

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-
DIOULASSO

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN
SCIENCES ET TECHNIQUES

GENIE BIOLOGIQUE

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
SOURO SANOU

01 BP: 676 BOBO-DIOULASSO



RAPPORT DE FIN DE CYCLE

Pour obtenir la

LICENCE PROFESSIONNELLE DE GENIE BIOLOGIQUE

Option : Analyses Biologiques

Présentée par

BOULOU Sibiri

Sur le thème :

*Mise en culture sur gélose Sabouraud plus
chloramphénicol des prélèvements pulmonaires pour
l'étude de la diversité des portages ou infections
fongiques au Centre Hospitalier Universitaire Sourou
Sanou de Bobo-Dioulasso*

Maître de stage : Dr Ibrahim SANGARE

Directeur de rapport : Dr Ernest SALOU

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

Allah, qui par sa miséricorde nous a guidé et nous a donné la santé afin que nous puissions étudier. Je le glorifie et je demande toujours son assistance.

Ma mère et à mon père qui ont tant investi dans mon éducation. Permettez-moi de dire que ce travail est le fruit de vos conseils, et de votre patience ;

Mon oncle Ibrahim BOULOU et ses trois épouses qui n'ont cessé de me motiver et de m'encourager. Merci infiniment pour vos soutiens.

Mes très chers frères et sœurs, toujours présent pour moi, puisse ce travail être le témoignage de ma profonde affection ;

Mes camarades de classe, par votre bonne collaboration je me sens aisé dans le milieu étudiant ;

Mes très chers oncles, tantes, cousins et cousines, que ce travail soit le témoin de toute mon affection, mon estime et mon attachement.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier très chaleureusement toutes les personnes qui nous ont soutenus, conseillés et aidés dans la réflexion que nous avons menée et qui a abouti à la réalisation de notre document. Il convient de remercier vivement :

- Dr SALOU Ernest, il est notre directeur de mémoire. Enseignant à l'UFR-ST de l'UPB, il a toujours été disponible pour nous soutenir.
- Dr SANGARE Ibrahim, il est notre Maître de stage. Il a toujours pris en compte nos préoccupations malgré ses multiples occupations.
- Pr OUEDRAOGO Abdoul Salam, il est chef de service de l'Unité de bactériologie-virologie. Nous avons pu effectuer notre stage dans cette unité grâce à son accord.
- Mr MILLOGO Anselme, Mr BIEBOURE Georges, Mme OUATTARA Salimata sans oublier leurs collègues. Avec leur qualité de technologiste biomédical, ils nous ont donné un meilleur encadrement sur la paillasse de travail.
- Dr MEDA Roland, il est enseignant à l'UFR-ST de l'UPB. En ses qualités de coordonnateur de la filière Génie Biologique, il s'est toujours battu pour améliorer nos conditions d'étude.
- Tous nos amis sans exception, nous disons merci pour leurs soutiens, conseils et encouragements avant et pendant la rédaction de ce rapport.
- Mademoiselle OUEDRAOGO Alima, elle est ma petite amie. Elle m'a toujours encouragé et soutenu pendant mes moments de détresse.

Que toutes ces personnes retrouvent ici l'expression de nos sincères reconnaissances.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	
REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIERES	III
SIGLES ET ABREVIATIONS	V
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	VII
AVANT-PROPOS	VIII
RESUME	IX
INTRODUCTION ET ENONCE DU PROBLEME	1
CHAPITRE I : GENERALITES	3
A. LA TUBERCULOSE PULMONAIRE	3
I. GENERALITE SUR LES MYCOBACTERIES	3
II. DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE PULMONAIRE	6
III. EPIDEMIOLOGIE ET TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE	10
B. LES MYCOSES	12
I. GENERALITE SUR LES ESPECES FONGIQUES	12
II. DIAGNOSTIC DES MYCOSES	16
III. EPIDEMIOLOGIE ET TRAITEMENT DES MYCOSES	19
CHAPITRE II : METHODOLOGIE	22
I. CADRE ET PERIODE D'ETUDE	22
II. TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGE	22
III. LES TECHNIQUES DE LABORATOIRE	23
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	28
I. RESULTATS	28
II. DISCUSSION ET COMMENTAIRES	31
CONCLUSION	33

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34
Annexe 1	i
Annexe 2	ii

SIGLES ET ABREVIATIONS

Ag : Antigène

AmB : Amphotéricine

ANOFEL : Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie

BAAR : Bacille Acido-Alcool Résistant

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BK : Bacille de Koch

CHUSS : Centre Hospitalier Universitaire Sourou Sanou

CHUYO : Centre Hospitalier Universitaire Yalgado Ouédraogo

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CUPB : Centre Universitaire Polytechnique de Bobo-Dioulasso

ETB : Ethambutol

INH : Isoniazide

IV : Intra Veineux

MGG : May-Grünwald-Giemsa

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PZA : Pyrazinamide

RMP : Rifampicine

SAB : Sabouraud

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

SMX : Sulfaméthoxazole

STR : streptomycine

TB : Tuberculose

TB-MR : Tuberculose Multirésistante

TB-UR : Tuberculose Ultra Résistant

TMP : Triméthoprim

TPM+ : Tuberculose Pulmonaire à Microscopie positive

UFR/ST: Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Techniques

UPB : Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Aspect microscopique des BAAR colorés au Ziehl-Neelsen (x100).....	8
Figure 2 : Aspect microscopique des BAAR colorés à l'auramine (x25).....	8
Figure 3 : Colonies de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sur milieu solide de Löwenstein Jensen ..	9
Figure 4 : Aspect de colonies de <i>A. fumigatus</i> en culture sur Sab chloramphénicol (ANOFEL).	13
Figure 5 : Vue microscopique de <i>A. fumigatus</i> (x100).....	14
Figure 6 : Vue microscopique à l'état frais de <i>Candida albicans</i> (x40) [23].....	14
Figure 7 : Vue microscopique à l'état frais de <i>Candida sp</i> (x40)	16
Figure 8 : Vue microscopique à l'état frais de levure (x400).....	24
Figure 9 : Vue microscopique à l'état frais de filaments de <i>Aspergillus sp</i> (x40)	24
Figure 10 : Aspect microscopique des filaments de <i>Aspergillus</i> colorés au MGG (x100) (ANOFEL)	26
Figure 11 : Image de levure en culture sur gélose sab chloramphénicol (BOULOU S 2016).	27
Figure 12 : Image d'une culture de <i>Aspergillus sp</i> sur gelose Sab choramphénicol (BOULOU S 2016)	27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des espèces de mycobactéries	4
Tableau II : Médicaments antifongiques	20
Tableau III : Résultats de l'examen microscopique	29
Tableau IV : Résultat des cultures sur Sab chloramphénicol	29
Tableau V : Identification par culture sur sab chromogène	30
Tableau VI : identification des espèces filamenteuses.....	30

AVANT-PROPOS

Le Centre Universitaire Polytechnique de Bobo-Dioulasso (CUPB) a vu le jour en septembre 1995. Fondé pour répondre à une politique de décentralisation de l'enseignement supérieur au Burkina Faso, le CUPB est transformé en université polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB) le 16 mai 1997. Depuis le 29 juillet 2002, l'UPB est un établissement public de l'Etat à caractère scientifique, culturel et technique (EPSCT) chargé d'enseignement supérieur et de recherche scientifique. Elle a pour mission fondamentale l'élaboration de la connaissance et sa transmission en vue de former des hommes et des femmes pour les besoins de la nation. Pour ce faire, elle poursuit les objectifs suivants :

- former des cadres dans tous les domaines en général et dans les filières professionnalisantes en particulier ;
- conduire des activités de recherche scientifique et en vulgariser les résultats;
- élever le niveau technique, scientifique et culturel des travailleurs ;
- contribuer au développement économique, social et culturel du pays;
- valoriser les compétences dans tous les secteurs d'activités du pays ;
- coopérer en matière de formation et de recherche et promouvoir les échanges interuniversitaires.

Les écoles doctorales sont au nombre de trois (03)

- Sciences Naturelles et Agronomiques
- Sciences Exactes et Appliquées
- Sciences de Santé

L'UPB est composée actuellement d'Unités de Formation et de Recherche (UFR), d'instituts et d'écoles que sont :

- L'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Techniques (Mathématiques-Physiques-Informatique, Statistiques-Informatique, Sciences Biologiques, Génie Biologique), l'Unité de Formation et de Recherche en Science juridique, politique et Gestion ;
- L'Institut Universitaire de Technologie, l'Institut de Développement Rural et l'Institut Supérieure des Sciences de la Santé ;
- L'Ecole Supérieure d'Informatique.

RESUME

Les infections respiratoires constituent l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Leur prise en charge nécessite un diagnostic étiologique précis du fait de la diversité des pathogènes pouvant être responsables de ces pathologies. Les infections fongiques respiratoires dues à des champignons microscopiques existent partout dans le monde mais demeurent sous-diagnostiquées dans les pays en voie de développement comme le Burkina Faso. L'objectif de notre étude est de mettre en culture les prélèvements pulmonaires sur milieu Sabouraud plus chloramphénicol pour étudier la diversité des portages ou infections fongiques.

Il s'agissait d'une étude transversale. Elle s'est déroulée au Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou (CHUSS). Elle a concerné 264 patients qui ont fourni 434 échantillons d'origine pulmonaire (crachats). Chaque échantillon a fait l'objet d'un examen macroscopique et microscopique puis de culture sur milieu Sabouraud.

Nous avons observé un taux de positivité de 89,8% des cultures sur Sabouraud avec une prédominance de champignons levuriformes (60,6%) par rapport aux champignons filamenteux (29,2%). Ces résultats montrent un portage ou infection des muqueuses respiratoires des patients suspects de tuberculose par des champignons. D'où la nécessité d'une prise en compte des portages ou infections fongiques pour la lutte contre les infections respiratoires.

