
- [60] **Tortorano, A. M., et al. (2006).** Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 27(5), 359-366.
- [61] **Pfaller, M. A., et al. (2011d).** Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole,

and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *J Clin Microbiol*, 49(3), 845- 850.

[62] **Rex, J. H., & Pfaller, M. A. (2002).** Has antifungal susceptibility testing come of age?

*Clin Infect Dis*, 35(8), 982-989.

[63] **Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2013).** Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*, 56(9), 1284-1292.

[64] **Telenti, A., et al. (1991).** Quantitative blood cultures in candidemia. *Mayo Clin Proc*, 66(11), 1120-1123.

[65] **Cuenca-Estrella, M., et al. (2012).** ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 7, 9-18.

[66] **Cornely, O. A., et al. (2012).** ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 7, 19-37.

[67] **Taur, Y., et al. (2010).** Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(1), 184-190.

[68] **Bader, O. (2013).** MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13(5), 788-799.

[69] **Lacroix, C., et al. (2013).** Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*.

[70] **Lavergne, R. A., et al. (2013).** An extraction method of positive blood cultures for direct identification of *Candida* species by Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Med Mycol*, 51(6), 652-656.

- [71] **Dhiman, N., et al. (2011).** Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol*, 49(4), 1614-1616.

# **Annexe**

**Milieux de cultures****Sabouraud dextrose agar au Chloramphénicol**

(IPA): Glucose 20g  
Peptone 10g  
Agar 20g  
Eau distillée 1L  
pH 5,6  
Chloramphénicol 0,5g

**Sabouraud dextrose**

**agar :** Glucose  
20g Peptone 10g  
Agar 20g  
Eau distillée 1L  
pH 5,6

**Sabouraud bouillon :**

Glucose 20g  
Peptone 10g  
Eau distillée 1L  
pH 5,6

**Milieu CHROMagarCAN :**

Peptone 5g  
Extrait de levures 3g  
Extrait de malte 10g  
Glucose 10g  
Chloramphénicol 0,05g  
Mix chromogènes 3g  
Agar 18g  
pH 7,2.

DEMANDE N° .....	de CONSULTATION ou D'EXAMEN	HOPITAL MILITAIRE REGIONAL UNIVERSITAIRE Cdt ABDELALI BENBAATOUCHE DE CONSTANTINE - 5° R.M

NOM [redacted] Grade ..... Corps .....  
Imp. e.e.p.a - El-Achour

il présente les symptômes urgents suivants : Réponse du Spécialiste

- AVC ischémique  
- intubée ventilée  
- T° = 35°C.  
(flogyl  
claforan)

il a déjà reçu les soins et médicaments suivants :

Examen demandé

- Hémocultures

A / le 21/05/2018 le médecin, A [signature] le 20 ..... le médecin.

**BIO-RAD**

**AUXACOLOR™ 2**

56513

20 PRUEBAS

---

**AUXANOGRAMA COLORIMÉTRICO PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES LEVADURAS  
DE INTERÉS MÉDICO**

---

**IVD**

**Thème :**

Les candidoses invasives en réanimation

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en mycologie  
Biotechnologie fongiques.

**Résumé :**

Le présent travail a été effectué dans le but d'étudier les candidoses invasives en service de réanimation à l'hôpital militaire régionale universitaire de Constantine (HMRUC).

Les candidoses invasives sont rares dans la population générale (environ 8 épisodes/100 000 personnes-années), mais elles sont une complication redoutée en milieu hospitalier (0,5cas /1000admissions) et plus particulièrement en réanimation (10cas /1000 admissions) où elles représentent de 10 à 15% des infections nosocomiales. Elles sont difficiles à diagnostiquer et leur mortalité globale est comparable à celle du choc septique (40–60%). Une bonne connaissance de leur physiopathologie et la mise à disposition des dérivés triazolés mieux tolérés que l'amphotéricine B ont permis le développement du concept d'un traitement empirique précoce ou présomptif.

La prophylaxie des candidoses invasives, basée sur l'identification précoce de facteurs de risque, s'est révélée très efficace, mais elle doit toutefois être réservée à certains groupes de patients bien identifiés, de manière à tenter de limiter les risques de développement et/ou la diffusion de souches résistantes

**Mots clés :** *Candida spp* ; candidémie; candidose disséminée; infection nosocomiale; prophylaxie.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de parasitologie à l'hôpital militaire régionale universitaire de Constantine HMRUC.

**Jury d'évaluation :**

**Président :** Mme. ARABET Dallel M.C.B. Univ.Des frères Mentouri Constantine.

**Reporteur :** Mr. REHAMNIA Yacine Assistant au service de parasito à HMRUC.

**Examinatrice :** Mme. BOUCHLOUKH Warda M.A.A.Univ. Des frères Mentouri Constantine.

**Date de soutenance :** 27/06/2018