



HAL
open science

Application de la PCR en temps réel au diagnostic des candidémies

Olivier Béréziat

► **To cite this version:**

Olivier Béréziat. Application de la PCR en temps réel au diagnostic des candidémies. Sciences du Vivant [q-bio]. 2004. hal-01732521

HAL Id: hal-01732521

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732521v1>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

178935
DOUBLE

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Présenté et soutenu publiquement
le 14 décembre 2004

par **Olivier BÉRÉZIAT**



APPLICATION DE LA PCR EN TEMPS RÉEL
AU DIAGNOSTIC DES CANDIDÉMIES

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810
Du 10 septembre 1990, ce mémoire tient lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

JURY

| | | |
|---------------------|---------------------|-----------|
| M. FORTIER B. | Professeur | Président |
| Mme SCHWARTZBROD J. | Professeur | Juge |
| M. RIO Y. | Docteur en Médecine | Juge |
| Mme MACHOUART M. | Docteur en Sciences | Juge |

BIBLIOTHEQUE MEDECINE NANCY 1



D

007 229975 4

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Présenté et soutenu publiquement

le 14 décembre 2004

par **Olivier BÉRÉZIAT**



APPLICATION DE LA PCR EN TEMPS RÉEL
AU DIAGNOSTIC DES CANDIDÉMIES

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810

Du 10 septembre 1990, ce mémoire tient lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

JURY

| | | |
|---------------------|---------------------|-----------|
| M. FORTIER B. | Professeur | Président |
| Mme SCHWARTZBROD J. | Professeur | Juge |
| M. RIO Y. | Docteur en Médecine | Juge |
| Mme MACHOUART M. | Docteur en Sciences | Juge |

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Patrick NETTER

Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Assesseurs

du 1^{er} Cycle :

du 2^{ème} Cycle :

du 3^{ème} Cycle :

de la Vie Facultaire :

Mme le Docteur Chantal KOHLER

Mr le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

Mr le Professeur Hervé VESPIGNANI

Mr le Professeur Bruno LEHEUP

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Georges GRIGNON – Professeur Jacques ROLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

Louis PIERQUIN – Etienne LEGAIT – Jean LOCHARD – René HERBEUVAL – Gabriel FAIVRE – Jean-Marie FOLIGUET

Guy RAUBER – Paul SADOUL – Raoul SENAULT – Marcel RIBON

Jacques LACOSTE – Jean BEUREY – Jean SOMMELET – Pierre HARTEMANN – Emile de LAVERGNE

Augusta TREHEUX – Michel MANCIAUX – Paul GUILLEMIN – Pierre PAYSANT

Jean-Claude BURDIN – Claude CHARDOT – Jean-Bernard DUREUX – Jean DUHEILLE – Jean-Pierre GRILLIAT

Pierre LAMY – Jean-Marie GILGENKRANTZ – Simone GILGENKRANTZ

Pierre ALEXANDRE – Robert FRISCH – Michel PIERSON – Jacques ROBERT

Gérard DEBRY – Georges GRIGNON – Pierre TRIDON – Michel WAYOFF – François CHERRIER – Oliéro GUERCI

Gilbert PERCEBOIS – Claude PERRIN – Jean PREVOT – Jean FLOQUET

Alain GAUCHER – Michel LAXENAIRE – Michel BOULANGE – Michel DUC – Claude HURIET – Pierre LANDES

Alain LARCAN – Gérard VAILLANT – Daniel ANTHOINE – Pierre GAUCHER – René-Jean ROYER

Hubert UFFHOLTZ – Jacques LECLERE – Francine NABET – Jacques BORRELLY

Michel RENARD – Jean-Pierre DESCHAMPS – Pierre NABET – Marie-Claire LAXENAIRE – Adrien DUPREZ – Paul VERT

Philippe CANTON – Bernard LEGRAS – Pierre MATHIEU – Jean-Marie POLU – Antoine RASPILLER – Gilbert THIBAUT

Michel WEBER – Gérard FIEVE – Daniel SCHMITT – Colette VIDAILHET

=====
**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS -
PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD – Professeur Eric LABOUYRIE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Alain BERTRAND – Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Professeur Luc PICARD – Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Pierre NICOLAS

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur Jean-Pierre CRANCE – Professeur Jean-Pierre MALLIE

Professeur François MARCHAL – Professeur Philippe HAOUZI

3^{ème} sous-section : (Biologie cellulaire)

Professeur Claude BURLET

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU – Professeur Alain LOZNIIEWSKI

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)

Professeur Bernard FORTIER

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Guy PETIET – Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Christian JANOT – Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Pierre LEDERLIN – Professeur Jean-François STOLTZ

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Pierre BEY – Professeur Didier PEIFFERT

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Dan LONGROIS - Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES

2^{ème} sous-section : (Réanimation médicale)

Professeur Henri LAMBERT – Professeur Alain GERARD

Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT – Professeur Bruno LÉVY

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique)

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP et RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI

Professeur Xavier DUCROCQ

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE

Professeur Thierry CIVIT

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes)

Professeur Jean-Pierre KAHN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean-Marie ANDRE

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Jacques POUREL – Professeur Isabelle VALCKENAERE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Daniel MOLE

Professeur Didier MAINARD

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique)

Professeur François DAP

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie)

Professeur Yves MARTINET - Professeur Jean-François CHABOT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL –

Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACE

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie)

Professeur Marc-André BIGARD

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

2^{ème} sous-section : (Chirurgie digestive)

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN (Mme) – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Luc CORMIER

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne)

Professeur Francis PENIN – Professeur Denise MONERET-VAUTRIN – Professeur Denis WAHL

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Abdelouahab BELLOU

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

1^{ère} sous-section : (*Pédiatrie*)

Professeur Danièle SOMMELET – Professeur Michel VIDAILHET – Professeur Pierre MONIN
Professeur Jean-Michel HASCOET – Professeur Pascal CHASTAGNER – Professeur François FEILLET

2^{ème} sous-section : (*Chirurgie infantile*)

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Gilles DAUTEL – Professeur Pierre JOURNEAU

3^{ème} sous-section : (*Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale*)

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

4^{ème} sous-section : (*Endocrinologie et maladies métaboliques*)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

5^{ème} sous-section : (*Biologie et médecine du développement et de la reproduction*)

Professeur Hubert GERARD

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

2^{ème} sous-section : (*Ophthalmologie*)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

3^{ème} sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)

Professeur Michel STRICKER – Professeur Jean-François CHASSAGNE

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Daniel BURNEL

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Jean-Pascal FYAD

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Docteur Edouard BARRAT – Docteur Jean-Claude GUEDENET

Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Docteur Yves GRIGNON – Docteur Béatrice MARIE

Docteur Laurent ANTUNES

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteur Xavier HERBEUVAL – Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Bernard NAMOUR – Docteur Marc MERTEN

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Gérard ETHEVENOT – Docteur Nicole LEMAU de TALANCE – Docteur Christian BEYAERT

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Docteur Didier QUILLIOT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)

Docteur Francine MORY – Docteur Michèle WEBER – Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX – Docteur Véronique VENARD

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)

Docteur Marie-France BIAVA – Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)

Docteur François ALLA

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication (type biologique))

Docteur Pierre GILLOIS

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Docteur François SCHOONEMAN

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Docteur Marie-Nathalie SARDA

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteur Christophe PHILIPPE

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)

Docteur Jacqueline HELMER – Docteur Gérard AUDIBERT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT

Docteur Damien LOEUILLE

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

19^{ème} section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Michèle BAUMANN

32^{ème} section : CHIMIE ORGANIQUE, MINÉRALE, INDUSTRIELLE

Monsieur Jean-Claude RAFT

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT
Monsieur Jean-Yves JOUZEAU

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE
Monsieur Alain DURAND

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Madame Marie-Odile PERRIN – Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE
Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY – Madame Anne GERARD
Madame Ketsia HESS – Monsieur Pierre TANKOSIC – Monsieur Hervé MEMBRE

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE
Madame Nadine MUSSE

68^{ème} section : BIOLOGIE DES ORGANISMES
Madame Tao XU-JIANG

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale
Docteur Alain AUBREGE
Docteur Francis RAPHAEL

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Georges GRIGNON – Professeur Michel PIERSON - Professeur Michel BOULANGE
Professeur Alain LARCAN - Professeur Michel WAYOFF – Professeur Daniel ANTHOINE
Professeur Hubert UFFHOLTZ – Professeur Pierre GAUCHER – Professeur Claude CHARDOT
Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Paul VERT – Professeur Jean PREVOT – Professeur Jean-Pierre GRILLIAT
Professeur Philippe CANTON – Professeur Pierre MATHIEU – Professeur Gilbert THIBAUT
Professeur Daniel SCHMITT

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des
Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*

A notre Maître et Président de thèse

Monsieur le Professeur Bernard FORTIER

Interne dans votre service nous avons pu apprécier
votre écoute attentive et votre soutien.

Vous nous faites un grand honneur d'accepter la
présidence du jury de cette thèse.

Nous vous prions de trouver dans ce travail l'expression
de notre gratitude et notre profond respect.

A NOS JUGES

Madame le Professeur J. SCHWARTZBROD

Vous nous faites l'honneur de juger notre travail.
Nous vous en remercions respectueusement.
Nous avons eu la chance de profiter de votre enseignement.
Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect.

Monsieur le Docteur Y. RIO

Vous nous avez proposé de mener à bien ce travail
au cours duquel nous avons pu apprécier votre esprit
scientifique, vos connaissances fondamentales, votre
disponibilité et vos qualités pédagogiques.
Nous tenons à vous remercier pour votre aide précieuse.
Soyez assuré de notre reconnaissance et de toute notre considération.

Madame le Docteur M. MACHOUART

Nous vous remercions pour votre disponibilité, vos conseils
et votre soutien efficace.
Soyez assurée de notre sincère reconnaissance.

Je dédie cette thèse

A Corinne,
Pour tout ce qu'elle représente et m'apporte chaque jour,
Pour sa présence à mes cotés tout simplement
Pour tous nos moments partagés et surtout à venir
Avec tout mon amour.

A Arthur,
Petit bout d'amour, assoiffé de connaissances et trop pressé de grandir.

A Théo,
Tourbillon de vie, pour son enthousiasme permanent.

A mes parents adorés,
A ma mère partie trop tôt, en ce début d'internat,
A mon père

A ma sœur Véronique, à Thierry et leur petite graine de vie Lucas,
A toute ma famille
A mes cousins cousines,

A ma belle-mère pour sa présence et son soutien
A Nathalie, pour sa joie de vivre, son courage et sa pugnacité
A Frédéric, Cédric et Yann pour nos instants corses
A toute ma belle famille.

A Christophe, l'ami d'enfance, le frère que je n'ai pas eu
Pour tous nos souvenirs et moments partagés.

A Jean-Charles, compagnon d'études et de gardes
A nos fous rires, à nos soirées, pour tous nos souvenirs.

A tous mes amis d'externat dijonnais.

REMERCIEMENTS PARTICULIERS

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la participation bienveillante et efficace de chacun d'entre vous ; je vous en remercie profondément.

- Toute l'équipe du service de Microbiologie de Metz
- Madame le Docteur F. JURIN
- Madame F. BIDON

Aux malades.

SERMENT

"Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque".

1 PLAN



| | pages |
|--|--------------|
| 1 PLAN | 13 |
| 2 INTRODUCTION | 19 |
| 3 LES INFECTIONS à <i>CANDIDA sp.</i> | 23 |
| 3.1 Epidémiologie et pathogénie des <i>Candida</i> | 24 |
| 3.1.1 Biologie des levures | 24 |
| 3.1.1.1 Physiologie des champignons – Généralités | 24 |
| 3.1.1.2 Morphologie et caractères des <i>Candida</i> | 25 |
| 3.1.1.2.1 Morphologie | 25 |
| 3.1.1.2.2 Caractères physiologiques, biochimiques et caryotype | 26 |
| 3.1.1.2.3 Caractères sérologiques | 26 |
| 3.1.1.3 Epidémiologie | 27 |
| 3.1.1.4 Les espèces du genre <i>Candida</i> | 28 |
| 3.1.2 Physiopathologie des infections systémiques à <i>Candida</i> : de la colonisation à l'infection | 29 |
| 3.1.3 Facteurs favorisants des candidoses | 31 |
| 3.1.3.1 Pathogénicité du genre <i>Candida</i> | 31 |
| 3.1.3.2 Facteurs favorisants liés à l'hôte ou intrinsèques | 32 |
| 3.1.3.3 Facteurs favorisants iatrogènes ou extrinsèques | 35 |
| 3.2 Manifestations cliniques | 36 |
| 3.3 Diagnostic biologique | 39 |
| 3.3.1 Diagnostic biologique sur prélèvements non sanguins | 39 |
| 3.3.1.1 Les prélèvements : sites et modalités | 39 |
| 3.3.1.2 L'examen direct | 41 |
| 3.3.2 Hémocultures | 43 |
| 3.3.3 Les cultures | 45 |
| 3.3.3.1 Les milieux de culture | 45 |
| 3.3.3.2 Ensemencement | 46 |
| 3.3.3.3 Incubation | 46 |
| 3.3.3.4 Lecture | 46 |
| 3.3.3.5 Identification | 47 |
| 3.3.4 Index de colonisation de Pittet | 49 |
| 3.3.5 Diagnostic sérologique | 50 |
| 3.3.5.1 Détection d'antigène candidosique dans le sang circulant | 50 |
| 3.3.5.2 Détection d'anticorps anti-candidosiques dans le sang circulant | 51 |
| 3.3.5.3 Détection conjointe des antigènes et des anticorps candidosiques | 52 |
| 3.3.6 Tests de sensibilité aux antifongiques | 53 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.4 | Traitements des candidémies | 55 |
| 3.4.1 | Indications | 55 |
| 3.4.2 | Antifongiques | 55 |
| 3.4.2.1 | L'amphotéricine B et ses dérivés lipidiques | 55 |
| 3.4.2.2 | La flucytosine | 56 |
| 3.4.2.3 | Les azolés | 57 |
| 3.4.2.4 | Les échinocandines | 58 |
| 3.4.3 | Stratégie thérapeutique | 59 |
| 3.4.3.1 | Choix du traitement curatif | 59 |
| 3.4.3.1.1 | Selon le genre et l'espèce | 59 |
| 3.4.3.1.2 | Selon les localisations | 60 |
| 3.4.3.2 | Traitement préemptif en réanimation | 60 |
| 3.4.4 | Prophylaxie | 61 |
| 3.4.4.1 | En réanimation | 61 |
| 3.4.4.2 | En hématologie | 61 |
| 3.4.4.2.1 | La chimio-prophylaxie primaire | 61 |
| 3.4.4.2.2 | La chimio-prophylaxie secondaire | 62 |
| 4 | PRINCIPES DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE | 63 |
| 4.1 | PCR Classique | 64 |
| 4.1.1 | Principe | 64 |
| 4.1.2 | Acteurs de la PCR | 65 |
| 4.1.2.1 | L'acide désoxyribonucléique contenant le fragment à amplifier | 65 |
| 4.1.2.2 | Les amorces : sens et antisens | 66 |
| 4.1.2.3 | L'ADN polymérase et ses inhibiteurs | 66 |
| 4.1.2.4 | Les nucléotides dNTPs | 67 |
| 4.1.2.5 | Le Magnésium (Mg^{2+}) | 67 |
| 4.1.3 | Notion de température de fusion ou T_m | 68 |
| 4.1.4 | La réaction | 69 |
| 4.1.4.1 | Etape de dénaturation thermique | 69 |
| 4.1.4.2 | Etape d'hybridation des amorces (également appelée annealing) | 69 |
| 4.1.4.3 | Etape d'élongation | 70 |
| 4.1.4.4 | La cinétique de la réaction de PCR | 72 |
| 4.1.5 | Migration électrophorétique et révélation | 73 |
| 4.2 | PCR nichée (ou <i>nested PCR</i>) | 75 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3 | PCR en temps réel | 77 |
| 4.3.1 | Principe | 77 |
| 4.3.2 | Intérêts de la PCR en temps réel | 79 |
| 4.3.3 | Le LightCycler® (Roche-Diagnostics®) | 80 |
| 4.3.4 | Révélation par un agent intercalant : le SYBR®Green | 81 |
| 4.3.5 | Courbe de fusion et spécificité de l'amplicon | 83 |
| 5 | DONNEES DE LA LITTERATURE | 85 |
| 5.1 | Objectifs de notre travail | 86 |
| 5.2 | Choix de la cible | 87 |
| 5.3 | Choix du type de prélèvement | 90 |
| 5.4 | Choix de la technique d'extraction | 92 |
| 5.5 | Choix des techniques d'amplification et de révélation | 93 |
| 6 | MATERIELS ET METHODES | 95 |
| 6.1 | Sélection des champignons | 96 |
| 6.2 | Validation de la technique par bioinformatique | 97 |
| 6.2.1 | Recueil des séquences des ITS | 97 |
| 6.2.2 | Alignements des séquences | 97 |
| 6.3 | Technique d'extraction d'ADN | 99 |
| 6.3.1 | Locaux et matériel de biologie moléculaire | 99 |
| 6.3.2 | Choix du kit commercial d'extraction | 99 |
| 6.3.3 | Préparation des échantillons avant leur extraction | 101 |
| 6.3.3.1 | Suspension de levures | 101 |
| 6.3.3.2 | Echantillon de sang total prélevé sur EDTA | 102 |
| 6.3.4 | Extraction proprement dite de l'ADN de <i>Candida</i> | 103 |
| 6.3.5 | Conservation et qualité des produits d'extraction | 104 |
| 6.4 | Amplification de l'ADN par PCR classique | 105 |
| 6.4.1 | Choix de la cible | 105 |
| 6.4.2 | Les amorces | 105 |
| 6.4.3 | PCR externe spécifique du genre <i>Candida</i> | 106 |
| 6.4.4 | PCR interne spécifique d'une espèce de <i>Candida</i> | 108 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 6.5 | Adaptation sur LightCycler® (Roche Diagnostics®) | 111 |
| 6.5.1 | Intérêts de l'adaptation de la technique classique en une PCR temps réel | 111 |
| 6.5.2 | Extraction, amorces et SYBR®Green pour la PCR en temps réel | 111 |
| 6.5.3 | PCR spécifique du genre <i>Candida</i> | 113 |
| 6.5.4 | PCR spécifique d'une espèce de <i>Candida</i> | 116 |
| 6.6 | Essais sur le sang total de patients | 119 |
| 6.1.1 | Sélection des patients | 119 |
| 6.6.2 | Techniques de diagnostic de référence | 120 |
| 6.6.3 | Extraction de sang total de patients | 120 |
| 6.6.4 | Techniques de PCR | 120 |
| 7 | RESULTATS | 121 |
| 7.1 | PCR classique | 122 |
| 7.1.1 | Détection du produit d'amplification | 122 |
| 7.1.2 | Spécificité | 122 |
| 7.1.3 | Sensibilité | 124 |
| 7.2 | PCR en temps réel | 126 |
| 7.2.1 | Sur suspension de levures | 126 |
| 7.2.1.1 | Adaptation sur LightCycler® | 126 |
| 7.2.1.1.1 | Mélange réactionnel (<i>Mix</i>) | 126 |
| 7.2.1.1.2 | Programmation du LightCycler® | 127 |
| 7.2.1.2 | Détection du produit d'amplification | 128 |
| 7.2.1.3 | Spécificité | 128 |
| 7.2.1.4 | Sensibilité | 129 |
| 7.2.2 | Sur sang total de patients | 130 |
| 7.2.2.1 | Patients ayant une candidose invasive prouvée | 130 |
| 7.2.2.2 | Patients ayant une candidose invasive possible | 134 |
| 8 | DISCUSSION | 135 |
| 8.1 | Diagnostic biologique actuel | 137 |
| 8.2 | Mise en place de la PCR classique au laboratoire | 139 |
| 8.2.1 | Choix du type de prélèvement et du kit d'extraction | 139 |
| 8.2.2 | Publication de référence et choix des amorces | 140 |
| 8.3 | PCR en temps réel | 142 |
| 8.3.1 | Avantages de la PCR en temps réel comparée à la PCR nichée | 142 |
| 8.3.2 | La technique SYBR®Green | 144 |
| 8.4 | Evaluation des techniques de PCR | 147 |
| 8.4.1 | PCR classique | 147 |
| 8.4.2 | PCR en temps réel | 148 |
| 8.5 | Essais sur le sang total de patients | 148 |
| 8.6 | Améliorations potentielles de la technique | 150 |

| | |
|------------------|-----|
| 9 CONCLUSION | 152 |
| 10 BIBLIOGRAPHIE | 155 |
| 11 ANNEXES | 177 |



ABRÉVIATIONS



| | |
|-----------|---|
| Ac | Anticorps |
| AFSSAPS | Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| Ag | Antigène |
| AmB | Amphotéricine B |
| AMM | Autorisation de mise sur le marché |
| ANAES | Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé |
| ARN | Acide ribonucléique |
| BET | Bromure d'éthidium |
| CI | Candidose invasive |
| EC4 | European Communities Confederation of Clinical Chemistry |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| EORTC | European Organisation for Research and Treatment of Cancer |
| FRET | Fluorescence Resonance Energy Transfert |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| pb | Paire de bases |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| SDS | Dodécylsulfate de sodium |
| SFAR | Société française d'anesthésie et de réanimation |
| SRLF | Société de pathologie infectieuse de la langue française |
| SRLF | Société de réanimation de la langue française |
| Tm | Melting Temperature (Température de fusion) |
| Tr/min | Tours par minute |
| UFC (CFU) | Unité formant colonie (Colony Forming unit) |
| UNG | Uracile N-DNA glycosylase |

2 INTRODUCTION

Autrefois très rares, les infections fongiques invasives ne concernaient qu'un nombre restreint de sujets débilisés et signaient l'évolution terminale de leur pathologie. Depuis une trentaine d'années, le progrès des thérapeutiques immunosuppressives et l'essor de la chirurgie ont favorisé une augmentation progressive de ces fongémies. Les infections fongiques invasives impliquent les infections à levures, représentées en majorité par les *Candida*, et les infections à champignons filamenteux, dominées par les *Aspergillus*. Les levures du genre *Candida* sont pour l'essentiel des hôtes commensaux du tube digestif, de la peau ou des muqueuses, inoffensives chez le sujet sain. Dans certains cas, la défaillance du système immunitaire offre des conditions de développement favorables à ces champignons qui adoptent alors un véritable comportement opportuniste. *C. albicans* et *C. glabrata* font partie des espèces dont l'habitat naturel est le tube digestif humain. Ils sont les plus fréquents responsables de candidoses profondes ou candidémies.

Face à ces infections polymorphes au pronostic très sombre, le clinicien est demandeur d'outils diagnostics précoces permettant d'établir un traitement d'urgence. En effet, le diagnostic de candidose disséminée repose sur des arguments cliniques, radiologiques et biologiques généralement tardifs. Néanmoins, il est souvent difficile car les signes et les symptômes ne sont pas caractéristiques. Fréquemment, la preuve diagnostique, c'est-à-dire l'isolement de *Candida* à partir d'un site normalement stérile, manque ou est trop tardive. De plus, les prélèvements non sanguins, lorsqu'ils sont positifs, posent un problème d'interprétation : la frontière entre pathogène (invasion) et contaminant (colonisation) étant parfois difficile à définir.

Pour confirmer le diagnostic de candidose invasive à dissémination hématogène, la référence reste l'obtention d'une hémoculture positive à *Candida* sp. Malheureusement cette technique, de faible sensibilité, reste souvent négative. C'est pourquoi depuis les années 1975, d'autres outils diagnostiques ont été mis en place, comme la recherche d'antigènes et d'anticorps circulants dans le sang, ou sont en développement, comme la mise en évidence d'ADN fongique circulant.

Le galactomannane, composant spécifique de la paroi cellulaire du genre *Candida*, permet la détection combinée de l'antigène circulant et des anticorps anti-mannane de *Candida*. Cette recherche peut être combinée à la détection des anticorps anti-mannane de *Candida*. Cette association technique n'est pas encore formellement retenue dans l'arbre diagnostique des candidoses invasives ; pourtant sa répétition, permet de réaliser un véritable suivi sérologique des patients à risque.

Afin d'améliorer la sensibilité et surtout la spécificité de ces tests, diverses techniques d'amplification génique (PCR) ont été développées. Les techniques de biologie moléculaire vont-elles apporter une solution véritablement satisfaisante ? Elles ne sont déjà plus réservées aux recherches fondamentales. Les progrès techniques font disparaître peu à peu les facteurs limitants de ces méthodes. L'extraction de l'ADN est désormais réalisable rapidement. Durant les dernières années, plusieurs publications ont montré l'intérêt de la PCR pour le diagnostic des candidoses disséminées. Elles ont précisé la sensibilité extrême de la méthode avec un seuil de détection du génome de *C.albicans* de l'ordre de dizaines de fentogramme par échantillon. La spécificité semble également excellente. La positivité de la PCR chez certains patients à haut risque suggère la possibilité d'identifier et de traiter très précocement les patients de ce groupe qui développent ultérieurement une infection systémique.

Dans le but d'améliorer le diagnostic précoce des candidoses invasives au CHR de Metz, nous avons adapté une PCR classique pour développer une technique de PCR en temps réel spécifique du genre *Candida* et capable de différencier également les cinq espèces les plus incriminées de ce genre. Dans cette thèse nous rapportons l'optimisation, à partir de souches de *Candida* cultivées in vitro, de cette technique d'amplification génique et son application à des échantillons sanguins prélevés chez 17 patients atteints de candidoses profondes.

3 LES INFECTIONS A *CANDIDA* sp.

3.1 Epidémiologie et pathogénie des *Candida*

3.1.1 Biologie des levures

3.1.1.1. Physiologie des champignons - Généralités

Les levures du genre *Candida* appartiennent à un règne bien individualisé au sein du monde vivant : les champignons et plus particulièrement aux champignons microscopiques ou micromycètes.

Les champignons ont une physiologie particulière : étant dépourvus de chlorophylle, ils doivent trouver leur carbone dans les composés organiques. Cela conditionne leur vie qui est saprophytique ou parasitaire, ou l'une et l'autre. Ils sont généralement aérobies et croissent à des températures très variables, une température de 20 à 30°C leur étant souvent favorable. Ils supportent des variations de pH considérables, la neutralité leur convenant très bien [8].

Parmi les micromycètes, les deutéromycètes englobent des espèces dont on ne connaît pas la reproduction sexuée. Cette division comprend les levures blastomycètes auquel appartient le genre *Candida* dont les éléments fongiques se reproduisent par bourgeonnement, les hyphomycètes (champignons filamenteux) ainsi que les coelomycètes (champignons filamenteux avec pycnides ou acervules). [Annexe n°1]

Les levures sont des organismes eucaryotes, immobiles qui se reproduisent au moyen de spores. A la différence des bactéries, les champignons possèdent un noyau entouré d'une membrane nucléaire, un réticulum endoplasmique et des mitochondries. Ils possèdent également une membrane riche en ergostérol et des microtubules constitués de tubuline.

3.1.1.2 Morphologie et caractères des *Candida*

Un champignon se détermine par l'aspect macroscopique et microscopique de ses colonies et par ses caractères physiologiques.

3.1.1.2.1 Morphologie

Ces levures ont des formes variées : rondes, ovoïdes, ellipsoïdes, allongées, apiculées, triangulaires etc. Leur forme et leur taille peuvent varier selon le milieu. En milieu solide les colonies de *Candida* sp. sont crémeuses à muqueuses, de couleur blanc à beige et de surface lisse.

Les *Candida* ont un mode de reproduction végétatif asexué : le bourgeonnement. Une évagination apparaît à un point de la cellule mère. Le bourgeon grandit peu à peu et forme une nouvelle cellule qui se détache de la cellule mère. Certaines espèces de *Candida* peuvent parfois donner naissance à des éléments très allongés (pseudofilaments ou pseudomycelium), soit *in vitro*, en fonction des milieux utilisés (4 heures suffisent à *C. albicans* pour former un tube de germination dans du sérum à 37°C), soit *in vivo*, (*Candida* sp. passant de l'état saprophyte à l'état pathogène). Cette pseudofilamentation est en réalité une succession de bourgeons, produits en chaînes ramifiées, qui ne se détachent pas entre eux, ni de la cellule mère et conduisent ainsi à un aspect buissonnant, édifice assez instable, pouvant se désarticuler à tout moment. [Annexe n°2]

Candida albicans présente un type de chlamydospore particulier : il s'agit de spores rondes, de grande taille (10 à 15µm), à paroi épaisse qui se forme sur les filaments. Elles sont toujours terminales. On ne connaît pas leur signification car contrairement aux chlamydospores observées dans d'autres champignons, elles ne filamentent jamais.

3.1.1.2.2 Caractères physiologiques, biochimiques et caryotype [35,92]

Les levures produisent l'énergie nécessaire à leur synthèse en oxydant et/ou en fermentant certains composés carbonés et azotés. L'étude des caractères physiologiques des levures est exploitée pour leur diagnostic. Ainsi, par exemple, l'assimilation des sucres et du nitrate, la résistance à un antifongique (actidione) et la température de croissance permettent l'étude de *C. albicans*.

Les techniques d'analyse moléculaire ont permis d'établir la carte des chromosomes de certains *Candida*. On a ainsi dénombré, selon les techniques utilisées de 8 à 11 chromosomes pour *C.albicans* et 5 pour *C tropicalis*.

3.1.1.2.3 Caractères sérologiques

La paroi de la levure *Candida* est constituée d'une membrane phospholipidique et de mannanes liés à des protéines et à des glucanes. Ces mannanes représentent les déterminants antigéniques de la levure [34,84,143].

Cette structure antigénique des levures et son application en diagnostic immunologique ont été étudiées depuis de nombreuses années. C'est en 1960, que Hasenclever démontre qu'il existe 2 sérotypes pour *C.albicans* : le sérotype A, le plus répandu en Amérique et en Europe, le sérotype B, plus fréquent en Afrique sans qu'il n'existe de pathogénicité différente entre les deux sérotypes. Des travaux complémentaires ont montré par ailleurs une résistance plus fréquente du sérotype B à la 5 fluorocytosine [92].

En 1970, les travaux de Tsuchiya et collaborateurs, basés sur la composition des polysaccharides thermostables de la paroi permettent de séparer les levures en 5 groupes antigéniquement indépendants. L'application pratique de ces découvertes a vu le jour avec les anticorps monoclonaux permettant d'identifier, par simple agglutination sur lame, les principales espèces incriminées en pathologie humaine [164].

3.1.1.3 Epidémiologie

Depuis les années 1970 la fréquence des mycoses systémiques est en constante augmentation.

Aux Etats-Unis entre 1980 et 1990, elle est passée de 2,0 à 3,8 infections pour 1000 hospitalisations. Toutes les structures hospitalières furent touchées, des grands centres universitaires aux hôpitaux de petite taille [10]. Des études autopsiques ont confirmé cette augmentation de fréquence des infections fongiques profondes de 1,6 à 4,1% entre 1978-1982 et 1988-1992 [173]. En France, entre 1995 et 1997, vingt huit centres parisiens ont recueilli des données concluant à une incidence de 2,2 pour mille admissions [57]. Concernant plus particulièrement les unités de réanimation nord-américaines, des données récentes de la National Epidemiology of Mycoses Survey, montrent une incidence de 9,8 à 12,3/1 000 admissions [145].

Aujourd'hui près de 10% des infections nosocomiales aux Etats-Unis et 4 à 5 % en France sont d'origine fongique, principalement à *Candida* sp [113].

En terme de mortalité ces infections sont des plus préoccupantes : *Candida* se place au premier rang des micro-organismes isolés d'hémocultures [38]. Le genre *Candida* représente 70 à 80 % des hémocultures prélevées au cours de mycoses profondes et il arrive ainsi au 4^{ème} rang des septicémies voire même au 3^{ème} dans de nombreuses unités de soins intensifs [10,52,163]. Dès 1988, il était démontré que la survenue d'une candidémie était associée à une mortalité globale de 57% avec une mortalité spécifique de 38% aux Etats-Unis [8,180].

Les données françaises de 1999, montrent une situation identique avec une mortalité globale et directement attribuable à *Candida* de respectivement 56% et 31% [100].

On note également une modification de la diversité des espèces en cause. Même si *Candida albicans* continue de prédominer on voit de plus en plus d'infections à *Candida non-albicans* ; quatre espèces sont responsables de 80 à 90% de ces candidémies : *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. glabrata* [71,87,133,135,162,173].

3.1.1.4 Les espèces du genre *Candida* [6,19,142]

De nombreuses espèces appartenant au genre *Candida* sont impliquées en pathologie. La plus fréquente est *C.albicans*, elle représente plus de 60% de toutes les levures isolées chez l'homme. C'est un commensal des cavités naturelles, en particulier du tube digestif. D'autres espèces sont également rencontrées en pathologie humaine ; par ordre de fréquence décroissante on trouve :

- *Candida (ex Torulopsis) glabrata*, il vit aussi en commensal dans les voies génito-urinaires et l'intestin de l'homme. Son incidence a augmenté ces dernières années sous la pression des antifongiques azolés, notamment en hématologie. Il représente actuellement 10 à 20 % des isolats [162].

- *Candida tropicalis*, rencontré aussi bien sur les muqueuses que sur la peau saine, est responsable de septicémies [153].

- *Candida parapsilosis* est aussi une levure commensale de la peau. Elle est à l'origine de lésion de la peau ou des ongles. Par ailleurs, elle est impliquée dans des septicémies (2^{ème} place après *C.albicans*) provoquées par des cathéters souillés [133].

- *Candida dubliniensis*, espèce découverte en 1995, se rapproche de *Candida albicans* de par ses caractéristiques morphologiques (filamentation) et chromogéniques sur milieu ChromAgar[®]BD [17,62]. Certaines techniques d'identification peuvent donc être prises en défaut, au bénéfice de l'espèce *albicans* [26,51,59,61,138].

Il faut aussi citer certains *Candida* d'origine alimentaire : *Candida kefir* issu de produits laitiers fermentés, *C. krusei* dont l'émergence chez les malades cancéreux est attribuée à sa résistance primaire au fluconazole, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. norvegensis*, etc.

3.1.2 Physiopathologie des infections systémiques à *Candida* : de la colonisation à l'infection

La majorité des champignons qui se déposent sur notre peau ou qui sont inhalés ne produisent aucun dommage, car les barrières mécaniques ou de défenses immunologiques sont efficaces pour arrêter leur pénétration et leur développement. Mais l'existence de facteurs favorisants, intrinsèques ou extrinsèques, modifiant les défenses de l'organisme permet aux organismes opportunistes de créer des lésions au niveau de divers organes.

Le pouvoir pathogène des champignons opportunistes varie d'une espèce à l'autre ; en effet, il est quasi nul dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae* tandis que quelques arthrospores seulement suffisent à *Coccidioides immitis* pour être infectant [63].

Les levures du genre *Candida* sont des commensaux du tractus digestif (dès la sphère oropharyngée) et du tractus génito-urinaire. Dans le tube digestif, les levures cohabitent avec les bactéries de façon naturelle ; la compétition entre ces deux flores entraînant un certain équilibre [91].

L'importance des candidoses a été sous estimée pendant longtemps pour plusieurs raisons :

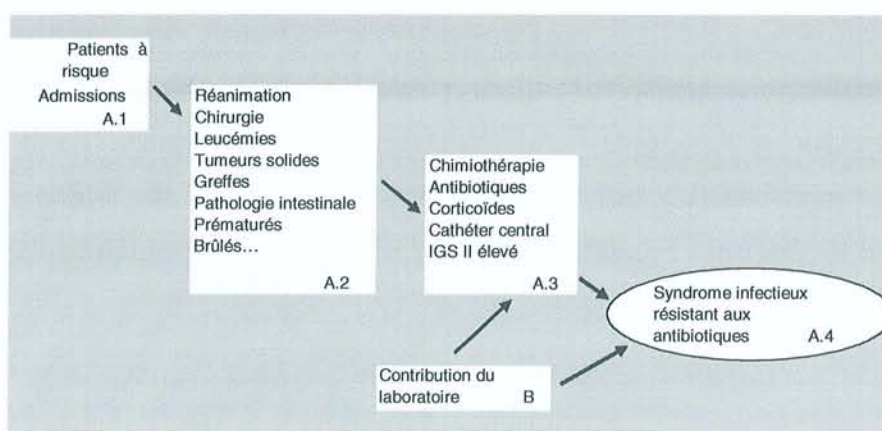
- le pouvoir pathogène des levures a longtemps été jugé négligeable car ne présentant aucun danger pour le sujet sain dont elles sont un commensales ;
- les candidoses étaient considérées comme un évènement annonciateur d'un pronostic défavorable plutôt que comme sa cause, l'un et l'autre pouvant en fait coexister ;
- l'assimilation des *Candida* à de simples opportunistes avant leur mise en évidence comme véritables agents pathogènes au cours des infections par le VIH ;
- les thérapeutiques modernes, qui de plus en plus efficaces, sont aussi de plus en plus agressives, favorisant le développement des *Candida*.