Mots clés : tuberculose, portages ou infections fongiques, CHUSS.

INTRODUCTION ET ENONCE DU PROBLEME

Les infections respiratoires sont des pathologies affectant les voies respiratoires. Elles se manifestent généralement par des éternuements, de la toux, de la fièvre, des maux de gorge et des écoulements nasaux (Hordé, 2015). Elles sont la principale cause de décès dans le monde (Wedzicha et *al.*, 2015). En effet les données de 2013 témoignent de la gravité de ces infections respiratoires : 18 millions de cas déclarés dont 4 millions de décès enregistrés (Ferkol et *al.*, 2014). Plusieurs agents infectieux peuvent être responsables de ces infections. Les plus importants sont les virus respiratoires, les pneumocoques causant les pneumopathies, les mycobactéries responsables de la tuberculose ou de mycobactérioses et certaines espèces fongiques responsables de mycoses graves (Bekaoui et *al.*, 2014). La survenue de ces mycoses fait suite généralement à une colonisation des muqueuses respiratoires à la faveur d'une antibiothérapie à large spectre ou à un déséquilibre du système immunitaire. Aussi, l'existence des cavités pulmonaires chroniques telles que les cavernes observées chez les patients tuberculeux constituent des facteurs favorables au développement des pathologies pulmonaires dues aux champignons (Corzo-Léon et *al.*, 2015). Des études épidémiologiques montrent que la tuberculose pulmonaire ainsi que les mycoses respiratoires affectent généralement les mêmes catégories de patients : les sujets en état de déséquilibre immunitaire ou immunodéprimés, les sujets vivant dans des conditions d'hygiène précaire (Lanternier et *al.*, 2013).

Dans les pays développés où les laboratoires sont bien équipés avec du personnel spécialisé, le diagnostic biologique des infections respiratoires s'établit avant la mise sous traitement.

En Afrique, un traitement à base d'antibiotique à large spectre est généralement entrepris sans diagnostic bactériologique ou mycologique.

La lutte contre la tuberculose au Burkina Faso s'inscrit dans un programme national et de ce fait bénéficie d'une surveillance. Devant les signes évocateurs d'infections pulmonaires chroniques chez les patients en déséquilibre immunitaire ou immunodéprimés, la recherche de BAAR est prescrite selon les recommandations de la lutte antituberculeuse. Le dépistage des infections fongiques respiratoires n'est pas systématique chez ces patients malgré la similarité des signes cliniques (Badiane et *al.*, 2015). En effet, des études réalisées au Sénégal, au Kenya, au Vietnam et en Inde montrent que des patients suspects de tuberculose souffraient plutôt d'infections fongiques respiratoires (Lebeaux et *al.*, 2009). Au pire des cas, il peut s'agir d'une co-infection tuberculose-mycose. Les laboratoires de mycologie sont rares du fait de l'insuffisance de personnel qualifié et de laboratoires équipés. En l'absence d'une demande

d'examen de diagnostic de ces mycoses, celles-ci passent sous silence (Enarson et *al.*, 2000). Au CHUSS, les infections respiratoires constituent l'une des principales causes de consultations. Il est important d'établir la part des infections fongiques ou de connaître les espèces fongiques colonisant les voies respiratoires. Ils sont de potentiels agents causaux d'infections opportunistes chez ces patients dont la flore bactérienne est détruite par une antibiothérapie à large spectre ou qui sont affectés par un déséquilibre du système immunitaire. Ceci est l'intérêt de notre étude. Elle vise à mettre systématiquement en culture sur gélose Sabouraud plus chloramphénicol, les prélèvements pulmonaires des patients soumis au dépistage de la tuberculose afin d'étudier la diversité des portages ou infections fongiques au Centre Hospitalier Universitaire Sourou Sanou (CHUSS).

L'objectif de notre travail était de décrire la diversité des espèces fongiques isolées dans les prélèvements pulmonaires dans les cas de suspicion de tuberculose au CHUSS.

CHAPITRE I : GENERALITES

A. LA TUBERCULOSE PULMONAIRE

DEFINITION :

La tuberculose est une maladie bactérienne, contagieuse principalement par voie aérienne (Shinnick et *al.*, 1994). Elle se transmet d'homme à homme. Le germe responsable est le bacille de la tuberculose ou *Mycobacterium tuberculosis* et rarement *Mycobacterium bovis*.

I. GENERALITE SUR LES MYCOBACTERIES

1. LA SYSTEMATIQUE

Les mycobactéries sont rattachées du grand groupe des bactéries du monde microbien. Elles appartiennent au genre *Mycobacterium*, de la famille des *Mycobacteriaceae*, de l'ordre des Actinomycétales et de la classe des Actinobactéries (Zhi et *al.*, 2009). La classification des espèces figurant à l'intérieur du genre *Mycobacterium* a connu une évolution importante à cause de l'apparition des nouvelles techniques de biologie moléculaire. La classification de Runyon définit quatre (04) groupes parmi les mycobactéries sur la base de caractères culturels (temps de croissance sur milieux solides) et morphologiques (pigmentation des colonies). La pratique courante distingue les mycobactéries tuberculeuses, pathogènes obligatoires dont le réservoir est l'homme ou certains mammifères (*Mycobacterium tuberculosis complex*) et les mycobactéries non tuberculeuses ou encore dites atypiques, présentes dans l'environnement, qui ne sont pas des pathogènes obligatoires. Le tableau I résume la classification des mycobactéries (Decoster, 1994).

Tableau I : Classification des espèces de mycobactéries

Morphologie	Genre	Espèce	Nom courant	Habitat	Pouvoir pathogène
Bacilles alcoolo- acido résistants	<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i>	Bacille de Koch (BK)	Homme	tuberculose
		<i>bovis</i>		Homme et Animaux	tuberculose
		"atypiques"		Environnement, homme	Infections (SIDA)
		BCG			vaccin
		<i>leprae</i>	Bacille de Hansen	Homme	lèpre

Les mycobactéries du « complexe *Mycobacterium tuberculosis* » comprennent :

- ☞ *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacille de Koch (B.K): responsable de la tuberculose humaine ;
- ☞ *Mycobacterium africanum*: agent responsable le plus souvent de la tuberculose en Afrique de l'Ouest ;
- ☞ *Mycobacterium bovis*: agent responsable de la tuberculose chez les bovins et parfois chez l'homme ;
- ☞ *Mycobacterium microti*, *caprae* et *pinnipedii*: agents responsables de la tuberculose chez les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins ;
- ☞ *Mycobacterium canetti*: agent responsable de tuberculose humaine (en particulier à Djibouti).

2. LES CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES MYCOBACTERIES

a. LES CARACTERES MORPHOLOGIQUES

Les mycobactéries sont des bacilles droits ou légèrement incurvés, de 0,2 à 0,6 µm de diamètre sur 1,0 à 10,0 µm de longueur. Elles présentent parfois des renflements ou des ramifications, formant occasionnellement des filaments qui se fragmentent très facilement en éléments bacillaires. Elles sont immobiles et non sporulées.

Ces bactéries sont difficilement colorées par la coloration de Gram mais sont considérées comme à Gram positif. En fait, la paroi des mycobactéries possède une structure plus complexe que la paroi des bactéries à Gram positif et, sur un frottis coloré par la technique de

Gram, les mycobactéries apparaissent souvent comme non colorées. Leur mise en évidence repose sur leur propriété particulière d'acido-alcool résistance, c'est pourquoi on les appelle des BAAR (Bacilles Acido-Alcool Résistants).

b. LES CARACTERES BIOCHIMIQUES

La paroi des mycobactéries est constituée de trois couches : la plus interne est formée d'un peptidoglycane sur lequel est fixé un polymère de molécules d'arabinose et de galactose (arabino-galactane) qui s'attachent par des liaisons esters à des acides mycoliques situés dans la couche intermédiaire (apparaissant comme un espace clair en microscopie électronique). La partie externe de la paroi, est formée d'une matrice de phospholipides, de molécules amphiphiles, de protéines dont certaines sont sans doute des porines et de mycosides.

Les mycobactéries ont d'autres propriétés biochimiques qui permettent leur identification. Ainsi des tests biochimiques sont réalisés tels que :

- ☞ l'épreuve de photo induction
- ☞ la recherche de l'uréase
- ☞ la recherche de l'activité catalasique
- ☞ la recherche de l'acide nicotinique (Niacin Test de Konno)
- ☞ la réduction des nitrates (Epreuve de Virtanen)
- ☞ la recherche de la phosphatase acide
- ☞ la recherche de l'hydrolyse du tween 80
- ☞ l'utilisation du Mannitol comme unique source de carbone
- ☞ l'utilisation de l'Inositol comme unique source de carbone
- ☞ l'utilisation du Citrate de sodium comme unique source de carbone

Ces propriétés identifient les mycobactéries au sein du genre *Mycobacterium* (Coignard, 2005).

c. LES CARACTERES ANTIGENIQUES

Ils permettent l'identification de l'espèce *tuberculosis* des autres espèces. En effet, *Mycobacterium tuberculosis* en culture produit des antigènes dont l'un d'eux nommé MPT 64 est le plus important. Cet antigène est mis en évidence par un test immunochromatographique dont *SD BIOLINE TB Ag MPT 64* (Banavaliker et al., 1998).

d. LES CARACTERES CULTURAUX

Selon les espèces, les exigences et le temps de génération des mycobactéries sont variables : les colonies ne sont visibles qu'après un temps d'incubation compris entre 2 jours et 10 semaines à 37°C en aérobiose (les mycobactéries sont aérobies strictes). En fonction de leur vitesse de croissance et de leurs exigences, les espèces du genre *Mycobacterium* sont divisées en (02) groupes :

- les mycobactéries à croissance lente (incluant les mycobactéries responsables de la tuberculose), ne formant des colonies qu'après au moins 7 jours de culture sur milieu enrichi à l'œuf coagulé (Löwenstein-Jensen) et incapables de cultiver sur des milieux standards ;
- les mycobactéries à croissance rapide, formant des colonies en moins de 5 jours et aptes à se développer sur gélose trypticase soja.

NB : *Mycobacterium leprae* n'est pas cultivable sur milieu de culture.

3. CONTAMINATION ET POUVOIR PATHOGENE DES MYCOBACTERIES

a. CONTAMINATION

La tuberculose se transmet principalement de manière directe par voie aérienne : *Mycobacterium tuberculosis* (bacille de Koch) est une espèce strictement humaine pénétrant dans les voies respiratoires lors de l'inhalation d'aérosols chargés en bactéries (émis par les malades). En outre, la résistance des mycobactéries au froid et à la dessiccation leur permet de persister sur dans la poussière.

La tuberculose à *Mycobacterium bovis* peut être contractée par des personnes vivant au contact d'animaux malades mais aussi par consommation de lait contaminé et non pasteurisé (cas très rares).

b. POUVOIR PATHOGENE

Sur le plan structural, les mycobactéries se caractérisent par une paroi riche en lipides (60 % des constituants) et dont la constitution explique, au moins partiellement, les propriétés tinctoriales, la pathogénicité et la résistance à divers antibiotiques.

II. DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE PULMONAIRE

1. INDICATION DE RECHERCHE

Le diagnostic de la tuberculose est indiqué dans les cas suivants :

- Devant des signes cliniques évocateurs de la tuberculose chez les enfants non vaccinés, les personnes âgées, les immigrants venant de pays où l'endémie tuberculeuse est

forte, les patients immunodéprimés, le personnel médical en contact fréquent avec les tuberculeux.

- Devant des lésions pulmonaires diverses observées par radiologie chez un sujet ayant une immunité cellulaire déprimée.

- Dans le cadre d'études épidémiologiques ou dans la surveillance de l'efficacité du traitement.

2. DIAGNOSTIC CLINIQUE

La tuberculose est une infection nécrosante d'aspect chronique, dont la transmission est généralement aérienne. La primo infection est généralement asymptomatique, puis les bacilles restent à l'état latent mais, dans 5 à 10% des cas, les bacilles vont de nouveau se multiplier aboutissant à l'extension du foyer infectieux, le plus souvent au niveau du poumon. Les signes pulmonaires sont alors une toux précoce constante, productive avec des quintes. Les signes généraux associent une fièvre modérée (38°C) persistante accompagnée de sudations nocturnes, d'une anorexie et d'une asthénie.

3. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

Le diagnostic biologique consiste à la détection des mycobactéries par différents moyens dans un organisme. Il s'agit :

a. L'EXAMEN DIRECT

Deux colorants spécifiques sont utilisés : l'auramine (Dugommier) en dépistage grâce à sa sensibilité élevée puis le Ziehl Neelsen en confirmation grâce à sa spécificité. L'examen direct détecte les patients TPM + dans 45 à 50% des cas.

Ces tests permettent de signifier la présence ou l'absence de BAAR. Ainsi leur positivité permet d'isoler rapidement le patient et de commencer le traitement. Les figures 1 et 2 montrent l'aspect des BAAR respectivement au Ziehl et à l'auramine.

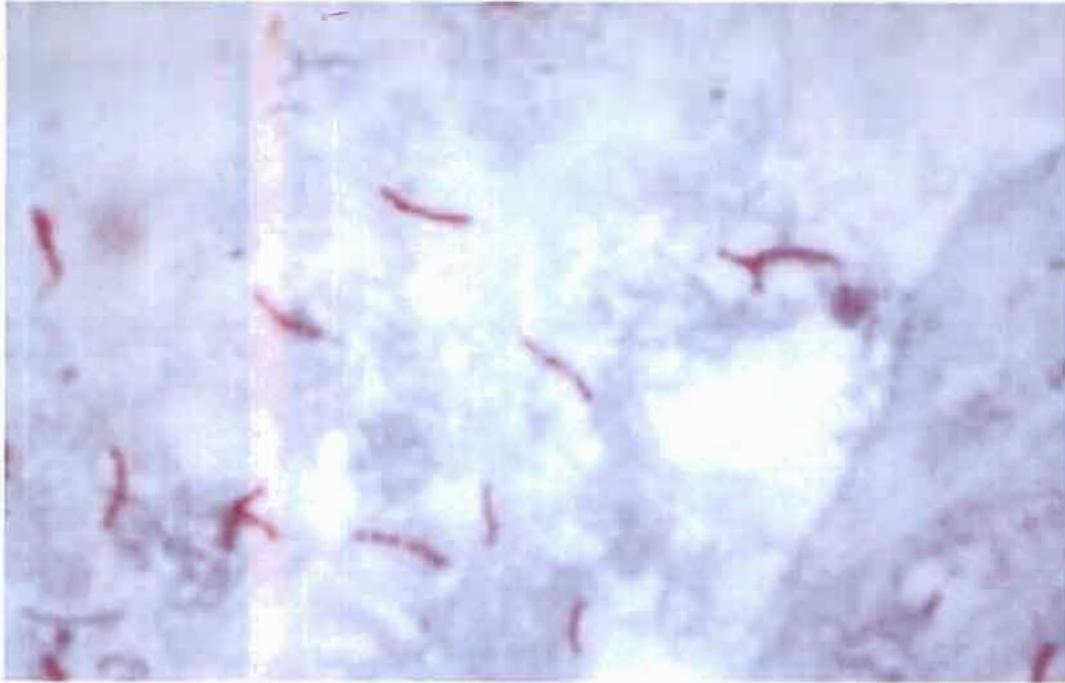


Figure 1 : Aspect microscopique des BAAR colorés au Ziehl-Neelsen (x100)
(institutpasteur.nc)



Figure 2 : Aspect microscopique des BAAR colorés à l'auramine (x25)
(institutpasteur.nc)

b. LE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

Le diagnostic moléculaire de la tuberculose passe par la détection des mycobactéries à partir de leur matériel génétique par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) : le système GeneXpert.

Le système GeneXpert a été lancé en 2004 et simplifie les tests moléculaires en intégrant et en automatisant complètement les trois processus (préparation de l'échantillon, amplification et détection) requis pour les tests moléculaires fondés sur la PCR en temps réel. Il comporte un instrument, un ordinateur personnel, un lecteur de codes-barres, un logiciel préinstallé et utilise des cartouches à usage unique renfermant les réactifs lyophilisés, les tampons et les solutions de rinçage. La détection et la caractérisation de la cible se font en temps réel à l'aide d'un dispositif laser à six couleurs. Il permet de détecter *Mycobacterium tuberculosis*, ainsi que les mutations conférant la résistance à la rifampicine, à l'aide de trois amorces spécifiques et de cinq sondes moléculaires uniques garantissant un haut degré de spécificité. Il fournit directement les résultats à partir des expectorations en moins de 02 heures (Agrawal et al., 2016).

c. LA CULTURE

C'est la technique de référence du diagnostic indispensable à l'identification des mycobactéries. Les mycobactéries sont exigeantes en facteurs de croissance. Ainsi leur mise en culture requiert des milieux spécifiques. Le milieu solide le plus utilisé est celui de Löwenstein-Jensen. C'est un milieu solide à base d'œufs, additionnés en proportions variables d'asparagine, de glycérine, de vert de malachite. Sur ce milieu les mycobactéries y poussent à des vitesses de croissance différente allant de 02 à 06 semaines. Les colonies ont un aspect chou-fleur de couleur blanche comme le montre la figure 3.



Figure 3 : Colonies de *Mycobacterium tuberculosis* sur milieu solide de Löwenstein Jensen (fr.wikipedia.org)

Il existe d'autre milieu tel que le milieu liquide qui est plus sensible et plus rapide mais aussi automatisé, ce qui est couteux donc inaccessible par nos laboratoires.

III. EPIDEMIOLOGIE ET TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE

1. EPIDEMIOLOGIE

a. AU PLAN MONDIAL

La tuberculose est l'une des maladies la plus meurtrière au monde ; elle figure désormais au même titre que le VIH parmi les principales causes de décès (Organisation mondiale de la Santé, 2005). En effet, en 2011 on estimait à 8,7 millions le nombre de nouveaux cas de tuberculose avec 13% coinfectés par le VIH et 1,4 millions de décès (Organisation mondiale de la Santé, 2015). En outre, en 2014, la tuberculose a tué 1,5 million de personnes (1,1 million de personnes VIH-négatives et 0,4 million personnes VIH-positives) : 890 000 hommes, 480 000 femmes et 140 000 enfants (Organisation mondiale de la Santé, 2005).

Environ 3,7% des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire dans le monde sont dus à des souches multirésistantes (TB-MR). La proportion est bien plus grande chez les patients déjà traités et atteint 20% environ. La fréquence de la TB-MR varie sensiblement d'un pays à l'autre. Quelque 9% des cas de TB-MR sont aussi résistants à deux autres classes de médicaments. On parle alors de tuberculose ultrarésistante (TB-UR) (Organisation mondiale de la Santé, 2014).

En 2014, ce sont 480 000 cas de tuberculose multirésistante (TB- MR) que l'on estime s'être produits, près d'un quart seulement soient 123 000 ont été détectés et notifiés (Diop et *al.*, 2016).