La colonisation du tube digestif chez les individus sains varie d'un sujet à l'autre. Par ailleurs aucune étude menée n'a permis de conclure quant aux facteurs de risque de colonisation intestinale : certains facteurs nutritionnels, des additifs alimentaires, des polluants, la pilule oestroprogestative, certains médicaments ou bien encore le diabète insulinodépendant pourraient être associés à une colonisation intestinale à *Candida* [95].

Les modifications de l'écologie de la microflore résidente, induites par l'administration d'antibiotiques, sont des facteurs potentiels d'infection qui favorisent la croissance des *Candida* [130]. Ainsi, les patients susceptibles de passer d'un état colonisé à celui d'infecté, sont généralement ceux dont la prise en charge est lourde (hématologie oncologique, cancérologie, réanimation chirurgicale et médicale, pédiatrie, brûlés et gériatrie) [37]. Lorsque l'intégrité des muqueuses colonisées est rompue, une infection localement invasive se développe et une dissémination hématogène secondaire peut alors s'ensuivre à l'occasion d'une baisse même transitoire de l'immunité [87,145]. Toutefois, cette colonisation seule ne suffit pas pour développer une infection, puisque avec plus de trois sites colonisés, la sensibilité pour développer une candidose systémique est de 45% pour une spécificité de 72% [139]. [Fig. 1]

Le plus souvent, les formes cliniques miment des infections bactériennes et c'est souvent un syndrome infectieux résistant aux antibiotiques qui fait évoquer le diagnostic de candidose profonde. La candidose systémique débute alors généralement par une dissémination des *Candida* à point de départ digestif mais peut être liée à une infection locale (cathéter, péritoine, poumon) [142].

Chez les patients survivant à cette translocation, les *Candida* diffusent par voie hématogène et déterminent des foyers infectieux dans de nombreux organes, dont la nature dépend de l'état physiologique de l'hôte : hépatospléniques des patients d'onco-hématologie, rénales, articulaires, chorioretinites. Pendant longtemps ces dernières ont été considérées comme le diagnostic de certitude des candidoses systémiques.



De A1 à A4 : Cumul des facteurs de risques et probabilité accrue de candidose profonde
(adapté d'après Wenzel)

B : Patients pour lesquels l'évaluation des paramètres mycologiques et sérologiques peut contribuer à poser un diagnostic spécifique (dont l'index de Pittet)

Figure 1 : Infections systémiques à *Candida* : de la colonisation à l'infection [142]

3.1.3 Facteurs favorisant des candidoses

Le genre *Candida* présente de nombreuses spécificités par rapport aux infections déterminées par des pathogènes d'autres taxons, bactéries notamment. Le parasitisme n'est pas nécessaire à la multiplication ni à la dissémination de *C. albicans* mais conditionné par une baisse transitoire des défenses locales ou générales de l'hôte. Les facteurs de virulence *stricto sensu* n'étant pas connus, nous pouvons considérer des facteurs propres à la levure favorisant la pathologie, et des facteurs indépendants d'elle.

3.1.3.1 Pathogénicité du genre *Candida*

Il a été suggéré une « versatilité » de *C. albicans*, lui permettant une adaptation rapide aux différentes conditions du « milieu »; ceci pourrait expliquer sa prépondérance en pathologie humaine. D Soll a démontré que les souches pathogènes présentaient une fréquence de “phenotypic switching” plus élevée que les souches commensales et que cette fréquence affectait la virulence et intervenait dans la pathogénèse [159].

On note également une adaptation cellulaire impliquant d'une part des protéines enzymatiques (dont des protéases) et d'autre part des protéines structurales : faculté de *C. albicans* à produire des filaments (pseudo-mycelium et mycelium). Ces tubes germinatifs ont le pouvoir de pénétrer les tissus humains et c'est la forme sous laquelle *C. albicans* s'échappe des phagocytes [31,144,178].

Des travaux récents ont mis en évidence que les souches de *Candida* dites virulentes *in vivo* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) sont statistiquement plus adhérentes au polychlorure de vinyle (PVC) que les souches non virulentes dites de colonisation (*C. kefyr*). Cette observation suggérait une relation entre l'adhérence de *Candida* aux différents supports et sa virulence en clinique humaine. Le biofilm ainsi constitué par les *Candida* est également retrouvé sur les surfaces en téflon et en silicone [86].

Enfin, cette étude a démontré qu'il existe une grande variabilité du pouvoir d'adhérence du genre *Candida* en fonction de l'espèce mais également au sein de l'espèce en suivant la souche même. Ainsi les *Candida non-albicans* possèdent un pouvoir d'adhérence aux surfaces inertes bien supérieur à celui de *Candida albicans*. Ceci explique leur émergence comme nouveaux pathogènes chez les malades des unités de soins intensifs porteurs de matériel (cathéter, prothèse).

Les levures du genre *Candida* présentent des complexes moléculaires constitués de résidus mannoses polymérisés appelés mannanes. Ces déterminants antigéniques activent la voie alterne du complément et sont capables d'inhiber, lorsqu'il circule, la réponse lymphocytaire [84,142].

En 2003, il a été démontré que les phospholipomannanes de *Candida albicans* permettaient à la levure de survivre en induisant l'apoptose de la cellule macrophagique qui tentait de la détruire [77,78,79,85].

Ce phénomène de virulence résulte, d'une part, des caractéristiques de la souche (capacité d'adhésion à la muqueuse notamment intestinale) et, d'autre part, de l'effraction des muqueuses associée à une baisse des mécanismes de défense.

3.1.3.2 Facteurs favorisant liés à l'hôte ou intrinsèques

Des caractéristiques propres à l'hôte, indépendamment de celles du genre *Candida*, peuvent contribuer à la sévérité de l'infection.

Le plus souvent les fongémies sont d'origines endogènes, à partir de la flore saprophyte dont le pouvoir pathogène est exacerbé par des facteurs locaux ou généraux.

Ces principaux facteurs locaux sont l'altération des barrières mécaniques naturelles : présence de cathéters intraveineux centraux ou périphériques, ulcération des muqueuses (mucites réaction des chimiothérapies cytotoxiques ou de la radiothérapie), brûlés, interventions chirurgicales lourdes assurant une porte d'entrée notamment digestive.

Parmi les facteurs généraux, le nombre et la fonction des polynucléaires jouent un rôle important dans la prévention et dans l'évolution favorable des formes de septicémie à *Candida*. En effet, la phagocytose par les polynucléaires prévient la dissémination hématogène. Par conséquent, lors des déficits quantitatifs, les plus fréquents, et/ou des déficits qualitatifs du système phagocytaire, le risque de fongémie est accru.

Les neutropénies sévères (polynucléaires neutrophiles < 1 G/l) et prolongées (> 15 jours) constituent le principal facteur prédisposant aux infections fongiques. On les rencontre en particulier au cours du traitement des hémopathies malignes : leucémies aiguës, et principalement leucémies myéloïdes, et des greffes de moelle osseuse (irradiation, chimiothérapie, corticothérapie, traitement immunosuppresseur). L'incidence et la gravité des accidents infectieux sont directement corrélées à l'intensité et à la durée de la neutropénie. Les mycoses systémiques se situent donc à l'inverse du risque bactérien qui prédomine très largement dans la phase initiale de la neutropénie. Cliniquement ce sont les poumons, les tissus mous, la peau, le périnée et la cavité oropharyngée qui sont le plus souvent atteints dans un tel contexte [150].

Certaines anomalies qualitatives de la fonction phagocytaire facilitent le développement des mycoses profondes. Citons par exemple la granulomatose septique chronique (GSC) qui entraîne un défaut de destruction intracellulaire des micro-organismes catalase positifs dont *Candida* sp. De telles infections se traduisent par des pneumopathies qui peuvent s'accompagner de métastases cutanées, osseuses et cérébrales.

La splénectomie, les déficits en immunoglobulines ou en complément, qu'ils soient congénitaux ou acquis, ne majorent pas le risque de survenue de mycoses profondes. Les réponses lymphocytaires sont très difficiles à évaluer compte tenu du fait que les candidoses invasives surviennent chez des patients dont la réponse immunitaire cellulaire est très perturbée.

Les mycoses systémiques concernent donc essentiellement des patients immunodéprimés, que l'immunodépression soit acquise, liée au VIH [97] ou iatrogène (chimiothérapie, corticothérapie, greffes de moelle osseuse ou d'organes [173]), et l'hospitalisation prolongée en unité de soins intensifs, médicale ou chirurgicale. Environ 25% des candidémies surviennent chez des patients hospitalisés en chirurgie, où elles s'accompagnent d'une mortalité élevée (55%) [60]. Si nous regardons plus particulièrement chez le transplanté d'organe (coeur, poumon, foie, rein) les complications infectieuses demeurent, après le rejet, la principale cause de morbidité (40%) et de mortalité parmi ces patients, 8 à 40 % développent une infection fongique, et dans la moitié des cas celle-ci entraîne le décès [63]. L'âge du patient peut influencer l'espèce en présence et la résistance thérapeutique [136]. Le diabète, la nutrition parentérale et la toxicomanie intraveineuse sont également des facteurs de risque de survenue de mycose profonde [15,112].

En conclusion, les infections fongiques profondes représentent un risque majeur pour les malades immunodéprimés et débilisés. Leur pronostic reste sévère avec une mortalité de 30 à 50 % en cas de candidose profonde, plus élevée chez des patients immunodéprimés (38-76%) [28,132].

3.1.3.3 Facteurs favorisant iatrogènes ou extrinsèques

Parfois l'infection profonde à *Candida* est d'origine exogène : contamination du nouveau-né durant l'accouchement, transmission sexuelle, infections par transmission interhumaine nosocomiale : rôle ici du manuportage par le personnel soignant (à partir des accès vasculaires ou de solutions de perfusion) [47,141] ou du matériel à partir de malades eux-mêmes contaminés. Ces derniers cas sont prépondérants dans les services de soins intensifs et peuvent devenir épidémiques. Les infections fongiques ont représenté 17 % des infections nosocomiales acquises en réanimation, détectées au cours de l'étude européenne de prévalence des infections nosocomiales (EPIC) [171]. Pour la période 1992 à 1997, les données de 115 hôpitaux américains du programme NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) indiquent que près de 12% des infections nosocomiales sont d'origine fongique. Cette étiologie occupe le quatrième rang des infections contractées en établissements de soins, précédée par les entérocoques, *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative [111,149].

Même si globalement les transmissions interhumaines sont rares [65], cette situation doit être intégrée par le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) de chaque établissement de soins hospitaliers publics et privés de France [55,58,180].

Ainsi, la présence des *Candida* a été favorisée par les progrès de l'hygiène hospitalière et de l'antibiothérapie. Désormais, ces levures occupent une position importante en pathologie.

3.2 Manifestations cliniques

Les signes cliniques des infections fongiques profondes sont généralement très peu spécifiques, se réduisant à une fièvre, parfois atténuée sous corticothérapie, irrégulière, désarticulée. L'état général s'altère rapidement. La splénomégalie peut faire tardivement partie du tableau septicémique. Devant ce tableau de fièvre inexpliquée, résistante à l'antibiothérapie, survenant sur un terrain à risque, l'étiologie fongique doit être évoquée.

Les candidoses systémiques, d'origine opportunistes, iatrogènes et/ou nosocomiales; se présentent sous différentes formes cliniques : [137]

- les formes monoviscérales : candidoses osseuses, méningites, péritonites
- les candidoses disséminées aiguës : au moins deux viscères atteints
- les candidoses disséminées chroniques : synonyme de candidose hépatosplénique

Les éléments à rechercher en faveur d'une candidose systémique sont :

- des métastases cutanées sous la forme de maculo-papules, de nodules érythémateux dont la biopsie avec culture et histologie affirme l'étiologie. Chez un patient neutropénique fébrile, l'apparition de lésions macronodulaires, bien circonscrites, initialement de quelques millimètres de diamètre, est extrêmement évocatrice d'une mycose profonde : candidose disséminée, aspergillose invasive, fusariose. Ces localisations cutanées peuvent précéder le diagnostic de mycose profonde par hémocultures ;

- une chorioretinite par un fond d'œil systématique, des lésions caractéristiques parfois sans troubles visuels; l'atteinte oculaire est plus fréquente chez le neutropénique ;

- des micro-abcès au niveau du cerveau, dans le cœur et dans le rein ;

- une candidurie d'apparition soudaine avec des douleurs lombaires et une diminution de la fonction rénale : syndrome présent dans environ la moitié des candidoses invasives. Une candidurie ne signifie pas toujours qu'il existe une véritable infection urinaire mais une colonisation le plus souvent. La présence d'urocultures positives répétées peut être le reflet d'une candidémie « occulte ». Le *fungus ball* est une boule fongique qui se développe dans l'arbre urinaire en cas d'anomalie anatomique (bassinets, vessie) [175] ;

- des douleurs musculaires de myosite infectieuse associée ;

- chez l'héroïnomane, un syndrome septicémique peut comporter successivement l'atteinte cutanée, oculaire et ostéo-articulaire (chondro-costale ou vertébrale).

Notons que les atteintes osseuses, surtout les vertèbres lombaires, sont d'apparition tardive par rapport à un épisode de candidémie présumé bénin.

Les péritonites comportent : fièvre, douleurs abdominales et présence de polynucléaires neutrophiles dans le liquide d'ascite. Les péritonites sur cathéter de dialyse péritonéales restent généralement localisées sans translocation. Les péritonites post-chirurgicales correspondent souvent à un lâchage de sutures intestinales et/ou à un abcès cloisonné dans le péritoine, les métastases viscérales sont fréquentes, le pronostic est mauvais, une ré-intervention est souvent nécessaire.

En néonatalogie : Prématurité avec un très petit poids de naissance, présence prolongée de cathéters intravasculaires et antibiothérapies sont des facteurs majorant le risque de complications infectieuses. La présence d'une candidose buccale peut orienter le diagnostic. Les principales manifestations cliniques sont neuroméningées (50%), articulaires et rénales sur ce terrain. Mais paradoxalement, le pronostic est moins défavorable que chez l'adulte [63]. Notons aussi que certains enfants, en raison d'un rare déficit de l'immunité cellulaire assez sélectif vis-à-vis de *C.albicans*, présentent une candidose chronique touchant les extrémités, les phanères et le tube digestif (granulomes moniliasiques). Des formes plus discrètes peuvent s'observer, en particulier chez l'adulte.

Une forme clinique particulière est la candidose hépatosplénique. Sa fréquence a diminué chez les allogreffés de moelle en raison d'une prophylaxie par fluconazole devenue systématique. La maladie apparaît généralement lors de la sortie d'aplasie et se caractérise par une hépatosplénomégalie fébrile, des douleurs abdominales et des phosphatases alcalines élevées. Le scanner ou l'I.R.M. objectivent de nombreuses lacunes hépatiques et/ou spléniques correspondant à des abcès.

Du point de vue terminologique, ces mycoses doivent maintenant être désignées par les termes de candidose invasive (CI) ou de candidose à dissémination hématogène (CDH) en remplacement du terme trop vague de candidose systémique. Ces dénominations concernent les candidémies avec ou sans envahissement d'un ou de plusieurs organes profonds (œil, rein, cerveau...)[63].

Devant les difficultés diagnostiques et l'absence de signes cliniques formellement évocateurs, l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) et le Mycosis Study Group (MSG) ont réuni un comité pour proposer des critères diagnostiques consensuels en 2002 [7]. Ces définitions reposent sur l'association de critères cliniques et microbiologiques avec des facteurs de risque en oncologie. Trois niveaux de probabilité sont proposés : « prouvée », « probable » et « possible » [14] [Annexes n°3 et 4].

Le diagnostic de candidose disséminée est souvent difficile car les signes et les symptômes ne sont pas caractéristiques. Souvent, la preuve diagnostique, c'est-à-dire l'isolement de *Candida* à partir d'un site normalement stérile, manque ou est trop tardive.

3.3 Diagnostic biologique

Une mycose invasive, qu'elle survienne chez un malade neutropénique transplanté, sidéen ou en soins intensifs, présente toujours un caractère de haute gravité et le pronostic est le plus souvent très péjoratif.

L'issue favorable dépend de deux types de facteurs :

- la restauration des fonctions de défenses de l'organisme
- la prescription précoce d'une thérapeutique spécifique [63]

Pour cela, le clinicien doit pouvoir s'appuyer sur un diagnostic biologique rapide et formel. Or le diagnostic précoce de mycose invasive est souvent difficile en raison des diverses localisations potentielles, de la négativation possible des examens mycologiques par un traitement antifongique préalable et du manque de spécificité ou de sensibilité des méthodes indirectes de diagnostic (sérologie).

La valeur des examens de laboratoire est donc essentiellement conditionnée par l'obtention de prélèvements biologiques appropriés et la sélection des tests mis en œuvre.

Actuellement le diagnostic des candidoses invasives repose essentiellement sur les hémocultures. La détection d'antigènes fongiques (mannane) éventuellement couplée à la recherche d'anticorps est un outil diagnostic intéressant dans certaines situations cliniques. Comme pour tout micro-organisme, le classique diagnostic biologique reposant sur un examen direct suivi d'une culture en vue d'identification de l'agent en présence, a sa place ici.

3.3.1 Diagnostic biologique sur prélèvements non sanguins :

3.3.1.1 Les prélèvements : sites et modalités

La nature des prélèvements à effectuer est guidée par le « terrain » sous-jacent.

Le prélèvement est une étape capitale car de sa qualité dépend la fiabilité des résultats. La technique de prélèvement doit être adaptée au site à prélever. Les lésions suintantes, les muqueuses et les orifices naturels seront prélevés à l'aide de deux écouvillons minimum, en frottant énergiquement.

Le liquide céphalorachidien (LCR), les liquides divers, les pus, les sécrétions bronchiques, les selles seront recueillis dans des récipients stériles. En cas de suspicion de mycose systémique, il faut penser à réaliser des urocultures car la levure est concentrée dans les urines où sa présence est le témoin d'un passage systémique. Chez les malades chirurgicaux, les prélèvements concernent, selon les cas : liquide de drainage abdominal ou biliaire, liquide d'ascite, pus, péritoine, médiastin. Citons aussi les expectorations, les broncho-aspirations, les liquides de lavage broncho-alvéolaire.

Les fragments organiques seront découpés en petits morceaux et mis dans un pot stérile, en prenant soin de fixer dans du liquide de boin, un de ces morceaux qui servira pour l'examen anatomopathologique.

Le matériel biologique ou prothétique (prothèse vasculaire, valve cardiaque, stérilet), les extrémités de cathéters ou de sondes, seront déposés dans un pot stérile afin d'être rapidement acheminés au laboratoire. Ils seront alors agités vigoureusement avec quelques millilitres d'eau physiologique pour en décoller le biofilm ; ce liquide étant alors ensemencé.

Cas particulier des ponctions biopsiques

Toute lésion accessible à la ponction ou à la biopsie avec culture et histologie doit être prise en considération mais il existe souvent des contre-indications à ces explorations agressives (thrombopénies). La biopsie hépatique montre inconstamment de rares levures à l'examen direct ; la culture de la biopsie est très souvent négative.

Le prélèvement après désinfection à l'alcool, doit porter sur un gros fragment de nodule cutané qui est partagé en 2. Un morceau est fixé dans un flacon destiné à l'anatomie pathologique; le second est placé dans un flacon stérile avec quelques gouttes de sérum physiologique stérile pour l'examen mycologique.

Au laboratoire de mycologie, le prélèvement est recoupé pour obtenir au moins une dizaine de petits morceaux que l'on ensemence sur les pentes ou boîtes gélosées en points bien séparés. La lame de bistouri, ayant servi au découpage, recouverte de sérosité, permet de réaliser des frottis pour l'examen direct.

3.3.1.2 L'examen direct

Son rôle est crucial car il peut rester parfois le seul argument biologique.

L'examen direct est réalisé immédiatement.

En cas de positivité, il oriente le diagnostic en fonction des éléments observés et fait suspecter ou confirme la pathogénicité du champignon qui sera isolé. En effet, l'examen direct est primordial car la mise en évidence d'éléments fongiques (levures ou filaments) au sein d'un prélèvement profond et normalement stérile, affirme le diagnostic d'un foyer candidosique profond pouvant disséminer en une candidémie.

L'examen direct, effectué entre lame et lamelle et à l'état frais, se fait soit directement sur un prélèvement liquide, soit avec une goutte d'un liquide de montage ou un agent clarifiant : le noir chlorazol qui conjugue à la fois l'éclaircissement et la coloration (coloration sélective de la chitine qui ressort en vert olive sur un fond cellulaire incolore ou gris). Les échantillons de liquide biologiques peuvent être concentrés par centrifugation de 10 minutes à 1500G. Les expectorations sont en général observées directement ou après un court traitement fluidifiant à l'Acétylcystéine. Les échantillons de selles moulées sont dilacérés dans de l'eau distillée stérile.

La coloration de frottis, d'apposition ou de spot de cytocentrifugation est utilisable pour les fragments organiques, les pus, les expectorations, les écouvillonnages et les culots de concentration liquidienne. Après avoir été fixés, les frottis sont colorés avec les techniques suivantes : coloration de May-Grünwald-Giemsa, la coloration de Gram (tous les champignons sont gram⁺ : le cytoplasme des éléments fongiques est coloré en violet et la paroi reste blanche), colorations mycologiques (Noir chlorazol et bleu de lactophénol) et les colorations usuelles d'anatomopathologie.

Les levures se distinguent nettement des bactéries par leur taille plus importante et leur forme. La présence d'éléments bourgeonnants de 1 à 10 μm , ovales ou ronds, à paroi mince, non capsulés, accompagnés ou non de filaments mycéliens de longueur variable permet de suspecter ou de diagnostiquer la présence de levures du genre *Candida*. Le diagnostic différentiel doit ici être fait avec les *Cryptococcus* (levure encapsulée), des spores unicellulaires de champignons filamenteux, des cryptosporidies dans les selles pouvant simuler l'aspect de levures (formes bourgeonnantes toujours absentes dans ce cas), et avec des hématies collées par 2 ou en début de lyse, et il faut être sûr d'observer de vrais éléments bourgeonnants (avec un contenu cellulaire).

Cependant l'absence d'élément fongique visible à l'examen direct ne signifie pas nécessairement l'absence de champignons. En effet, il faut que l'échantillon contienne au minimum 10^4 à 10^5 éléments / ml pour que le champignon puisse être détecté [116].

3.3.2. Hémocultures

Le diagnostic d'une candidose invasive repose essentiellement sur deux types d'éléments : la visualisation du champignon dans des prélèvements biopsiques (blastospores/pseudomycélium) et la mise en évidence de la dissémination hématogène des levures par hémoculture. Tous les autres prélèvements (crachats broncho-alvéolaires, urines, drains chirurgicaux...) s'ils sont positifs, ne sont que les témoins d'une colonisation mais pas forcément d'une invasion.

L'ensemencement d'un flacon d'hémoculture nécessite une ponction veineuse périphérique introduisant une quantité de sang standardisée par le vide du flacon. Cette technique peut donc être qualifiée de non invasive.

L'hémoculture a largement bénéficié de l'amélioration des milieux et des systèmes de détection des agents infectieux dans le sang circulant. Les premières techniques consistaient en une lyse-centrifugation, devenue désuète depuis l'apparition d'automates. Toutefois, un problème majeur persiste avec ces derniers : la faible sensibilité des hémocultures (40 à 60% selon les études) lors de candidoses disséminées ou invasives, même si leur spécificité proche de 100% permet aisément un diagnostic de certitude.

Parmi les automates à hémoculture deux d'entre eux semblent les plus performants : le BACTEC 9240 de Beckton Dickinson Diagnostic Systems® et le BacT/Alert de Biomérieux® [117,118].

En 1999, Reisner et al. ont mené une étude sur le Bactec 9240 qui a démontré que si l'on détectait la plupart des bactéries importantes en pathologie humaine en 4 jours, il fallait patienter 6 jours pour déceler les levures de même importance clinique [146]. Ces résultats étaient donc semblables à ceux déjà décrits en 1992 pour le système BacT/Alert [66].

En 2003, Horvath et al. ont mené une étude qui a retrouvée une sensibilité de 59% sur BACTEC 9240, après correction par subculture [73]. Leurs résultats démontraient que le temps de détection moyen des levures était de 24 heures en flacon aérobie et plus long en anaérobiose ; des flacons se positivant jusqu'au 8^{ème} jour. Paradoxalement *Candida glabrata* était détecté en 24 heures environ en milieu anaérobie contre 6 jours en aérobie. L'oubli de prélèvement du flacon anaérobie expose donc au diagnostic tardif de fongémie à *C. glabrata* voire à une absence de diagnostic [151].

Toujours en 2003, cette même équipe texane [74] a repris son principe de simulation de candidémie par inoculum, pour mener une étude comparative entre le BACTEC 9240 et le BacT/Alert. Très globalement, bien que la technologie de détection du BacT/Alert soit supérieure à celle du BACTEC 9240, les deux automates avaient des temps et des sensibilités de détection voisins pour les flacons aérobies et anaérobies. Toutefois, même si les flacons spécifiques pour la détection mycologique donnent l'avantage au BACTEC 9240, *C. glabrata* nécessite toujours un temps de détection supérieur aux autres espèces.

Du point de vue technique, les hémocultures bénéficiant d'une lecture automatisée ne présentent pas de lourdeur particulière dans leur mise en œuvre (lecture d'émission de fluorescence indiquant la quantité et le taux de CO₂ produit, reflet de la croissance microbiologique). En cas de sélection positive par l'automate, un examen direct devra être immédiatement entrepris sur ce flacon, afin d'orienter le clinicien. A ce stade il n'est pas possible de diagnostiquer une association de levures, seule une association levure-bactérie est accessible à la coloration de GRAM.

Bien que de faible sensibilité vis-à-vis des levures, l'hémoculture est cependant un examen de valeur diagnostic des candidoses invasives.

Les vastes études réalisées au cours de ces dernières années montrent qu'il faut tenir compte :

- de la positivité de l'hémoculture même si une seule est positive (c'est le cas du tiers des maladies avec candidose invasive), le pronostic n'étant pas significativement différent de celui des malades qui ont eu plusieurs hémocultures positives. Dans les deux groupes, la mortalité est proche de 50%.

- de toute levure présente dans une hémoculture, quelle que soit l'espèce en cause : 49% des candidémies sont dues, en cancérologie, à des *Candida non-albicans* et leur pronostic est tout aussi défavorable que celui des fongémies à *C. albicans*, comme nous l'avons vu précédemment [151].

En résumé, nous pouvons donc dire qu'autrefois, les hémocultures étaient considérées comme le reflet d'une simple fongémie (trois hémocultures successives à 24 heures d'intervalle étaient nécessaires pour justifier la mise en œuvre d'un traitement) ; alors que depuis le début des années 90, la nécessité de traiter face à une seule hémoculture positive est maintenant bien établie. Cependant les hémocultures se positivent dans un délai de 24 heures à une semaine et manquent de sensibilité (50 %) [146]. Puis l'identification d'espèce requiert ensuite au minimum 24 heures supplémentaires [72] voire plus selon la méthode utilisée.

En conclusion, même si une seule hémoculture positive suffit pour porter le diagnostic, tous ces motifs font que ce type de technique diagnostique ne peut être considérée comme un véritable « gold standard » du diagnostic de candidose invasive (CI) ou de candidose à dissémination hémotogène (CDH).

3.3.3 Les cultures

3.3.3.1 Les milieux de culture

Les cultures sont indispensables pour pouvoir isoler et identifier le champignon et éventuellement tester sa sensibilité aux antifongiques.

Il faut préférer la boîte de Pétri au tube, car elle a l'avantage de présenter une surfaceensemencée plus importante. Ceci permet un bon isolement des colonies et une meilleure visualisation des associations et des bactéries.

Le milieu de Sabouraud-chloramphénicol et/ou gentamycine est le milieu classique qui permet d'isoler la totalité des levures. Il ne faut pas utiliser de milieux contenant de l'actidione qui inhibe la croissance de certaines levures.

3.3.3.2 Ensemencement

Les boîtes sontensemencées de façon stérile, en déposant le prélèvement au bord de la boîte et en isolant parfaitement par épuisement, en réalisant un maximum de cadrans. Les écouvillons sont déchargés par rotation sur un rayon ou dans un cadran, puis l'isolement est repris en cadran. Les fragments organiques, les biopsies et les produits de curetage sont soit frottés directement, soit broyés dans du sérum physiologique. Quelques gouttes du liquide surnageant sont alorsensemencées. Les fragments de cathéters et les embouts d'appareillages, seront agités vigoureusement, pendant 2 à 3 minutes, avec quelques gouttes d'eau physiologique stérile. Puis ces dernières seront prélevées à la pipette, pour ensemencement. Pour les prélèvements liquides, il faut déposer le culot ou quelques gouttes du liquide lui-même.

3.3.3.3 Incubation

La température d'incubation généralement choisie est de 30°C. La durée d'incubation est d'environ 2 à 3 jours. Toutefois pour les prélèvements profonds il est recommandé d'attendre jusqu'à une semaine : *Candida glabrata* pouvant n'apparaître qu'au 5^{ème} jour.

3.3.3.4 Lecture

La lecture s'effectue après 24 heures puis 48 heures et éventuellement encore à cinq jours.

Dans le cas des levures comme *Candida*, il est important d'évaluer le nombre de colonies. Un comptage exprimé en nombre de CFU/mL serait plus précis mais sa reproductibilité impose une standardisation au minimum au sein même du laboratoire. Ceci est possible pour les urines,ensemencées au « rateau » de 100 µL ou à l'öse de 10 µL, mais est beaucoup plus difficile pour les crachats ou les selles par exemple. « Chez un patient à risque » le plus important peut être de suivre l'évolution de la colonisation. Cette surveillance hebdomadaire couplée aux facteurs de risque d'infection fongique rentre dans le calcul de l'index de Pittet, score au-delà duquel un traitement précoce par fluconazole est instauré [29,139,140].

3.3.3.5. Identification

Les caractères utilisés pour l'identification des *Candida* sont très nombreux. Dans la pratique courante au laboratoire, l'identification des levures est basée sur la détermination de caractères morphologiques, physiologiques, structuraux (biochimiques) ou immunologiques (identification à l'aide d'anticorps monoclonaux avec un test d'agglutination). Classiquement, l'identification de *C. albicans* est basée sur la filamentation en sérum en 3 à 4 heures d'incubation à 37°C (test de blastèse ou de Tshadjian). De manière plus standardisée, le biologiste peut disposer d'autres possibilités d'identification que les seuls caractères structuraux et morphologiques étudiés sur milieu Rice Agar Tween (RAT) ou milieu au Tétrazolium : milieux chromogènes, test d'agglutination et mini galerie d'identification [122].

Il existe des milieux d'isolement chromogènes (utilisables en primo-culture) avec détection sélective de *C.albicans* : Candiselect® (Biorad), *Candida* ID®/ID2® (Biomérieux). Sur ces milieux les colonies de *C .albicans* sont colorées en bleu turquoise à vert-gazon [5,50,51]. Un milieu chromogène encore plus performant a été développé par Becton Dickinson : BD CHROMagar *Candida*®. Ce milieu colore différemment les quatre espèces de *Candida* les plus fréquemment incriminées : *Candida albicans* (colonie grasse et vert clair à vert-gazon), *C. tropicalis* (colonie +/- sèche et bleu turquoise), *C. krusei* (sèche et vieux rose) et enfin *C. glabrata* (grasse et rose fuchsia). Ainsi ce dernier milieu présente de nombreux avantages par rapport à ses concurrents : excellente performance comme milieu d'isolement sélectif, détection facile de cultures mixtes de levures, précision supérieure pour l'identification de *C. albicans* et couleur spécifique des quatre espèces sus-citées à partir de la 24^{ème} heure d'incubation [185]. [annexe n°5]

Citons également deux milieux de culture spécifiques d'espèce : Krusei-color® et Glabrata RTI® (Fumouze Diagnostics) qui permettent une identification rapide. [182].

Le test d'agglutination des antigènes pariétaux : le test Bichro-latex Albicans (Fumouze) permet l'identification de *C. albicans* en 5 minutes à partir de colonie de primo-culture. Ce test est d'une grande sensibilité mais ne permet pas de diagnostiquer une association.

Il existe, sur le marché du diagnostic *in vitro*, des mini galeries d'identification : Auxacolor[®] et Fongiscreen[®]4H (Biorad, Marnes la Coquette, France); cette dernière permet d'identifier en quatre heures 4 espèces (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *Cryptococcus neoformans*) par détection d'activités enzymatiques.

Si les primo-cultures précédentes n'ont pas abouti, il faudra alors réaliser des galeries d'identification basées sur les caractères biochimiques distincts de chaque espèce. La société Biomérieux commercialise deux types de galerie : ID32C et Api20C moins performante, car ne permettant pas la distinction entre les *Candida albicans* et *dublinsiensis* (plus fréquent chez le sidéen) [103,169].

Notons également Rapid Yeast Plus System (Remel, Innovative diagnostic Systems, Norcross, Ga.) et toujours chez Biomérieux[®] Vitek YBC system et Vitek 2 ID-YST system, plus rapide que la classique galerie API32C [44,115,138].

Ces galeries d'identification,ensemencées à partir des colonies de primo-culture, nécessitent donc 96 à 120 heures de délai entre le prélèvement et le rendu de résultat ; alors qu'il n'est que de 24 à 48 heures en utilisant BD CHROMagar *Candida*[®] comme premier milieu de culture.

Le but principal de ces galeries est donc l'identification de *Candida* dans un site stérile. Très souvent, avec des prélèvements non sanguins, il est difficile de trancher entre colonisation ou réel marqueur de dissémination fongique et donc de conclure en faveur d'une véritable invasion fongique.

3.3.4 Index de colonisation de Pittet

La relation entre le nombre de sites colonisés et le risque de candidémie est indiscutable : la probabilité de candidémie passe de 5% si un seul site est colonisé à 22% si plusieurs sites le sont [140]. Pittet et al. ont défini un « index de colonisation » (IC) en rapportant le nombre de sites colonisés à *Candida* sp. au nombre de sites distincts prélevés [139]. Un IC supérieur à 0,5 est associé à un risque très significatif de voir se développer une candidose sévère (sensibilité : 100%, spécificité : 69%). Chez les patients simplement colonisés, l'IC moyen est 0,47 et la mortalité est de 11% alors qu'en cas de candidose systémique, l'IC moyen est de 0,7 et la mortalité atteint 55%. Pourtant, une enquête transversale menée en 2001 dans 704 unités de soins intensifs français, par Dupont et al. a montré qu'un tel index n'était appliqué que dans une minorité de service CHU (14%), CHG (10%) ou établissement privé (8%) [36].

Par la suite, Chabasse a démontré qu'il existe une corrélation significative ($p=0,003$) entre une candidurie importante, supérieure à 10^4 CFU/ml et un index de colonisation de Pittet élevé (nombre de sites positifs/nombres de sites prélevés $\geq 0,5$). La quantification de la candidurie pourrait ainsi permettre de sélectionner les patients à haut risque d'infection disséminée à *Candida* [20,139].

Le plus souvent les prélèvements non sanguins, guidés par des points d'appel cliniques, ne sont donc que des éléments d'orientation et de diagnostics supplémentaires mais ils peuvent être utilisés pour affirmer l'origine de la candidémie (extrémité d'un cathéter central par exemple).

3.3.5 Diagnostic sérologique

La faible sensibilité des hémocultures a favorisé le développement de nouveaux tests diagnostiques. Ceux-ci s'appuient sur la recherche d'antigène et / ou d'anticorps.

3.3.5.1 Détection d'antigène candidosique dans le sang circulant

Un test commercial d'agglutination sur latex, le Cand-Tec (Eurobio, Les Ulis, France), utilise des antigènes non définis, ce qui en fait un test certes sensible mais nettement moins spécifique que la recherche immuno-enzymatique de mannane pour le diagnostic de candidose invasive [101].

Un autre test s'appuie sur l'agglutination de particules de latex : le Pastorex[®] *Candida* (Biorad, Marnes la Coquette, France). Sa sensibilité théorique est de l'ordre de 5 ng de mannane / ml de sérum [notice fabricant]. Ce test bien que très spécifique est peu sensible. Ce défaut est dû au format (latex) et surtout à la clairance rapide des antigènes dans le sang majorée par la présence d'anticorps spécifiques. En effet les résidus mannanes sont très rapidement métabolisés. L'antigénémie détectée est donc transitoire, ce qui nécessite la répétition du test, chez un même patient, pour en améliorer la sensibilité [69,76].

Ce même anticorps monoclonal a servi au développement d'un nouveau test immuno-enzymatique donc standardisé : le Platelia[®] *Candida* Ag (Biorad[®], Marnes la Coquette, France). La sensibilité théorique passe à 0,5 ng de mannane /ml de sérum [notice fabricant]. Ce test conserve la spécificité (98%) tout en améliorant la sensibilité. Cette dernière passe ainsi de 20 à 40% mais laisse encore beaucoup de faux négatifs, le facteur limitatif résidant toujours dans le caractère fugace de l'antigénémie [158].