Sur les 9,6 millions de nouveaux cas de tuberculose enregistrés en 2014, 58 % étaient des régions de l'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental. L'Afrique comptabilisait 28 % du nombre de cas mais la plus lourde charge par rapport à sa population : 281 cas pour 100 000 habitants, soit plus du double de la moyenne mondiale de 133. L'Inde, l'Indonésie et la Chine comptaient le plus grand nombre de cas : 23 %, 10 % et 10 % respectivement du total mondial (Organisation mondiale de la Santé, 2015).

b. AU BURKINA FASO

Au Burkina Faso, l'incidence de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive était de 31 pour 100.000 habitants en 2014 (Ministère de la santé, BF, 2014). Le nombre de nouveaux cas détectés était d'environ 3722 avec 1600 cas de décès la même année (Ministère de la santé, BF, 2014). Soit une morbidité de 42,98%. Les enfants et les personnes âgées sont les plus touchés par la maladie.

2. TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE PULMONAIRE

Cinq médicaments antituberculeux majeurs sont disponibles : rifampicine, isoniazide, éthambutol, streptomycine, et pyrazinamide. D'autres antituberculeux mineurs, moins actifs, souvent mal tolérés sont indiqués en cas de multirésistance. Ils sont d'indication exceptionnelle (kanamycine, capréomycine, cyclosérine, éthionamide, thiacétazone). Certains antibiotiques prescrits dans des infections non tuberculeuses ont une bonne activité sur *M. tuberculosis* et constituent un recours en cas de tuberculose multirésistante (amikacine, rifabutine, fluoroquinolone).

- La rifampicine autrement appelée rifadine* ou rimactan* (RMP) (10 mg/kg/j) est le plus efficace des antituberculeux. Elle agit sur les bacilles extra et intra-cellulaires. Elle a un taux faible de mutants résistants et elle est très diffusible. Elle a l'inconvénient d'induire une stimulation des enzymes du foie de sorte qu'elle accélère le catabolisme de certains médicaments dans l'organisme (oestrogènes, antivitamine K, cortisone).

- L'isoniazide (rimifon*) (INH) (5 mg/kg/j chez l'adulte, 10 mg/kg/j chez le petit enfant et le nourrisson) : Elle vient immédiatement après la rifampicine dans la hiérarchie des antituberculeux. Elle peut déterminer des troubles neurologiques (polynévrite), psychiques et hépatiques (ictère, cytolytique). Elle doit être administrée en association avec la vitamine B6 chez la femme enceinte, le dénutri, en cas de diabète ou d'alcoolisme.

- L'éthambutol (myambutol*, dexambutol*) (ETB) (20 mg/kg/j chez l'adulte) : Ce médicament peut être utile à la période initiale du traitement. Il implique un contrôle de la vue car il peut déterminer une névrite optique rétrobulbaire (trouble de la vision des couleurs, de l'acuité et du champ visuel).

- La streptomycine (STR) (1 g/j en intramusculaire) est l'antituberculeux le plus ancien. Elle n'agit que sur la population de bacilles extracellulaires. Elle peut entraîner des manifestations cochléo-vestibulaires, des troubles rénaux. Elle est d'indication rare voir absente dans les pays industrialisés.

- Le Pyrazinamide (pirilène*) (PZA) (30 mg/kg/j) est généralement introduit comme troisième ou quatrième antibiotique à la phase initiale du traitement. Il n'agit que sur la population des bacilles intracellulaires. Il peut entraîner des troubles hépatiques et élève constamment le taux d'uricémie (avec parfois douleurs articulaires).

D'une manière générale, prescrits à bonne dose et en dehors d'une fragilité particulière de l'hôte, ces médicaments, après une phase d'adaptation initiale, sont généralement bien tolérés. Par commodité pour la prescription, ils peuvent être associés dans un même comprimé : rifinah (rifampicine 300 mg + INH 150 mg) ou rifater (rifampicine 120 mg +

isoniazide 50 mg + pyrazinamide 300 mg). L'observance du traitement (compliance) est la clé de la guérison. En cas d'intolérance majeure, il ne faut pas réduire la posologie ou arrêter isolément un médicament incriminé, mais suspendre l'ensemble du traitement et prendre un avis spécialisé.

Le traitement de la tuberculose est bien codifié. Il comporte la prise quotidienne d'au moins trois antituberculeux (ou quatre dans certains pays, et s'il y a une forte présomption de résistance primaire) sur une durée de 6 à 9 mois minimum. Le régime à 6 mois comporte la prise quotidienne en traitement d'attaque durant les deux premiers mois d'isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide relayés durant les quatre mois suivants par isoniazide et rifampicine.

Le régime à 9 mois comporte la prise quotidienne des trois antibiotiques suivants en traitement d'attaque : isoniazide-rifampicine-éthambutol, l'isoniazide et la rifampicine étant maintenus du troisième au neuvième mois en bithérapie.

Plusieurs nouveaux schémas thérapeutiques pour la tuberculose sensible aux médicaments et/ou résistante sont actuellement en cours d'essais (Organisation mondiale de la Santé, 2015).

B. LES MYCOSES

I. GENERALITE SUR LES ESPECES FONGIQUES

DEFINITION :

Les mycoses sont des lésions provoquées chez l'homme par des champignons microscopiques (Dufresne et *al.*, 2014).

1. CLASSIFICATION DES ESPECES FONGIQUES

Les champignons ont longtemps fait partie du règne des plantes. Ils sont actuellement classés dans un règne (phylum) propre : Fungus. Parmi les nombreuses classifications existantes concernant les champignons (taille : macro et micromycètes, critères morphologiques linnéens : genre, espèce), la mycologie médicale en distingue trois groupes : les champignons filamenteux ; les champignons levuriformes (levures) et les champignons dimorphiques (Dufresne et *al.*, 2014).

a. LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

Ils concernent principalement le genre *Aspergillus* retrouvé dans les mycoses. Ils naissent de la germination d'une spore. De la spore naît un filament qui va se développer puis se diviser en se ramifiant et constituer un enchevêtrement de filaments formant le mycélium.

Les champignons filamenteux sont identifiés généralement sur la base des caractères morphologiques de leur reproduction non sexuée qui a pour finalité la pérennité de l'espèce, en produisant des spores appelées aussi conidies. Elles peuvent être de formes et de tailles très variables. Ces spores sont des organes de résistance et de dissémination.

L'identification du genre et d'espèce des champignons filamenteux s'effectue sur la base de la forme des conidies en microscopie et des caractères macroscopiques (aspect et couleur) des colonies en culture. Une grande partie des champignons filamenteux sont ce que l'on appelle des moisissures. Les espèces pathogènes généralement retrouvées sont *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*. Elles sont illustrées par les figures 4 et 5.



Figure 4 : Aspect de colonies de *A. fumigatus* en culture sur Sab chloramphénicol (ANOFEL).

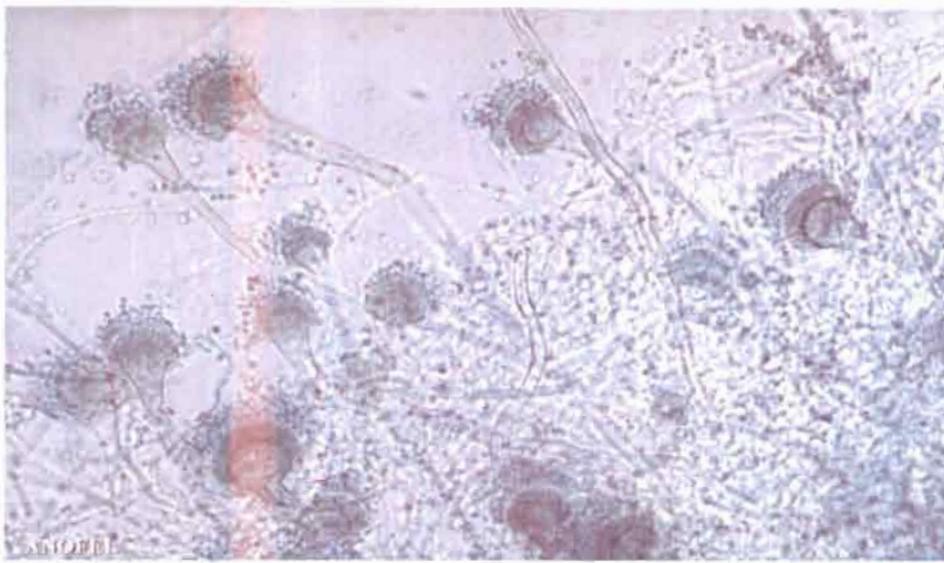


Figure 5 : Vue microscopique de *A. fumigatus* (x100) (ANOFEL).

b. LES CHAMPIGNONS LEVURIFORMES (LEVURES)

Les principaux genres retrouvés chez l'homme sont *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*.

Certaines espèces restent toujours sous forme levures, d'autres par contre présentent les deux formes : levures + pseudofilaments.

Des particularités de morphologie microscopique orientent vers l'identification immédiate de genres ou d'espèces particulières : chlamydospores (*C. albicans*). Dans d'autres cas, l'aspect de la culture, les caractères microscopiques et les caractères de croissance seront nécessaires à leur identification. Le genre *Candida* présente de pseudo-filaments en microscopie lors d'une candidose confirmée, illustrée par la figure 6.



Figure 6 : Vue microscopique à l'état frais de *Candida albicans* (x40) (McGinnis M).

c. LES CHAMPIGNONS DIMORPHIQUES

Ce sont des champignons plus rarement rencontrés, originaires surtout des régions tropicales. Ils ont un développement intermédiaire aux champignons précédents. La contamination se fait à partir d'un champignon filamenteux, par l'intermédiaire de spores, par voie aérienne (pulmonaire surtout) ou par voie transcutanée. Après pénétration dans l'organisme, les spores germent et prennent une forme levure. Toute la symptomatologie clinique est due au développement de ces levures. Lorsque ces levures sont extraites de leur hôte et se retrouvent dans l'environnement ou sontensemencées sur un milieu de culture, elles évoluent à nouveau en un champignon filamenteux. Elles produisent des spores très contaminantes si elles sont inhalées.

2. POUVOIR PATHOGÈNE

Il existe plus d'un million d'espèces regroupées dans environ 4 000 genres. Plus de 500 espèces ont été décrites comme susceptibles d'être pathogènes pour l'homme mais seulement une cinquantaine d'espèces sont régulièrement isolées dans des prélèvements d'origine humaine (Eholie et *al.*, 1997).

La contamination de ces germes se fait par inhalation des spores présentes dans l'environnement ou par ingestion d'aliments contaminés par des germes. Une fois dans l'organisme, les champignons peuvent rester quiescents chez le porteur. On parle de portage. Ils ne deviennent pathogènes qu'en présence de certains facteurs qui sont d'ordre physiologique (âge et grossesse), pathologiques (immunodépression) ou dans le cas d'un traitement avec d'immunosuppresseurs ou de corticoïdes (Taj-Aldeen et *al.*, 2015).

Parmi les principaux éléments qui participent au pouvoir pathogène de ces champignons, on retrouve :

- ☞ La petite taille des spores (2 à 3 μm de diamètre pour *A. fumigatus*) leur donnant la possibilité d'atteindre les alvéoles pulmonaires ;
- ☞ La thermo-tolérance (jusqu'à 55°C pour *A. fumigatus*) permettant leur développement chez leur hôte à 37°C ;
- ☞ La capacité d'adhérence à la membrane basale (via le fibrinogène, la laminine, la fibronectine, etc...) et la capacité d'induire des microlésions et des ulcérations vasculaires par le biais de toxines nécrosantes ;
- ☞ La production de mycotoxines impliquées dans des processus de sensibilisation responsables de manifestations allergiques.

En pathologie humaine, les mycoses les plus importantes sont les candidoses, les aspergilloses, les pneumocystoses et les cryptococcoses (Aubry et *al.*, 2015).

II. DIAGNOSTIC DES MYCOSES

1. LE DIAGNOSTIC CLINIQUE

Les mycoses n'ont pas de symptômes propres. Néanmoins elles peuvent être incriminées devant une fièvre prolongée (48 heures) après une antibiothérapie à large spectre (Bille et *al.*, 2005). Le diagnostic est surtout indiqué chez les patients à risque tels que les personnes âgées et les patients immunodéprimés.

2. LE DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE

Les étapes du diagnostic mycologique sont les suivantes : l'examen direct, la culture et l'étude des réactions immunologiques.

L'examen direct

Plusieurs types d'échantillons peuvent être utilisés (produit de lavage broncho-pulmonaire, liquide de tubage gastrique, crachats...).

La microscopie directe à l'état frais des prélèvements permet de visualiser les levures au grossissement x40 comme le montre la figure 7.



Figure 7 : Vue microscopique à l'état frais de *Candida sp* (x40) (-didier-pol.net)

Les levures sont aussi colorées au MGG, au Gram, au Giemsa ou au bleu de méthylène pour une meilleure observation tandis que les filaments d'aspergillus sont colorés en rose au MGG.

☞ La culture et identification

La culture est faite sur gélose sabouraud plus un antibiotique le plus souvent le chloramphénicol. Cet antibiotique a un large spectre d'action et qui inhibe la majeure partie des bactéries. Incubé à 37°C, les colonies de *Candida* apparaissent blanches crémeuses en 24 heures ou en 48 heures. Quant aux *Aspergillus*, ils poussent sous forme de choux fleur (10 jours maximum) et l'observation macroscopique et microscopique permet de les différencier en *A. fumigatus*, en *A. niger* et *A. flavus*.

Les colonies de *Candida* sont ensuite prélevées puis ensemencées sur un milieu d'identification spécifique (gélose sabouraud chromogène). Chaque espèce de *Candida* produit une enzyme qui permet son identification à travers la couleur des colonies. Ainsi on en distingue *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* mais leur présence ne confirme pas systématiquement une candidose.

☞ Diagnostic immunochimique et antigénique

Certains germes produisent des toxines qui sont mises en évidence par test immunochimique (réaction anticorps-antigènes). C'est le cas de l'espèce *Aspergillus flavus* qui produit de l'aflatoxine. Une recherche positive dans le sang est un argument biologique majeur pour le diagnostic de l'aspergillose invasive, en particulier chez le patient neutropénique. Il est actuellement recommandé d'utiliser une technique ELISA pour détecter l'antigène galactomannane présent dans la paroi de *Aspergillus fumigatus* (Aissaoui et al., 2013).

2. L'ANTIFONGIGRAMME

L'antifongigramme est réalisé à partir des souches pures identifiées. Son principe et sa méthode de réalisation sont décrits comme suit :

On utilise le E-TEST ou EUCAST qui est une technique de réalisation d'antifongigramme pour déterminer la sensibilité des souches fongiques.

Il s'agit d'une technique de diffusion en milieu gélosé permettant de donner une mesure précise de la concentration minimale inhibitrice d'un antifongique (CMI).

Cette technique introduite dans les années 1990 s'est révélée rapidement très utile en pratique de routine de laboratoire.

Le E-test® permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antifongique biotique à tester.

Ce gradient couvre une zone qui, en fonction des molécules, va de 0,016 à 256 mg/L ou de 0,002 à 32 mg/L.

Le E-test® associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide :

- Techniquement, l'antifongique est contenu dans un espace limité à une extrémité de la bandelette.
- Lorsque celle-ci est déposée sur une gélose Müller-Hinton (milieu spécifique pour la mesure de l'activité des antifongiques), à l'aide d'une pince flambée ou de l'applicateur en mettant l'échelle de la CMI face à l'ouverture de la boîte.
- Préalablement ensemencée à l'aide d'un inoculum fongique ou bactérien contenant 10⁶UFC/ml, l'antibiotique se répartit selon un gradient de concentration très précis.
- Assurer un bon contact entre la bande et la gélose en appuyant sur la bande en partant de la base, tout en évitant de déplacer la bande après l'application du fait que l'antibiotique diffuse immédiatement après contact dans la gélose.

☞ Résultats :

La lecture est réalisée après 24 ou 48 heures d'incubation à 37 °C ou sous 5% CO₂ si nécessaire.

Une ellipse d'inhibition de culture se dessine autour de la bandelette et la CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture fongique et de la bandelette.

Cette technique nécessite, selon les recommandations du fabricant, que ces bandelettes soient stockées à l'abri de l'humidité, à 5 °C, faute de quoi les résultats ne seront pas valides (risque de destruction du gradient).

Cette technique permet d'ouvrir plus largement la prescription des CMI qui représentent un outil important dans le suivi de l'antibiothérapie d'un patient.

NB : Les Antifongiques les plus testés sont :

- 5 fluoro cytosine
- l'amphotéricine B
- Caspofungine
- fluconazole
- l'Itraconazole

III. EPIDEMIOLOGIE ET TRAITEMENT DES MYCOSES

1. EPIDEMIOLOGIE DES MYCOSES

Les mycoses sont des infections opportunistes, inégalement réparties dans le monde. Ces infections sont fréquentes dans les régions de fort taux de VIH et de tuberculose. C'est principalement les régions d'Asie, de l'Amérique latine et de l'Afrique Sub-Saharienne. En zone tropicale, le développement des mycoses y est favorable. Avec une prévalence du VIH estimée en moyenne à 6,33 pour 1000 habitants, les mycoses constituent un problème de santé au Burkina Faso (Dubiley et *al.*, 2010). Aussi la pauvreté et les mauvaises conditions d'hygiène en sont des facteurs en faveur des mycoses.

2. TRAITEMENT DES MYCOSES

a. LISTE DE QUELQUES ANTIFONGIQUES

Au cours des dernières années, des progrès considérables ont été faits dans la prise en charge des infections fongiques grâce notamment à l'arsenal thérapeutique disponible. Ces antifongiques sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau II : Médicaments antifongiques

Dénomination commune Internationale	Nom générique	Formes galéniques	Posologie/jour (adulte)
Amphotéricine B désoxycholate	FUNGIZONE®	Poudre injectable 50 mg	1mg/kg en IV
Amphotéricine B liposomiale	AMBISOME®	Flacon 50 mg	3 mg/kg
Flucytosine	ANCOTIL®	Comprimé 500 mg, solution injectable à 1% ;	100 mg/kg
Itraconazole	SPORANOX®	Gélules 100 mg Solution orale (10 mg/ml)	400 à 600 mg
Fluconazole	TRIFLUCAN®	Gélules 50, 100 et 200 mg Solution orale Flacon IV 100 ou 200 mg	50 à 800 mg
Voriconazole	V-FEND®	Gélules à 50 et 200 mg Solution pour perfusion IV à 200 mg	400 mg à J1, 200 mg ensuite 6mg/kg toutes les 12 heures pendant 24 heures, puis 4mg/kg
Posaconazole	NOXAFIL®	Suspension buvable 40 mg/ml	800 mg/j
Terbinafine	LAMISIL®	Comprimés 250 mg	500 mg à 1 g/j
Caspofungine	CANDIDAS®	Flacons de 70 et 50 mg par voie IV	70 mg/j le premier jour, puis 50 mg/j les jours suivants
Micafungine	MYCAMINE®	Poudre 50 mg pour solution IV	50 mg/j (1 mg/kg) en prophylaxie, 100-200 mg (2-4mg/kg/j en curatif)
Anidulafungine	ECALTA®	Flacon de poudre de 100 mg	200 mg le premier jour, puis 100 mg/j en curatif

Dans la plupart des mycoses, le traitement de première intention est le Fluconazole.

b. TRAITEMENT DES MYCOSES FREQUENTES

☞ Les Candidoses

Le traitement des candidoses chez les patients immunodéprimés est le fluconazole 200 mg/j pendant 2 à 3 semaines. D'autres antifongiques sont indiqués tels que l'amphotéricine (AmB) désoxycholate, l'AmB liposomiale, le fluconazole, et le voriconazole.