Des chercheurs japonais ont développé une technique de détection de β -1,3-D-glucane non commercialisée en France (Fungitec G-test[®]). Mais le glucane est présent aussi bien dans les levures (*Candida*) que dans les champignons filamenteux (*Aspergillus*) ; une utilisation couplée à celle du galactomannane sera sans doute évaluée à l'avenir afin de mieux définir l'intérêt et la place d'une telle détection [119,121].

Enfin de nombreux travaux ont été consacrés à la détection de protéines et de métabolites mais sans suite effective dans notre pays. Citons par exemple les tests ciblés sur l'énolase qui n'ont pas été commercialisés en France [177].

3.3.5.2 Détection d'anticorps anti-candidosiques dans le sang circulant

Des tests de détection d'anticorps pour le diagnostic de candidoses ont été développés dans les années 70. Ces tests sérologiques ont un intérêt limité du fait d'une part de la faible réponse anticorps des patients immunodéprimés par ailleurs souvent transfusés, et d'autre part de la difficile distinction entre infection et colonisation. [128] Cette dernière notion impose que la méthode se fixe un seuil de positivité qui soit le meilleur compromis sensibilité/spécificité. Des titres très élevés, jamais observés chez les sujets colonisés, témoignent alors de l'existence d'un foyer fongique. Enfin puisque la colonisation est un facteur de risque, la détection d'anticorps, dont le taux reflète l'intensité de la colonisation, est facile à intégrer dans une surveillance mycologique régulière [166].

Ces notions de colonisation et de cinétique ont amené la firme BioRad® à développer un test immuno-enzymatique (double sandwich) détectant les anticorps anti-mannane : le Platelia® *Candida* Ac dont l'épitope EB-CA1 reconnaît les 5 espèces les plus incriminées dans les candidoses invasives (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. krusei*). Avec un seuil fixé arbitrairement à 10 UI, la spécificité est de 80% tandis que la sensibilité n'est que de 50% [183].

Ainsi en 2004, la recherche d'anticorps ne peut être généralisée pour le diagnostic d'infection fongique invasive.

3.3.5.3 Détection conjointe des antigènes et des anticorps candidosiques

En 1999, une équipe lilloise [155] a démontré que la combinaison des deux tests Platelia® *Candida* Ag et Ac, donnait une sensibilité cumulée de 80% avec 93% de spécificité et des valeurs prédictives positive et négative de respectivement 78 et 95%. La combinaison de ces deux tests est donc utile pour le diagnostic des candidoses invasives. Les résultats de cette étude suggéraient également que la clairance des antigènes est accélérée par la formation d'immun-complexes et que d'autre part, les résidus mannanes détectés auraient une action inhibitrice sur la synthèse des anticorps [158].

Globalement les délais moyens d'apparition des antigènes (4,7 à 6,2 jours) et des anticorps (7,3 jours) sont antérieurs à une hémoculture [43,158]. Plus récemment, cette même équipe a démontré que l'apparition d'anticorps avec la disparition d'antigène serait évocatrice d'une candidose tissulaire et que ces techniques auraient également leur place chez les patients neutropéniques [156,157].

Un suivi rapproché de type *monitoring* sérologique semble donc indispensable, des résultats sur des sérums isolés n'ayant que peu de signification. Ainsi il a pu être démontré qu'une surveillance régulière et ciblée chez les patients à risque utilisant les tests *Platelia Candida* permettrait d'initier une thérapeutique antifongique plus précocement [184].

Cependant, compte tenu de la lente cinétique des anticorps, ces méthodes sérologiques ne peuvent constituer un élément prépondérant dans la prise de décision pour les indications précoces et le maintien de thérapeutiques adaptées [114].

3.3.6 Tests de sensibilité aux antifongiques [32,33,124],

Depuis les 20 dernières années, l'augmentation croissante des mycoses profondes opportunistes nécessite l'utilisation plus fréquente des antifongiques existants. Cette évolution de l'antifongothérapie s'est accompagnée naturellement de la mise en œuvre de tests de sensibilité *in vitro*. A l'inverse de l'antibiogramme, l'antifongigramme a une valeur discutable en raison de l'absence de corrélation significative entre les résultats *in vitro* et l'efficacité *in vivo*.

Toutefois, dans certaines indications cliniques ces tests peuvent être justifiés :

- l'élargissement de l'arsenal antifongique avec l'apparition de triazolés remettant en cause l'indication première d' amphotéricine B
- l'existence de résistances aux azolés de certaines souches de *Candida* notamment non-albicans (*glabrata* et *lusitaniae* en tête)

Ces tests de sensibilités *in vitro* sont limités par diverses difficultés portant sur l'antifongique lui-même, les conditions opératoires et le stade selon lequel le *Candida* est testé. Toutes ces variations gênent la reproductibilité des résultats et donc la standardisation de la technique.

C'est pourquoi depuis 1990, les travaux du NCCLS ont permis de définir une technique de référence. Cette méthode standardisée de CMI par macrodilution en milieu liquide, proposée en 1994, a montré une corrélation interlaboratoire optimale sous certaines conditions de réalisation.

Parallèlement, il existe différentes techniques d'antifongigramme commercialisées :

- la méthode des disques : comparable à l'antibiogramme, l'antifongique diffuse dans la gélose créant une zone d'inhibition de croissance autour du disque. En fonction du diamètre de cette dernière, les souches sont classées en sensibles, résistantes ou intermédiaires.

- la méthode par dilution : soit en milieu solide avec une gamme de concentration incorporée dans la gélose, soit beaucoup plus utilisée en milieu semi-solide. Ces galeries possèdent en général plusieurs puits avec deux concentrations critiques différentes d'un même antifongique. Citons pour exemple : ATB Fungus[®]2 (Biomérieux[®], Marcy

l'Etoile, France) et Fungitest[®] (Biorad[®], Marnes la Coquette, France) dont les panels comprennent: la 5-fluorocytosine, l'amphotéricine B, l'itraconazole, le fluconazole plus le miconazole et le kétoconazole pour le Fungitest[®]. Cette méthode est rapide et reproductible. Toutefois elle ne permet pas de tester le voriconazole (triazolé de dernière génération) et la récente caspofungine.

- la méthode par dilution-diffusion : méthode basée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antifongique à étudier sur une face et une échelle de lecture sur l'autre face.

Cette méthode Etest[®] (AB Biodisck) réalisable en routine, est la seule à être actuellement corrélée à la méthode de référence NCCLS. Elle permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour *Candida* sp. de l'amphotéricine B, du fluconazole, de l'itraconazole, du kétoconazole et de la 5-fluorocytosine [27].

En conclusion, il convient d'avoir une attitude critique sur l'indication de l'antifongigramme qui ne doit absolument pas être considérée comme un examen systématique d'une infection à *Candida* sp. Il doit être réservé aux souches isolées de prélèvement profonds ou sanguins ou chez des patients immuno-compromis, ou bien encore en cas de récurrence.

3.4 Traitements des candidémies [98,167]

3.4.1 Indications

La décision d'instaurer une thérapeutique antifongique consiste en premier lieu à préciser quand il faut traiter et notamment quand un prélèvement positif à *Candida* sp. ne correspond pas à une infection évolutive mais à une simple colonisation.

A l'opposé, le retard au traitement antifongique, chez des patients en état septique sévère de candidémie, est associé à un pronostic péjoratif [49,148,160]. Ainsi tout diagnostic de candidose invasive impose de débiter sans tarder un traitement anti-infectieux adapté.

3.4.2 Antifongiques

Le panel des antifongiques utilisables pour le traitement des candidoses à dissémination hématogène s'est récemment agrandi. Il devrait encore s'enrichir dans un proche avenir, de nouvelles molécules à activité antifongique étant en cours de développement par l'industrie pharmaceutique (le ravuconazole, le posaconazole, la micafungine et l'anidulafungine).

Quatre familles d'antifongiques sont actuellement disponibles : les polyènes, la flucytosine, les azolés et les échinocandines [33,39,129].

3.4.2.1 L'amphotéricine B et ses dérivés lipidiques (liposomes, dispersion colloïdale ou complexe phospholipidique) [127] :

- L'amphotéricine B désoxycholate (**Fungizone[®]**) est un polyène, administrable uniquement par voie veineuse, son absorption digestive étant quasiment nulle. Elle présente un spectre très large d'activité contre les levures à l'exception de *Candida lusitanae* et *guilliermondii* qui ont été décrites comme résistantes in vitro. Les effets indésirables sont nombreux : l'AmB provoque des réactions d'intolérance générale immédiate très désagréables pour le patient (fièvre, frissons, vertiges, malaise général...), des troubles métaboliques, mais surtout une néphrotoxicité importante qui conduit rapidement à l'insuffisance rénale.

Pour toutes ces raisons, la Fungizone[®] n'est quasiment plus utilisée aujourd'hui dans cette formulation mais remplacée par les nouvelles formulations mises sur le marché. Ces nouvelles formes présentent un réel avantage car elles sont moins toxiques, mais elles ont un coût jusqu'à 100 fois plus élevé que celui de la Fungizone[®] [28,172].

- **Ambisome[®]** : c'est une forme liposomale d'AmB. Cette nouvelle formulation présente l'avantage d'une meilleure tolérance immédiate, et surtout une plus faible toxicité rénale (comme les deux autres formes existantes citées ensuite). Ce produit est indiqué dans le traitement des mycoses systémiques chez l'adulte et chez l'enfant ayant développé une insuffisance rénale sous AmB ou en cas d'altération pré-existante et persistante de la fonction rénale. Il est également indiqué dans le traitement empirique des infections fongiques présumées chez les patients neutropéniques et fébriles [1].

- **Abelcet[®]** : il possède une toute autre conformation lipidique; il est constitué de rubans et non de liposomes. Ses indications sont les mêmes que pour Ambisome[®].

- **Amphocil[®]** : C'est une forme de dispersion colloïdale d'AmB. Elle présente des propriétés équivalentes à l'Abelcet[®]; cette spécialité n'est pas disponible en France.

3.4.2.2 La flucytosine (Ancotil[®]) (5-FC) [168]

Cet antifongique à spectre large bloque la synthèse protéique des levures. Non liés aux protéines plasmatiques, il présente une excellente diffusion tissulaire, y compris dans le liquide céphalorachidien. Son association est synergique avec l'amphotéricine B. Il est possible de surveiller ses taux sériques. De nombreux échecs par émergence de résistance contre-indiquent son utilisation en monothérapie. Sa toxicité hépatique et surtout médullaire limite son indication à certaines infections particulières notamment par leur localisation (système nerveux central, yeux, valves cardiaques).

3.4.2.3 Les azolés

- Le kétoconazole (**Nizoral**[®]) : il présente une faible toxicité mais sa biodisponibilité dépendante de l'acidité gastrique le contre-indique pour le traitement des infections fongiques sévères à *Candida* sp.

- Les triazolés

Ils inhibent le cytochrome P₄₅₀ du champignon, bloquant ainsi la synthèse de l'ergostérol, composant essentiel de la paroi fongique. Leur spectre d'activité est plus étroit que celui des polyènes.

* Le fluconazole (**Triflucan**[®]) présente une excellente biodisponibilité par voie orale et sa diffusion tissulaire est bonne y compris dans le système nerveux central. Son spectre d'efficacité est étroit mais le rend actif sur *Candida* sp. à l'exception de *C. krusei* et de *C. glabrata* pour lequel son activité est dose-dépendante [175]. Son excellente tolérance (très peu d'effets indésirables), son peu d'interactions médicamenteuses et la présence de deux formes galéniques (orale et intraveineuse) expliquent sa large prescription pour le traitement des candidoses.

* L'itraconazole (**Sporanox**[®]), de part son spectre d'activité plus large que celui du fluconazole, cette molécule est indiquée dans le traitement des mycoses systémiques ou viscérales notamment les candidoses sévères, de l'immunodéprimé, éventuellement en relais de l'AmB [170]. Sa biodisponibilité *per os* est variable et justifie la réalisation de dosages sériques pour valider sa posologie dans cette indication. [134].

* Le voriconazole (**Vfend**[®]) est un dérivé triazolé de dernière génération et d'efficacité thérapeutique supérieure avec un spectre d'activité plus large notamment sur *C. glabrata* et *C. krusei* [82,126]. Il présente une meilleure réponse clinique et une meilleure tolérance que le fluconazole, hormis quelques troubles transitoires de la vision de couleurs [14,68]. L'existence d'une forme orale permet un relais chez le patient convalescent. Signalons qu'il n'existe pas de relation entre la concentration plasmatique du produit et son efficacité. Son AMM comprend les infections graves à *Candida* sp. résistants au fluconazole [2].

3.4.2.4 Les échinocandines

Nouvelle classe d'antifongiques, elles inhibent sélectivement la synthèse du bêta-1,3-glycane de la paroi fongique aboutissant à une instabilité osmotique et à la mort cellulaire.

La caspofungine (**Cancidas**[®]) présente un spectre d'activité très large sur l'ensemble des levures. Elle semble même aussi active lorsque les *Candida* sont incluses dans un biofilm [94]. Sa tolérance est excellente et seule la voie veineuse est disponible. Son efficacité dans le traitement des candidémies est documentée [125]. Ces données la positionnent en traitement de première intention pour le traitement des candidoses systémiques en particulier lorsqu'un *Candida* non *albicans* est suspecté ou documenté. Il en est de même lorsque le patient a reçu au préalable un traitement ou une prophylaxie par un triazolé [3].

| | V. d'administration Posologie | Principaux effets indésirables | | Surveillance biologique |
|---|---|--|---|--|
| Fungizone [®] amphotéricine B désoxycholate (AmB) | IV 0,6 à 1 mg/kg/j en perf. de 4 à 6 heures | Hypokaliémie, hypomagnésémie, insuffisance rénale Fièvre, frissons lors de l'injection Cytopénie | | Créatininémie Kaliémie +/- NFS plaq. |
| Ambisome [®] AmB liposomale (ABLp) Abelcet [®] AmB lipid complex (ABLC) | IV 3 à 5 mg/kg/jour | Mêmes complications que la Fungizone [®] mais fréquence moindre. Tolérance supérieure pour l'Ambisome [®] | | Créatininémie Kaliémie |
| Ancotil [®] flucytosine | IV/PO 100 à 200 mg/j en 4 fois | Troubles digestifs, hématologiques et hépatiques dose-dépendants | | NFS plaquettes Créatininémie |
| Sporanox [®] * itraconazole | IV/PO 200 à 400 mg/jour | Troubles digestifs, cytolyse hépatique, cholestase, réactions allergiques et cutanées | Insuffisance cardiaque congestive | ASAT, ALAT |
| Triflucan [®] fluconazole | IV/PO 6 à 12 mg/kg/jour | | | ASAT, ALAT |
| Vfend [®] * voriconazole | IV/PO 6 à 12 mg/kg/jour | | Troubles visuels réversibles | ASAT, ALAT |
| Cancidas [®] caspofungine | IV 70 mg J1, 50 mg/j | Peu fréquents et bénins | | |

*Relais oral précoce recommandé chez l'insuffisant rénal

3.4.3 Stratégie thérapeutique [27]

3.4.3.1 Choix du traitement curatif

3.4.3.1.1 Selon le genre et l'espèce

- Après isolement d'une levure et avant identification de l'espèce

L'augmentation de l'incidence des *Candida sp.* de sensibilité diminuée ou résistants aux azolés, une neutropénie, une insuffisance rénale et les médicaments co-prescrits (néphrotoxicité, interactions) interviennent dans les choix.

- Après identification de l'espèce de *Candida sp.*

Selon le spectre d'activité :

| | Fungizone® | Ancotil® | Triflucan® | Sporanox® | Vfend® | Cancidas® |
|------------------------|------------|----------|------------|-----------|--------|-----------|
| <i>C. albicans</i> | S | S/R | S | S | S | S |
| <i>C. glabrata</i> | S/I | S | SDD/R | SDD/R | S/? | S |
| <i>C. parapsilosis</i> | S | S | S | S | S | S/? |
| <i>C. tropicalis</i> | S | S | S/SDD | S | S | S |
| <i>C. krusei</i> | S/I | I/R | R | SDD/R | S | S |
| <i>C. lusitaniae</i> | S/R | S | S | S | S | S |

S : sensible ; *SDD* : sensibilité dose-dépendante ; *I* : intermédiaire ; *R* : résistant

3.4.3.1.2 Selon les localisations

- Candidémie

La durée de traitement est de 2 semaines après la dernière hémoculture positive et la disparition des symptômes ou au moins 7 jours après la correction de la neutropénie.

Le retrait du cathéter intravasculaire est recommandé.

Il n'y a pas de données suffisantes pour recommander actuellement une association d'antifongiques pour le traitement des candidoses invasives. Les conférences d'experts proposent donc une monothérapie pour le traitement de ces infections [83,129]. Ainsi la capsosungine et l'amphotéricine B ont une activité démontrée pour le traitement des candidoses graves. Le fluconazole pourrait être administré dans les infections fongiques sans signes de sepsis grave du fait de son spectre plus étroit ou en relais pour la suite du traitement, une fois l'identification précise de la levure obtenue. La prescription d'une association peut, néanmoins, se discuter dans certaines situations cliniques difficiles comme les candidoses hépatospléniques, les endocardites ou les méningites à levures et les rechutes ou les échecs d'un premier traitement antifongique bien conduit [27].

- Candidose hépatosplénique (chronique disséminée). La durée du traitement est de 6 mois en moyenne.

- Les endocardites sur valves natives ou sur prothèses valvulaires justifient le plus souvent le remplacement chirurgical des valves infectées. La durée du traitement est d'au moins six semaines avec un suivi nécessaire d'un an minimum devant le risque important de rechute.

- Arbre respiratoire. La présence de *Candida* sp. est ici généralement rapportée à une colonisation profonde et ne justifie pas de traitement spécifique.

- Les endophtalmies à *Candida* justifient un traitement spécifique de 15 jours à 6 semaines et imposent la recherche d'une candidémie concomitante.

3.4.3.2 Traitement préemptif en réanimation

Malgré l'absence de validation, un tableau septique préoccupant, sans autre documentation microbiologique, avec colonisation de plusieurs sites par *Candida* sp. et des facteurs de risques de CI, autorise un traitement préemptif [27].

3.4.4 Prophylaxie [27]

3.4.4.1 En réanimation

Il n'y a pas d'argument en faveur de l'utilisation d'une chimioprophylaxie chez le patient immunocompétent tout venant, admis en réanimation. L'absence de données suffisantes ne permet pas d'identifier les patients qui en bénéficieraient.

3.4.4.2 En hématologie

L'incidence élevée et la mortalité importante (50 % à 90 %) des infections fongiques ont justifié l'évaluation extensive de la chimioprophylaxie.

3.4.4.2.1 La chimio-prophylaxie primaire

L'AmB par voie respiratoire ou par voie veineuse (quelle que soit la formulation) ne réduit pas l'incidence des infections invasives. Le fluconazole (400 mg/j) est recommandé dans l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) car il réduit la fréquence des CI et leur mortalité. Cependant, en raison du risque de sélection de souches résistantes, 50 % des équipes européennes lui préfèrent l'utilisation des polyènes oraux. Pour les leucémies aigües et autogreffes, l'incidence habituelle des CI n'a pas permis de documenter l'intérêt d'une prophylaxie et le fluconazole n'est pas recommandé. L'itraconazole peut aussi être prescrit dans l'allogreffe de CSH. Cependant, sa difficulté d'utilisation justifie de restreindre sa prescription à certaines situations à risque : corticothérapie prolongée post- allogreffe de CSH. Aucune donnée n'est actuellement disponible avec le voriconazole.

3.4.4.2.2 - La chimio-prophylaxie secondaire

Elle doit être systématique, utiliser une molécule active vis-à-vis du champignon précédemment isolé ou suspecté et couvrir la période d'immunodépression.

En conclusion, il apparaît fondamental que chaque équipe connaisse l'écologie fongique de sa structure hospitalière, au même titre que pour les bactéries multirésistantes (BMR) endémiques. Cette connaissance permet d'anticiper sur le traitement probabiliste en tenant compte des résistances connues en fonction de l'espèce de *Candida*. La collaboration avec le mycologue est tout aussi fondamentale.

4 PRINCIPES DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

La biologie moléculaire comprend l'ensemble des techniques basées sur l'étude, la détection et la modification des acides nucléiques. C'est un outil à la fois de recherche, de diagnostic et de prédiction des maladies en médecine humaine. Les techniques de biologie moléculaire ont connu un essor extraordinaire ces dix dernières années passant de processus lourds, fastidieux et longs à mettre en œuvre à des techniques partiellement ou totalement automatisées [12,13,45].

4.1 PCR Classique [11]

4.1.1 Principe

La PCR ou *Polymerase Chain Reaction* est une technique qui procède de l'amplification des acides nucléiques humains ou exogènes. Cette méthode d'amplification décrite en 1985, a valu à K. Mullis, le prix Nobel de chimie en 1993. Elle repose sur la capacité d'une enzyme, une ADN polymérase, à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice.

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces (ou *primer*). Celles-ci sont constituées d'un segment de 17 à 30 bases d'acide nucléique. Leur association à l'ADN cible est suivie d'une élongation par la polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin.

Cette amplification est répétée un certain nombre de fois afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée.

4.1.2 Acteurs de la PCR [11]

4.1.2.1 L'acide désoxyribonucléique contenant le fragment à amplifier

Situé dans le noyau de la cellule, il est constitué de deux brins formant une double hélice. L'ADN est formé d'unités de bases, les nucléotides (une base + un sucre [le désoxyribose] + un phosphate), reliés par des liaisons phosphodiester [Fig. 2]. On distingue quatre bases :

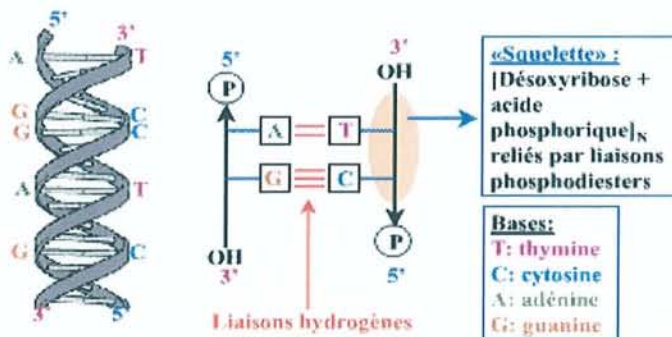
- les bases puriques : adénine (A) et guanine (G)

- les bases pyrimidiques : cytosine (C) et thymine (T)

Les deux chaînes d'ADN forment une double hélice en établissant au niveau de leurs bases des liaisons de faible énergie, les liaisons "hydrogènes". Celles-ci se forment selon les règles d'appariement suivantes :

- la base A est associée à la base T par deux liaisons hydrogènes.

- la base G est associée à la base C par trois liaisons hydrogènes.



(Bogard M., Lamoril J. et al, 1998)

Figure 2

Chaque brin d'ADN possède une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-hydroxyle. Par convention une orientation a été définie : elle se fait de 5' vers 3' (5' → 3'). Par ailleurs, les deux brins sont orientés en sens opposé : on dit qu'ils sont anti-parallèles. On peut facilement séparer les liaisons hydrogènes : on parle alors de dénaturation. Celle-ci est réversible. La réassociation s'appelle la renaturation ou hybridation. Elle peut se faire ADN/ADN, ADN/ARN ou ARN/ARN.

L'ADN cible sera extrait du milieu biologique à analyser (cultures cellulaires ou d'organismes, prélèvements sanguins, squames, biopsies...).

4.1.2.2 Les amorces : sens et antisens

Ce sont des oligonucléotides d'une taille comprise entre 17 pb et 30 pb. Idéalement, ils doivent être parfaitement complémentaires de la cible à analyser (l'une sur le 1^{er} brin et l'autre sur le brin complémentaire) et posséder une composition globale de 50 % [G+C]. Par ailleurs, ces amorces ne doivent pas s'hybrider sur elles-mêmes (auto-hybridation) ou entre elles, ni former de boucles sur elles-mêmes (structure en "épingle à cheveux"). Si c'est le cas, elles formeront des bandes parasites appelées dimères d'amorces. La présence de ceux-ci diminuera la sensibilité de la PCR.

Les températures de fusion (T_m) des amorces doivent être voisines et suffisamment élevées pour empêcher les hybridations non spécifiques.

La taille du segment amplifié sera déterminée par la distance entre les amorces.

4.1.2.3 L'ADN polymérase et ses inhibiteurs

On utilise la Taq-Polymérase. Cette enzyme a été purifiée à partir d'une bactérie vivante à proximité de sources d'eau chaude à 80°C, *Thermus aquaticus*. Il s'agit d'une ADN polymérase ADN-dépendante possédant une activité exonucléase 5' → 3' mais sans activité 3' → 5' (pas d'action correctrice). C'est une enzyme thermorésistante dont la température optimale de fonctionnement est comprise entre 70 et 75°C et dont la demi-vie est supérieure à 2h à 92°C et de 40 minutes à 95°C. Cette propriété de thermorésistance est à l'origine de son utilisation dans la technique d'amplification génique PCR. Depuis sa découverte cette enzyme a été clonée et modifiée afin d'augmenter sa résistance à la température..

Cette enzyme possède des inhibiteurs qui sont nombreux et sont présents dans de nombreux échantillons biologiques tels que sang, selles et urines.

Parmi les inhibiteurs identifiés, on peut citer : l'hème, l'héparine, le SDS (sodium dodécyl sulfate), le phénol, les polyamines.

Il existe des moyens de lever cette inhibition : par dilution de l'échantillon, par chauffage de l'échantillon, par purification de l'échantillon ("ré-extraction"), par changement d'ADN polymérase : elles sont plus ou moins résistantes à l'action des inhibiteurs, par utilisation de "facilitateurs" (la sérum-albumine-bovine, la bêtaïne, α 2-macroglobuline...)

4.1.2.4 Les nucléotides dNTPs

Les quatre désoxyNucléotides-Tri-Phosphates: dGTP, dATP, dTTP et dCTP, seront assemblés par la Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire.

4.1.2.5 Le Magnésium (Mg^{2+})

Ce cation est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation des précurseurs. Il doit être apporté en concentration précise sous forme de $MgCl_2$.

Tous ces composants seront mélangés dans le même tube réactionnel.

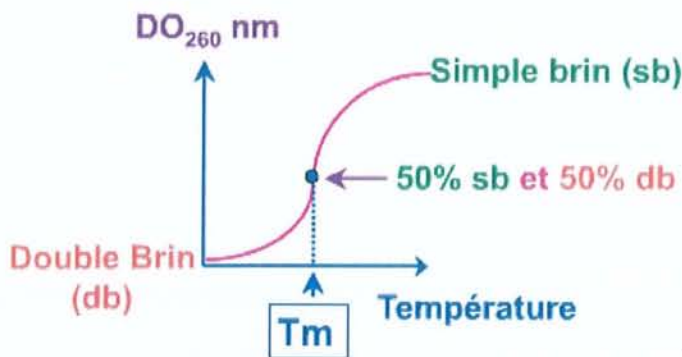
4.1.3 Notion de température de fusion ou Tm [11,12]

Quand un ADN double brin est chauffé au-delà d'une certaine température, les deux brins d'ADN se séparent par rupture des liaisons hydrogènes. L'ADN devient simple brin. La valeur de la température correspondant à ce phénomène s'appelle la température de fusion ou Tm ("melting temperature"). En pratique, le Tm correspond à la température où 50 % de l'ADN est sous forme simple brin et 50 % de l'ADN sous forme double brin.

Ce Tm dépend de plusieurs facteurs :

- la composition en bases. Les appariements AT (deux liaisons hydrogènes) sont moins stables que les appariements GC (trois liaisons hydrogène) en milieu salin (NaCl).
- la composition en sels du milieu. Une diminution de la concentration en sels du milieu diminue la force ionique et par conséquent diminue le Tm et inversement. Par convention, on parle de solution stringente quand la concentration en sels est faible (le Tm diminue alors).
- la quantité de misappariements (ou *mismatches*). On considère qu'il y a une diminution du Tm de 1°C pour 1 % de mismatch dans l'ADN.
- la longueur du fragment. Cet effet est minime quand la taille des fragments hybridés est supérieure à 500 pb.
- la présence d'agents "déstabilisants" (par exemple la formamide et l'urée).

Le Tm est calculé par des logiciels informatiques (bioinformatique) ou approché par une formule plus pratique : 2°C par base nucléotidique A ou T + 4°C par base G ou C [Fig.3]



(Bogard M., Lamoril J. et al, 1998)

Figure 3

4.1.4 La réaction [11]

Pour initier le processus, deux segments d'acide nucléique complémentaire du brin d'ADN matrice sont utilisés comme amorces (une sens et une antisens). Celle-ci subira une élongation par la polymérase, une fois hybridée à l'ADN cible. Ceci aboutit à la synthèse d'un ADN double brin.

La réaction a lieu dans un thermocycleur. Il s'agit d'un appareil programmable réalisant automatiquement et très rapidement les changements de température nécessaire aux cycles d'amplification. Celui-ci peut chauffer jusqu'à 100°C par une résistance et être refroidi à 0°C par effet Peltier en moins de 2 minutes.

La PCR comprend une succession de cycles (au moins 30) de trois étapes chacun et se décomposent de la manière suivante [Fig. 4 et 5]:

4.1.4.1 Etape de dénaturation thermique :

Durant cette étape de 30 à 60 secondes généralement, le milieu réactionnel est porté à une température élevée, avoisinant 95°C, les liaisons hydrogènes reliant les deux brins d'ADN sont alors rompues par la chaleur. Cette température est supérieure à la température de dénaturation (T_m) de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin. Chaque brin servira de matrice.

4.1.4.2 Etape d'hybridation des amorces (également appelée annealing) :

Les amorces délimitant la séquence d'ADN à amplifier et chacune complémentaire d'un des deux brins, sont ajoutées au milieu réactionnel. Le milieu est amené pendant environ 30 secondes à une température légèrement inférieure au T_m des amorces. Cette température d'hybridation est fonction de la séquence des amorces. Elle est le plus souvent égale à [$T_m - 5^\circ\text{C}$], ce qui est à la fois suffisamment proche du T_m pour éviter les appariements non spécifiques et suffisamment éloigné pour assurer une bonne hybridation sans risque de fusion prématurée.

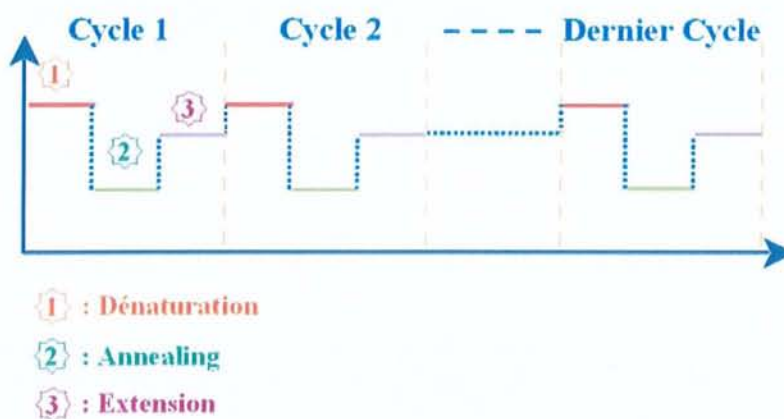
4.1.4.3 Etape d'élongation :

A partir de l'extrémité 3'OH de chaque amorce, l'ADN polymérase (Taq polymérase ou autre) incorpore les désoxynucléotides complémentaires du brin d'ADN matrice. La synthèse de l'ADN complémentaire se fait alors dans le sens 5' → 3' à la température optimale d'activité de l'enzyme, 72°C en général. A la fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

A la fin du premier cycle, un deuxième cycle thermique comprenant les mêmes étapes est effectué, puis un troisième etc... jusqu'au dernier cycle. Le nombre de cycles varie suivant la cible que l'on amplifie et le protocole choisi. En moyenne, 30 à 35 cycles sont réalisés au cours d'une PCR classique.

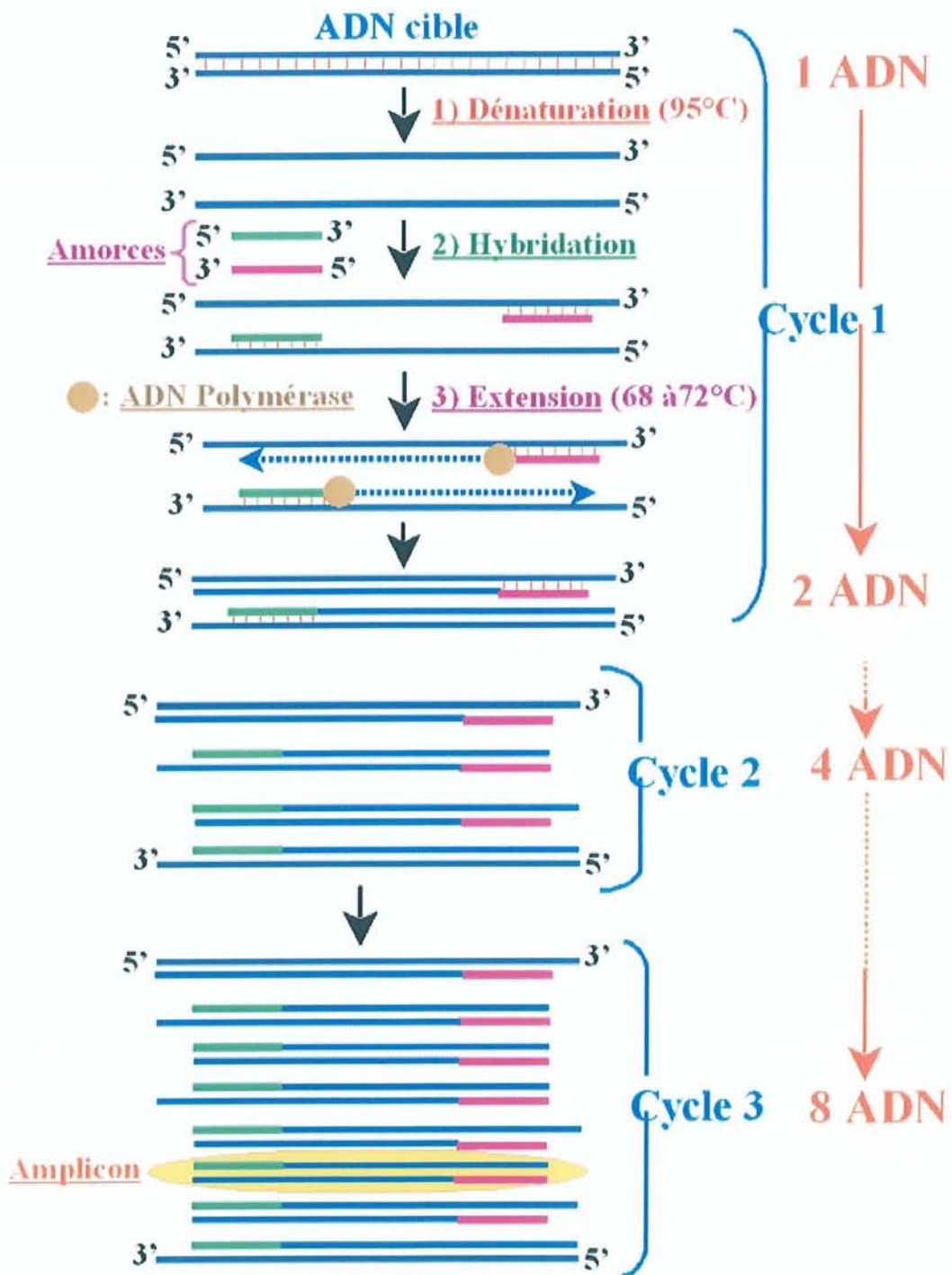
A chaque cycle correspond le doublement du nombre de copies de la séquence d'origine. Ainsi au bout de 30 cycles de PCR on obtient théoriquement 2^{30} copies de la cible ; en réalité ce chiffre n'est pas atteint car le rendement de chaque cycle n'est jamais de 100%.

Dans la majorité des cas, une PCR correctement optimisée permet d'obtenir un rendement moyen d'amplification de l'ordre de 85% ($0 < R \leq 1$).



(Bogard M., Lamoril J. et al, 1998)

Figure 4



Puis obtention de 2^n copies à la fin du $n^{\text{ième}}$ cycle

(Bogard M., Lamoril J. et al, 1998)

Figure 5 : Principe d'amplification d'une séquence d'ADN par PCR

4.1.4.4 La cinétique de la réaction de PCR

L'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde.

Cette courbe peut être divisée en deux phases [Fig. 5] :

- La première phase correspondant à une amplification exponentielle qui est modélisable. La quantité de produit de PCR obtenue à chaque moment de cette phase est directement fonction du nombre de copies initiales du fragment d'ADN amplifié.

- En revanche, la phase de plateau correspond à un ralentissement de l'amplification qui peut être dû à l'épuisement des différents réactifs de la PCR comme les amorces. Contrairement à la première phase, l'étape « plateau » est difficilement modélisable d'autant plus qu'elle n'est souvent pas reproductible.



(Bogard M., Lamoril J. et al, 1998)

Rem : la phase exponentielle comprend une phase de bruit de fond (à son début) puis une phase quasi-linéaire qui est mesurable.

Figure 5

Ainsi par exemple pour une PCR de 30 cycles, le nombre théorique de produits amplifiés obtenus, en considérant un rendement de 100 %, est de 230 par copie initialement présente. L'amplification est donc exponentielle.

Plusieurs raisons expliquent l'existence de cet "effet plateau" :

- l'épuisement des substrats (amorces, désoxyribonucléotides [dNTPs]).
- la dégradation des désoxyribonucléotides [dNTPs] consécutive à la température élevée.
- l'inactivation thermique progressive de l'ADN polymérase
- la concentration limitante de l'enzyme et/ou l'inhibition progressive de l'enzyme par les pyrophosphates générés au cours de la PCR.
- la ré-hybridation des produits formés gênant l'accès des différents réactifs aux séquences cibles.
- la réduction du rendement de dénaturation avec le nombre de cycles, consécutive à la quantité d'ADN accumulée.
- la destruction des produits néoformés par l'activité 5' → 3' exonucléase de l'ADN polymérase, quand elle en possède une.

4.1.5 Migration électrophorétique et révélation [11]

Les fragments d'ADN amplifiés peuvent être visualisés sur des gels d'agarose après électrophorèse.

Le gel forme des mailles au sein desquelles les acides nucléiques sont piégés. A pH= 7, leur migration se fait vers l'anode. En parallèle des fragments étudiés, on fait migrer un marqueur de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue (commercialisé par de nombreuses sociétés). En fonction de la taille du produit à examiner, la concentration d'agarose à utiliser sera différente et les mailles du réseau formé plus ou moins fines. Ainsi, la taille des produits PCR séparés par ces gels varie de 50 pb (gel à 3% d'agarose) jusqu'à 20 - 50 Kb (gel à 0.5% d'agarose).

Pour visualiser le front de migration, le produit amplifié est mélangé à un colorant (encore appelé tampon de charge), le bleu de bromophénol qui présente également l'avantage d'alourdir l'échantillon afin qu'il sédimente au fond des puits de dépôt creusés dans le gel.

La visualisation des acides nucléiques se fait après addition de bromure d'éthidium (BET), agent intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques (à manier avec précaution car cancérigène). Le BET contenu dans le gel, quand il est intercalé entre ces bases, va présenter une fluorescence orangée sous lumière ultraviolette (U.V. de longueur d'onde 312 nm).

Un gel peut aussi être visualisé après coloration au nitrate d'argent ou à l'acridine orange ou après ajout de SYBR[®]Green, agent intercalant plus sensible que le BET. Ce colorant commercialisé en France sous le nom de Gel-Star[®] par la société TEBU[®], donnera une fluorescence vert-pomme.

L'empreinte de la migration est ensuite obtenue par autoradiographie (fluorescence).

4.2 PCR nichée (ou *nested PCR*) [11]

Pour obtenir une plus grande sensibilité lors de la PCR, il est possible d'effectuer 2 PCR successives.

La « *nested PCR* » permet une meilleure spécificité : le produit issu de la première PCR est de nouveau amplifié au cours d'une deuxième PCR. Dans cette technique, 2 couples d'amorces différents sont successivement utilisés :

- un couple d'amorces externes :

Ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un premier fragment d'ADN amplifié, selon une PCR classique. Les amorces sont donc spécifiques des deux séquences bornant l'ADN à amplifier. Les fragments d'ADN obtenus servent alors de matrice pour une seconde PCR.

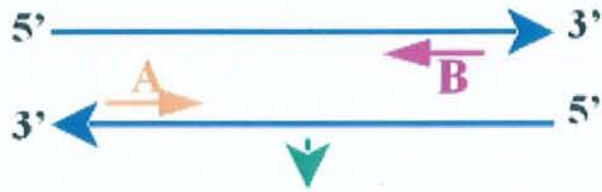
- un couple d'amorces internes :

Ce couple d'amorces délimite une région située à l'intérieur (ou nichée) du fragment nucléotidique obtenu avec le 1^{er} couple d'amorces, et donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la 1^{ère} PCR [Fig. 6].

Cette technique de « double PCR emboîtée » permet donc à la fois une plus grande sensibilité et une plus grande spécificité.

Cette méthode est très sensible : après une première PCR de 30 cycles, on obtient théoriquement 230 cibles amplifiées (pour un rendement de 100 %). La deuxième PCR de 30 cycles permettra d'obtenir $[2^{30}]^{30}$ soit $[2^{60}]$ cibles en théorie. Deux couples d'amorces étant utilisés, la spécificité de la réaction est accrue. Cette technique doit cependant être réalisée avec une extrême précaution, le risque de contamination étant encore augmenté du fait de l'existence de deux PCR successives et de la nécessité d'ouvrir le tube à la fin de la première PCR pour ajouter le deuxième couple d'amorces.

1) Première PCR avec le couple d'amorces A/B



2) Deuxième PCR avec le couple d'amorces C/D



(Bogard M., Lamoril J. et al, 1998)

Figure 6 : Principe de la PCR Nichée (ou *Nested PCR*)

4.3 PCR en temps réel

Les techniques classiques d'amplification génique (PCR) sont utilisées en routine depuis plus d'une dizaine d'années par les laboratoires de bactériologie pour identifier des micro-organismes pathogènes. Ces techniques dites "classiques" nécessitent, comme nous l'avons vu précédemment plusieurs étapes expérimentales, parfois complexes et difficiles à mettre en oeuvre dans des laboratoires de routine (PCR puis détection du produit amplifié). De plus, en raison de la multiplicité des procédures, ces tests requièrent les mêmes délais, voire des délais supérieurs à ceux des méthodes microbiologiques basées sur la culture *in vitro*, auxquels s'ajoutent les risques de contamination. Récemment, des automates réalisant dans un seul mélange réactionnel ("système fermé") à la fois la réaction de PCR et la détection du produit amplifié (amplicon) ont été développées. Ces appareils sont à la fois des thermocycleurs extrêmement performants (vitesse de *thermocycling* très rapide) et des fluorimètres qui détectent spécifiquement en temps réel l'amplicon formé.

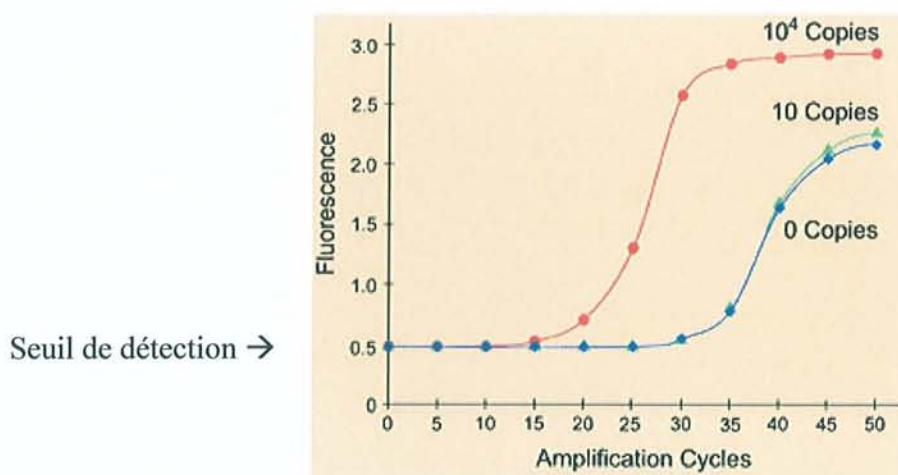
4.3.1 Principe

La technique de PCR en temps réel est directement inspirée de la PCR classique. Les cycles de PCR successifs induisent une augmentation exponentielle du produit d'amplification, et par conséquent de la fluorescence émise. En utilisant une gamme étalon d'ADN en quantité connue, il est possible de rendre un résultat quantitatif.

Pour la détection des amplicons, cette PCR utilise soit l'agent intercalant SYBR[®]Green, soit elle fait appel à des amorces spécifiques du gène à amplifier associées à un système de sondes fluorescentes qui se fixent spécifiquement sur le brin amplifié. On distingue trois grands types de sondes : les sondes d'hydrolyse TaqMan[®], les sondes d'hybridation FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfert) et les *molecular beacons* (balises moléculaires) [Annexe n°6]. Ces trois techniques exigent un choix approprié de leurs sondes. La sélection de ces dernières, quelle que soit la méthode utilisée, est ardue et impose l'emploi de logiciels spécialement adaptés pour chacune d'elle.

Le temps de détection du signal est directement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans le mélange réactionnel. Durant les premiers cycles, la fluorescence reste à son niveau de base. Le "Threshold cycle" (Ct) correspond au cycle à partir duquel la courbe de fluorescence croise la droite correspondant au seuil de détection. Il est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon biologique avant la réaction. Dès lors, un Ct précoce correspond à une réaction très positive et une concentration initiale d'ADN élevée, un Ct tardif reflète une quantité d'ADN moindre, enfin un Ct égal au nombre de cycles réalisés correspond à une réaction négative, dans ce cas la fluorescence mesurée au cours de la réaction ne dépasse pas le seuil de détection [Fig. 7]. Cette possibilité de quantification est à la base des techniques développées en virologie qui permettent la détermination des charges virales.

La PCR est suivie cycle par cycle pendant toute la durée de l'amplification par mesure de fluorescence, puis analysée par un logiciel. Elle permet donc de suivre l'amplification au moment de la phase exponentielle, période de la PCR où le rendement est constant. Comme pour toute PCR, la courbe obtenue en temps réel après mesure de la fluorescence, lors du suivi cycle par cycle, génère une courbe sigmoïde.



[http:// www.roche-applied-science.com/lightcycler-online](http://www.roche-applied-science.com/lightcycler-online)

Figure 7

4.3.2 Intérêts de la PCR en temps réel

1) Après extraction de l'ADN de l'échantillon biologique commune aux deux méthodes, les techniques impliquent une première étape qui est constituée par la réaction de PCR proprement dite et qui, pour les thermocycleurs standards actuellement commercialisés, nécessite au minimum à 2 heures pour réaliser 30 à 40 cycles alors que 20 à 30 minutes sont nécessaires pour le même nombre de cycles pour la plupart des appareils de PCR en temps réel.

2) Pour les techniques classiques, la détection du produit amplifié se fait, selon différentes méthodes évoquées plus haut qui sont fastidieuses et nécessitent l'utilisation éventuelle de produit cancérigène (BET). De plus, elles favorisent les contaminations avec l'ouverture nécessaire des tubes pour l'électrophorèse et imposent des locaux séparés pour les étapes d'amplification et de post-amplification.. A l'inverse, les techniques de PCR en temps réel, permettent une détection spécifique et immédiate de l'amplicon au cours de la réaction de PCR et ce pour des temps qui varient en fonction des appareils entre 30 et 120 minutes.

3) Si les deux types de techniques possèdent les mêmes spécificités, et donc des performances qualitatives identiques, la PCR en temps réel présente en plus l'avantage considérable d'être plus sensible et de pouvoir quantifier la cible détectée dans l'échantillon biologique.

4) L'utilisation des sondes de type FRET ou de type "balises moléculaires" permet également, sur certains appareils, une analyse des courbes de température de réassociation des amplicons obtenus permettant la détection d'éventuelles mutations ponctuelles au niveau de l'amplicon.

4.3.3 Le LightCycler® (Roche-Diagnostics®)

Parmi les six appareils de PCR en temps réel commercialisés, Le LightCycler® (Roche Diagnostics®) est un automate d'amplification qui couple un thermocycleur rapide à air pulsé et un spectrofluorimètre. Le logiciel qui pilote l'appareil permet l'acquisition et le traitement des données en temps réel [Annexe n°7].

Toute la réaction s'effectue dans des capillaires en verre borosilicaté directement chargés dans l'appareil ; cette automatisation a l'avantage de limiter les risques de contamination et d'être beaucoup plus rapide que la PCR classique associée à une révélation par électrophorèse (les résultats pour une série sur LightCycler® sont obtenus en 1 heure).

La révélation permet de choisir selon les modes sus-cités mais reste toujours basée sur la quantification d'une fluorescence émise.

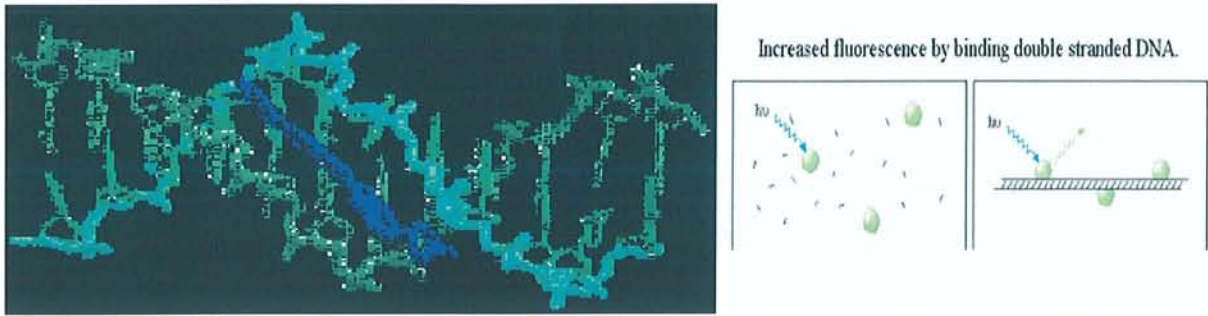
4.3.4 Révélation par un agent intercalant : le SYBR[®]Green

Vers la fin de l'année 1998, des kits pour la PCR quantitative sont apparus utilisant un intercalant. Son nom commercial est le SYBR[®]Green I fabriqué par Molecular Probe[®]. Comme le Bromure d'Ethidium, ce colorant vient s'intercaler au niveau des chaînes double brin d'ADN. Ce colorant ne devient fluorescent que s'il se lie à l'ADN double brin [Fig. 7]. Initialement vendu comme colorant pour gel, il s'est avéré compatible avec la PCR. Il est possible d'inclure cette molécule à faible dose dans une PCR en temps réel. Ainsi la quantité d'ADN double brin produite au cours de la réaction, peut être suivie directement en mesurant la fluorescence dans la gamme d'émission du SYBR[®]Green I (intensité maximale : 550 nm). Grâce à sa très grande stabilité, il permet d'effectuer un grand nombre de cycles sans dégradation de la fluorescence émise. De plus, puisque plusieurs molécules de SYBR[®]Green peuvent se lier à l'ADN, la fluorescence émise sera d'autant plus intense que l'amplicon est grand [Annexe n°8].

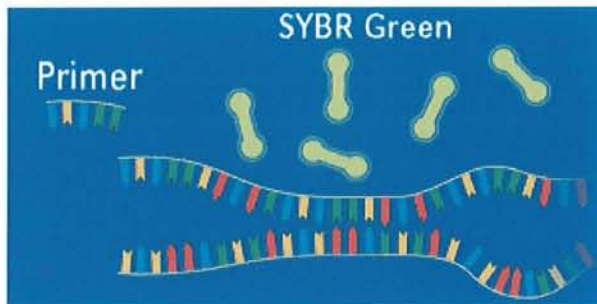
Le SYBR[®]Green, cancérigène, nécessite les mêmes précautions d'emploi que le BET.

La liaison du SYBR[®]Green à l'ADN n'est pas spécifique du produit à amplifier : la fluorescence mesurée peut provenir d'amplification non spécifique (dimères, contaminants..). Lors du développement de la technique, il convient donc de s'assurer de la spécificité des produits de PCR. Il est conseillé par exemple, de faire migrer sur gel les produits de PCR afin de s'assurer que la taille du fragment amplifié correspond à ce qui est attendu. Toutefois, puisque les amorces ont généralement été mises au point et validées en PCR classique, nous utilisons les informations fournies par la courbe de fusion comme contrôle de spécificité.

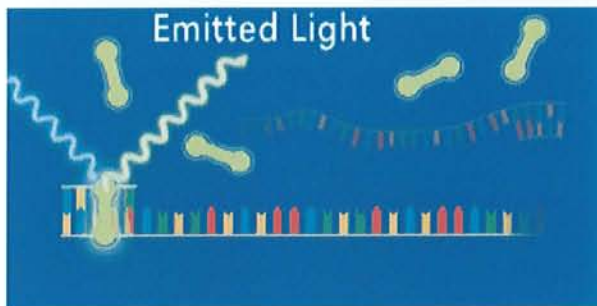
Figure 7 : Mécanisme d'action du SYBR[®]Green I



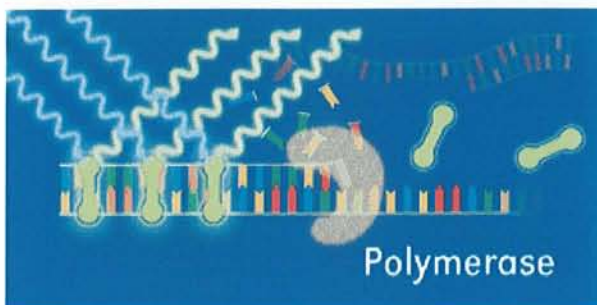
Ce colorant (---) s'intercale dans le petit sillon de l'ADN double brin, ce qui lui permet d'émettre une fluorescence après excitation par un faisceau.



Après dénaturation, tout l'ADN devient simple brin. A ce stade le SYBR[®]Green I ne s'accroche pas et l'intensité de la fluorescence est faible.



Pendant l'hybridation (annealing), les amorces s'hybrident à la séquence cible, ce qui crée des petites parties d'ADN double brin auxquelles le colorant se fixe, entraînant une augmentation de la fluorescence.



Pendant la phase d'élongation de la PCR, les amorces sont allongées, ce qui augmente la quantité de SYBR[®]Green I fixé.

A la fin de cette phase, tout l'ADN présent est double brin et la fixation du colorant est maximale.

[http:// www. Roche-applied-science.com/lightcycler-online](http://www. Roche-applied-science.com/lightcycler-online)

4.3.5 Courbe de fusion et spécificité de l'amplicon

Au cours de l'amplification de l'ADN, il est nécessaire de confirmer la spécificité des séquences détectées. Le LightCycler® enregistre les données correspondant à la courbe de fusion de l'ADN amplifié. Un programme informatique de l'automate permet, en analysant cette courbe, de s'assurer de la spécificité du produit principalement obtenu et éventuellement de la présence d'autres produits synthétisés aspécifiques.

Une particularité du LightCycler® est sa capacité à montrer en détail la courbe de fusion analysant les produits de PCR issus d'un cycle d'amplification. Le point de fusion d'un fragment d'ADN dépend de sa longueur et de sa composition exprimée en GC% ainsi que de la stringence et de la quantité de misappariements dans le milieu. Ainsi, la détermination d'une température de fusion propre à un brin d'ADN peut être utilisée comme marqueur de spécificité de ce produit d'amplification. Cette analyse de la courbe de fusion peut s'appliquer à tous les systèmes de marquage acceptés par l'automate. Le signal de fluorescence émis par le SYBR® Green diminue régulièrement tandis que l'ADN double brin fond [Fig. 8 et 9].

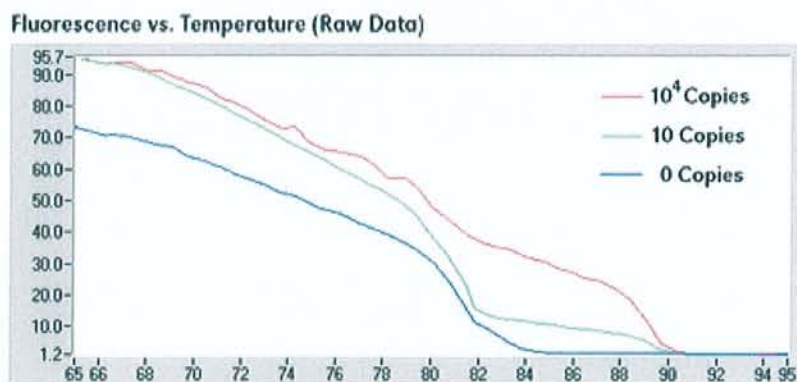


Figure 8

La figure 8 montre une courbe de fusion. L'axe des abscisses (X) représente la fluorescence tandis que celui des ordonnées (Y) indique les températures. A partir des points d'inflexion des courbes issues des 3 échantillons, il est possible de conclure sur la présence, en différente quantité, d'ADN « néoformés » qui fondent par chauffage progressif.

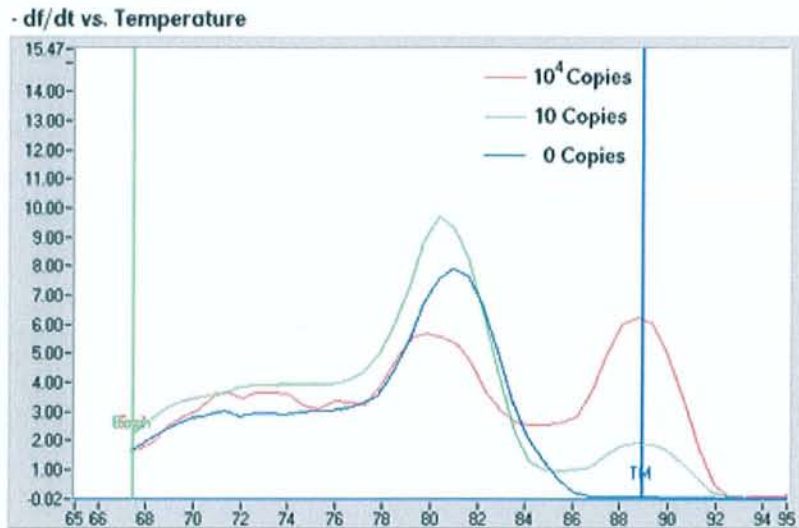


Figure 9

Le logiciel fournit la dérivée première des courbes précédentes où différents pics apparaissent alors de façon distincte [Fig 9]. Les pics de gauche sont dus à des dimères d'amorces : en raison de leur longueur réduite ils fondent à des températures plus basses. Le pic de droite, plus étroit, représente les produits d'amplification. Ce pic spécifique de l'amplicon diminue avec le nombre de molécules concernées dans l'échantillon.

La courbe bleue, montre un pic ne correspondant pas à la valeur attendue de l'ADN cible, mais à la formation d'un produit aspécifique. L'analyse de ces courbes de fusion permet de mettre en évidence le fragment d'ADN amplifié à l'aide d'une température caractéristique.

5 DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

5.1 Objectifs de notre travail

Le diagnostic de candidose invasive est souvent difficile et repose sur un ensemble de critères cliniques, radiologiques et biologiques. La précocité de ce diagnostic est fondamentale pour la prise en charge du patient, elle conditionne son pronostic.

D'un point de vue biologique, les hémocultures ne sont contributives que dans 50% des cas environ. L'association de la recherche d'antigène candidosique sérique couplée à celle d'anticorps anti-*Candida*, également par immuno-enzymologie, s'est révélée avoir une bonne sensibilité, une bonne spécificité et une valeur prédictive négative de 95%. Néanmoins, cette méthode n'est pas encore standardisée, compte tenu de la cinétique de la réponse immunitaire vis-à-vis de *Candida*, et n'est pas assez précoce pour avoir une place prépondérante parmi les critères diagnostiques. C'est pourquoi, de nombreuses équipes travaillent depuis plusieurs années à la mise au point d'une technique d'amplification génique (PCR) qui pourrait compléter ou anticiper le résultat des hémocultures et du diagnostic sérologique (Ag, Ac). Pour la PCR *Candida* aucune publication n'a formellement mis en évidence le meilleur type de prélèvement, ni la primauté d'un gène à la détection de *Candida* tant pour la sensibilité que la spécificité de la réaction. En revanche, de prime abord la sensibilité paraît meilleure que le diagnostic sérologique, et permettrait un diagnostic plus précoce.

Dans le but, de mettre effectivement en place une PCR *Candida*, une revue complète de la littérature a été menée afin de cibler les gènes, le meilleur type de prélèvement, la technique d'extraction et enfin des stratégies d'amplification et de révélation.

5.2 Choix de la cible

A ce jour, les techniques publiées concernant la PCR *Candida* sont nombreuses, mais seules quelques séquences cibles ont été testées.

Les molécules qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'analyses phylogénétiques sont les ARN ribosomiques. Les gènes codants pour les ARN ribosomiques sont répétés en tandem plusieurs dizaines voire centaines de fois. Chaque unité comprend à la fois des régions codantes et non codantes (les espaceurs). Chaque unité comprend ainsi une copie d'un gène codant pour l'ARN 18S, pour le 5.8S, pour l'ARN 28S et deux espaceurs, l'ITS ou espaceur interne transcrit, et l'IGS ou espaceur intergénique. Le gène codant pour le 5,8S est ainsi flanqué de l' ITS1 qui le sépare du gène 18S et de l' ITS2 qui le sépare du gène 28S [Fig. 10].

Ces molécules se sont avérées particulièrement intéressantes pour toutes les études phylogénétiques car, d' une part elles ont leurs homologues chez tous les organismes vivants et, d' autre part, elles sont constituées d'une succession de domaines dont l'évolution est plus ou moins rapide. Les domaines ayant la vitesse d'évolution la plus rapide étant ceux qui séparent les différentes régions codantes pour les ARN eux-mêmes : les ITS et les IGS. Les premières études ont ainsi été réalisées en séquençant directement les ARN ribosomiques à partir d'oligonucléotides s'hybridant dans les régions les plus conservées.

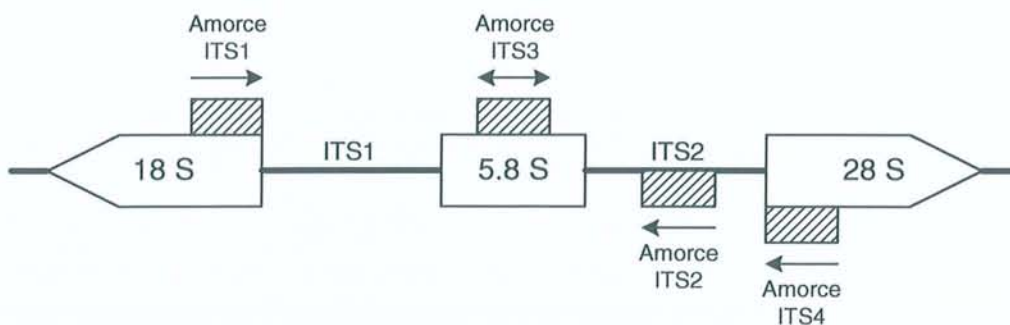


Figure 10

L'utilisation d'amorces telles que ITS1 et ITS4 [22,56,99] a permis d'établir les séquences des ITS1 et des ITS2 de très nombreuses souches et de montrer que le polymorphisme intra spécifique est très variable d'une espèce à une autre, tout en restant relativement faible à l'intérieur d'une espèce donnée. La mise à profit de cette homogénéité intraspécifique a permis de mettre au point des tests rapides d'identification après amplification et hybridation avec des sondes de référence [56] ou simplement sur la base du succès ou non de l'amplification.

Les premières publications portaient sur le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (ou RFLP "Restriction Fragment Length Polymorphism"). En 1995, Williams [181] et al. ont développé cette technique en ciblant le génome de *Candida sp.* compris entre deux zones non codantes de l'ADN ou espaceurs internes transcrit ITS1 et ITS4. Il s'agissait d'une technique longue, peu sensible et peu spécifique dont l'application reste limitée [30,152].

Dans la littérature, la partie du génome de *Candida* la plus couramment amplifiée est celle qui code pour la sous unité ARNr 18S. Cette séquence est commune à de nombreux champignons dont *Candida sp.* Ainsi Reiss et al. (1998) ont pu démontrer que la PCR classique amplifiant 18S rDNA était plus sensible que les hémocultures mais sans parvenir à une spécificité d'espèce puisque la région amplifiée était commune aux *Candida sp.*, aux *Aspergillus sp.* et aux *Cryptococcus neoformans* [147]. Seule une lourde hybridation in situ et une digestion par une protéinase permettaient secondairement le diagnostic d'espèce.

En 1997 Einsele et al. sont parvenus à dessiner une sonde ciblant une séquence consensuelle de *Candida sp.* et *Aspergillus sp.*, cependant leurs travaux ont démontré une hybridation croisée avec *Histoplasma capsulatum* [40].

En 2000, Loeffler et al. [107] ont repris l'amplification précédente du 18S rDNA. Ils ont démontré une excellente sensibilité de 100 fg (soit 10 CFU) mais, après séquençage des amplicons synthétisés ils ont conclu à leur communauté pour 17 espèces : les *Candida* les plus fréquents (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*), d'autres plus ou moins rares et enfin avec *S. cerevisiae*, *Trichosporon sp.* et *Malassezia furfur*. La spécificité d'une telle PCR pouvait donc être remise en cause ou tout du moins nécessitait une seconde étape, de type Southern Blot ou séquençage automatisé, pour parvenir au diagnostic d'espèce fongique.

Wahyuningsih et al. ainsi que Ferrer et al. ont utilisé comme cible le gène ribosomal 5.8S et sa région immédiatement contiguë ITS2 [48,176]. Cette région génomique est utilisée pour créer une amorce universelle et spécifique du genre fongique et nous a paru plus adaptée et plus sensible au genre *Candida* [48,93,109]. De plus, cette région 5.8S est comprise dans une région amplifiée par la PCR nichée donc plus sensible, décrite par Bougnoux [16].

Ces arguments génomiques nous ont poussés à choisir la région ITS / 5.8S rDNA comme cible pour notre étude.

5.3 Choix du type de prélèvement

Les techniques d'amplification génique ont été adaptées à plusieurs types de prélèvements : des tissus humains biopsiés de foyers infectieux, des hémocultures ensemencés avec du sang total de patient, du sérum ou du sang total. A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus en ce qui concerne la nature du prélèvement le mieux adapté.

Lorsque les conditions sont requises pour passer du stade de colonisation à celui d'invasion-infection (terrain et faculté de translocation du *Candida sp.*), les *Candida sp.* constituent de véritables foyers mycosiques dans certains organes. En 2000 [67] et 2001 [48] des techniques ciblées sur la région ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 ont été développées mais elles sont invasives et nécessitent de ponctionner ou de biopsier l'organe suspecté. Outre le fait que la biopsie puisse être en zone saine, les localisations organiques sont déjà tardives dans l'évolution clinique de la candidose invasive. Pour ces raisons ce type de prélèvement ne nous paraissait pas adapté à un diagnostic précoce de candidose invasive [89].

Les travaux de PCR, menés par Chang et al. [21] sur des flacons d'hémoculture ont permis certes, une identification en moins de 8 heures de l'espèce de *Candida*, mais leur technique était à la fois soumise à la positivité de l'hémoculture et à la présence éventuelle d'inhibiteur de PCR dans le flacon, selon le fournisseur retenu [25].

Actuellement les échantillons les plus testés sont le sang total et le sérum. Bognoux et al. ont décrit une supériorité du sérum sur le sang total mais celle-ci semble n'exister que pour *C. albicans* [16]. De nombreuses études ont été menées sur le sang total avec une sensibilité importante et une excellente spécificité [18,40,42,46,54,102,105].

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler, dans un premier temps sur le sérum, car ses avantages sont multiples :

- il est plus facile à manipuler (en particulier pour l'extraction de l'ADN),
- sa congélation ne pose pas de difficulté,
- il est moins susceptible à des variations interindividuelles (neutropénie...) que le culot de globules blancs.

Par la suite, comme il n'existait aucun arguments externes et aucun consensus défini auquel nous référer, nous sommes passés du sérum au sang total.

5.4 Choix de la technique d'extraction

Il est nécessaire d'extraire l'ADN avant de réaliser une amplification, afin de le concentrer, de le purifier, et d'éliminer d'éventuels inhibiteurs.

Les premières méthodes d'extraction publiées étaient des techniques manuelles qui faisaient appel à des kits « maison » [21,54,123,161,165,176]. Le problème majeur de ces kits est leur forte sensibilité aux contaminations extérieures ainsi que l'absence de standardisation.

L'apparition de kits commerciaux d'extraction manuelle a apporté de nombreux avantages : une meilleure reproductibilité, un meilleur rendement d'extraction, augmentant ainsi la sensibilité de la PCR. De plus, le gain de temps est appréciable de 2 à 4 heures de manipulation actuellement contre 8 heures et plus auparavant [104].

La tendance actuelle est au développement d'automates d'extraction automatique (MAGNA-Pur[®] - Roche Diagnostics[®]). Leur intérêt est surtout d'augmenter la qualité d'extraction et de diminuer le risque de contamination, car l'intervention humaine est limitée [108].

Cependant leur coût d'utilisation reste très élevé (acquisition de l'appareil et consommable), ce qui nous a poussés à utiliser un kit commercial d'extraction manuelle (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). Ce kit d'extraction présente l'avantage d'être applicable au sang total, au plasma et au sérum entre autres échantillons biologiques [81].

5.5 Choix des techniques d'amplification et de révélation

Historiquement, la PCR classique est la technique la plus utilisée mais d'autres méthodes ont été développées.

En 1997, Huang et al [75] ont repris le principe de l'amorce universelle fongique (région génomique située entre ITS1 et ITS2) en PCR classique et sont parvenus à une sensibilité de 10^3 à 10^4 cellules de *Candida albicans*/ml de suspension de culture. Par la suite certains auteurs ont développé diverses techniques diagnostiques de seulement deux [9,131,154] ou plusieurs espèces de *Candida* simultanément : technique multiplex mais sans améliorer la sensibilité même avec une révélation en électrophorèse capillaire [4,23,54,154].

Divers travaux de PCR-EIA (EIA=Immuno Enzymo Assay) ont été développés. Dans cette méthode, le produit d'amplification obtenu par PCR a été révélé par immunoenzymologie sur plaque [18,42]. La région amplifiée, située entre ITS1 et ITS4, concernait une portion de 18S rDNA, ITS1, 5.8SrDNA et les régions d' ITS2 rDNA ainsi qu'une portion de 28S rDNA [54,102,105].

Cette technique a présenté un problème d'hybridation croisée entre la sonde de *Candida glabrata* et *Saccharomyces cerevisiae* [53]. Néanmoins la PCR-EIA avait l'avantage d'améliorer considérablement la sensibilité. Les travaux de Fujita et al.[53] ont ainsi amélioré ceux de Miyakawa [120] et de Holmes [70], pour porter la sensibilité à 10 cellules/ml de sang soit 10 fois mieux qu'avec une technique de révélation en gel d'agarose ou TBE marqué au Bromure d'Ethidium[53] ; et avec une spécificité proche de 100% [42]. Le second intérêt de la PCR-EIA est la rapidité de sa révélation par les microplaques de puits coatés à la streptavidine (6 heures) en comparaison à une longue migration électrophorétique suivie de sa photographie (≥ 12 heures) [41,102].

En 1998, Loeffler et al. ont même réussi à atteindre 5CFU/ml de sensibilité sans perte de spécificité dans le sang [105].

En 2000, Loeffler et al. ont développé une technique de dosage quantitatif de fongémie par sonde d'hybridation (FRET). Cette technique, a présenté une bonne sensibilité (5CFU/ml) mais n'a concerné que *C albicans* dont le dosage était couplé avec *Aspergillus fumigatus*. Cette technique ne correspondait donc pas à l'objectif de notre travail [106].

LA PCR nichée associe deux PCR classiques successives et permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité ; cependant elle est difficilement utilisable pour un usage de routine sur des grandes séries car elle nécessite beaucoup de temps de manipulation. Cette technique reste très exposée aux risques de contaminations (du fait des deux PCR successives). Bougnoux et al. (1999) [16] ont démontré l'intérêt de cette technique pour le diagnostic de cinq espèces de *Candida* les plus fréquemment impliquées dans les candidoses à dissémination hématogène (déjà citées).

Le couple d'amorces externes était ITS1 et ITS4 donc incluait l'ADN ribosomal 5.8S en totalité et excluait notamment les 18S rDNA et 28S rDNA. Puis, la seconde PCR faisait appel à cinq couples d'amorces internes spécifiques chacune des espèces sus-citées. Cette technique expérimentale menée sur le lapin a démontré une excellente sensibilité : de 1 à 0,1 fg de DNA selon l'espèce de *Candida* considérée. La spécificité d'une telle méthode a été donnée à 100% par les auteurs mais surtout aucune réaction croisée entre les cinq espèces n'a été mise en évidence.

Les arguments, associés à la clarté et à la précision des techniques publiées, nous ont poussés à choisir cette cible et la PCR nichée pour notre étude. Ce choix a été conforté par la lecture des travaux de Khan et de Ferrer [48,90].