☞ Les Aspergilloses

Le traitement conventionnel reste l'AmB désoxycholate (1 à 1,7 mg/kg/j, dose totale : 1,5 à 4 g) ou l'AmB liposomiale [Ambisome] 5 mg/kg/j. pendant 2 semaines, puis 3 mg/kg.

☞ La pneumocystose

Il fait appel au cotrimoxazole associant triméthoprine et sulfaméthoxazole. 20 mg/kg/j de TMP et 100 mg/kg/j de SMX par voie orale ou 15 mg/kg/j de TMP et 75 mg/kg/j de SMX par voie IV en 4 prises ou en 4 perfusions courtes pendant 21 jours. Cette thérapeutique entraîne de nombreux effets secondaires : fièvre, signes cutanés d'intolérance, agranulocytose. Ces effets secondaires sont particulièrement fréquents chez les sujets atteints de sida (Zida et *al.*, 2014).

CHAPITRE II : METHODOLOGIE

I. CADRE ET PERIODE D'ETUDE

Notre étude a eu pour cadre le Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou (CHUSS) de Bobo-Dioulasso. La situation géographique et les caractéristiques socio-économiques de la ville de Bobo-Dioulasso lui confèrent une position de ville carrefour et cosmopolite, favorisant ainsi l'expansion de nombreuses pathologies infectieuses.

Le CHUSS est un hôpital universitaire de niveau I dans la pyramide sanitaire à l'instar du Centre Hospitalier Universitaire Yalgado Ouédraogo (CHU-YO) et du Centre Hospitalier Universitaire Charles De Gaulle (CHU-CDG). Il constitue le dernier niveau de référence des régions sanitaires des Hauts Bassins, des Cascades, de la boucle du Mouhoun et du Sud-ouest.

Sur le plan médical, la structure est organisée en départements (Pédiatrie, Médecine, Maternité, Laboratoires, Pharmacie et chirurgie).

Le département des laboratoires est organisé en plusieurs services : Accueil-prélèvement, Biochimie, Hématologie-Immunologie, Bactériologie-virologie, le service d'anatomie et cytologie pathologique et la Parasitologie-Mycologie.

Nous avons effectué notre étude dans le service de bactériologie-virologie précisément dans l'unité de mycobactériologie où sont réalisées toutes les étapes des analyses.

Il s'agit d'une étude prospective et descriptive qui s'est déroulé du 17 Novembre au 17 Mai correspondant à une durée de six (06) mois.

II. TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGE

1. POPULATION D'ETUDE

Nous avons inclus dans notre étude tous les patients indiqués au CHUSS pour un dépistage de tuberculose pulmonaire. Nous avons inclus, y compris les malades internés dans les services médicaux et suspects de tuberculose pulmonaire.

2. MATERIEL D'ETUDE

a. MATERIEL

Au cours de notre étude nous avons utilisé un certain nombre de matériel que sont : Microscope optique, Hotte, Lames porte-objets, Lamelles, Anse, Boîtes de pétrie, Etuve, Bec

Bunsen, Crachoirs, Pissette, Pincés, Erlenmeyer, Bécher, Ballon, Fiole, Flacon, Eprouvette graduée, Balance et Pipette pasteur.

b. REACTIFS

- ☞ Pour la coloration de Ziehl : Fuchsine de Ziehl, Safranine, Acide-alcool, Bleu de méthylène ;
- ☞ Pour la coloration au MGG : Solution de May Grünwald, Méthanol, Giemsa R.

c. MILIEUX DE CULTURE

Deux types de milieux de culture ont été nécessaires pour notre étude :

- ☞ La gélose Sabouraud chloramphénicol, milieu sélectif des germes fongiques. Elle est composée de caséine enzymatique, de pepsine digestive de tissu animal, du glucose et du chloramphénicol.
- ☞ La gélose Sabouraud chromogène, milieu plus spécifique permettant l'identification des différentes espèces de levure. Cette gélose contient de l'Agar, de l'extrait de levures, du dipotassium de phosphate d'hydrogène, du chloramphénicol et un mélange chromogène.

3. L'ECHANTILLONNAGE

Les échantillons sont composés essentiellement de :

- crachats, deux (02) prélèvements sont exigés (l'un à 00H et l'autre 06H) sauf les cas de contrôle où un seul prélèvement est accepté ;
- liquide de tubage gastrique, il est réalisé dans les services médicaux surtout chez les immunodéprimés et un seul prélèvement est suffisant ;
- pus, échantillon rare à être utilisé.

Les prélèvements sont reçus du Lundi au Vendredi au service d'accueil des laboratoires du CHUSS entre 07H et 09H.

Ainsi nous avons inclus systématiquement tous les patients suspects de tuberculose pulmonaire et qui ont pu apporter des échantillons au cours de notre étude.

III. LES TECHNIQUES DE LABORATOIRE

1. L'OBSERVATION MACROSCOPIQUE

Elle est la première étape des analyses et permet d'apprécier la qualité (l'aspect) des prélèvements. Elle rend compte déjà de la présence d'une possible pathologie.

2. LA MICROSCOPIE

C'est l'étape fondamentale et comprend les états frais et les colorations.

a. L'ETATS FRAIS

Il consiste à confectionner sur une lame, un frottis dans de l'eau physiologique que l'on observe au microscope entre lame et lamelle. Dans les échantillons de crachats, nous recherchons notamment des levures et des filaments. Les figures 8 et 9 montrent ces éléments.



Figure 8 : Vue microscopique à l'état frais de levure (x400) (fr.wikipedia.org)



Figure 9 : Vue microscopique à l'état frais de filaments de *Aspergillus sp* (x40) (-techmicrobio.eu)

b. LES TECHNIQUES DE COLORATIONS UTILISEES

Après avoir confectionné un frottis mince sur une lame et séché à l'air libre, nous la fixons à la flamme pendant 4 secondes. Nous utilisons ainsi plusieurs types de coloration pour mettre en évidence les espèces recherchés en microscopie.

La coloration de ZIEHL NELSEN pour recherche de BAAR

Elle consiste à :

- recouvrir la lame avec la fuchsine phéniquée de ZIEHL à chaud et attendre pendant 5 minutes ;
- laver délicatement la lame à l'eau de robinet puis décolorer avec de l'acide-alcool ;
- recouvrir le frottis avec du bleu de méthylène pendant 1 minute puis laver la lame encore à l'eau de robinet et on laisse séché à l'air libre ;
- lire frottis le au microscope optique à l'objectif x100 et immergé d'huile. Les BAAR apparaissent ainsi sous forme de bâtonnets rouges.

☞ La coloration de Dugommier (Auramine) pour recherche de BAAR

Elle est simple et son protocole est décrit comme suit :

- recouvrir le frottis avec de l'auramine pendant 20 minutes puis laver à l'eau de robinet ;
- décolorer à l'alcool pendant 20 à 30 secondes ;
- recouvrir ensuite le frottis de permanganate de potassium, un contre colorant à l'origine du fond noir de la préparation. Après 1 minute, laver lame et la sécher à l'air libre à l'obscurité. La lecture se fait au microscope à fluorescence à l'objectif x100. Les BAAR apparaissent dorés sur un fond noir.

☞ La coloration au May-Grunwald-Giemsa (MGG)

Cette coloration met en évidence les filaments d'aspergillus et consiste à :

- recouvrir le frottis d'une solution de May-Grunwald pendant 02 minutes puis ajouter de l'eau distillée à volume égal pendant 03 minutes et laver délicatement à l'eau de robinet;
- recouvrir le frottis avec la solution de Giemsa R dilué au 1/10 et laisser agir pendant 20 minutes puis laver à l'eau de robinet.

Après avoir séchée, la lame est observée au microscope optique à l'objectif x100 et immergée d'huile. Les filaments de *Aspergillus* sont colorés en rose comme le montre la figure 10.

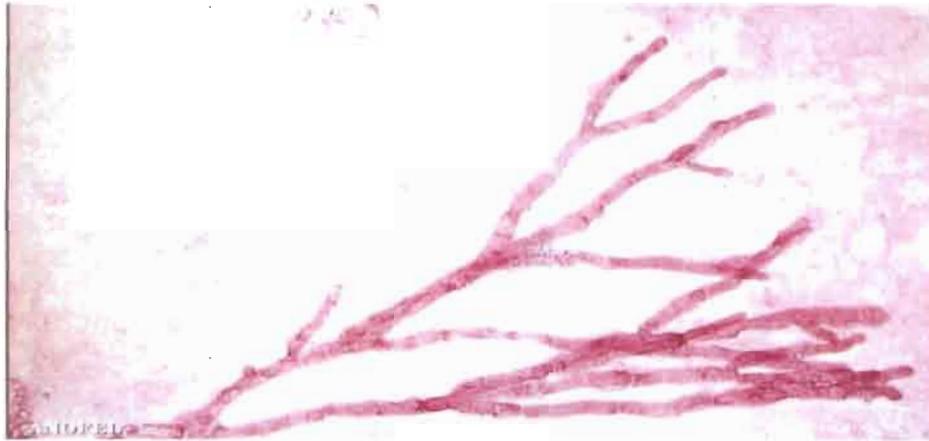


Figure 10 : Aspect microscopique des filaments de *Aspergillus* colorés au MGG (x100) (ANOFEL)

3. LA CULTURE

La culture est une méthode de diagnostic plus fiable. Nous avons utilisé deux (02) sortes de milieux qui sont essentiellement sélectifs pour les espèces fongiques. Ce sont la gélose sabouraud chloramphénicol et la gélose sabouraud chromogène.

a. LA CULTURE SUR GELOSE SABOURAUD CHLORAMPHENICOL

La gélose sabouraud chloramphénicol est un milieu de culture simple où accroissent les espèces fongiques. Sa composition est décrite en annexe 1

- Caséine enzymatique hydrolysable 5,0g. Son rôle est de faciliter les réactions enzymatiques ;
- Pepsine digestive de tissu animal 05 g : Son rôle est de fournir l'azote nécessaire pour la croissance des levures et des moisissures ;
- Glucose 40,0g : il constitue la principale source d'énergie pour les germes ;
- Chloramphénicol 0,05g : c'est un antibiotique de la famille des phénicolés. Avec un large, cet antibiotique inhibe la croissance de nombreuses bactéries ;
- Gélose 15,0 g : c'est la composante de base contenant les autres éléments qui compose le milieu. Cette gélose a un pH relativement acide dont la valeur est de $5,6 \pm 0,2$.