Secondairement nous chercherons donc à transposer la technique de Bougnoux et al., sur un automate de PCR en temps réel afin d'être d'une part plus rapide pour la phase d'amplification et de révélation et d'autre part d'automatiser la technique tout en limitant les risques de contaminations inhérents à toute PCR .

6 MATÉRIELS ET MÉTHODES

6.1 Sélection des champignons

Les cinq espèces de *Candida* retenues sont les plus fréquentes des infections invasives à *Candida* : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*. Ce sont celles utilisées dans la publication de Bougnoux et al. de 1999.

Les cinq souches sélectionnées ont été isolées et obtenues à partir de cultures. Celles-ci avaient été ensemencées à partir de divers prélèvements de patients du CHR de Metz. Les boîtes de culture utilisées étaient des milieux chromogènes Sabouraud CHROMagar[®] BD. Nous avons réalisé l'identification des espèces au moyen des galeries API 20C AUX Biomérieux[®]. Chaque souche a bénéficié de deux identifications réalisées à 48 heures d'intervalle. La seconde identification avait pour but de s'affranchir de toute erreur d'identification ou de défaut de croissance intra-puits dans ces galeries. Le résultat a été confronté à la couleur obtenue sur milieu CHROMagar[®] BD. Nous signalons ici que la souche de *C. albicans* était issue d'un patient séronégatif pour le VIH et immunocompétent, nous pensons avoir ainsi écarté le risque d'erreur de non identification et/ou de confusion entre *C. dubliniensis* et *C. albicans* sur galerie API 20C AUX..

Les repiquages de colonies ont été réalisés sur milieu de Sabouraud standard afin d'éviter tout risque induit par les chromogènes.

6.2 Validation de la technique par bioinformatique

6.2.1 Recueil des séquences des ITS :

Le recueil des séquences ITS des gènes ribosomiques des *Candida*, des autres champignons (pathogènes ou contaminants) et des bactéries pouvant être retrouvées comme potentiellement pathogène a été réalisé à partir des banques de données médicales (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Chaque séquence est associée à un numéro d'accès et inscrite dans la GenBank internationale [Annexe n°9].

6.2.2 Alignements des séquences :

Pour chaque champignon, plusieurs séquences ITS des gènes ribosomiques sont répertoriées dans les banques de données. Par alignement nucléotidique, nous avons sélectionné une séquence consensus représentative de chacun d'eux. L'alignement de l'ensemble des séquences consensus a ensuite permis de repérer les régions où sont placées les amorces et d'évaluer la spécificité de celle-ci.

http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html.

Ces alignements ont permis de confirmer que le couple d'amorces ITS1-ITS4 était spécifique du genre *Candida* sp. dans son ensemble mais qu'il reconnaissait et donc permettait l'amplification également de *Fusarium* sp. et de *Penicillium* sp.

Certes, l'alignement des amorces externes choisies croise avec *Fusarium* sp. et *Penicillium* sp., mais les produits d'amplifications ainsi obtenus auront un poids moléculaire supérieur à ceux des *Candida*, donc une bande de taille différente en électrophorèse et un Tm différent en PCR en temps réel sur LightCycler®.

Les alignements des séquences sont présentés en annexes 9 et 10.

Le tableau suivant correspond aux tailles théoriques des bandes amplifiées par le couple d'amorces ITS1-ITS4 :

| Nom des micro-organismes possédant 5.8S rDNA dont la séquence génomique est reconnue par le couple d'amorces ITS1-ITS4 | N° séquence de la GenBank | Taille du fragment (pb) |
|--|---------------------------|-------------------------|
| <i>Candida albicans</i> 5.8S complete, 28S 5' end | L 47111 | 535 |
| <i>Candida tropicalis</i> 18S 3' end, 5.8S complete, 28S 5' end | L47112 | 524 |
| <i>Candida glabrata</i> 18S, 3' end, 5.8S, 5' end | L 47108 | 478 |
| <i>Candida parapsilosis</i> 18S 3' end, 5.8S complete, 25S 5' end | L 47109 | 520 |
| <i>Candida krusei</i> 18S 3' end, 5.8S complete, 25S 5' end | L 47113 | 510 |
| <i>Candida guilliermondii</i> 18S 3' end, 5.8S complete, 25S 5' end | L 47110 | 608 |
| <i>Fusarium sp.</i> ITS1, 5.8S, ITS2 | AJ279478 | 555 |
| <i>Penicillium sp.</i> ITS1, 5.8S, ITS2 | AJ279476 | 580 |

Les organismes suivant ne figurent pas dans ce tableau puisque conformément aux alignements de séquences, les amorces ne les amplifient pas :

- *Aspergillus fumigatus* (AF078892)
- *Cryptococcus neoformans var. gattii* (AJ493575)
- *Pneumocystis carinii* (U07222)
- *Rhizomucor pusillus* (AJ278365)
- *Rhizopus oryzae* (AB097383)
- *Mucor indicus* (AB113027)

- *Staphylococcus aureus* (U11780)
- *Staphylococcus sp.* (AY728162)

Il est à noter ici que les bactéries ne possèdent pas de région 5.8 S.

6.3 Technique d'extraction d'ADN

6.3.1 Locaux de biologie moléculaire

Pour toutes les techniques de biologie moléculaire, afin d'éviter tout problème de contamination, des locaux séparés et du matériel spécifique sont nécessaires.

Les locaux de biologie moléculaire du laboratoire de Microbiologie du CHR de Metz sont composés de 4 pièces :

Pièce n°1 : local de la préparation de l'échantillon (extraction de l'ADN)

Pièce n°2 : local de la préparation des réactifs de PCR (Mix),
possédant une hotte à flux laminaire

Pièce n°3 : local des thermocycleurs (amplification) et de migration électrophorétique

Pièce n°4 : Pièce du LightCycler®-Roche®

6.3.2 Choix du kit commercial d'extraction

Dans un premier temps nous avons extrait l'ADN à partir de suspension de levures en eau « RDNA free », par un kit commercial d'extraction : cette eau est garantie vierge de toute molécule d'ADN et d'ARN par son fabricant. Nous avons choisi le kit commercial Maestro Yeast Kit® (Eurobio, Courtaboeuf, France), car il avait été élaboré spécifiquement pour les extractions des levures. Il était donc adapté au sérum, type de prélèvement de la publication retenue [16]. Utilisé seul, et conformément aux directives du fabricant ce kit d'extraction n'a pas donné de résultat correct pour l'extraction des *Candida*. Nous avons donc choisi de faire un prétraitement à la Protéinase K avec 10% de Sodium DodécylSulfate (SDS) avant son utilisation. Cette enzyme et ce détergent anionique ont permis, en digérant les cellules de levures et leur noyau de rendre l'ADN de *Candida* plus accessible pour les étapes suivantes. Nous avons ainsi obtenu des produits d'extraction plus conformes à notre attente: produits d'extraction présents sur gel de migration électrophorétique et quantité correcte d'ADN en présence, mesurée par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm.

Par la suite, le kit Maestro Yeast Kit[®] n'étant plus commercialisé et compte tenu de nos résultats de faible sensibilité sur sérum, nous avons opté pour le coffret QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen[®], Courtaboeuf, France) validé pour l'extraction des *Candida* dans différents types de prélèvements humains [104,110,176].

Ce kit d'extraction manuelle utilise un système de colonnes de centrifugation contenu dans des microtubes. L'ADN se fixe spécifiquement sur la membrane de gel de silice QIAamp tandis que les contaminants y sont filtrés librement. Les inhibiteurs de PCR tels que les cations divalents et les protéines sont totalement éliminés par deux étapes de lavage ; laissant l'acide nucléique purifié pour être élué dans un tampon de reprise ou dans de l'eau.

6.3.3 Préparation des échantillons avant leur extraction

L'extraction a été effectuée selon les préconisations de la notice du kit mais en procédant à quelques adaptations : nécessité d'un prétraitement de l'échantillon avant l'emploi du kit, en raison de la difficulté à lyser les levures *Candida*.

6.3.3.1 Suspension de levures

Les suspensions de levures sont préparées à l'aide de 10 à 20 CFU diluées dans 3 ml d'eau « RDNA Free ».

L'étape de prétraitement propre aux suspensions de levures :

- Centrifuger 10 minutes à 5000 g (soit environ 7500 Tours/min)
- Remettre en suspension le culot ainsi obtenu dans 600 µl de tampon sorbitol puis ajouter 200 U de lyticase (ou de zymolaze) et incubé 30 minutes à 37°C dans un bain-marie à sec. Cette enzyme a pour but d'obtenir la lyse membranaire des *Candida*.

- Précipiter les sphéropastes de levures ("noyaux nus") par 5 minutes de centrifugation à 5000 g avant de les remettre en suspension dans 180 µl de tampon ATL

- Agiter vigoureusement puis incubé ce mélange 1 heure à 56°C dans un bain-marie à sec

- Centrifuger brièvement pour enlever les gouttelettes à l'intérieur du bouchon

- Ajouter 180 µl de tampon AL

- Agiter vigoureusement 15 secondes puis incubé 10 minutes à 70°C

- Centrifuger brièvement

- Ajouter 200 µl d'Ethanol absolu et vortexer 15 secondes

Puis suivre le protocole QIAamp® proprement dit ou stocker éventuellement à + 4°C

Ce prétraitement s'applique aussi aux extractions sur sérum.

6.3.3.2 Echantillon de sang total prélevé sur EDTA

Lorsque nous utilisons des échantillons de sang total prélevé sur tube classique à EDTA-K3 (bouchon violet dans la classification internationale) un prétraitement doit être effectué. En effet, le prélèvement sur sang total impose la lyse des globules rouges puis celle des globules blancs avant de pouvoir lyser efficacement les membranes de levures efficacement.

** Lyse des globules rouges puis des globules blancs du sang total :*

- Dans un tube Falcon de 50 ml mettre 3 ml de sang total homogénéisé
- Ajouter 15 ml de tampon RCLB (lyse des hématies) et laisser 15 minutes dans la glace
- Centrifuger 10 minutes à 3000 Tours/min
- Enlever le surnageant par retournement et ajouter 15 ml de tampon RCLB, et mélanger par retournement pour laver le culot de centrifugation
- Centrifuger 10 minutes à 3000 Tours/min
- Enlever le surnageant par retournement puis à la pipette de transfert
- Ajouter 1 ml de tampon WCLB (lyse des leucocytes) puis incuber 45 minutes à 65°C (dans un bain-marie) avant de centrifuger 10 minutes à 5000 Tours/min
- Enlever le surnageant

** Lyse des membranes de cellules de levures potentiellement en présence :*

- Ajouter 500 µl de tampon lyticase (lyse des membranes de *Candida* en présence) et incuber 30 minutes à 37°C avant de centrifuger 10 minutes à 5000 Tours/min
 - Enlever le surnageant pour récupérer les sphéroplastes
 - Ajouter 180 µl de tampon ATL + 20µl de protéinase K issus tous deux du kit QIAamp[®] DNA Mini Kit, et incuber 15 minutes à 55°C
 - Ajouter 200 µl de tampon AL puis incuber 10 minutes à 70°C
 - Ajouter 200 µl d'éthanol absolu
 - Mettre ce mélange dans une colonne QIAamp[®] posée sur un microtube
- Puis suivre le protocole QIAamp[®] proprement dit

6.3.4 Extraction d'ADN de *Candida*

Nous avons utilisé le kit QIAamp[®] DNA Mini Kit selon les directives du fabricant et après un prétraitement spécifique selon la nature de l'échantillon à analyser.

- Reprendre le tube issu du prétraitement et contenant 200 µl d'Ethanol absolu et venant d'être agité vigoureusement 15 secondes.
- Mettre ce mélange dans une colonne QIAamp[®] posée sur un microtube
- Centrifuger 1 minute à 8000 Tours/min (6000g)
- Jeter le tube et mettre la colonne sur un autre microtube
- Ajouter 500 µl de tampon AW1
- Centrifuger 1 minute à 8000 Tours/min
- Jeter le tube et mettre la colonne sur un autre microtube
- Ajouter 500 µl de tampon AW2
- Centrifuger 3 minutes à 13000 Tours/min
- Jeter le tube
- Poser la colonne sur un microtube de récupération finale
- Ajouter 50 µl de tampon AE et incubé 1 minute à température ambiante
- Centrifuger 1 minute à 7500 Tours/min

Jeter la colonne : l'extrait recueilli peut être conservé à -20°C avant amplification.

Afin de vérifier la limite de linéarité de ce protocole d'extraction, nous avons constitué un sang total fictif : mélange de sang hyperleucocytaire (> 30 G/l) et de sang de patient polyglobulique (Hb >17g /l), qui a été déplété d'une partie de son plasma. Nous avons réalisé une gamme de dilution de ce sang fictif. Puis nous avons contaminé chaque tube de la gamme avec une quantité constante de suspension moyennement concentrée en levure (CFU). Nous n'avons pas mis en évidence de problème d'extraction quelle que soit la quantité d'ADN humain en présence.

6.3.5 Conservation et qualité des produits d'extraction

Les extraits sont soit immédiatement utilisés soit congelés à 20°C sous forme d'aliquots permettant de conserver l'ADN extrait plusieurs années.

Lors des premières extractions sur suspensions de levures, nous avons quantifié l'ADN obtenu par lecture de la densité optique à 260 nm et évalué l'absence de contamination protéique à 280 nm. La quantité d'ADN simple ou double brin a été calculée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm et à 280 nm. Concentration ($\mu\text{g/ml}$) = 50 X Facteur de dilution X DO_{260} .

L'absence de contamination protéique est évaluée par le rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ qui doit être compris entre 1,7 et 2. Si le rapport est inférieur à 1,7, il existe une contamination protéique nécessitant un traitement adapté.

6.4 Amplification de l'ADN par PCR classique

6.4.1 Choix de la cible

Pour notre étude, nous avons choisi d'amplifier la région 5.8S rDNA du genre *Candida sp.* Pour cela nous avons réalisé une PCR nichée d'après les travaux de Bougnoux et al., en 1999.

6.4.2 Les Amorces

La première PCR utilise comme couple d'amorces externes les amorces universelles spécifiques de *Candida sp.* (ITS1 et ITS4), pour amplifier les espaceurs intergéniques des ADN ribosomiaux du genre *Candida sp.*

Amorce ITS1 : 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

Amorce ITS4 : 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Puis la seconde PCR utilisera des amorces internes décrites dans le tableau ci-dessous :

| Séquences d'oligonucléotides utilisées dans la PCR nichée | | | | |
|---|----------------------|----------|--------|--------|
| Espèces (N° Genbank et amorces) | Séquence 5' → 3' | Position | Taille | T (°C) |
| <i>C. albicans</i> (L47111) | | | | |
| Oligonucléotide 1: CAL1 | AACTTGCTTTGGCGGTGGGC | 73 | 386 | 66 |
| Oligonucléotide 2: CAL3 | TGGACGTTACCGCCGCAAGC | 439 | | |
| <i>C. tropicalis</i> (L47112) | | | | |
| Oligonucléotide 1: CTR1 | ATTTCTTTGGTGGCGGGAGC | 73 | 373 | 57 |
| Oligonucléotide 2: CTR3 | GGCCACTAGCAAAATAAGCG | 426 | | |
| <i>C. glabrata</i> (L47108) | | | | |
| Oligonucléotide 1: CGL1 | ATGCTATTTCTCCTGCCTGC | 128 | 234 | 57 |
| Oligonucléotide 2: CGL3 | TGNATCCACTGGGAGAACTC | 342 | | |
| <i>C. parapsilosis</i> (L47109) | | | | |
| Oligonucléotide 1: CPA1 | GCCAGAGATTANACTCAACC | 123 | 336 | 55 |
| Oligonucléotide 2: CPA3 | GGAAGAAGTTTTGGAGTTTG | 439 | | |
| <i>C. krusei</i> (L47113) | | | | |
| Oligonucléotide 1: CKR2 | ACTACACTGCGTGAGCGGAA | 43 | 360 | 55 |
| Oligonucléotide 2: CKR3 | AAAAAGTCTAGTTCGCTCGG | 383 | | |
| Position = Position dans la séquence ITS | | | | |
| Taille = Taille du fragment exprimée en paire de bases | | | | |
| T°C = Température d'hybridation (annealing) exprimée en degré Celsius | | | | |

6.4.3 PCR externe spécifique du genre *Candida*

* Préparation du Mix [Fig. 11]

| Réactifs | Prise d'essai | Concentration finale obtenue (sur 50 μ l) |
|---|---------------------|---|
| Tampon 10 X | 5 μ l | 1 X |
| MgCl ₂ à 25 mM | 3 μ l | 1,5 mM/ l |
| Précurseurs nucléotidiques dNTPs (10 mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 1 μ l de chaque | 200 μ M/ l |
| Amorce sens ITS1 (10 pmol/ μ l) | 2 μ l | 0,4 μ M/ l |
| Amorce antisens ITS4 (10 pmol/ μ l) | 2 μ l | 0,4 μ M/ l |
| Taq Polymérase (5 U/ μ l) | 0,5 μ l | |
| Eau pour biologie moléculaire | 28,5 μ l | |

Répartir le Mix dans les tubes à PCR : 45 μ l par tube.

Recouvrir d'une goutte d'huile le mélange réactionnel (Mix) pour le protéger de toute contamination environnementale.

Ajouter 5 μ l d'ADN fraîchement extrait ou décongelé, à travers l'huile de surface

Obturer les tubes.

Déposer les tubes dans le Thermocycleur Perkin-Elmer® 2400.

* Programmation de l'amplification :

1^o) 95°C, 5 minutes pour activer la Taq-Polymérase et dénaturer l'ADN

2^o) 35 cycles de PCR : - 94°C, 20 secondes (dénaturation)

- 55°C, 15 secondes (hybridation)

- 72°C, 65 secondes (élongation)

3^o) 72°C, 15 minutes (élongation finale)

4^o) 4°C, infini.

Obtention du produit de la 1^{ère} PCR.

* Révélation :

L'obtention de produits-PCR de taille attendue a été vérifiée par électrophorèse sur gel.

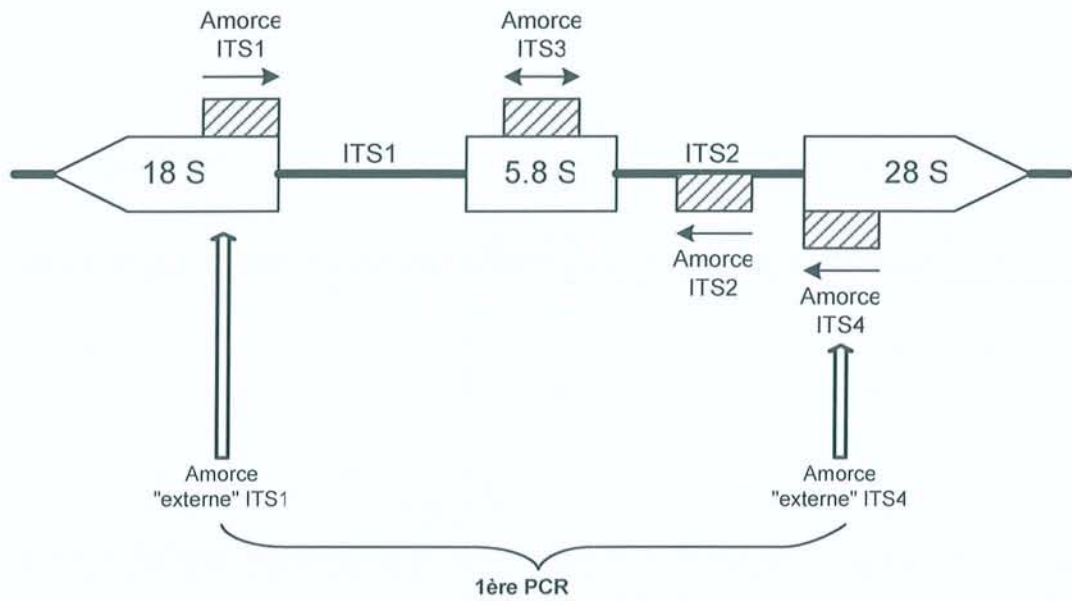


Figure 11 : PCR classique : externe spécifique du genre *Candida*

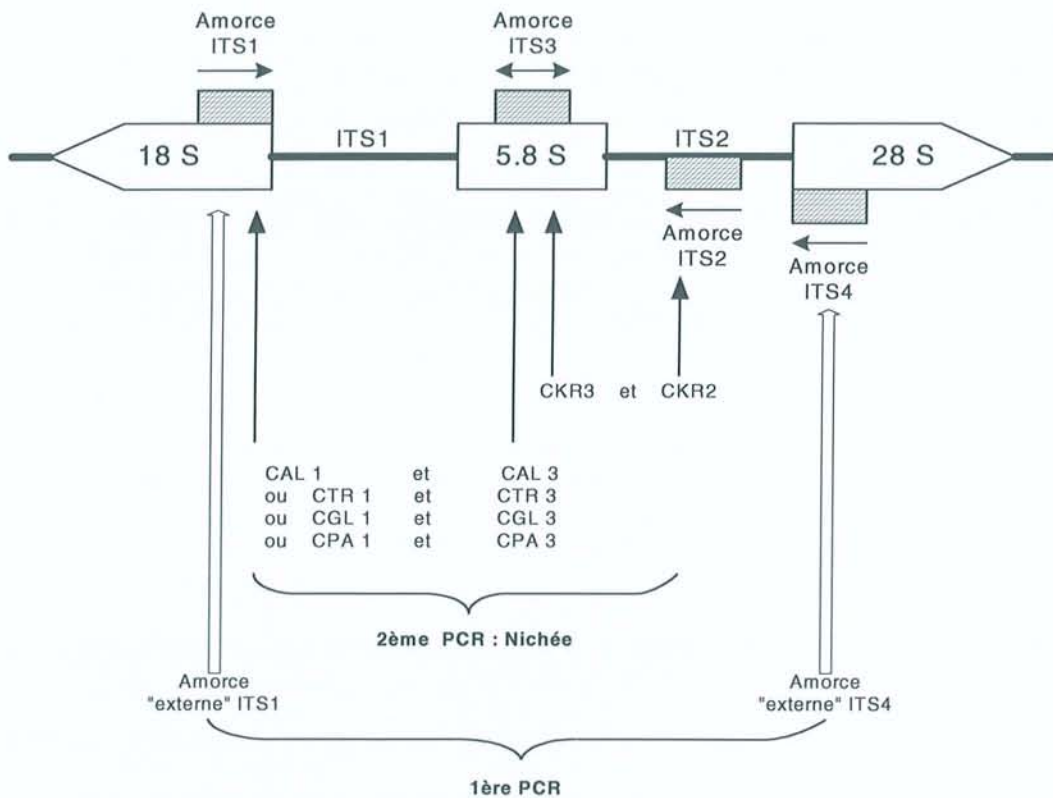


Figure 12: PCR classique : interne spécifique d'une espèce de *Candida* (PCR nichée)

6.4.4 PCR interne spécifique des espèces de *Candida* (PCR nichée)

* Amorces et préparation du Mix [Fig. 12]

Nous avons utilisé la même base de Mix que pour la première PCR, seuls changent les couples d'amorces qui sont spécifiques d'espèces.

| Réactifs | Prise d'essai | Concentration finale obtenue (sur 50 µl) |
|---|----------------|--|
| Tampon 10 X | 5 µl | 1,5 mM/ l |
| MgCl ₂ à 25 mM | 3 µl | 1,5 mM/ l |
| Précurseurs nucléotidiques dNTPs (10 mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 1 µl de chaque | 200 µM/ l |
| Amorce sens spécifique d'espèce (10 pmol/µl) | 2 µl | 0,4 µM/ l |
| Amorce antisens spécifique d'espèce (10 pmol/µl) | 2 µl | 0,4 µM/ l |
| Taq Polymérase (5 U/µl) | 0,5 µl | |
| Eau pour biologie moléculaire | 28,5 µl | |

Il faut donc préparer cinq Mix : un par espèce de *Candida*.

Pour la recherche de *C. albicans*, le couple d'amorces est CAL1 – CAL3 avec une température d'hybridation propre à ce couple de 66°C.

Pour la recherche de *C. tropicalis*, le couple d'amorces est CTR1 – CTR3 avec une température d'hybridation propre à ce couple de 57°C.

Pour la recherche de *C. glabrata*, le couple d'amorces est CGL1 – CGL3 avec une température d'hybridation propre à ce couple de 57°C.

Pour la recherche de *C. parapsilosis*, le couple d'amorces est CPA1 – CPA3 avec une température d'hybridation propre à ce couple de 55°C.

Pour la recherche de *C. krusei*, le couple d'amorces est CKR2 – CKR3 avec une température d'hybridation propre à ce couple de 55°C.

Répartir le Mix propre à chaque espèce dans les tubes à PCR : 45 µL par tube.
Recouvrir d'une goutte d'huile le mélange réactionnel (Mix)
Ajouter 5 µL du produit d'amplification obtenu par la 1^{ère} PCR (prélevé à travers l'huile).
Obturer les tubes.
Déposer les tubes dans le Thermocycleur Perkin Elmer[®] 2400.

** Programmation de l'amplification :*

- 1[°]) 95°C, 5 minutes pour activer la Taq-Polymérase
- 2[°]) 35 cycles de PCR :
 - 94°C, 20 secondes (dénaturation)
 - Ici la température d'hybridation est spécifique de chaque couple d'amorces donc de chaque espèce de *Candida*.
 - 72°C, 65 secondes (élongation)
- 3[°]) 72°C, 15 minutes (élongation finale)
- 4[°]) 4°C, infini.

Notons ici que les températures propres à chaque couple d'amorces spécifiques nous ont permis d'apparier les amplifications pour des programmations communes du thermocycleur. Ainsi nous avons pu disposer sur un même thermocycleur la recherche de *C. tropicalis* avec celle de *C. glabrata*, la recherche de *C. parapsilosis* avec celle de *C. krusei* dans un second temps ou sur un autre thermocycleur, tandis que les tubes pour *C. albicans* doivent être placés seuls.

** Révélation :*

La révélation est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose à 2% contenant un colorant fluorescent des acides nucléiques : GelStar[®] Nucleic Acid Gel Stain (FMC Bioproducts[®], Rockland, Maine, USA).

L'amplicon (15 µl) et 3 µl bleu de bromophénol (pour visualiser le front de migration et d'alourdir le produit) ont été déposés dans les puits de ce gel.

Sur chaque gel, un témoin positif d'ADN de *Candida* amplifié pour la ou les espèces concernées, un témoin négatif (eau distillée), et un marqueur de taille (encore appelé témoin de poids moléculaire) ont systématiquement été déposés.

- Préparation des gels :

- 2 % d'agarose dans 100 ml de tampon TBE 0,5X pour électrophorèse.
- GelStar[®] 1 µl / 100 ml de gel

- Migration :

- Le gel est immergé dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE
- Dépôt des produits d'amplification des deux PCR dans des puits de migration avec du Cyanol Dye Bromophenol Blue[®] (encore appelé tampon de charge).
- L'électrophorèse est réalisée en 1 heure sous une tension de 130 V.

- Lecture :

Elle est réalisée sous rayonnement ultraviolet (312nm) ; on photographie le gel.

Les tailles des amplicons attendus doivent être de :

- 386 pb pour *C. albicans*,
- 373 pb pour *C. tropicalis*,
- 234 pb pour *C. glabrata*
- 336 pb pour *C. parapsilosis*
- 360 pb pour *C. krusei*

6.5 Adaptation sur LightCycler[®] (Roche Diagnostics[®])

6.5.1 Intérêts de l'adaptation de la technique classique en une PCR temps réel

La PCR nichée étant longue et fastidieuse, il nous a paru judicieux d'adapter cette technique sur l'automate LightCycler[®] Roche Diagnostics[®].

La PCR en temps réel présente plusieurs avantages :

- rapidité de la phase d'amplification et lecture en temps réel voire à la fin des cycles d'amplification soit après 1 heure maximum.
- meilleure sensibilité par un système de lecture plus performant qu'une électrophorèse sur gel.
- meilleure traçabilité des séries de PCR
- capillaire de petite taille donc deux fois moins consommateur de Mix

Nous avons donc pensé pouvoir développer une technique d'analyse plus rapide sans perte de sensibilité ni de spécificité, réduisant ainsi le délai de rendu de résultat aux cliniciens accélérant ainsi la démarche thérapeutique éventuelle.

6.5.2 Extraction, amorces et SYBR[®]Green pour la PCR en temps réel

** Extraction*

Nous avons utilisé les mêmes kits et protocoles d'extraction qu'en PCR classique.

** Choix des amorces*

Nous avons également utilisé les mêmes amorces et leur température d'hybridation, que précédemment, pour la première comme pour la seconde PCR.

Par conséquent nous avons pu apparier la recherche de *C. tropicalis* avec celle de *C. glabrata* (57°C), la recherche de *C. parapsilosis* avec celle de *C. krusei* (55°C) dans une seconde série, tandis que les capillaires pour *C. albicans* devaient être placés seuls (66°C).

* Agent intercalant SYBR[®]Green

Nous avons choisi le marquage des amplicons natifs à l'aide de l'agent intercalant SYBR[®]Green pour des raisons pratiques : l'absence de conception de sondes et l'adaptation des travaux de Bougnoux et al., repris précédemment, sur l'automate de PCR en temps réel LightCycler[®] Roche Diagnostics[®].

* Adaptation du Mix

Il nous a fallu adapter la concentration de MgCl₂.

Nous avons également réalisé divers essais permettant de retenir le nombre optimal de cycles d'amplification.

6.5.3 PCR spécifique du genre *Candida*

* Amorces

Nous avons réalisé une première PCR tout à fait superposable à la première PCR classique : les amorces universelles spécifiques pour des ADN ribosomiaux du genre *Candida* sp. (ITS1 et ITS4).

Amorce ITS1 : 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

Amorce ITS4 : 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

* Préparation du Mix

Le *Mix* est constitué de tampon SYBR[®]Green reconstitué, de MgCl₂ à 25 mM, des amorces sens ITS1 et antisens ITS4, et d'eau pour biologie moléculaire.

| Réactifs | Prise d'essai | Concentration finale obtenue (sur 20 µl) |
|--|---------------|--|
| Tampon SYBR [®] Green reconstitué | 2 µl | |
| MgCl ₂ à 25 mM | 2 µl | Essais avec une gamme de 2,5 à 6,5 mM/ l |
| Amorce sens (10 pmol/µl) | 0,4 µl | 0,2 µM/ l |
| Amorce antisens (10 pmol/µl) | 0,4 µl | 0,2 µM/ l |
| Eau pour biologie moléculaire | 10,2 µl | |

Le tampon SYBR[®]Green contient : le tampon, le SYBR[®]Green, les précurseurs nucléotidiques dNTPs, la Taq Polymérase et 1 mM de MgCl₂.

* Préparation des capillaires

- Déposer le nombre de capillaires LightCycler® (20 µl) nécessaires sur le portoir spécial réfrigéré à + 4°C ou “cooling-bloc”.
- Distribuer 15 µl de Mix dans chaque capillaire.
- Pour le témoin négatif : 5 µl d’eau pour biologie moléculaire sont ajoutés aux 15 µl de Mix et le capillaire est immédiatement fermé sous la hotte.
- Couvrir les capillaires avec le couvercle du “cooling-bloc”

* Ajout de l’ADN extrait (pièce d’extraction)

- Ajouter 5 µl d’ADN fraîchement extrait ou décongelé dans chaque capillaire.
- Pour le témoin positif : 5 µl d’ADN de témoin positif sont ajoutés aux 15 µl de Mix.
- Fermer chaque capillaire à l’aide d’un bouchon adapté.
- Centrifuger 15 secondes à 3000 Tours/min (descente au fond des capillaires et mélange avec le Mix).

* Programmation du LightCycler®

Après avoir distribuer les capillaires sur la couronne du LightCycler®, la programmation du LightCycler® est donc la suivante :

1- Incubation préalable : 8 minutes à 95°C (dénaturation l'ADN et activation de la Taq-polymérase) avec une vitesse de chauffe S de 20°C/seconde.

2- Amplification : 45 cycles thermiques tels que :

- dénaturation à 95°C pendant 10 secondes
- hybridation à 62°C pendant 10 secondes
- élongation à 72°C pendant 25 secondes

3- Courbes de fusion (melting curves) : 1 cycle thermique tels que :

- dénaturation à 95°C pendant 15 secondes
- réhybridation à 71°C pendant 10 secondes
- chauffe progressive jusqu'à 95°C par palier de 0,05°C/sec (=S)

4- Refroidissement : 40°C pendant 30 secondes (avec S= 20°C/sec) puis température ambiante à l'infini.

La fluorescence est mesurée à chaque cycle en fin d'élongation.

* Interprétation d'un signal

Les données d'amplification ont été collectées en temps réel et analysées par le logiciel de l'automate LightCycler®.

Un résultat positif s'observe par un décrochement sur la courbe de fluorescence.

Le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour obtenir ce décrochement est fonction de la quantité d'ADN présente au départ dans l'échantillon.

6.5.4 PCR spécifique des espèces de *Candida*

Dans un premier temps nous avons réalisé une PCR nichée c'est-à-dire reprenant les amplicons de la première PCR avec les amorces spécifiques d'espèce; mais nous avons observé de nombreux misappariements (hybridations non spécifiques).

C'est pourquoi nous avons modifié notre stratégie : nous réalisons une 1^{ère} PCR avec les amorces ITS1-ITS4 afin d'affirmer ou non la présence du genre *Candida*. En cas de positivité, les couples d'amorces spécifiques d'espèces étaient alors utilisés directement sur les produits d'extraction issus de la suspension de levures ou du prélèvement humain [Fig. 13].

* Amorces et préparation du Mix

Nous avons utilisé la même base de Mix que pour la première PCR LightCycler[®], seul changent les couples d'amorces qui sont spécifiques d'espèces [Fig. 13].

Il faut donc préparer cinq Mix : un par espèce de *Candida*.

* Préparation des échantillons

Pour cette étape, nous avons procédé de manière identique à la PCR spécifique de genre sur LightCycler[®]. Le Mix propre à chaque espèce est distribué dans des capillaires séparés : 15 µl par capillaire ainsi que 5 µl d'ADN extrait.

* Programmation du LightCycler®

La programmation du LightCycler® est identique à celle pour la PCR spécifique du genre *Candida*, seul change le nombre de cycle et les températures d'hybridation, spécifiques de chaque couple d'amorces donc de chaque espèce de *Candida* recherchée.

Pour la recherche de *C. albicans*, le couple d'amorces est CAL1 – CAL3 avec une température d'hybridation propre à ce couple de 66°C.

Pour la recherche de *C. tropicalis* (couple d'amorces CTR1 – CTR3) et la recherche de *C. glabrata* (couple d'amorces CGL1 – CGL3) la température d'hybridation commune aux deux couples d'amorce est de 57°C.

Pour la recherche de *C. parapsilosis* (couple d'amorces CPA1 – CPA3) et la recherche de *C. krusei* (couple d'amorces CKR2 – CKR3) la température d'hybridation commune aux deux couples d'amorce est de 55°C.

La fluorescence est mesurée à chaque cycle en fin d'élongation.

* Exploitation des données

Les données d'amplification sont ensuite exploitées par le logiciel de l'automate LightCycler® de la même façon que pour la PCR spécifique du genre *Candida*.

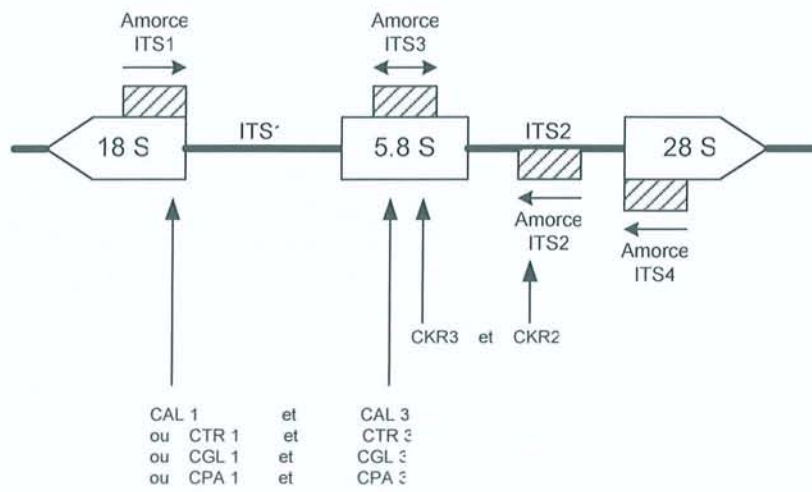


Figure 13 : PCR spécifique d'une espèce de *Candida* en technique LightCycler®

utilisant les amorces spécifiques d'espèces directement sur les produits d'extraction issus de la suspension de levures ou du prélèvement humain.

6.6 Essais sur le sang total de patients

Après l'optimisation de la technique sur culture, nous avons procédé à son application sur échantillons humains.

6.6.1 Sélection des patients

Ces essais prospectifs ont été réalisés sur une période de six mois.

Nous avons pratiqué des prélèvements chez 48 sujets "sains" de consultations externes. Ces derniers constituent notre groupe de témoins négatifs.

Nous avons limité le recrutement des patients à deux services du CHR de Metz : le service de réanimation chirurgicale et celui d'onco-hématologie ; l'unité de réanimation de chirurgie cardiaque étant exclue.

Le recrutement de ces deux services correspondait aux patients à risque élevé pour le développement de candidose invasive, selon d'une part, l'épidémiologie et la physiopathologie de l'agent infectieux *Candida* et d'autre part, selon la propre épidémiologie du Centre Hospitalier Régional durant les 12 mois précédents (8 cas en réanimation, 1 cas en onco-hématologie et 2 cas dans deux autres services pour un total de 7 décès).

L'inclusion a été laissée à la discrétion des médecins-cliniciens selon leurs suspicions cliniques et selon les tableaux pathologiques auxquels ils étaient confrontés.

Ces patients ont été classés comme ayant une candidémie prouvée, probable ou possible en application des critères diagnostiques de l'EORTC. [Annexes n°3 et 4].

Selon cette classification, les 17 patients inclus se répartissent ainsi :

- Candidose invasive prouvée pour deux d'entre-eux
- Aucun patient suspect de candidose probable
- Candidose possible pour 15 d'entre-eux

6.6.2 Techniques de diagnostic de référence

Bien qu'elles ne soient pas un véritable « gold standard » pour le diagnostic des candidoses à dissémination hématogène, nous avons choisi les hémocultures comme méthode de référence. Le système utilisé au CHR était le Bioargos[®] de Biorad[®].

Chaque prélèvement pour PCR-*Candida* devait s'accompagner d'un couple de flacons à hémoculture (aérobie et anaérobie) prélevé immédiatement avant ou après le tube pour PCR et sur la même ponction veineuse ou voie d'abord périphérique.

La recherche plus ou moins combinée d'antigène et d'anticorps de *Candida sp.*, selon les Kits Platélia[®] *Candida*, n'a pas été systématiquement prescrite par les médecins cliniciens.

6.6.3 Extraction de sangs totaux de patients

Le sang des patients a été prélevé sur tubes anticoagulants EDTA (Bouchon violet). Ces tubes ont été rapidement acheminés à l'unité de biologie moléculaire du laboratoire de Microbiologie, si nécessaire ils étaient stockés, par le centre de tri, à + 4° C pour la nuit.

L'extraction a été réalisée à l'aide du kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen[®], Courtaboeuf, France) et précédée d'un prétraitement selon le protocole précédemment décrit.

Si les extraits n'étaient pas techniques immédiatement, ils étaient congelés à -20°C.

6.6.4 Techniques de PCR

La recherche d'ADN candidosique a été effectuée grâce à la technique de PCR en temps réel en prenant tout d'abord les amorces externes puis, en cas de positivité de cette première PCR, en réalisant une seconde amplification avec des amorces spécifiques d'espèce.

Toutefois, durant cette période d'inclusion, en cas de négativité de l'hémoculture et de la PCR spécifique du genre *Candida*, nous avons décidé de réaliser également une PCR spécifique d'espèce chez tous patients prélevés.

7 RESULTATS

7.1 PCR classique

7.1.1 Détection du produit d'amplification

Les couples d'amorces spécifiques d'espèces de *Candida* ont permis d'amplifier les fragments de longueur variable, par PCR nichée.

L'amplicon observé mesure :- 386 pb pour *C. albicans*,
- 373 pb pour *C. tropicalis*,
- 234 pb pour *C. glabrata*
- 336 pb pour *C. parapsilosis*
- 360 pb pour *C. krusei*

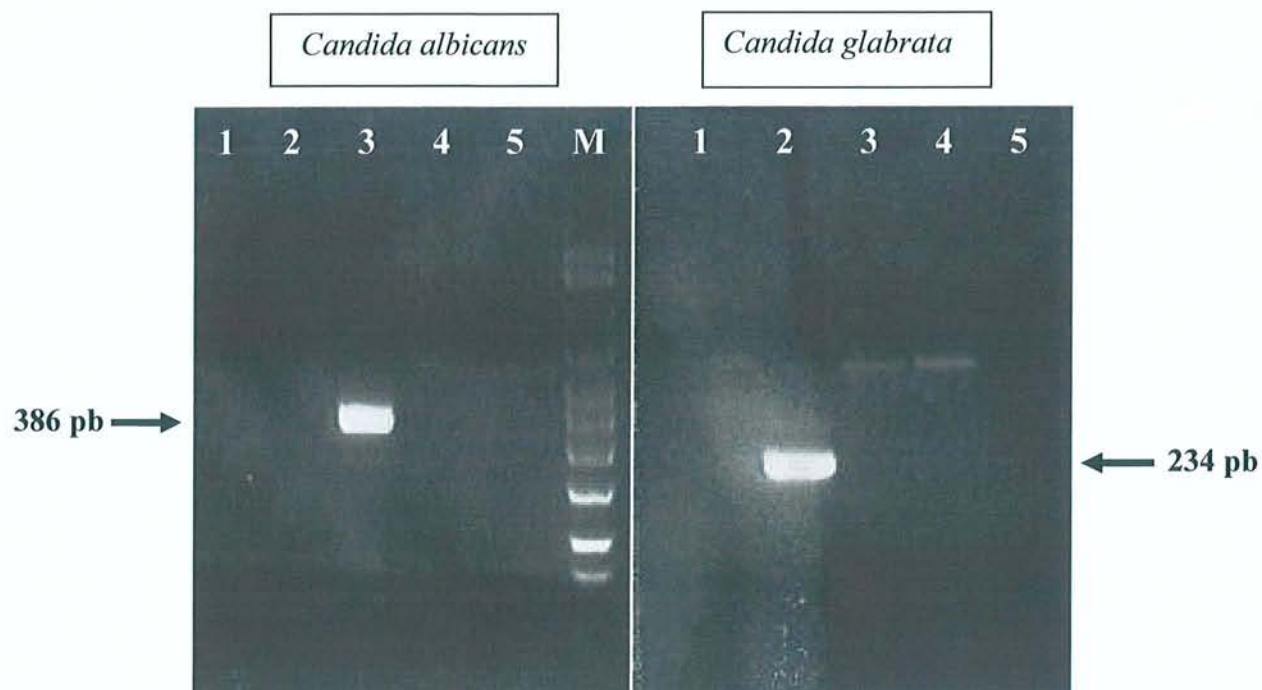
7.1.2 Spécificité [Fig.14]

Les amorces ITS1-ITS4 ne possèdent qu'une spécificité pour le genre *Candida*. Les cinq couples d'amorces spécifiques d'espèces utilisées dans la PCR nichée ont bien conduit au fragment annoncé dans la publication de référence (Bougnoux et al.).

Nous n'avons pas observé de problème d'identifications croisées avec les souches ayant servies aux extractions (environ 5 souches/espèces).

Les épreuves de charge des produits d'extraction de suspension de levure, par de l'ADN humain, ainsi que leur contamination avec des extraits d'ADN d'autres microorganismes n'ont montré aucune interférence.

- que ce soit lorsqu'ils ont bénéficié des cinq PCR nichées d'espèces
- ou lors de mélange de produits d'extraction d'une des espèces de *Candida* avec un des trois micro-organismes testés (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*).



| | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Puits 1 : <i>C. glabrata</i> | Puits 1 : <i>C. albicans</i> |
| Puits 2 : <i>C. krusei</i> | Puits 2 : <i>C. glabrata</i> |
| Puits 3 : <i>C. albicans</i> | Puits 3 : Bande aspécifique |
| Puits 4 : <i>C. tropicalis</i> | Puits 4 : Bande aspécifique |
| Puits 5 : <i>C. parapsilosis</i> | Puits 5 : Témoin négatif |

Figure 14 : **Spécificité d'espèce en PCR nichée classique**

Absence d'amplification croisée entre les amorces d'une espèce et d'autres espèces

7.1.3 Sensibilité [fig. 15]

Le système de PCR nichée réalisée dans notre étude n'a pas permis de retrouver les mêmes sensibilités que Bounoux et al.

La sensibilité obtenue par notre technique étant 10^5 à 10^{10} fois moins sensible selon les espèces :

| | Poids moléculaire | Température d'hybridation(°C) | Bounoux et al (/ ??) | Nos résultats (/l) en PCR nichée |
|------------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| ITS1-ITS4 | nc | 55 | nc | Non mesurable |
| <i>C. albicans</i> | 386 | 66 | 1 fg | 10 pg |
| <i>C. tropicalis</i> | 373 | 57 | 1 fg | 10 µg |
| <i>C. glabrata,</i> | 234 | 57 | 1 fg | 1 mg |
| <i>C. parapsilosis</i> | 336 | 55 | 1fg | 10 µg |
| <i>C. krusei</i> | 360 | 55 | 0,1 fg | 10 µg |

Pour mémoire : nano= 10^{-9}

pico= 10^{-12}

fento= 10^{-15}

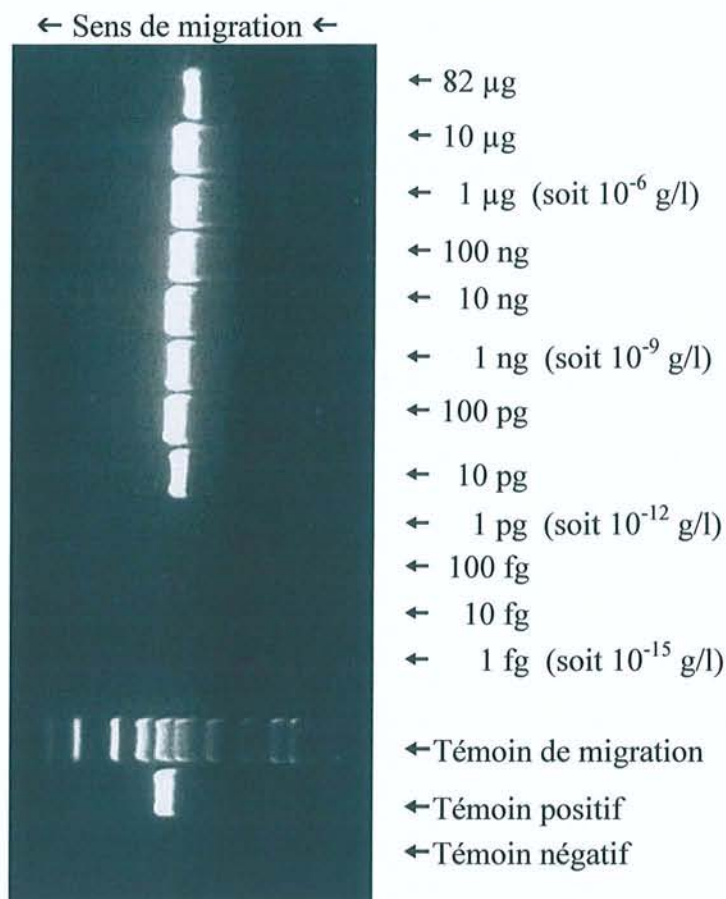


Figure 15 : Sensibilité de la PCR nichée avec *C. albicans*, obtenue en testant une gamme de dilution.

Rappelons ici que 10 C.F.U.= 100 fg de DNA fongique [107]. Afin de ne pas avoir de problème d'identification, nous nous sommes attachés à trouver la concentration de MgCl₂ donnant des bandes spécifiques identifiées en regard du témoin de poids moléculaires.

Cette adaptation a également permis de s'affranchir des rares misappariements observés au début de la mise au point technique.

Nous avons pu vérifier que la spécificité des amorces et par conséquent de la PCR nichée est bonne (voisine de 100%).

7.2 PCR en temps réel

7.2.1 Sur suspensions de levures

7.2.1.1 Adaptation sur LightCycler®

7.2.1.1.1 Mélange réactionnel (*Mix*)

Il nous a fallu adapter la concentration de $MgCl_2$ en raison de la forte sensibilité de la technique de PCR en temps réel et du système de thermocyclage à air pulsé qui induisaient des misappariements (ou *mismatches*) en quantité non négligeable. Néanmoins, comme pour toute PCR, une majoration de la concentration en $MgCl_2$ augmente la sensibilité mais diminue la spécificité.

Nous avons donc réalisé différents essais avec des concentrations allant de 2,5 à 6,5 mM/l de concentration finale dans le mélange réactionnel à amplifier. Nous avons alors pu retenir 3,5 mM/l comme concentration finale optimale intra-capillaire n'induisant pas de misappariements notables.

En vue de l'application de la technique à du sang total de patient, nous avons ensuite cherché à optimiser la quantité d'échantillon c'est-à-dire le ratio entre quantité d'amorces / quantité d'ADN en présence. Nous avons repris notre modèle de sang total fictif tel que précédemment décrit. Celui-ci a bénéficié d'une extraction de son ADN humain à l'aide du kit Qiagen®. A partir de ce produit d'extraction nous avons réalisé une gamme de dilution de 50 ng/μl de raison, allant de 500 à 50 ng/μl d'ADN humain. Puis nous avons procédé à la contamination de chaque tube de la gamme par la même quantité moyenne d'ADN de levure extrait. Ces essais nous ont permis de conclure qu'aucune interférence n'était observée jusqu'à 300 ng/μl d'ADN génomique humain. Au-delà de 300 ng/μl et surtout à partir de 400 ng/μl, nous avons observé d'une part une baisse de sensibilité : augmentation du nombre de cycle nécessaire à l'obtention d'un signal de fluorescence ; et d'autre part une perte de spécificité observée au niveau de la courbe de fusion : pic de température de fusion (T_m) moins haut et moins étroit. Rappelons ici que le seuil très élevé de 300 ng/μl d'ADN génomique humain, ne peut être rencontré dans aucune situation clinique.

Au final, nous avons arrêté la composition suivante pour le Mix :

| Réactifs | Prise d'essai | Concentration finale obtenue (sur 20 μ l) |
|--|---------------|---|
| Tampon SYBR [®] Green reconstitué | 2 μ l | |
| MgCl ₂ à 25 mM | 2 μ l | 3,5 mM/ l |
| Amorce sens (10 pmol/ μ l) | 0,4 μ l | 0,2 μ M/ l |
| Amorce antisens (10 pmol/ μ l) | 0,4 μ l | 0,2 μ M/ l |
| Eau pour biologie moléculaire | 10,2 μ l | |

Le tampon SYBR[®]Green contient : le tampon, le SYBR[®]Green, les précurseurs nucléotidiques dNTPs, la Taq Polymérase et 1 mM de MgCl₂.

Ce Mix est identique pour les 2 PCR en temps réel, seul change les couples d'amorces.

Toutefois, pour la PCR spécifique d'espèce, il faut préparer cinq Mix : un par espèce de *Candida*.

7.2.1.1.2 Programmation du LightCycler[®]

Nos essais ont permis de retenir 45 cycles d'amplification comme valeur optimale pour les amorces ITS1-ITS4 et 40 cycles pour les amorces spécifiques d'espèces.

Concernant la température d'hybridation pour les amorces ITS1-ITS4, nous avons effectué des essais allant de 52°C à 63°C. Nous avons retenu la température optimale de 62°C soit 7°C supplémentaire en comparaison à celle de la PCR spécifique de genre en PCR classique.

Pour chaque couple d'amorces spécifiques d'espèce non-*albicans*, nous avons effectué des essais de température d'hybridation allant de 52°C à 63°C. Les températures optimales retenues étaient les mêmes que celles employées pour la PCR nichée. De même, la température d'hybridation pour le couple d'amorces CAL1-CAL3 retenue était identique à celle en PCR nichée soit 66°C.

7.2.1.2 Détection du produit d'amplification

Les amplicons, quelle que soit leur taille, sont détectés par marquage SYBR[®] Green qui s'est lié au double brin d'ADN néo-formé. La fluorescence émise par cet agent intercalant, est lue à 530 nm, à la fin de la phase d'élongation ; la quantité croissante des produits de PCR peut être suivie cycle après cycle, en temps réel.

7.2.1.3 Spécificité

Ce sont également les mêmes extraits de souches de différents champignons qui ont été testés. Les cinq espèces de *Candida* choisies ont été amplifiées. Pour les deux PCR en temps réel l'identification des amplicons a été réalisée dans un premier temps par la température correspondant au pic de la courbe de fusion (melting point). Pour nous assurer de la nature de l'amplicon nous avons réalisé une contre-centrifugation des capillaires sortis de LightCycler[®] : accumulant ainsi le produit d'amplification dans la partie supérieure du capillaire. Ces amplicons ont été repris pour bénéficier d'une migration électrophorétique en gel d'agarose selon notre protocole de PCR classique. Nous avons comparé chaque spot de migration au témoin de poids moléculaire et confirmé ainsi l'identification, de genre pour la première PCR ou d'espèce. Que ce soit entre les cinq espèces de *Candida* considérées ou avec les trois autres microorganismes testés comme précédemment en PCR classique, nous n'avons pas rencontré de problème d'identification. La spécificité de ce système est donc bien conforme à celle attendue.

7.2.1.4 Sensibilité

Comme pour la technique précédente, la sensibilité a été testée pour les deux PCR et à chaque série par notre gamme étalon.

Pour la PCR spécifique du genre *Candida*, nous avons obtenu un seuil de détection à 10 pg/l pour *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. parapsilosis* tandis qu'il n'était que de 100 pg/l pour *C. glabrata*.

Pour la PCR spécifique d'une espèce de *Candida*, nous avons obtenu les résultats suivants :

| | Poids moléculaire | Température de fusion(°C) | Bougnoux et al (/ ??) | Nos résultats (/l) | |
|------------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|----------------|
| | | | | PCR nichée | PCR temps réel |
| ITS1-ITS4 | nc | | nc | Non Réal. | 10 µg |
| <i>C. albicans</i> | 386 | 86 | 1 fg | 10 pg | 1 pg |
| <i>C. tropicalis</i> | 373 | 83 | 1 fg | 1 µg | 1 pg |
| <i>C. glabrata,</i> | 234 | 85 | 1 fg | 1 mg | 100 pg |
| <i>C. parapsilosis</i> | 336 | 84 | 1fg | 1 µg | 100 fg |
| <i>C. krusei</i> | 360 | 90 | 0,1 fg | 1 µg | 100fg |

Pour mémoire : nano= 10⁻⁹

pico=10⁻¹²

fento=10⁻¹⁵

La sensibilité obtenue avec la PCR en temps réel spécifique d'espèces est donc supérieure à celle que l'on observe par la technique de PCR classique.

7.2.2 Sur sang total de patients

Toutes les PCR en temps réel pratiqués chez les 48 témoins ont été négatives.

Selon la classification des critères diagnostiques de l'EORTC, en 6 mois nous avons pu inclure 17 patients dans notre étude.

Parmi eux nous avons obtenu les résultats suivants :

7.2.2.1 Patients ayant une candidose invasive prouvée

* Patient SCH [Fig. 16 à 19]

Cet homme, diabétique, de 47 ans est atteint d'une pancréatite aiguë.

Ce patient est hospitalisé le 11 novembre, via le service d'urgence, dans le service d'hépto-gastro-entérologie. Après 24 heures, son état se décompense et il est admis en réanimation pour un syndrome de détresse respiratoire aiguë avec hyperthermie et hyperleucocytose (20.000 /L) à polynucléaires. A partir du 12 novembre, des flacons d'hémocultures ont été prélevés toutes les 8 heures chez ce patient. Jusqu'au 18 novembre après-midi inclus ils étaient tous stériles. Dans l'attente de ces résultats et compte tenu du tableau clinique, les réanimateurs ont instauré une antibiothérapie à large spectre associant Tiénam[®], Ciflox[®] et Targocid[®]. L'hémoculture prélevée le 18 novembre à 22h30 mettra 48 heures pour être détectée positive par l'automate à hémocultures (Bioargos[®], Biorad[®]). L'identification par culture conduira au diagnostic de *Candida glabrata*. Cette souche sera également retrouvée sur l'extrémité d'un cathéter veineux périphérique le 24 novembre. Le 20 novembre, dès les résultats de l'examen direct communiqués, le patient bénéficie de l'instauration d'un traitement antifongique par Triflucan[®] tandis qu'il développe une insuffisance rénale. Les hémocultures étant encore positives le 29 novembre, le Triflucan[®] est remplacé pour de l'Abelcet[®]. La dernière hémoculture à *Candida Glabrata* sera retrouvée le 4 décembre. Compte tenu de la pathologie pancréatique de ce patient, l'infection à *Candida glabrata* a été rapportée d'origine digestive, tandis que la location sur cathéter en était une localisation métastatique.

Par la suite le patient est sorti du centre hospitalier en février.

Durant la période où les hémocultures aérobiees étaient positives à *Candida glabrata*, 7 prélèvements pour PCR ont été effectués, tous sous traitement antifongique. Avec la PCR, un échantillon sur les 7 s'est positif. A noter que pour les 6 PCR négatives, les deux techniques de PCR en temps réel ont été prises en défaut. Signalons enfin que compte tenu de la certitude diagnostic par hémoculture, les tests Platelia Biorad[®] Antigène et Anticorps n'ont pas été demandés chez ce patient.

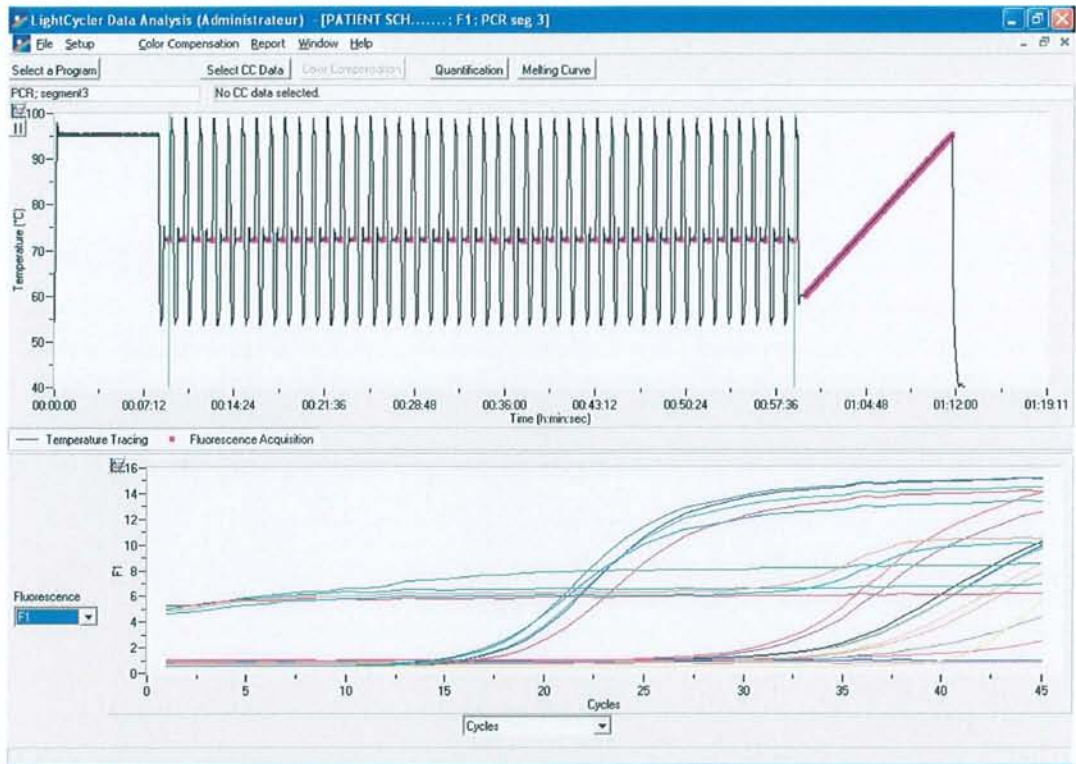


Figure 16 : Partie supérieure : Cycle d'amplification, chauffe de 0,05°/seconde puis fusion de l'ADN
Partie inférieure : Apparition du signal selon le nombre de cycle, Threshold (Ct)

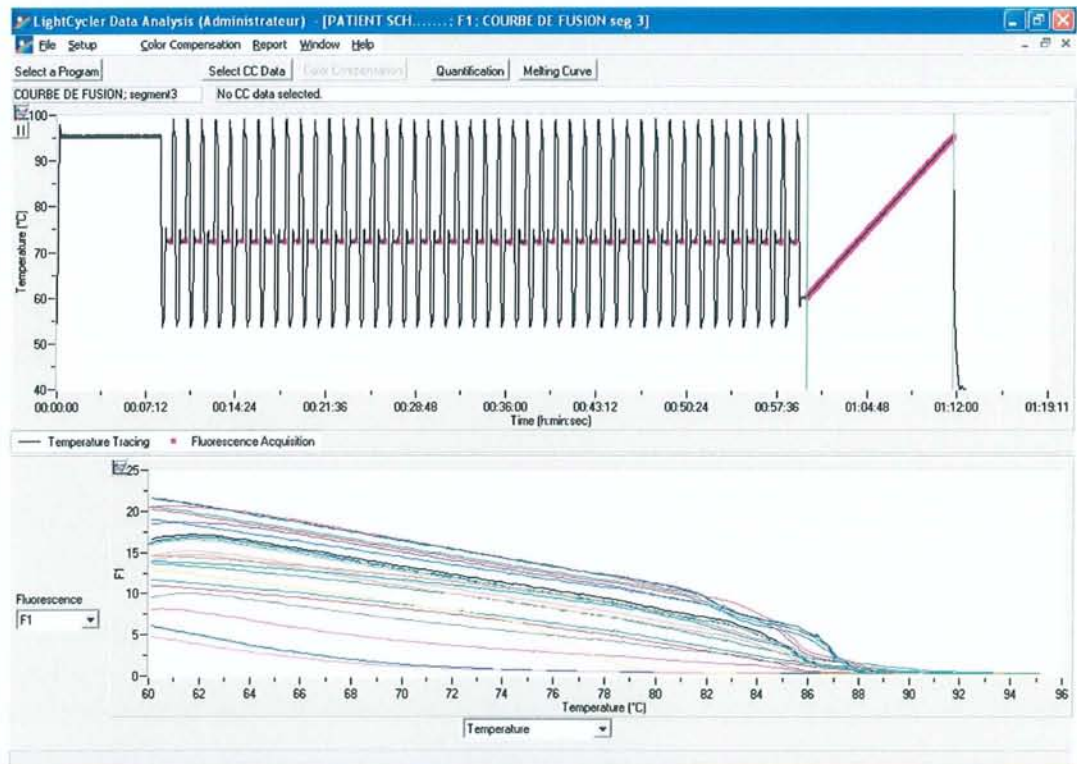


Figure 17 : Partie supérieure : Cycle d'amplification, chauffe de 0,05°/seconde puis fusion de l'ADN
Partie inférieure : Extinction de fluorescence, courbe de fusion de 23 capillaires du cycle.

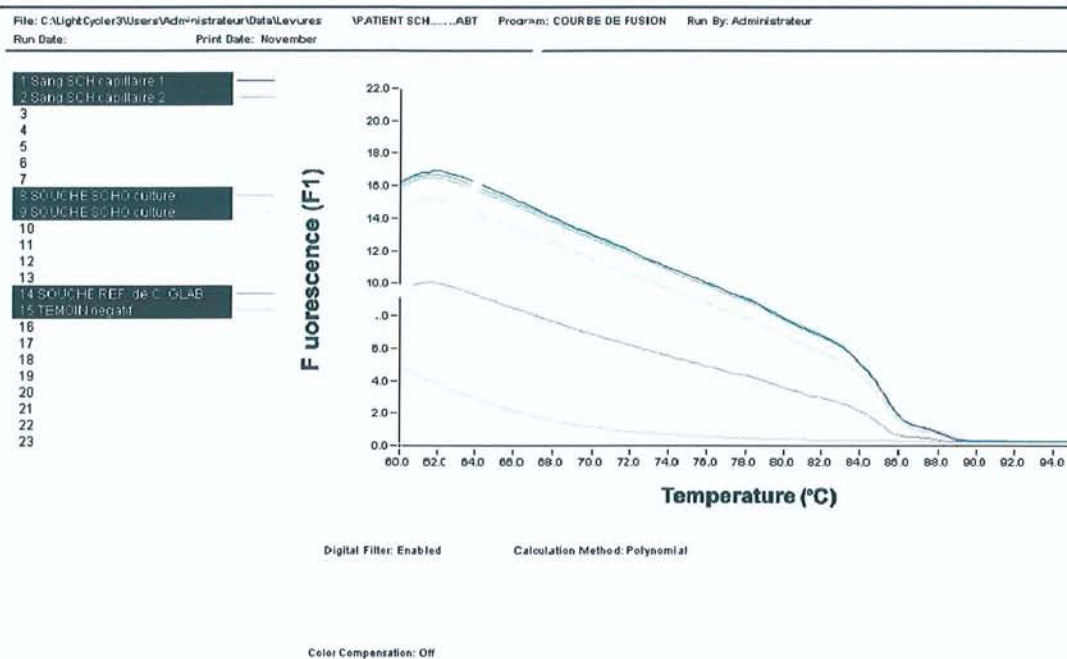


Figure 18 : Courbe de fusion des capillaires concernant le patient SCH

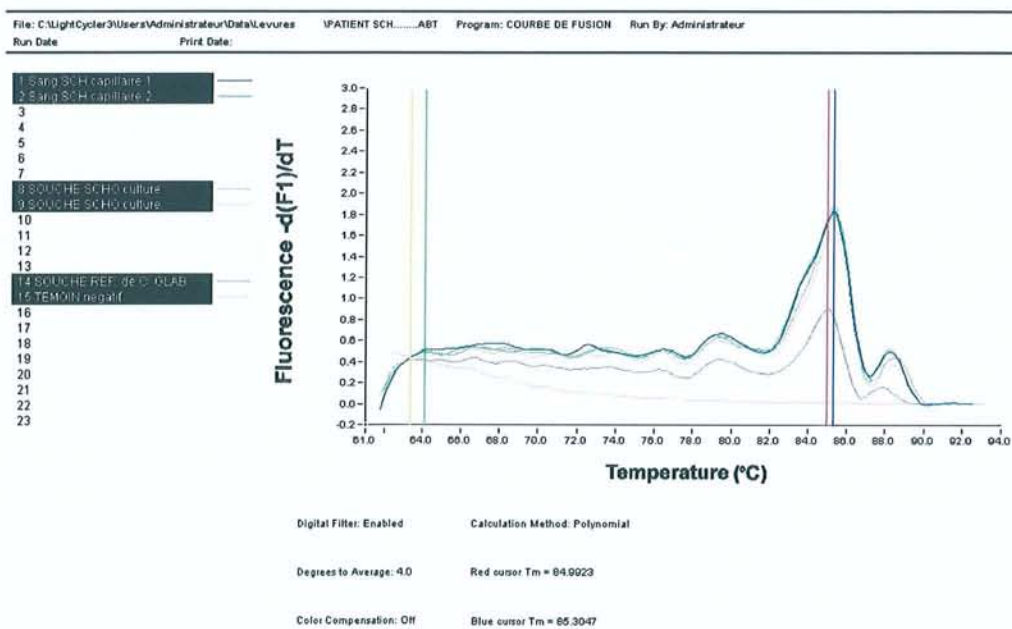


Figure 19 : Détermination des Tm

Températures de fusion identiques pour le prélèvement de sang du patient SCH, la souche isolée dans ses hémocultures et notre souche de référence. Absence de Tm pour le témoin négatif.

* Patient BOU

Cet homme est atteint d'un adénocarcinome colique.

Il bénéficie d'une chimiothérapie pré-opératoire, lorsque le 19 février il doit être hospitalisé en raison d'une hyperthermie avec hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles. Les hémocultures d'entrée seront négatives. Le 3 mars il présente des fausses membranes oro-pharyngées dans lesquelles l'examen microbiologique objectivera la présence d'une souche de *Candida glabrata* et de *Streptococcus non groupable*. Le 6 mars le patient développe une occlusion colique avec ascite carcinomateuse et doit être opéré puis transféré en réanimation. Le 25 février, alors que le tableau infectieux persiste sous antibiothérapie à large spectre, une hémoculture est prélevée et sera positive à *Candida glabrata*. Le même jour deux prélèvements pour PCR ont été réalisés. Le 12 mars, la présence significative de *Candida glabrata* était retrouvée dans une coproculture. Malgré le traitement anti-infectieux entrepris, le tableau clinique s'est aggravé conduisant au décès du patient.

Les PCR en temps réel réalisées sur le sang total de ce patient se sont révélées négatives.

7.2.2.2 Patients ayant une candidose invasive possible

Durant les 6 mois de l'étude, les médecins des services de réanimation et d'Onco-Hématologie du CHR de Metz pouvaient demander un « prélèvement pour recherche d'ADN *Candida* par PCR en temps réel » devant toute suspicion de candidose invasive.

Pendant cette période, 15 prélèvements de 15 patients différents sont parvenus au laboratoire. Parallèlement tous ont bénéficié de prélèvement pour hémoculture.

Chez ces 15 patients les hémocultures et les PCR se sont toutes avérées négatives.

8 DISCUSSION

Depuis les années 70, les candidoses profondes sont devenues un problème majeur en terme de fréquence, de morbidité et de mortalité chez les patients immunodéprimés : neutropéniques, greffés de moelle osseuse, greffés d'organes (foie, poumons...), sidéens, atteints d'une granulomatose septique chronique... D'autres formes de candidoses invasives peuvent survenir chez des patients moins immunodéprimés, sous corticothérapie par exemple. Depuis 1996, le genre *Candida* dans son ensemble est assimilé à un agent émergent des infections nosocomiales hospitalières [52].

Ce problème touche essentiellement les Unités de Soins Intensifs de tous types (pédiatrique, médicale, chirurgicale et cardiovasculaire) avec une diminution significative des infections à *Candida albicans* et parallèlement une majoration des candidémies à *Candida glabrata*. Une des explications fournies à ce changement écologique est d'une part, l'utilisation prophylactique de fluconazole et d'autre part, l'émergence des espèces non-*albicans* peu affectées par les mesures de bonnes pratiques hygiénistes contre les bactéries [163].

Le diagnostic de candidémie est difficile à établir chez les patients immunodéprimés, car il s'appuie sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques ; les techniques d'imagerie digestive, pulmonaire et cardiaque étant souvent peu informatives. D'un point de vue biologique, les examens mycologiques ne reflètent pas toujours l'état infectieux réel du patient (faux négatif). Quelle attitude adopter chez un patient fébrile et résistant à une antibiothérapie à large spectre avec une recherche de candidose invasive négative malgré une forte suspicion clinique ? Afin d'aider le clinicien dans ce cas de figure, une autre technique serait utile pour confirmer ou non un résultat litigieux d'hémoculture ou de sérologie.

Les techniques de biologie moléculaire se développent dans tous les domaines d'analyses biomédicales et en particulier en microbiologie (bactériologie, virologie, parasitologie). Ces techniques sont réputées comme étant sensibles et spécifiques, apportant une aide considérable dans le diagnostic et la prise en charge de nombreuses pathologies infectieuses. La PCR semble donc être un outil intéressant dans le cas de la candidose invasive, car elle pourrait apporter un argument supplémentaire pour confirmer ou non un diagnostic précoce, afin de pouvoir prendre en charge le plus rapidement possible le patient.

8.1 Diagnostic biologique actuel

Le diagnostic biologique actuel comprend trois axes : l'identification d'après la culture de prélèvement périphérique, les hémocultures et les tests sérologiques (Ag, Ac).

Les prélèvements non sanguins sont d'interprétation difficile entre colonisation et véritable invasion. Par exemple, la positivité de prélèvements *peropératoires* (péritoine, médiastin) n'affirme pas obligatoirement l'infection mais peut ne traduire que le passage momentané et fugace de levures présentes au niveau du tube digestif vers la cavité concernée. Ainsi, la présence de levures dans un liquide péritonéal peut aussi bien traduire une authentique péritonite que la contamination par les levures commensales du tube digestif lors d'une intervention chirurgicale ou d'une perforation.

Bien qu'ayant bénéficié d'améliorations techniques (milieu, détection) les hémocultures prélevées sur sang total, arrivent globalement à 50% de sensibilité même si leur spécificité proche de 100% permet aisément le diagnostic de certitude. En cas de positivité, 24 à 48 heures supplémentaires sont nécessaires pour parvenir au diagnostic d'identification.

Les raisons de cette faible sensibilité des hémocultures vis-à-vis des levures, ne sont pas univoques. Les *Candida* ne persistent que très peu de temps dans la circulation sanguine alors qu'ils n'y sont pas déchargés continuellement à partir du foyer originel, comme cela peut être le cas pour les infections bactériennes profondes. Ce faible inoculum explique une part probablement importante de cette faible sensibilité alors que les problèmes techniques ne sont pas prépondérants. Actuellement, les milieux utilisés dans les automates avec agitation permettent la croissance de la majorité des levures. Certains types de flacons comportent un milieu spécifiquement dédié aux champignons, ce qui augmente légèrement le seuil et diminue le temps de détection. Ainsi la sensibilité globale des hémocultures s'en trouve légèrement améliorée.