Sa préparation suit un protocole décrit comme suit :

- Peser 65,05 g de gélose déshydratée puis suspendre dans un litre d'eau distillée
- Porter le mélange à ébullition pour dissoudre complètement la gélose
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes
- Bien mélanger avant de couler dans des boîtes de Pétri stériles (5 mm d'épaisseur)
- Porter les renseignements (nom de la gélose et date de préparation) sur les boîtes.

Les prélèvements sont ensemencés systématiquement sur la gélose et incubés à l'étuve à 37°C. Les cultures sont observées tous les 24 heures et cela pendant 10 jours. Ainsi des colonies blanchâtres apparaissent entre 24 heures et 48 heures et oriente vers les levures (candida) comme le montre la figure 11.



Figure 11 : Image de levure en culture sur gélose sab chloramphénicol (BOULOU, 2016)

En outre nous avons observé des colonies chou-fleur de couleur variable nous indiquant vers les *Aspergillus*, illustré par la figure ci-dessous.



Figure 12 : Image d'une culture de *Aspergillus sp* sur gelose Sab choramphénicol (BOULOU, 2016)

A partir des cultures, l'aspect des colonies, la couleur, le temps de croissance nous orientent déjà vers une espèce de *Aspergillus*. Nous avons identifié les espèces de *Aspergillus* par la microscopie des cultures colorées au MGG. Ce sont : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*.

b. LA CULTURE SUR GELOSE SABOURAUD CHROMOGENE : IDENTIFICATION DES ESPECES DE CANDIDA

La composition de cette gélose est décrite en Annexe 2.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS

1. LES CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES

Nous avons inclus 264 patients dans notre étude.

☞ SEXE

Parmi ces 264 patients, 151 patients étaient de sexe masculin (57,4%), soit un sexe-ratio en faveur des hommes de 1,4.

☞ L'AGE

Les extrêmes des âges étaient 05 mois et 85 ans. L'âge moyen a été estimé à 40 ans. La tranche d'âge la plus représentée était celle comprise entre 30 et 35 ans.

2. L'EXAMEN MACROSCOPIQUE DES ECHANTILLONS

Nous avons collecté au total 434 échantillons. 94 patients ont fourni 1 échantillon et 170 patients ont fourni 2 échantillons chacun.

Chaque échantillon a fait l'objet d'un examen macroscopique. 421 étaient mucopurulents soit 96,1% contre 11 qui étaient salivaires et 2 sanguinolents.

3. L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES ECHANTILLONS : LA COLORATION AU MGG

Nous avons confectionné un frottis pour chaque échantillon. Tous les frottis ont été d'abord colorés au MGG avant d'être observés au microscope optique au grossissement X100 pour rechercher les champignons microscopiques : levures et moisissures. Nous avons trouvé une prévalence globale de 17, 59% de champignons microscopiques avec prédominance des levures (11,6%) par rapport aux autres champignons. Les détails de ces résultats sont consignés dans le tableau III.

Tableau III : Résultats de l'examen microscopique

Observations	Effectifs	Prévalences (%)
Levures uniquement	50	11,6
Levures et filaments de <i>Aspergillus</i>	21	4,84
Filaments d' <i>Aspergillus</i>	05	1,15
Microscopie négative	358	82,4
Total	434	100

4. LA MISE EN CULTURE DES ECHANTILLONS PULMONAIRES SUR SABOURAUD CHLORAMPHENICOL.

Tous les échantillons collectés ont fait l'objet d'une mise en culture sur Sab chloramphénicol. Nous avons utilisé la méthode d'ensemencement en stries. Ainsi, sur un total de 434 échantillons, nous avons observé une prévalence globale de positivité de 89,8%. Aussi, nous trouvés une prédominance des champignons levuriformes (60,6%) par rapport aux champignons filamenteux (29,2%). Les détails de ces résultats sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV : Résultat des cultures sur Sab chloramphénicol

Aspect et couleur des colonies	Etat des cultures frais	Effectif	Prévalence (%)
Choux fleur, blanc centre vert	Filamenteux	82	18,9
Choux fleur, blanc centre vert à jaune	Filamenteux	2	0,3
Choux fleur, blanche	Filamenteux	38	8,8
Choux fleur, orange	Filamenteux	4	1
Coule de miel blanche	Levuriformes	25	5,8
Crémeux, blanche	Levuriformes	228	52,6
Rugueux, blanche	Levuriformes	10	2,2
culture négative	culture négative	45	10,1
Total		434	100

5. INDENTIFICATION DES ESPECES FONGIQUES

a. IDENTIFICATION DES CANDIDA : CULTURE SUR GELOSE SABOURAUD CHROMOGENE

Les 263 levures des 389 cultures positives ont fait l'objet d'une identification par repiquage sur gélose sabouraud chromogène. Après 24 heures, nous avons identifié les espèces à l'aide d'une échelle de lecture (voir méthodologie). Nous avons observé une prédominance de l'espèce *Candida albicans* (32,13) par autres espèces du genre *Candida*. Ces résultats sont consignés dans le tableau V.

Tableau V : Identification par culture sur sab chromogène

Espèces identifiées	Couleur des colonies	Effectif	Prévalence (%)
<i>Candida albicans</i>	Vert-claires	125	32,13
<i>Candida glabrata</i>	Blanches	33	8,48
<i>Candida tropicalis</i>	Bleues	9	2,31
<i>Candida krusei</i>	Violettes ou pourpres	60	15,42
<i>Candida sp</i>	Autres	36	9,25
Total		389	100

b. IDENTIFICATION DES ESPECES FILAMENTEUSES : COLORATION AU BLEU DE LACTOPHENOL

Toutes les 126 espèces filamenteuses des 389 cultures positives ont fait l'objet d'une identification. Les résultats obtenus ont montré une prédominance de l'espèce *Aspergillus fumigatus* (22,62%). Les détails de ces résultats sont indiqués dans le tableau VI.

Tableau VI : identification des espèces filamenteuses

Espèces identifiées	Effectif	Prévalence (%)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	88	22,62
<i>Aspergillus niger</i>	19	4,88
<i>Aspergillus flavus</i>	3	0,77
<i>Aspergillus sp</i>	16	4,11
Total	389	100

II. DISCUSSION ET COMMENTAIRES

1. LES LIMITES DE L'ETUDE

Nous avons réalisé une enquête transversale prospective. Les inclusions ont été faites dans le cadre des activités de dépistage et de suivi de routine des patients suspects de tuberculose. Certains patients ont fourni des prélèvements de volume insuffisant pour la bacilloscopie (13). Ces aspects n'ont pas permis de les inclure, réduisant ainsi le nombre de patient inclus. D'autre part nous avons rencontré des difficultés pour recueillir certains renseignements cliniques (prise d'antibiotique, statut sérologique par rapport au VIH) qui auraient mieux contribué à une meilleure analyse de nos résultats. Malgré ces limites, les résultats de notre étude gardent leur validité scientifique.

2. LES CARACTERISTIQUES SOCIODEMOGRAPHIQUES DE NOTRE POPULATION D'ETUDE

Notre population d'étude comprenait 264 patients dont 57,4% de sexe masculin. Nous avons trouvé un sexe-ratio de 1,4. Ainsi nous avons observé une prédominance masculine. Cela serait lié à l'épidémiologie de la tuberculose au Burkina Faso. Les individus de sexe masculin occupent des secteurs d'activités qui semblent les exposer plus à la tuberculose selon Zida et *al.*, en 2014.

L'âge médian des patients de notre population était 40 ans, avec des extrêmes allant de 5 mois à 85 ans. La tranche d'âge de 30 à 35 ans était la plus représentée soit 14,73% (64/264). Ces résultats observés ont révélé que les sujets jeunes étaient les plus suspects de tuberculose. Nos résultats sont similaires à ceux de Zida et *al.*, qui en 2014 au Burkina Faso, ont travaillé sur l'état des lieux des mycobactérioses et ont eu les mêmes résultats. Mais en Europe, les résultats semblent bien différents. L'étude du groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène publique de France sur l'épidémiologie de la tuberculose a rapporté un risque élevé de développer la TB chez les personnes âgées. Nos résultats pourraient s'expliquer par le fait que la population burkinabé est à majorité jeune.

3. RESULTAS DES EXAMENS BIOLOGIQUES DES ECHANTILLONS

D'une part, dans l'examen microscopique des 434 échantillons, nous avons observé 71 levures et 26 champignons filamenteux. Nous avons trouvé une prédominance de colonisation ou d'infection des voies respiratoires par des levures. Ces résultats corroborent

ceux de Taj-Aldeen et *al.*, qui ont fait l'étude sur la charge des infections fongiques au Qatar en 2015. Cette fréquence plus élevée des levures pourrait s'expliquer par la ou les techniques utilisées qui est ou sont plus appropriée (s) pour la mise en évidence des levures que des champignons filamenteux.