Ces flacons dits spécifiques pour la détection des agents mycologiques dans le sang, sont certes abordés dans la littérature [74], mais leur place dans le diagnostic biologique n'y est nullement définie : doivent-ils être prélevés systématiquement en association avec les traditionnels flacons d'hémoculture aérobie et anaérobie (majorant ainsi de façon notable le coût financier d'une telle démarche) ? Où doivent-ils être prélevés isolément en cas de fièvre

résistante à une antibiothérapie à large spectre dans un contexte clinique particulier ? Aucun consensus ne semble être dégagé en 2004 sur ce point [27].

La faible sensibilité des hémocultures a stimulé le développement de tests sérologiques. En 1999, une équipe française a démontré que la combinaison d'un test d'antigénémie avec une recherche d'anticorps anti-*Candida*, donnait une sensibilité cumulée de 80% avec 93% de spécificité pour une valeur prédictive négative de 95%. Cependant, compte tenu de la lente cinétique des anticorps, cette association sérologique ne permet pas le diagnostic précoce des candidoses à dissémination hémotogène. En 2004, son intérêt clinique est évident : elle vient étayer une présomption clinique ou sert de surveillance régulière et ciblée (*monitoring* sérologique), permettant ainsi d'initier une thérapeutique antifongique plus précocement. Néanmoins, cette technique n'est pas formellement retenue par la dernière conférence de consensus des anesthésistes-réanimateurs de langue française de mai 2004.

Dans un tel contexte, il nous paraissait donc opportun d'évaluer une nouvelle technique diagnostique *in vitro* permettant de faire bénéficier au patient d'une thérapeutique plus précoce et donc mieux adaptée au genre *Candida* sp. Nous avons alors orienté notre étude vers la biologie moléculaire.

8.2 Mise en place de la PCR classique au laboratoire

La mise en place de la PCR *Candida* présente diverses difficultés : le choix des amorces, le type de prélèvement, la composition du mélange réactionnel (Mix) de la PCR.

8.2.1 Choix du type de prélèvement et du kit d'extraction

Le choix du type de prélèvement à analyser en PCR est un point essentiel. Cependant, la nature du prélèvement le mieux adapté pour la PCR *Candida* ne fait pas l'unanimité dans la littérature. L'avantage semble aller au sérum [16] mais certains auteurs ont préféré réaliser une PCR directement sur flacon d'hémoculture ou de subculture. Suivant notre publication de référence, nous avons débuté nos extractions à l'aide du kit commercial Maestro Yeast Kit[®] (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Nous avons donc réalisé des extractions sur des suspensions de levures et obtenu des produits d'amplification à l'aide de la PCR nichée. Nos résultats ont objectivé, pour cette technique, une sensibilité moindre que celle de Bougnoux et al. Nous avons alors appliqué cette méthode d'extraction à des sérums humains contaminés par des colonies de *Candida*. Les résultats obtenus sur ces sérums et quelle que soit l'intensité de leur contamination, ont confirmé notre impression forgée après extraction de suspensions de levures : un manque d'efficacité du Maestro Yeast Kit.

Nous avons alors recherché un autre kit commercial pour l'extraction de levures : le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen[®], Courtaboeuf, France), disponible en France et reconnu selon les données de la littérature, était validé pour l'extraction de l'ADN des levures sur différents types de prélèvements, dont le sang total. Ayant remarqué que l'étape de centrifugation du sérum pouvait éventuellement conduire à une perte de levures (du sérum vers la phase cellulaire : dans ou à la surface du culot), nous avons mené la suite de notre étude sur sang total à l'aide de ce kit. Par la suite, nous avons appris que Maestro Yeast Kit avait été retiré du marché pour des motifs techniques, ce qui a conforté notre impression.

De plus, ce modèle « sang total » se rapprochait des hémocultures, méthode de référence actuelle.

Nous avons observé que le kit QIAamp DNA Mini Kit[®] utilisé directement avec la suspension de levures ne permettait pas une extraction complète ce qui nous a conduit à élaborer un protocole de prétraitement. Les produits issus de cette extraction ont alors bénéficié de la PCR nichée selon les travaux de Bougnoux et al. Cette technique de PCR nichée est discutable pour une application diagnostique puisqu'elle favorise les contaminations et est très longue car nécessite le temps de deux PCR. Disposant d'un outil autorisant la PCR en temps réel au laboratoire de Microbiologie du CHR de Metz, il nous a semblé judicieux de chercher à adapter ces amorces spécifiques à cette technologie moderne.

8.2.2 Publication de référence et choix des amorces

La majorité des publications porte sur l'amplification d'une région hautement conservée du gène codant pour l'ARNr 18S. La plupart des amorces 18 S sont pan-fongiques et permettent d'amplifier l'ADN de tous les champignons pathogènes. Néanmoins le polymorphisme de ce génome ribosomal est insuffisant pour permettre l'identification d'espèce. Ceci peut poser un problème diagnostique par exemple avec le genre *Aspergillus* qui infecte souvent des patients présentant les mêmes risques que pour les candidoses invasives. L'utilisation du gène 5,8S nous a semblé plus adapté et plus spécifique pour la recherche des cinq *Candida* les plus fréquemment observés au cours des candidoses invasives (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*); de plus, il a fait l'objet d'une publication riche en données techniques. Ces raisons ont motivé notre choix d'étude : adapter une technologie de PCR en temps réel utilisant le gène ribosomal 5,8S à partir d'une méthode de PCR nichée préalablement validée [16].

Bougnoux et al. ont contrôlé la spécificité des amorces sur diverses bactéries (*Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis*), parasites (*Toxoplasma gondii*) et agents fongiques non-*Candida* (*Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, *Trichophyton rubrum* et *Microsporium canis*) et de l'ADN génomique humain.

Nous avons répété et complété ces données en réalisant une étude bioinformatique afin de vérifier la spécificité pour le genre *Candida* des amorces externes et celle des amorces internes pour les 5 catégories de *Candida* que nous souhaitons amplifier.

Nous avons de ce fait mis en évidence que la spécificité d'espèce de *Candida* ne repose alors que sur la différence de taille des amplicons obtenus. En effet, les séquences correspondant aux amorces externes sont retrouvées chez les *Candida* mais aussi chez *Fusarium sp.* et *Penicillium sp.* Notre étude bioinformatique a ainsi confirmé le caractère d'orientation de la première PCR pour les genres *Candida*, *Fusarium* et *Penicillium*. La spécificité des cinq espèces de *Candida* repose dès lors sur les amorces internes. De plus, la PCR nichée apporte au final une sensibilité supplémentaire par amplification du premier produit de PCR.

Toutefois cette technique nécessite l'ouverture des tubes entre ses deux étapes ce qui favorise les contaminations. Dans notre cas, bien que la technique de PCR nichée interdise la pré-incubation du second mélange réactionnel avec de l'UNG (enzyme de réparation de l'ADN servant de système anti-contamination)[11,13] nous n'avons pas observé de problème de contamination.

En conclusion, nous pensons avoir choisi des couples d'amorces performants pour ce travail.

8.3 PCR en temps réel

8.3.1 Avantages de la PCR en temps réel comparée à la PCR nichée

La PCR nichée étant longue et fastidieuse, il nous a paru judicieux d'adapter cette technique sur l'automate LightCycler® Roche Diagnostics®.

Les techniques de PCR en temps réel offrent d'énormes avantages en comparaison aux techniques classiques. Ces dernières sont des systèmes réactionnels "ouverts" nécessitant de multiples manipulations sur l'ADN amplifié ce qui augmente les risques de contamination de l'échantillon par de l'ADN exogène et permet également la dissémination des aérosols d'ADN. Ces risques de contamination imposent une infrastructure (une pièce séparée par étape) et des procédures particulières ; ceci constitue d'importants facteurs limitants pour le développement de ce type de technique dans les laboratoires de diagnostic biologique. A l'inverse, les systèmes de PCR en temps réel présentent l'avantage incomparable d'être réalisés en système "fermé" ce qui limite ces risques de contamination et rend la faisabilité de ces techniques accessibles à tous les laboratoires.

Outre ce système fermé, la PCR en temps réel présente d'autres avantages que nous estimons intéressants:

- la rapidité de la phase d'amplification et la lecture en temps réel voire à la fin des cycles d'amplification. Le fluorimètre de l'automate permet une lecture instantanée, en temps réel, de l'amplicon formé. Ainsi, il suffit d'une à deux heures pour obtenir à la fois les produits d'une réaction de PCR et leur révélation. Ce gain de temps n'est pas négligeable pour le clinicien comparé à la technique en PCR classique qui exigeait plus de huit heures. En outre, cette rapidité est exploitée lors de la mise au point d'une nouvelle technique comme pour les séries de sang de patients. En effet, le seuil de détection du signal étant plus bas qu'en PCR classique, il est plus facile d'étudier en parallèle des échantillons ayant des nombres de copies initiales (charge génomique) très différents. La réaction de PCR en temps réel se comporte donc comme si elle était, en quelque sorte, peu dépendante de la concentration initiale en ADN cible pour son seuil de détection.

- les automates de PCR en temps réel permettent de travailler sur de plus petits volumes réactionnels. Les capillaires de petite taille sont deux fois moins consommateurs de Mix et surtout ils permettent d'assurer, au sein du milieu réactionnel, des variations franches et homogènes de température pour les étapes de la PCR. Cet avantage est possible également de part la technologie du thermocycleur intégré : système à air.

- une meilleure sensibilité par un système de lecture plus performant qu'une électrophorèse sur gel.

- une meilleure traçabilité des séries de PCR : stockage informatique des résultats consultables et imprimables à la demande.

Seul inconvénient, le prix de ces automates reste encore élevé en comparaison à celui des thermocycleurs standards. Le deuxième point concerne le prix des consommables qui là encore, est plus élevé que celui des consommables utilisés pour les techniques classiques. Cependant, globalement ces techniques permettent de réduire les coûts en temps de main d'oeuvre et de matériel nécessaire à l'étape de détection. Le surcoût calculé qui tient compte de l'ensemble de ces données a été estimé entre 2 et 3 euros par réaction [24].

Nous avons donc développé une technique d'analyse plus rapide sans perte de sensibilité ni de spécificité, réduisant ainsi le délai de rendu de résultat aux cliniciens.

8.3.2 La technique SYBR[®]Green

L'adaptation en PCR temps réel nous a imposé de choisir un système de révélation. L'automate LightCycler[®] permet de révéler les marquages par agent intercalant SYBR[®]Green, par sondes d'hydrolyse TaqMan[®] et avec les sondes d'hybridation FRET.

La technique SYBR[®]Green présente l'avantage d'être plus facile à mettre en oeuvre (pas de sondes marquées à concevoir) et moins coûteuse (pas de sondes à synthétiser). Toutefois, la liaison du SYBR[®]Green à l'ADN n'est pas spécifique du produit à amplifier : la fluorescence mesurée pouvant donc provenir d'amplification non spécifique (dimères, contaminants,...) La spécificité de l'amplicon découle donc uniquement des amorces utilisées.

La révélation par SYBR[®]Green est plus sensible que celle réalisée par migration électrophorétique couplée au BET. A titre indicatif, la limite de détection d'un ADN double brin sous UV à 300 nm, est d'environ 5-10 ng après addition de BET alors qu'elle passe à environ 60 pg après addition de SYBR[®]Green I.

Du point de vue quantitatif, les techniques SYBR[®]Green et TaqMan[®] sont équivalentes en sensibilité et en reproductibilité.

La température d'hybridation des amorces n'a pas permis de réaliser tous les tests en un seul cycle (PCR multiplex en temps réel). Nous avons testé une gamme de températures comprenant les différentes températures d'hybridation des couples spécifiques d'amorces, aucune n'a été favorable à l'amplification de toutes les espèces sans donner d'artéfacts. Des essais supplémentaires seraient nécessaires pour trouver une telle température moyenne permettant l'amplification potentielle des 5 espèces en un seul cycle de PCR en temps réel. La capacité à effectuer un tel cycle présenterait un gain de temps supplémentaire pour le délai de rendu de résultat.

Nous avons également réalisé des essais en ajoutant de l'ADN humain extrait (réalisation d'une gamme) à l'ADN issu de suspension de levures : nous n'avons pas observé d'interaction avec les amorces choisies que ce soit le couple ITS1-ITS4 ou les couples spécifiques d'espèces. Notre choix d'amorces était donc adapté au travail sur sang total de patient.

La constitution des *Mix* et les programmations du LightCycler® présentées dans nos résultats nous paraissent être celles à retenir comme optimales. Elles ont été arrêtées à partir de nos nombreux essais réalisés sur des bases théoriques. Elles permettent l'obtention d'un signal précoce avec un taux d'hybridation non spécifique faible et aisément identifiable sur la courbe de fusion.

Les couples d'amorces internes utilisés comme pour la première PCR nichée ont donné de nombreux misappariements en LightCycler®. En effet, ces amorces n'ont pas été conçues en premier lieu pour une utilisation en temps réel. Ces hybridations non spécifiques nous ont par conséquent conduits à redéfinir notre stratégie de PCR. Le but de la PCR nichée classique était avant tout l'augmentation de sensibilité, celle-ci ne se justifie donc plus en technique temps réel mais peut au contraire être un inconvénient (taux de *mismatches*). De plus, avec la bioinformatique, nous avons vérifié que les amorces d'espèces leurs étaient bien spécifiques. Pour toutes ces raisons, nous pouvions nous affranchir de la première étape de PCR et ainsi décider de ne faire qu'une seule étape avec les seconds couples d'amorces spécifiques d'espèces.

Au final, notre stratégie a donc été de réaliser en premier lieu la PCR spécifique du genre *Candida*; puis, seulement en cas de positivité de cette dernière, nous avons choisi de ne pas faire de PCR nichée, mais d'appliquer les couples d'amorces spécifiques d'espèces directement aux produits d'extraction.

L'intérêt d'un tel changement stratégique réside dans le fait que ce système automate PCR en temps réel –marqueur SYBR®Green permet la révélation immédiate d'un éventuel produit d'amplification dès la 1^{ère} PCR. Ce changement ayant pour but, lors de la future application sur le sang du patient, d'apporter au clinicien une information la plus rapide possible : une orientation diagnostique. Cette première PCR en temps réel pourrait donc permettre, à elle seule, la détection de candidose invasive sans préjuger avec certitude de l'espèce incriminée (simple orientation grâce au Tm). Aussi, il nous est apparu possible et judicieux de pouvoir fournir une réponse aux cliniciens dès ce stade : « absence de levure du genre *Candida* » ou « présence de levure du genre *Candida*, identification d'espèces en cours par biologie moléculaire ».

Nous avons choisi de ne pas appliquer dès le départ, les trois PCR spécifiques d'espèces pour diverses raisons :

-la rapidité de rendu des résultats: un seul cycle de LightCycler® contre trois successifs avec les amorces internes spécifiques d'espèces.

-la PCR ITS1-ITS4, consensuelle du genre *Candida*, permet donc de ne pas écarter une candidose invasive due à une autre espèce non-*albicans*, absente des PCR spécifique d'espèce.

-le coût : trois PCR pour une information moindre en cas de négativité comparé à une PCR avec les amorces ITS-ITS4.

Enfin, en cas de positivité de la PCR de genre *Candida*, nous avons décidé de réaliser systématiquement les trois PCR d'espèces afin de ne pas négliger une éventuelle co-infection par plusieurs de ces cinq espèces de *Candida*. Ces trois cycles de PCR permettent en outre de connaître l'espèce en cause, ce qui a un intérêt thérapeutique pour les espèces de résistance naturelle ou acquise à certains antifongiques ; et également un intérêt épidémiologique (suivi d'une souche nosocomiale).

8.4 Evaluation des techniques de PCR

8.4.1 PCR classique

La sensibilité différente de notre étude, comparée à celle de référence, peut s'expliquer par différents biais d'appréciation. Concernant l'inoculum, il n'existe aucune méthode de standardisation. La technique Mac Farland d'appréciation des inoculums bactériens, n'est pas bien adaptée pour les colonies de levure *Candida*, quoiqu'elle le soit pourtant plus qu'avec les *Aspergillus* sp. ou les dermatophytes. Bougnoux et al. avaient développé une procédure d'évaluation de leur inoculum avant extraction : double lavage des cellules *Candida* dans du tampon de phosphate de sodium suivi d'un comptage en hémostomètre. Nous avons utilisé une technique différente de celle de la publication pour préparer nos inoculums. En outre, la standardisation d'un inoculum est toujours soumise à une certaine variabilité : laboratoire et manipulateur dépendant.

Pour évaluer la concentration d'ADN de la suspension mère de notre gamme, après extraction, nous avons réalisé une mesure spectrométrique. Nous avons corrélé cette évaluation au nombre de CFU de la suspension extraite, et à la correspondance de la littérature : 10 CFU correspondent à 100 femtogrammes de ADN fongique [107]. Contrairement aux travaux de références [16], il nous a semblé plus juste de déterminer notre gamme sur la quantité d'ADN après extraction plutôt que sur le nombre de CFU mis en suspension en vue d'extraire leur ADN. En effet, il semble judicieux de mesurer la capacité propre de détection de la PCR plutôt qu'une évaluation globale incluant l'extraction. Ainsi, notre sensibilité tient compte des éventuels rendements de pertes d'extraction.

Concernant la sensibilité, il existe donc des biais de comparaison entre les résultats de Bougnoux et les nôtres, notamment le processus d'évaluation et le rendement des extractions non superposables (technique personnelle *versus* kit commercial).

8.4.2 PCR en temps réel

Outre les avantages en terme de rapidité, le passage en technique en temps réel nous a permis d'augmenter la sensibilité de notre technique d'un facteur 10^1 à 10^6 selon les espèces concernées.

8.5 Essais sur le sang total de patients

Nos essais réalisés sur le sang total de patients nous ont permis l'inclusion de 17 malades en 6 mois. Les deux sujets atteints de candidose invasive représentaient 1/3 des cas diagnostiqués par hémoculture sur l'ensemble du CHR de Metz durant cette période. Parmi ces 6 cas, 3 n'étaient pas dans les services retenus pour notre étude : 2 en chirurgie cardiaque dont un en secteur de réanimation ; le 6^{ème} cas ayant été enregistré en secteur d'Hépatogastro-Entérologie. Le nombre total de cas semble donc faible mais il reflète bien la fréquence de ce type de pathologie.

Pour recueillir des données statistiquement exploitables, il serait souhaitable de prolonger une telle étude au-delà de 12 mois voire en multicentrique.

Concernant nos résultats négatifs, nous pouvons les expliquer de diverses manières :

- un pré-traitement et une extraction perfectible
- la présence d'inhibiteur de l'ADN polymérase. Des études mériteraient d'être menées sur la voie d'abord veineux : absence de prélèvement sur une voie veineuse centrale dont certaines doivent encore être héparinées (biomatériaux), sur les traitements de réanimation comme l'influence de perfusion de solutés macromoléculaires.
- la sensibilité de la technique PCR pourrait être améliorée,
- la physiopathologie des invasions à *Candida* et la présence labile des levures dans la circulation systémique. Nous pensons que la PCR, comme les hémocultures et les sérologies *Candida*, est soumise au même écueil : la fugacité du passage des *Candida* dans le sang par translocation. Ceci entraîne une baisse de sensibilité diagnostic majoritairement par faible sensibilité du prélèvement en lui-même et non pas du fait de la technique PCR.

A quel moment prélever ? Devant l'absence de réelle décharge fongique, comme cela est le cas pour les bactéries avec leur cortège symptomatique (pic fébrile, frissons,..), il est difficile de se déterminer. Ceci devra être précisé lors de futures études. Dans le cas du patient SCH, nous aurions pu penser que les coulées pancréatiques auraient induit d'importants passages sanguins de levures, mais malgré le nombre d'hémocultures positives, la PCR n'a presque rien détecté (un résultat positif sur sept prélèvements).

Un autre problème sera à préciser à l'avenir : Une fois détectée par PCR en temps réel, qu'elle importance faudra t'il accorder à la présence d'ADN de *Candida* sp. dans le sang : simple et faible translocation ? Simple présence d'ADN libre de *Candida* sp.? Ce concept d'ADN libre étant lui-même encore peu défini en physiopathologie. Ou réelle invasion hématogène ? La réponse viendra peut être avec la quantification par PCR et la définition d'un seuil diagnostic.

8.6 Améliorations potentielles de la technique

La nouvelle stratégie de diagnostic de candidémies par PCR, définie dans notre travail semble originale (région 5.8 S) et encourageante. Bien sûr il sera intéressant de pouvoir améliorer cette technique, les pistes à explorer pourraient être les suivantes :

- compléter l'étude bioinformatique présentée ici avec tous les *Candida* pathogènes et invasifs pour l'homme, ainsi que d'autres agents fongiques. Ceci permettra peut-être de redessiner un couple d'amorces consensuelles de tous les *Candida* excluant *Fusarium* et *Penicillium*. En effet, en 1999, Bounoux et al. et n'ont pas mis en évidence la reconnaissance de *Fusarium* et *Penicillium* par le couple d'amorces externes ITS1-ITS4.

- une autre stratégie d'amplification de l'ADN ribosomal des levures pourrait être l'utilisation d'amorces externes pour un premier *screening* de présence ou d'absence du genre *Candida*, avec ensuite application d'une sonde marquée ciblant l'intérieur de cette séquence. Ces sondes de type Taqman[®] ou FRET[®], spécifiques d'espèce, permettront un gain de sensibilité et de spécificité. Une fois validées, de telles sondes pourraient être utilisées dans la même PCR que le couple d'amorces externes, afin de fournir un résultat rapide, en un seul cycle de LightCycler[®]; une telle PCR de type multiplex permettant une intervention thérapeutique adaptée.

Le but de ce travail était de proposer un outil diagnostique précoce, rapide et précis aux cliniciens. Nous pourrions développer l'aspect quantitatif de l'analyse, ce qui est aisément concevable avec la PCR en temps réel. Nous avons décrit le *monitoring* sérologique mais pourquoi ne pas le rendre réalisable par PCR ? Les applications pourraient en être variées : 1) Suivi des patients avec définition d'une valeur seuil, alertant le clinicien sur le passage d'un état colonisé à celui d'infecté. 2) Suivi thérapeutique : détection précoce d'une résistance et d'un pronostic péjoratif ou au contraire courbe de décroissance avec guérison du patient ce qui permettrait d'éviter une prescription inutilement prolongée du traitement antifongique, très onéreux par ailleurs (de l'ordre de plusieurs centaines d'euros par jour).

Enfin, avant d'entreprendre toutes ces pistes de travail, il serait intéressant de mener une étude pour optimiser et standardiser un inoculum permettant les études de sensibilité et les travaux quantitatifs. Cette étude passerait par l'analyse et la recherche du meilleur type de prélèvement à partir duquel travailler. L'extraction, une fois reprecisée selon le prélèvement, pourra être optimisée au moyen d'un extracteur automatique. Certes, ces automates présentent un coût encore très élevé mais ils semblent intéressants pour mener de telles études : standardisation, reproductibilité, rapidité et sécurité environnementale par rapport au produit d'extraction.

De même des mesures d'assurance qualité en biologie moléculaire devront être codifiées et appliquées. La biologie moléculaire est à peine évoquée dans le Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA)[64] ainsi que dans la norme internationale de certification spécifique à la biologie médicale : l'ISO 15189 [80]. Depuis l'été 2004, le groupe d'experts de l'EC4, déjà instigateur de l'ISO 15189, se réunit pour élaborer les critères spécifiques à l'assurance qualité en biologie moléculaire.

L'élaboration de ce travail, et notamment le passage de la PCR classique à celle en temps réel, nous a permis de soulever des problèmes techniques ou « conceptuels » à chaque étape. Ces derniers, d'importance variable, doivent être résolus avant de pouvoir utiliser les outils modernes mis à notre disposition. Ces problèmes ont pour la plupart déjà été solutionnés dans d'autres domaines du diagnostic microbiologique par biologie moléculaire. Citons par exemple la recherche du gène *MecA* de résistance à la pénicilline du staphylocoque et le diagnostic des virus.

Avec le développement de cette technique appliquée aux levures, nous avons appréhendé un nouveau type de microorganismes par biologie moléculaire. Compte tenu de l'importance grandissante des agents fongiques en pathologie humaine, nous pensons que notre concept, est précurseur dans le domaine diagnostic.

9 CONCLUSION

Le genre *Candida* sp. correspond à des champignons levuriformes, saprophytes du tube digestif humain, responsables d'infections graves chez le patient immunodéprimé (neutropénie, corticothérapie à forte dose au long cours, greffés...).

Cette infection opportuniste est fréquemment mortelle puisque sa létalité est estimée à environ 50 %. Le pronostic pour le patient dépend de trois facteurs : les restaurations de l'immunité et de l'intégrité des muqueuses, et la mise en place précoce d'un traitement antifongique adapté. Le clinicien doit donc pouvoir s'appuyer sur un diagnostic à la fois précoce, rapide et sûr; or le diagnostic de candidose invasive est difficile à poser avec les techniques actuelles. Les cultures de prélèvements non sanguins sont généralement positives mais d'interprétation difficile, les hémocultures ont une valeur prédictive positive de 100% mais seulement 50% de sensibilité. Quant aux tests sérologiques, même combinés ils restent tributaires de la fugacité des antigènes sériques et de la cinétique des anticorps. Les résultats microbiologiques doivent donc nécessairement être intégrés dans l'analyse complète du dossier médical, en particulier l'analyse des facteurs de risque. La symptomatologie des infections fongiques profondes se résume le plus souvent à une fièvre persistante sous antibiotiques chez un patient immunodéprimé. Le médecin-clinicien ne peut se permettre l'attente d'arguments diagnostiques formels, ce qui aurait pour conséquence un retard au traitement et une aggravation du pronostic.

En pratique, la candidose à dissémination hémotogène est considérée comme possible ou probable d'après un ensemble d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques.

La stratégie diagnostique actuelle pourrait s'enrichir de l'apport de la biologie moléculaire ; en effet la PCR est déjà largement utilisée dans le diagnostic d'autres maladies infectieuses d'origine bactériologique, virologique ou parasitaire. Dans le domaine de la PCR-*Candida* les études divergent sur la nature du prélèvement biologique le mieux adapté, sur la séquence d'ADN à amplifier, ou encore sur la technique de PCR à utiliser. Nous avons choisi, dans ce travail, de développer au laboratoire de Microbiologie du CHR de Metz une technique de PCR en temps réel. Enfin, la PCR en temps réel représente certainement l'un des progrès actuels les plus prometteurs de l'évolution récente des techniques d'analyses appliquées à la biologie moléculaire.

Les résultats exposés dans ce travail sont encourageants. Les techniques de PCR en temps réel sur automate LightCycler® sont assez récentes et posent encore des problèmes de mise au point. Elles ont montré en pratique leur intérêt car elles sont rapides, facilement réalisables pour des grandes séries du fait de leur automatisation. Elles offrent également la possibilité de donner des résultats en quantification avec la technique employée qu'est le SYBR Green® mais également avec des sondes Taqman ou FRET, technologies encore plus spécifiques qui pourraient être développées. Cependant des travaux devront être effectués pour standardiser le choix du prélèvement à analyser (sérum, plasma, sang total, urines, LCR, LBA..) et leur traitement avant extraction. En effet les techniques classiques utilisées pour les bactéries ou les cellules eucaryotes sont peu ou non efficaces à cause de la localisation intracellulaire possible du champignon et surtout en raison de la structure et la composition des parois fongiques. La sensibilité des techniques de PCR pourrait être augmentée par immunocapture des éléments fongiques libres.

Compte tenu du faible nombre de patient inclus dans notre étude, biais inhérent à cette pathologie, il est difficile de répondre sur la valeur diagnostique de notre technique. Elle devra donc être réévaluée sur une plus large population.

Il s'avère nécessaire de poursuivre ce travail en essayant d'optimiser la sensibilité des techniques, car il est très probable qu'elles remplaceront à plus ou moins long terme toutes les autres techniques de PCR dites "classiques".



10 BIBLIOGRAPHIE



- 1 - AFSSAPS - Unité de la transparence.
Amphotéricine B (Ambisome[®], laboratoires Gilead Sciences). Avis de la commission de transparence - 18 avril 2001, 9p
- 2 - AFSSAPS - Unité de la transparence.
Voriconazole (Vfend[®], laboratoires Pfizer). Avis de la commission de transparence – 4 septembre 2002, 6p
- 3 - AFSSAPS - Unité de la transparence.
Caspofungine (Cancidas[®], laboratoires MSD). Avis de la commission de transparence - 23 juillet 2003, 7p
- 4 - Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU.
Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification.
J Clin Microbiol. 2002, 40, 7, pp 2483-2489
- 5 - Al Mosaid A, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman DC.
Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar.
J Clin Microbiol. 2001, 39, 1, pp 323-327
- 6 - ANOFEL – Association Française des Enseignants de Parasitologie
Parasitologie Mycologie Edition CR 6^{ème} édition, Paris, 1998, 481p. et son CD-ROM
- 7 - Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.
Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus.
Clin Infect Dis. 2002, 34, 1, pp 7-14
- 8 - Badillet G, de BIEVRE C, GUEHO E Champignons contaminant des cultures et champignons opportunistes – Atlas Clinique et biologique Paris, Tome 1&2, VIARA Editeur
- 9 - Bautista-Munoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernandez-Rodriguez C.
Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods.
J Clin Microbiol. 2003, 41, 1, pp 414-420

- 10 - Beck-Sague C., W. R. Jarvis.
Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990.
J. Infect. Dis. 1993, 167, pp 1247-1251
- 11 - Bogard M, Lamoril J [Coordinateurs].
Biologie Moléculaire en Biologie Clinique. Tome I : Méthodes, 1998, Collection Option/Bio, Elsevier Editeur Paris, 348p
- 12 - Bogard M, Lamoril J [Coordinateurs].
Biologie moléculaire en biologie clinique. Tome II : Applications en infectiologie et en cancérologie, 1999, Collection Option/Bio Elsevier Editeur Paris
- 13 - Bogard M, Lamoril J [Coordinateurs].
Biologie moléculaire en biologie clinique. Tome III : Applications en génétique, 1999, Collection Option/Bio, Elsevier Editeur Paris.
- 14 - Botterel F, Bretagne S.
Diagnostic des mycoses invasives, tests de sensibilité in vitro et nouveaux antifongiques.
Spectra Biologie 2003, 22, 130, pp 49-55
- 15 - Bougnoux ME, Dupont C, Turner L, Rouveix E, Dorra M, Nicolas-Chanoine MH.
Mixed *Candida glabrata* and *Candida albicans* disseminated candidiasis in a heroin addict.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997, 16, 8, pp 598-600
- 16 - Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine M.
Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR.
J Clin Microbiol. 1999, 37, 4, pp 925-930
- 17 - Boyle BM, Sullivan DJ, Forkin C, Mulcahy F, Keane CT, Coleman DC.
Candida dubliniensis candidaemia in an HIV-positive patient in Ireland.
Int J STD AIDS 2002, 13, 1, pp 55-57
- 18 - Burnie JP, Golbang N, Matthews RC
Semiquantitative polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosis of disseminated candidiasis.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997, 16, 5, pp 346-350
- 19 - Chabasse D, Guiguen Cl, Contet-Audonneau N.
Mycologie médicale, 1999, Collection Abrégés, Masson Editeur, 324p

- 20 - Chabasse D.
Intérêt de la numération des levures dans les urines. Revue de la littérature et résultats préliminaires d'une enquête multicentrique réalisée dans 15 centres hospitaliers universitaires.
Ann Fr Anesth Réanim 2001, 20, pp 400-406
- 21 - Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC.
Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method.
J Clin Microbiol. 2001, 39, 10, pp 3466-3471
- 22 - Chen W, Hoy JW, Schneider RW.
Species-specific polymorphism in transcribed ribosomal DANN of five *Pythium* species.
Exp Mycol. 1992, 16, pp 22-34
- 23 - Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, Lafe K, Bui U, Limaye AP, Cookson BT.
Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts.
J Clin Microbiol. 2001, 39, 11, pp 4042-4051.
- 24 - Cockerill, F. R.
Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory.
Arch Pathol Lab Med 2003, 127, pp 1112-1120
- 25 - Coignard C, Hurst SF, Benjamin LE, Brandt ME, Warnock DW, Morrison CJ.
Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes.
J Clin Microbiol. 2004, 42, 2, pp 858-861
- 26 - Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB.
Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*.
AIDS 1997, 11, 5, pp 557-567
- 27 - Conférence de consensus commune organisée conjointement par la Société Française d'Anesthésie Réanimation (SFAR), la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et la Société de Réanimation de Langue Française (SFRL) avec la participation de la Société Française d'Hématologie et la Société Française de Mycologie Médicale,
Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte.
13 mai 2004, Paris, Institut Pasteur. Texte long
- 28 - Coukell AJ, Brogden RN.,
Liposomal amphotericin B. Therapeutic use in the management of fungal infections and visceral leishmaniasis.
Drugs. 1998, 55, 4, pp 585-612

- 29 - Couprie B.
L'examen mycologique en pratique quotidienne
Feuillets de Biologie 2001, 42, 241, pp 29-34
- 30 - Cresti S, Posteraro B, Sanguinetti M, Guglielmetti P, Rossolini GM, Morace G, Fadda G.
Molecular typing of *Candida* spp. by random amplification of polymorphic DNA and analysis of restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA repeats.
New Microbiol. 1999, 22, 1, pp 41-52
- 31 - Dalle F, Jouault T, Trinel PA, Esnault J, Mallet JM, d'Athis P, Poulain D, Bonnin A.
Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro
Infect Immun 2003, 71, 12, pp 7061-7068
- 32 - Dannaoui E.
Intérêt des tests de sensibilité in vitro dans la prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives
Conférence de consensus commune SFAR, SPILF, SRLF, 2004, pp 52-59
- 33 - Datry A, Thellier M, Traoré B, Alfa-Cissé O, Danis M.
Utilisation des antifongiques dans le traitement des candidoses systémiques: antifongiramide, point sur les résistances, données pharmacologiques.
Ann Fr Anesth Réanim. 2001, 20, pp 389-393
- 34 - Dromer F, Chevalier R, Sendid B, Improvisi L, Jouault T, Robert R, Mallet JM, Poulain D.
Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*.
Antimicrob Agents Chemother. 2002, 46, 12, 3869-3876
- 35 - Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neugeglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL.
Genome evolution in yeasts.
Nature. 2004, 430, 6995, pp 35-44

- 36 - Dupont H.
Infections fongiques en réanimation. Enquête transversale.
Ann Fr Anesth Reanim 2001, 20, pp 413-417
- 37 - Dupont H.
Colonisation ou infection à *Candida* en réanimation.
Conférence de consensus commune SFAR, SPILF, SRLF 2004, pp 71-78
- 38 - Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP.
Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis,
Clin Infect Dis. 1999, 29, 2, pp 239-244
- 39 - Eggimann P, Garbino J, Pittet D.
Management of *Candida* species infections in critically ill patients.
Lancet Infect Dis. 2003, 3, 12, pp 772-785
- 40 - Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA,
van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U.
Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes.
J Clin Microbiol. 1997, 35, 6, pp 1353-1360
- 41 - Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ.
Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes.
J Clin Microbiol. 1998, 36, 11, pp 3260-3265
- 42 - Ellepola AN, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ.
Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida*
species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic
identification methods.
Oral Microbiol Immunol. 2003, 18, 6, pp 379-388
- 43 - Eloy O, Tabella C, Harzic M, Pina P, Allouch P, Pangon B, Bedos JP, Ghnassia JC
Intérêt de l'antigénémie mannane, du dosage des anticorps totaux par Elisa Platelia®
dans le diagnostic des infections profondes à *Candida*.
Ann Biol Clin 2002, 60, 6, pp 711-714
- 44 - Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J.
Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of
common, new, and emerging yeast pathogens.
J Clin Microbiol. 1998, 36, 4, pp 883-886.
- 45 - Etienne J, Biochimie génétique & Biologie moléculaire, 4^e édition, 1998, Collection
Abrégés, Masson Editeur, 503p

- 46 - Evertsson U, Monstein HJ, Johansson AG.
Detection and identification of fungi in blood using broad-range 28S rDNA PCR amplification and species-specific hybridisation.
APMIS. 2000, 108, 5, pp385-3092
- 47 - Faure O, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Mallaret MR, Ambroise-Thomas P, Grillot R
Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units.
J Hosp Infect. 2002, 50, 2, pp 155-160
- 48 - Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL.
Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections
J Clin Microbiol. 2001, 39, 8, pp 2873-2879
- 49 - Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC.
Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality.
Clin Infect Dis. 1992, 15, 3, pp 414-421
- 50 - Freydiere, A. M., Perry, J. D., Faure, O., Willinger, B., Tortorano AM., Nicholson, A., Peman, J., Verweij, P. E.
Routine Use of a Commercial Test, GLABRATA RTT, for Rapid Identification of *Candida glabrata* in Six Laboratories.
J. Clin. Microbiol. 2004,42, pp 4870-4872
- 51 - Fricker-Hidalgo H, Orensa S, Lebeau B, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Grillot R.
Evaluation of *Candida* ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species.
J Clin Microbiol. 2001, 39, 4, pp 1647-1649
- 52 - Fridkin S.K., and W. R. Jarvis W.
Epidemiology of nosocomial fungal infections.
Clin. Microbiol. 1996, 9, pp 499-511
- 53 - Fujita S, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ.
Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood.
J Clin Microbiol. 1995, 33, 4, pp 962-967
- 54 - Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T.
Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains.
J Clin Microbiol. 2001, 39, 10, pp 3617-3622