D'autre part, nous avons trouvé un taux de positivité de 89,8% des échantillons mis en culture sur sabouraud chloramphénicol. A l'état frais de ces cultures, nous avons observé 60,6% de levures contre 29,2% de filaments d'aspergillus. Ces résultats corroborent ceux de Astekar et *al.*, en 2016 dans l'étude sur la prévalence et caractérisation des infections opportunistes à *Candida* chez les sujets ayant la tuberculose pulmonaire (60% dont 55% de *Candida* et 5% d'aspergillus). Cependant l'étude faite par Adou-Bryn et al en 1999 sur des échantillons des liquides d'aspiration bronchique a montré des résultats contraires (17,60% de culture positive). Nos résultats pourraient s'expliquer par le fait que nos échantillons sont des crachats et qu'il pourrait favoriser une contamination par la flore buccale.

Aussi, nos résultats ont montré une prédominance de *Candida albicans* (32,13%) et de *Aspergillus fumigatus* (22,62%). Ces résultats sont contraires à ceux d'Oubayyou et *al.*, en 2016 qui ont trouvé 13,6% de *Candida albicans* et 19% de *Aspergillus fumigatus*. Cependant, nos résultats sont similaires à ceux de Astekar et *al.*, trouvés en Inde en 2016 (40% de *Candida albicans* et 24,48% d'*Aspergillus fumigatus*). Dans des pays voisins comme la Côte-d'Ivoire Adou-Bryn al ont rapporté les mêmes observations en 1999. Ces portages ou infections fongiques ne sont pas sans impact sur la tuberculose pulmonaire et les maladies respiratoires chroniques.

Les infections broncho-pulmonaires fongiques se développent à la faveur d'une colonisation des voies respiratoires chez les patients présentant des facteurs locaux (tuberculose pulmonaire ou maladies pulmonaires chroniques) ou généraux (Société française de microbiologie, 2015). Les patients atteints de tuberculose pulmonaire ou de maladies respiratoires chroniques constituent donc des terrains à risques de développer des candidoses ou aspergilloses. L'association tuberculose-maladies respiratoires fongiques augmente le risque de gravité de la tuberculose, des échecs thérapeutiques et du taux de mortalité des patients tuberculeux. L'approche diagnostique de ces infections fongiques chez ces types patients s'avère nécessaire en vue d'améliorer leur prise en charge.

CONCLUSION

A l'issu de notre étude, nous observons une colonisation ou infection des muqueuses respiratoires des patients suspects de tuberculose par des champignons microscopiques avec une prédominance des champignons levuriformes par rapport aux champignons filamenteux. Ces observations montrent une circulation de ces pathogènes au sein des patients soumis au dépistage de la tuberculose. Cela interpelle à la surveillance de ces pathogènes, surtout dans cette catégorie de patients pour une meilleure prise en charge des infections respiratoires chroniques. Par ailleurs, il serait souhaitable de réaliser une étude plus approfondie prenant en compte les informations cliniques et paracliniques permettant de distinguer les cas de portages des infections fongiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adou-Bryn. Champignons et parasites isolés à l'examen de 142 liquides d'aspiration bronchique à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Médecine d'Afrique Noire* : 1999; 46:7.
2. Agrawal, Bajaj, Bhatia, Dutt. Comparative Study of GeneXpert with ZN Stain and Culture in Samples of Suspected Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016; 10(5):09-12.
3. Aissaoui. *Aspergillus et aspergilloses*. 2013:32.
4. Astekar, Bhatiya, Sowmya. Prevalence and characterization of opportunistic candidal infections among patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2016; 20(2):183-189.
5. Aubry, Gaüzère. *Mycoses profondes*. *Médecine Tropicale*. 2015:1.
6. Badiane, Ndiaye, Denning. Prevalence and estimation of main fungal infection in Senegal. *Mycoses*. 2015:5.
7. Banavaliker, Bhalotra, Sharma, Manoj, Khandekar, Bose. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction in clinical specimens. *The Indian Journal of Tuberculosis*. 1998; 45: 15.
8. Bekaoui. Case report. *Pan African Medical Journal*. 2014; 19:22.
9. Bille. Le diagnostic des infections fongiques invasives. *Revue Médecine Suisse* Edition 2005:30260.
10. Coignard. *Mycobactéries mode opératoire, Identification des mycobactéries*. Edition 2005 ; A:3.
11. Corzo, Armstrong-James, Denning. Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases. *Mycoses*. 2015; 58:34–44.
12. Decoster. *Classification des bactéries*. Edition 1994:3.
13. Diop. Utilisation du test GeneXpert pour le diagnostic de la tuberculose. *Pan African Medical Journal*. 2016; 23:244.
14. Dubiley, Ignatova, Mukhina. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Tula area, Central Russia, before the introduction of the Directly Observed Therapy Strategy. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1421–1426.
15. Dufresne, Guy. *Identification des champignons d'importance médicale*. *Mycologie*. Edition 2014:23.

16. Eholie, N'gbocho, Bissagnene, Coulibaly, Ehui, Kra, Assoumou, Aoussi, Kadio. Mycoses profondes au cours du sida à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Bulletin de la Société de pathologie exotique*. 1997; 90 (5) :307-311.
17. Enarson, Rieder, Arnadottir, Trébucq. *Tuberculosis Guide for Low Income Countries*. Edition 2000; 5:91.
18. Ferkol, Schraufnagel. The global burden of respiratory disease. *American Thoracic Society*. 2014:404-406.
19. Hordé. Infection pulmonaire-symptômes, causes et traitement. *Santé-Médecine*. 2015:1.
20. Lanternier, Cypowyj, Picard, Bustamante, Lortholary, Casanova, Puel. Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. *National Institutes of Health (NIH)*. 2013; 25(6): 736–747.
21. Lebeaux, Lanternier. Risque infectieux fongique au cours des maladies systémiques. *La Presse Médicale*. 2009; 38: 260-273.
22. Ministère de la santé (Burkina Faso). *Annuaire statistique*. 2014:264-270.
23. Ministère de la santé (Burkina Faso). *Tableau de bord des indicateurs de santé-Burkina Faso*. 2014:62.
24. Organisation mondiale de la Santé. *Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde, Résumé d'orientation*. 2014:3.
25. Organisation mondiale de la Santé. *Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde, résumé d'orientation*. 2015:2.
26. Organisation mondiale de la Santé. *TB/VIH, Manuel clinique*. Edition 2005:43.
27. Oubayyou, Zida, Moumouni, Savadogo, Traoré, Ouédraogo. Aspects épidémiologiques et étiologiques des affections pulmonaires d'origine parasitaire et fongique en milieu hospitalier à Ouagadougou (Burkina Faso). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2016 ; 10(3): 1286-1294.
28. PNT (Burkina Faso). *Guide technique de lutte contre la tuberculose*. Edition 2011:89.
29. Shinnick. *Classification des bactéries*. Edition 1994:4.
30. Société française de microbiologie. *Rémic (Référentiel en microbiologie médicale)*. 5^e Edition 2015 ; 5.1 :179.
31. Taj-Aldeen, Chandra, Denning. Burden of fungal infections in Qatar. *Mycoses*. 2015; 58:51-57.

32. Wedzicha, Adler, Hansen-Flaschen. Annual report. American Thoracic Society. 2015-2016.
33. Zhi. Mycobacteriaceae. Edition 2009:5.
34. Zida, Targnagda, Kaboré. Etat des lieux des mycobactérioses atypiques au Burkina Faso : résultats d'une enquête régionale. The Pan African Medical Journal. 2014; 17:188.

Annexe 1

- Caséine enzymatique hydrolysable 5,0g. Son rôle est de faciliter les réactions enzymatiques ;
- Pepsine digestive de tissu animal 05 g : Son rôle est de fournir l'azote nécessaire pour la croissance des levures et des moisissures ;
- Glucose 40,0g : il constitue la principale source d'énergie pour les germes ;
- Chloramphénicol 0,05g : c'est un antibiotique de la famille des phénicolés. Avec un large, cet antibiotique inhibe la croissance de nombreuses bactéries ;
- Gélose 15,0 g : c'est la composante de base contenant les autres éléments qui compose le milieu. Cette gélose a un pH relativement acide dont la valeur est de $5,6 \pm 0,2$.

Sa préparation suit un protocole décrit comme suit :

- Peser 65,05 g de gélose déshydratée puis suspendre dans un litre d'eau distillée
- Porter le mélange à ébullition pour dissoudre complètement la gélose
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes
- Bien mélanger avant de couler dans des boîtes de Pétri stériles (5 mm d'épaisseur)
- Porter les renseignements (nom de la gélose et date de préparation) sur les boîtes.

Annexe 2

- Peptone spécial 15,0 g/l
- Extrait de levures 4,0 g/l
- Dipotassium de phosphate d'hydrogène
- Mélange chromogène 1,00 g/l
- Chloramphénicol 0,5 g/l
- Agar 15,00 g/l

Sa préparation est simple et suit le protocole décrit ci-dessous :

- Peser 42,72 g de gélose déshydratée puis suspendre dans 1000 ml d'eau distillée
- Porter l'ensemble à ébullition pour dissoudre complètement la gélose
- A ne pas stériliser à autoclave
- Laisser refroidir puis couler dans des boîtes de Pétri stériles (5mm d'épaisseur)
- Porter les renseignements (nom de la gélose et date de préparation) sur les boîtes.

Les colonies de culture sont ensemencées en strie sur le milieu sab chromogène et incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Nous avons identifié quatre (04) espèces à partir de la coloration des colonies. Ainsi, les colonies de *Candida albicans* sont colorées en vert clair, celles de *Candida glabrata* en blanc, celles de *Candida tropicalis* en bleu et celles de *Candida krusei* en violet ou pourpre.

Nous avons conservé toutes les souches au congélateur à -80°C dans une solution que nous avons préparé. Cette solution de conservation contient de la gélose bouillon cœur-cerveille et du glycérol.