- 55 - Gangneux JP, Bretagne S, Cordonnier C, Datry A, Derouin F, Grillot R, Kauffmann-Lacroix C, Lebeau B, Morin O, Nicolle MC, Piens MA, Poirot JL.
Prevention of nosocomial fungal infection: the French approach.
Clin Infect Dis. 2002, 35, 3, pp 343-346
- 56 - Gardes M, Fortin J, White TJ, Bruns TD, Taylor JW
Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in mycorrhizae by amplification of the internal transcribed spacer.
Can J Bot. 1991, 69, pp 180-190
- 57 - Gauzit R.
Epidemiology and prognostic factors of systemic candidiasis in intensive care units
Ann Fr Anesth Reanim. 2001, 20, 4, pp 394-399
- 58 - Gauzit R, Cohen Y, Dupont H, Hennequin C, Montravers P, Timsit JF, Veber B, Chevalier E, Blin P, Palestro B.
Infections by *Candida* sp. in intensive care. Survey of French practices
Presse Med. 2003, 32, 10, pp 440-449
- 59 - Gee SF, Joly S, Soll DR, Meis JF, Verweij PE, Polacheck I, Sullivan DJ, Coleman DC.
Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo
J Clin Microbiol. 2002, 40, 2, pp 556-574
- 60 - Giamarellou H, Antoniadou A.
Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery.
Infect Control Hosp Epidemiol. 1996, 17, 8, pp 558-564
- 61 - Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NA.
Candida dubliniensis: phylogeny and putative virulence factors.
Microbiology. 1998, 144, Pt 4, pp 829-838
- 62 - Graf B, Trost A, Eucker J, Gobel UB, Adam T.
Rapid and simple differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*.
Diagn Microbiol Infect Dis. 2004, 48, 2, pp 149-151
- 63 - Grillot R.
Les mycoses humaines : démarche diagnostique, 1996,
Collection Option Bio, Elsevier Editeur Paris, 392p
- 64 - Guide de Bonne Exécution des Analyses
Arrêté du 2 novembre 1994 modifié le 2 décembre 1999.
Journal officiel de la République française du 11 décembre 1999

- 65 - Hamal P, Kappe R , Rimek D.
Rate of transmission and endogenous origin of *Candida albicans* and *Candida glabrata* on adult intensive care units studied by pulsed field gel electrophoresis .
J Hosp Infection 2001, 49, pp 37-42
- 66 - Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC.
Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures.
J Clin Microbiol. 1992, 30, 6, pp 2743-2745
- 67 - Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kahkola P, Anttila VJ, Malmberg H, Richardson M, Ylikoski J.
Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens.
J Clin Microbiol. 2000, 38, 11, pp 4186-92
- 68 - Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR
Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis.
N. Eng. J. Med. 2002, 347, pp 408-415
- 69 - Herent P, Stynen D, Hernando F, Fruit J, Poulain D.
Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis.
J Clin Microbiol. 1992, 30, 8, pp 2158-64
- 70 - Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF.
Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR.
J Clin Microbiol. 1994, 32, 1, pp 228-231
- 71 - Hong Nguyen M., Peacock J.E.0, Morris A.J.,Tanner D.C.,Nguyen M. Snyderman D.R.
The changing face of candidemia: emergence of non-*albicans* species and antifungal resistance.
Am. J. Med. 1996, 100, pp 617-623
- 72 - Horvath LL, Duane R, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley D.
Direct isolation of *Candida* spp. from blood culture on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*.
J Clin Microbiol. 2003, 41, 6, pp 2629-2632
- 73 - Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP.
Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with plus aerobic/F and anaerobic/F blood culture bottles.
J Clin Microbiol. 2003, 41, 10, pp 4714-4717

- 74 - Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR.
Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection.
J Clin Microbiol. 2004, 42, 1, pp 115-118
- 75 - Huang CC, Tsai WC, Hseu RS, Wang HH.
Identification of *Candida albicans* by specific primers of polymerase chain reaction and DNA probes
J Microbiol Immunol Infect. 1997, 30, 1, pp 18-31
- 76 - Ibanez-Nolla J, Torres-Rodriguez JM, Nolla M, Leon MA, Mendez R, Soria G, Diaz RM, Marrugat J.
The utility of serology in diagnosing candidosis in non-neutropenic critically ill patients.
Mycoses 2001, 44, 1-2, pp 47-53
- 77 - Ibata-Ombetta S, Jouault T, Trinel PA, Poulain D.
Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in macrophage killing of *Candida albicans*.
J Leukoc Biol. 2001, 70, 1, pp 149-154.
- 78 - Ibata-Ombetta S, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D, Jouault T.
Candida albicans phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis.
J Biol Chem. 2003, 278, 15, pp 13086-13093
- 79 - Ibata-Ombetta S, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D, Jouault T.
Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation.
Ann N Y Acad Sci. 2003, 1010, pp 573-576
- 80 - ISO/CEN 15189 : Laboratoires d'analyses de biologie médicale –
Exigences particulières concernant la qualité et la compétence, Nov. 2003
- 81 - Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, Towler HM, Matheson MM, Adamson P, Okhravi N, Lightman S.
Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR.
J Clin Microbiol. 2000, 38, 8, pp 2902-2908
- 82 - Johnson LB, Kauffman CA.
Voriconazole : A new triazole antifungal agent.
Clin Infect Dis, 2003, 36, pp 630-637

- 83 - Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH.
Combination antifungal therapy.
Antimicrob Agents Chemother. 2004, 48, 3, pp 693-715
- 84 - Jouault T, Fradin C, Trinel PA, Bernigaud A, Poulain D.
Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid.
J Infect Dis. 1998, 178, 3, pp 792-802
- 85 - Jouault T, Fradin C, Trinel PA, Poulain D.
Candida albicans-derived beta-1,2-linked manno-oligosaccharides induce desensitization of macrophages.
Infect Immun. 2000, 68, 2, pp 965-968
- 86 - Kaabachi O, Jemli B, Barguellil F, Boudabous A, GArgouri S, Amor A.
Etude comparative de l'adhérence de cinq espèces de *Candida* au polychlorure de vinyle
Ann Bio Clin 2001, 59, 3, pp 271-276
- 87 - Kao A.S., Brandt M.E., Pruitt W.R., Conn L.A., Perkins B.A., Stephens D.S.
The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population based active surveillance
Clin. Infect. Dis , 1999, 29, pp 1164-1170
- 88 - Kaplan JC, Delpech M,
Biologie Moléculaire et médecine, 1996,
Médecine-Sciences Flammarion Editeur, 610p
- 89 - Kappe R, Okeke CN, Fauser C, Maiwald M, Sonntag HG.
Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue
J Med Microbiol. 1998, 47, 9, pp 811-820
- 90 - Khan ZU, Mustafa AS.
Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia.
Microbiol Res. 2001, 156, 1, pp 95-102.
- 91 - Knoke M
Gastrointestinal microecology of humans and *Candida*.
Mycoses 1999, 42, pp 30-34
- 92 - Koenig H.,
Guide de Mycologie Médicale, 1995
Ellipses Editeur, 287p

- 93 - Korabecna M, Liska V, Fajfrlik K.
Primers ITS1, ITS2 and ITS4 detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene region in clinical isolates of fungi.
Folia Microbiol. 2003, 48, 2, pp 233-238.
- 94 - Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA.
Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms : unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins.
Antimicrob Agents Chemother. 2002, 46, pp 17773-1780
- 95 - Lacour M, Zunder T, Huber R, Sander A, Daschner F, Frank U.
The pathogenetic significance of intestinal *Candida* colonization- a systematic review from an interdisciplinary and environmental medical point of view.
Int. J. Hyg. Environ Health 2002, 205, pp 257-268
- 96 - Latgé JP.
Aspergillus fumigatus and aspergillosis.
Clin Microbiol Rev. 1999, 12, 2, pp 310-350
- 97 - Launay O, Lortholary O, Bouges-Michel C, Jarrousse B, Bentata M, Guillevin L.
Candidemia: a nosocomial complication in adults with late-stage AIDS
Clin Infect Dis. 1998, 26, 5, pp 1134-1141
- 98 - Léautérez S, Raffi F.
Thérapeutique des mycoses profondes (à l'exception des aspergilloses et des fusarioses).
Rev Fr des Labo 2001, 31, 332, pp 23-30
- 99 - Lee SB, Taylor JW
Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA
Mol Biol Evol. 1992, 9, pp 636-653
- 100 - Leleu G, Aegerter P, Guidet B.
College des Utilisateurs de Base de Données en réanimation. Systemic candidiasis in intensive care units: a multicenter, matched-cohort study,
J Crit Care. 2002, 17, 3, pp 168-175.
- 101 - Lemieux C, St-Germain G, Vincelette J, Kaufman L, de Repentigny L.
Collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis.
J Clin Microbiol. 1990, 28, 2, pp 249-253

- 102 - Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ.
Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes.
J Clin Microbiol. 2001, 39, 10, pp 3505-3511
- 103 - Lo HJ, Ho YA, Ho M.
Factors accounting for misidentification of Candida species.
J Clin Microbiol. 2001, 34, 3, pp 171-177
- 104 - Loeffler J, Hebart H, Schumcher U, Reitze H, Einsele H.
Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood J Clin Microbiol 1997, 35, pp 3311-3312
- 105 - Loeffler J, Hebart H, Sepe S, Schumcher U, Klingebiel T, Einsele H.
Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system.
Med Mycol. 1998, 36, 5, pp 275-279.
- 106 - Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H.
Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system.
J Clin Microbiol. 2000, 38, 2, pp 586-590
- 107 - Loeffler J, Hebart H, Magga S, Schmidt D, Klingspor L, Tollemar J, Schumacher U, Einsele H.
Identification of rare Candida species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization.
Diagn Microbiol Infect Dis. 2000, 38, 4, pp 207-212
- 108 - Loeffler J, Schmidt D, Hebart H, Schumacher U, Einsele H.
Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA pure LC System
J Clin Microbiol 2002, 40, pp 2240-2243
- 109 - Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E.
Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of Candida albicans and related species.
Yeast. 1993, 9, 11, pp 1199-1206
- 110 - Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F.
Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered Candida species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay.
J Clin Microbiol. 2004, 42, 7, pp 3159-3163
- 111 - Maertens J, Vrebois M, Boogaerts M.
Assessing risk factors for systemic fungal infections.
European Journal of Cancer Care 2001, 10, 1, pp 56-62

- 112 - Marais E, Stewart R, Duse AG, Rosekilly IC, de Jong G, Aithma N.
Candida parapsilosis detected in TPN using the BacT/Alert system and characterized by randomly amplified polymorphic DNA.
J Hosp Infect. 2004, 56, 4, pp 291-296.
- 113 - de Marie S.
New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections
Haematologica, 2000, 85, pp 88-93
- 114 - Martinez JP, Gil ML, Lopez-Ribot JL, Chaffin WL.
Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of Candida albicans.
Clin Microbiol Rev. 1998, 11, 1, pp 121-141
- 115 - Massonet C, Van Eldere J, Vaneechoutte M, De Baere T, Verhaegen J, Lagrou K.
Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species.
J Clin Microbiol. 2004, 42, 5, pp 2209-2211
- 116 - Michel-Guyen A, Favel A, Regli P
Identification des levures au laboratoire : comment allier performance et simplicité
Feuillets de Biologie 2002, 43, 245, pp 41-52
- 117 - Mirrett S, Reller LB, Petti CA, Woods CW, Vazirani B, Sivadas R, Weinstein MP.
Controlled clinical comparison of BacT/ALERT standard aerobic medium with BACTEC standard aerobic medium for culturing blood.
J Clin Microbiol. 2003, 41, 6, pp 2391-2394
- 118 - Mirrett S, Petti CA, Woods CW, Magadia R, Weinstein MP, Reller LB.
Controlled clinical comparison of the BacT/ALERT FN and the standard anaerobic SN blood culture medium.
J Clin Microbiol. 2004, 42, 10, pp 4581-4585
- 119 - Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Kakeya H, Otsubo T, Kawamura S, Hossain MA, Noda T, Hirakata Y, Kohno S.
Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia.
J Clin Microbiol. 1996, 34, 8, pp 1918-1921
- 120 - Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y.
New method for detection of Candida albicans in human blood by polymerase chain reaction.
J Clin Microbiol. 1993, 31, 12, pp 3344-3347
- 121 - Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, Hara K.
Plasma (1->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis.
J Clin Microbiol. 1995, 33, 12, pp 3115-3118.

- 122 - Moalic E., Virmaux M., Lecordier P., Carrou C., Le Flohic AM.
Performance du diagnostic en mycologie
Feuillets de Biologie 2002, 42, 245, pp 77-78
- 123 - Muller FM, Werner KE, Kasai M, Francesconi A, Chanock SJ, Walsh TJ.
Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption.
J Clin Microbiol. 1998, 36, 6, pp 1625-1629
- 124 - National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).
Référence method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts ;
Approved standard - Second edition
Washington DC, USA. 2002, 22, 15, M27-A2
- 125 - Nguyen MH, Peacock JE Jr, Tanner DC, Morris AJ, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Yu VL.
Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study.
Arch Intern Med. 1995, 155, 22, pp 2429-2435
- 126 - Nguyen MH, Yu CY.
Voriconazole against fluconazole-susceptible and resistant candida isolates: in-vitro efficacy compared with that of itraconazole and ketoconazole.
J Antimicrob Chemother. 1998, 42, 2, pp 253-256
- 127 - Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SF.
Amphotericin B : Time for a new "gold standard".
Clin Infect Dis. 2003, 37, pp 415-425
- 128 - Pallavicini F, Izzi I, Pennisi MA, Morace G, Portaccio GG, Bello G, Iodice F, Godino D, Del Borgo C, Proietti R.
Evaluation of the utility of serological tests in the diagnosis of candidemia.
Minerva Anesthesiol. 1999, 65, 9, pp 637-639
- 129 - Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE;
Infectious Diseases Society of America.
Guidelines for treatment of candidiasis.
Clin Infect Dis. 2004, 38, 2, pp 161-189
- 130 - Pappu-Katikaneni LD, Rao KP, Banister E.
Gastrointestinal colonization with yeast species and Candida septicemia in very low birth weight infants.
Mycoses, 1990, 33, pp 20-23

- 131 - Park S, Wong M, Marras SA, Cross EW, Kiehn TE, Chaturvedi V, Tyagi S, Perlin DS. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *J Clin Microbiol.* 2000, 38, 8, pp 2829-2836
- 132 - de Pauw BE, Meunier F. The challenge of invasive fungal infection. *Chemotherapy.* 1999, 45, Suppl 1, pp 1-14
- 133 - Pfaller, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 22 (Suppl. 2):S89-S94
- 134 - Pfaller M.A, Jones R.N, Doern V, Sader H.S, Messer S.A, Houston A, Coffman S, Hollis R.J and the Sentry Participant Group. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in north america and latin America, 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000, 44, 3, pp 747-751
- 135 - Pfaller, M.A., D.J. Diekema, R. N. Jones, H. S. Sader, A. C. Fluit, R. J. Hollis, and S. A. Messer. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, pp 3254-3259
- 136 - Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ; SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol.* 2002, 40, 3, pp 852-856
- 137 - Pilly E. Mycoses systémiques. *Maladies infectieuses et tropicales* 19^e édition 2004. Paris : Editions 2M2, pp 493-495
- 138 - Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, Bassel A, Sullivan DJ, Clarke M, Hearn V. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol.* 1999, 37, 11, pp 3533-3359

- 139 - Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R.
Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients.
Ann Surg. 1994, 220, 6, pp 751-758
- 140 - Pittet D, Monod M.
Candida infections in intensive care
Schweiz Med Wochenschr. 1995, 125, 23, pp 1130-1137. R. French.
- 141 - Posteraro B, Bruno S, Boccia S, Ruggiero A, Sanguinetti M, Romano Spica V,
Ricciardi G, Fadda G.
Candida parapsilosis bloodstream infection in pediatric oncology patients: results of
an epidemiologic investigation.
Infect Control Hosp Epidemiol. 2004, 25, 8, pp 641-645
- 142 - Poulain D.
Physiopathologie et diagnostic des candidoses systémiques
La Lettre de l'Infectiologie, 2000 mai ; Tome XV, n°5, pp 182-190
- 143 - Poulain D, Slomianny C, Jouault T, Gomez JM, Trinel PA.
Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-
oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts.
Infect Immun. 2002, 70, 8, pp 4323-4328
- 144 - Poulain D, Jouault T.
Candida albicans cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a
decisive crosstalk.
Curr Opin Microbiol. 2004, 7, 4, pp 342-349
- 145 - Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M,
Pfaller M, Edwards JE Jr, Jarvis W, Dawson J, Wenzel RP.
National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of
bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units
and six neonatal intensive care units.,
Clin Infect Dis. 1999, 29, 2, pp 253-8
- 146 - Reisner BS, Wodds GL.
Times to detection of bacteria and yeasts in Bactec 9240 blood culture bottles. *J Clin
Microbiol.* 1999, 37, 6, pp 2024-2026
- 147 - Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeauvais JP, Hanazawa R,
Latge JP, Lortholary J, Makimura K, Morrison CJ, Murayama SY, Naoe S, Paris S,
Sarfati J, Shibuya K, Sullivan D, Uchida K, Yamaguchi H.
Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections.
Med Mycol. 1998, 36 Suppl 1, pp 249-257

- 148 - Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2000, 30, 4, pp 662-78
- 149 - Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit. Care Med. 1999, 27, pp 887-892.
- 150 - Richardson MD, Kokki MH. Diagnosis and prevention of fungal infection in the immunocompromized patient. Blood Rev. 1998 ; 12, 4, pp 241-254
- 151 - Riley JA, Heiter BJ, Bourbeau PP. Comparison of recovery of blood culture isolates from two BacT/ALERT FAN aerobic blood culture bottles with recovery from one FAN aerobic bottle and one FAN anaerobic bottle. J Clin Microbiol. 2003, 41, 1, pp 213-217.
- 152 - Robert F, Lebreton F, Bougnoux ME, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. J Clin Microbiol. 1995, 33, 9, pp 2366-2371
- 153 - Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Francesconi A, Kasai M, Filioti J, Tsivitanidou M, Sofianou D, Kremenopoulos G, Walsh TJ. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. J Clin Microbiol. 2003, 41, 2, pp 735-741
- 154 - Selvarangan R, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridization. J Clin Microbiol. 2002, 40, 11, pp 4308-4312
- 155 - 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, 5, pp 1510-1517

- 156 - Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, Poulain D.
Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species.
J Med Microbiol. 2002, 51, 5, pp 433-442
- 157 - Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B, Klingspor L, Grandjean M, Bonnin A, Poulain D.
Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults.
J Clin Microbiol. 2003, 41, 10, pp 4551-4558
- 158 - Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, Poulain D.
Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis.
J Clin Microbiol. 2004, 42, 1, pp 164-171
- 159 - Soll D.R.
Gene regulation during high frequency switching in *Candida albicans*
Microbiology 1997, 143, Pt2, pp 279-288
- 160 - Solomkin JS, Flohr AM, Simmons RL.
Indications for therapy for fungemia in postoperative patients.
Arch Surg. 1982, 117, 10, pp 1272-1275
- 161 - Talluri G, Mangone C, Freyle J, Shirazian D, Lehman H, Wise GJ.
Polymerase chain reaction used to detect candidemia in patients with candiduria.
Urology 1998, 51, 3, pp 502-505
- 162 - Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R; ECMM Working Group on Candidaemia.
Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23, 4, pp 317-22
- 163 - Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, and R. P. Gaynes.
Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999
Clin. Infect. Dis. 2002, 35, pp 627-630
- 164 - Tsuchiya T, Nishikawa T, Harada S, Hatano H, Fukazawa Y.
Identification of *Candida* isolated from the cutaneous candidiasis by the combined use of confirmatory medium and slide agglutination with monofactorial antibodies.
Mycopathol Mycol Appl. 1971, 25, 43, 3, pp 269-277

- 165 - van Deventer AJ, Goessens WH, van Belkum A, van Vliet HJ, van Etten EW, Verbrugh HA.
Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis.
J Clin Microbiol. 1995, 33, 3, pp 625-628
- 166 - van Deventer AJ, Goessens WH, van Zeijl JH, Mouton JW, Michel MF, Verbrugh HA
Kinetics of anti-mannan antibodies useful in confirming invasive candidiasis in immunocompromised patients.
Microbiol Immunol. 1996, 40, 2, pp 125-131
- 167 - Veber B.
Traitement des candidoses systémiques.
Conférence de consensus commune SFAR, SPILF, SRLF, 2004, pp 79-86
- 168 - Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J.
Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions.
J. Antimicrob Chemother. 2000, 46, 2, pp 171-179
- 169 - Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJ, Meis JF.
Comparative study of seven commercial yeast identification systems.
J Clin Microbiol. 1999, 52, 4, pp 271-273
- 170 - Vidal – Dictionnaire des médicaments. Edition janvier 2004
- 171 - Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chamoine MH et al.
The prevalence of Nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prévalence of Infection in Intensive Care (EPIC) study
JAMA 1995, 274, pp 639-644
- 172 - Viscoli C., Castagnola E.
Emerging fungal pathogens, drug resistance and the role of lipid formulations of amphotericin B in the treatment of fungal infections in cancer patients : a review
Int. J. Infect. Dis. 1999, 3, pp 109-118
- 173 - Viscoli C, Girmenia C., Marinus A. Colette L., Artino P., Vandercam B.
Candidemia in cancer patients : a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the european organization for research and treatment of cancer (EORTC),
Clin. Infect. Dis. 1999, 28, pp 1071-1079
- 174 - Voss A, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA.
Fluconazole in the management of fungal urinary tract infections.
Infection 1994, 22, pp 247-251

- 175 - Voss A, de Pauw BE.
High-dose fluconazole therapy in patients with severe fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999, 18, 3, pp 165-174
- 176 - Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P.
Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis.
J Clin Microbiol. 2000, 38, 8, pp 3016-3021
- 177 - Walsh TJ, Hathorn JW, Sobel JD, Merz WG, Sanchez V, Maret SM, Buckley HR, Pfaller MA, Schaufele R, Sliva C.
Detection of circulating candida enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis.
N Engl J Med. 1991, 11, 324, 15, pp 1026-1031
- 178 - Watts HJ, Very AA, Perera TH, Davies JM, Gow NA.
Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*.
Microbiology 1998, 144, Pt 3, pp 689-695
- 179 - Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP., Hospital-acquired candidemia.
The attributable mortality and excess length of stay.
Arch Intern Med. 1988, 148, 12, pp 2642-2645
- 180 - 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, 10, pp 2349-2353
- 181 - Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ.
Identification of candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA.
J Clin Microbiol 1995, 33, pp 2476-2479
- 182 - Willinger, B., Hillowoth, C., Selitsch, B., Manafi, M.
Performance of *Candida* ID, a New Chromogenic Medium for Presumptive Identification of *Candida* Species, in Comparison to CHROMagar *Candida*.
J. Clin. Microbiol. 2001, 39, pp 3793-3795
- 183 - Yeo SF, Wong B.
Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections.
Clin Microbiol Rev. 2002, 15, 3, pp 465-484

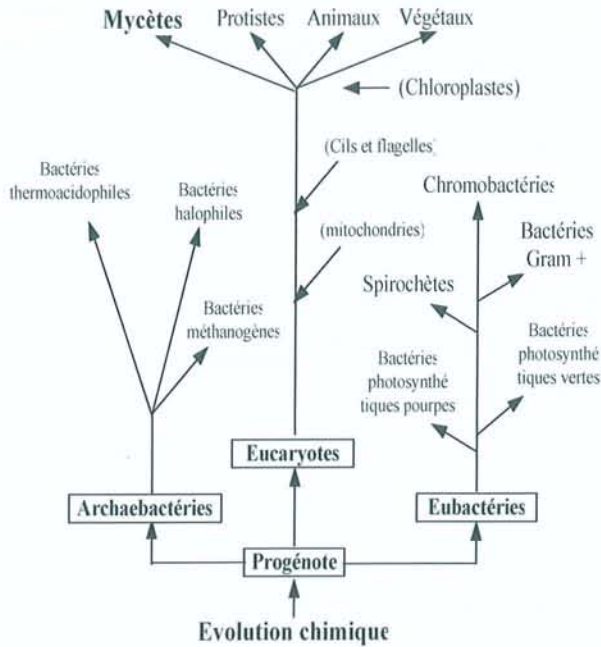
- 184 - Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D.
Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001, 20, 12, pp 864-870
- 185 - Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D, Sendid B.
Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium.
J Clin Pathol. 2004, 57, 2, pp 196-198.



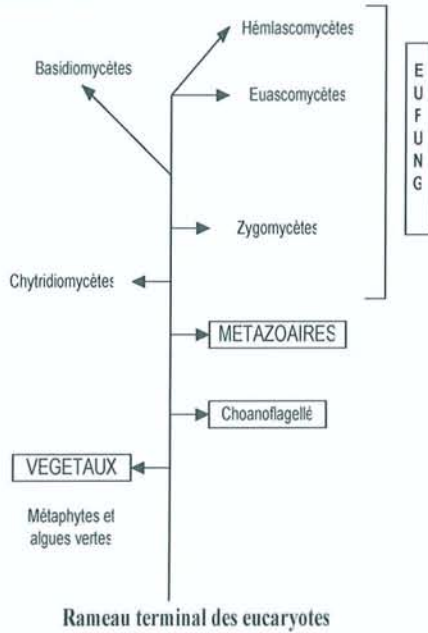
11 ANNEXES

ANNEXE n°1

Arbre phylogénétique du vivant d'après Regnault (1990)

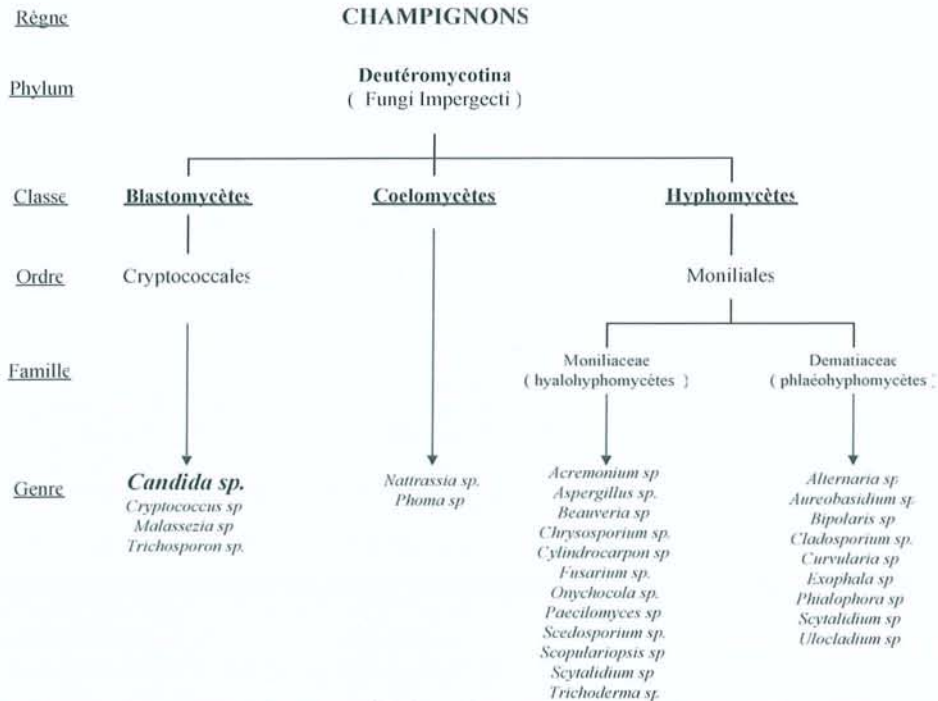


Reconstitution de l'arbre phylogénétique des champignons au niveau du rameau terminal des eucaryotes



Schémas extraits de Mycologie médicale 1999, Chabasse D, Guiguen CI, Contet-Audonneau N, Collection Abrégés, Masson Editeur, p 6 & p 12.

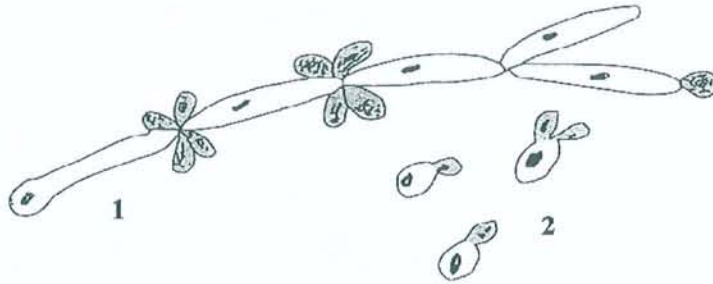
Classification des Deutéromycètes



Extrait de BIOFORMA Cahier de formation Biologie médicale, Les moisissures d'intérêt médical, 2002, n°25, p 16.

ANNEXE n°2

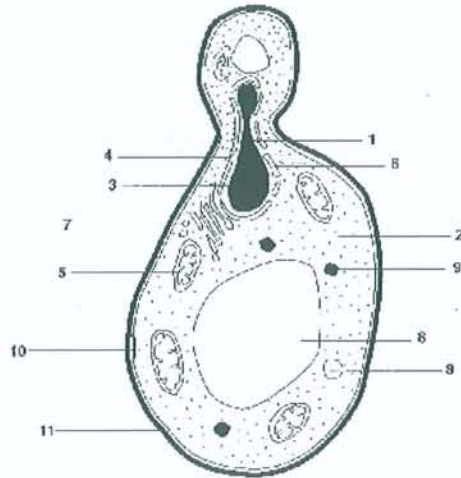
Reproduction végétative asexuée du genre *Candida*



1 - Pseudomycélium

2 - Blastospores
(levures bourgeonnantes)

Schéma d'une levure en microscopie électronique



- | | |
|-------------------|----------------------------|
| 1- Noyau | 6- Réticulum endoplasmique |
| 2- Cytoplasme | 7-Appareil de Golgi |
| 3- Chromatine | 8- Vacuole |
| 4- Pore nucléaire | 9- Corps lipidiques |
| 5- Mitochondrie | 10- Membrane cytoplasmique |
| | 11-Paroi |

Schémas extraits de Mycologie médicale 1999, Chabasse D, Guiguen CI, Contet-Audonneau N., Collection Abrégés, Masson Editeur

ANNEXE n°3

Définition des infections fongiques invasives

| INFECTIONS INVASIVES PROUVEES | |
|--|---|
| Infections tissulaires profondes | |
| <p>Champignons filamenteux¹ * Présence d'hyphes à l'examen cytopathologique d'un prélèvement à l'aiguille ou d'une biopsie, associés à des lésions tissulaires démontrées soit par microscopie, soit de façon non univoque par imagerie.</p> <p style="text-align: center;">Ou</p> <p>* Culture positive d'un prélèvement obtenu de façon stérile d'un site normalement stérile associée à des signes cliniques ou radiologiques compatibles avec l'infection.</p> | <p>Levures¹ Histo/cytologie mettant en évidence des formes levures plus ou moins associées à des filaments (certaines espèces de <i>Candida</i> peuvent produire des pseudohyphes et des hyphes) dans des prélèvements obtenus à partir d'une aspiration à l'aiguille ou d'une biopsie, à l'exclusion des muqueuses.</p> <p style="text-align: center;">Ou</p> <p>Culture positive d'un prélèvement obtenu de façon stérile à partir d'un site normalement stérile associée à des signes cliniques ou radiologiques compatibles avec l'infection, à l'exclusion des urines, des sinus, et des muqueuses.</p> <p style="text-align: center;">Ou</p> <p>Microscopie (encre de Chine, coloration au mucicarmin) ou antigénémie positive² pour <i>Cryptococcus</i> sp. dans le LCR</p> |
| Fongémies | |
| <p>Champignons filamenteux¹ Hémoculture positive à champignon, à l'exclusion d'<i>Aspergillus</i> spp. et de <i>Penicillium</i> spp. autre que <i>P. marneffeii</i>, associée à des signes cliniques et des symptômes temporaires compatibles avec l'organisme identifié.</p> | <p>Levures¹ Hémoculture positive à <i>Candida</i> sp. ou autres levures chez un patient présentant de façon temporaire des signes cliniques et des symptômes compatibles avec la levure identifiée.</p> |
| Infections fongiques endémiques (Histoplasmosse, blastomycose, coccidioidomycose et paracoccidioidomycose): | |
| <p>Ces infections, qu'elles soient systémiques ou limitées au poumon, doivent être prouvées par culture à partir du site infecté, chez un patient ayant des symptômes en rapport avec l'infection documentée. Si les cultures sont négatives ou impossibles, l'examen histologique ou cytologique de l'organisme est considéré comme suffisant pour les champignons dimorphiques ayant une morphologie caractéristique (Blastomyces, Coccidioides et Paracoccidioides). Le diagnostic d'infection disséminée peut être établi par des hémocultures ou la positivité des tests antigéniques utilisant le radioimmuno-marquage (RIA) sur les urines ou le sérum.</p> | |
| INFECTIONS INVASIVES PROBABLES | |
| <p style="text-align: center;">Au moins un facteur d'hôte (cf annexe 4) ET Un critère microbiologique ET Un critère majeur Ou 2 critères mineurs d'un site compatible avec l'infection fongique</p> | |
| INFECTIONS INVASIVES POSSIBLES | |
| <p style="text-align: center;">Au moins un facteur d'hôte (cf annexe 4) ET Un critère microbiologique OU un critère clinique (ou 2 critères mineurs) d'un site compatible avec l'infection fongique</p> | |
| <p>¹ Identifier au niveau du genre ou de l'espèce à partir des cultures ² Des réactions faussement positives avec l'antigène cryptocoque dues à des infections à <i>Trichosporon beigelli</i>, à <i>Stomatococcus mucilaginosus</i>, à un facteur rhumatoïde circulant, et à une infection maligne peuvent être observées si un test antigène positif dans cette catégorie.</p> | |

Tableau traduit de l'anglais (EORTC et MSG) par Botterel F., Bretagne S., Diagnostic des mycoses invasives, tests de sensibilité in vitro et nouveaux antifongiques. Spectra Biologie, 2003 Mars-avril, Vol 22 (130) p 50

ANNEXE n°4

Critères d'infections fongiques invasives chez les patients cancéreux ou ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques

| FACTEURS D'HÔTE | |
|---|--|
| 1- Neutropénie: PNN < 500 /mm ³ depuis plus de 10 jours. 2- Fièvre persistante depuis > 96h réfractaire à une antibiothérapie à large spectre. 3- Température centrale > 38 ° C ou < 36 ° C ET au moins un des critères suivants : * Neutropénie prolongée (>10 jours) au cours des 60 derniers jours. * Administration récente ou présente d'immunosuppresseurs au cours des 30 derniers jours. * Infection fongique invasive probable ou prouvée durant un précédent épisode de neutropénie. * SIDA symptomatique. 4- Signes et symptômes de GVH. 5- Administration prolongée (> 3 semaines) de corticoïdes au cours des 60 derniers jours. | |
| CRITERES MICROBIOLOGIQUES | |
| 1- Culture de l'expectoration ou du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) positive pour un champignon filamenteux (en particulier <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., Zygomycètes, <i>Scedosporium</i> spp.), ou <i>C. neoformans</i> ou d'un champignon endémique. 2- Culture positive ou examen direct en microscopie montrant des champignons filamenteux à partir d'une aspiration des sinus. 3- Examen direct positif en microscopie pour un champignon filamenteux ou <i>Cryptococcus</i> sp. à partir d'une expectoration ou d'un LBA. 4- Antigène <i>Aspergillus</i> positif ds un LBA, dans le LCR, ou dans = 2 prélèvements sanguins. 5- Antigène cryptococque positif dans le sang (voir notes en bas du tableau précédent pour les causes de faux positifs à éliminer). 6- Examen microscopique positif pour un champignon dans un liquide normalement stérile (tableau I, pour <i>Cryptococcus</i> dans le LCR) 7- Deux urocultures positives à levures en l'absence de sonde urinaire. 8- Présence de cylindres de <i>Candida</i> dans les urines en l'absence de sonde urinaire. 9- Hémo-culture positive à <i>Candida</i> spp. | |
| CRITERES CLINIQUES | |
| Doivent être en rapport avec le site du critère microbiologique et relié dans le temps à l'épisode actuel. | |
| Majeur | Mineur |
| Infection du tractus respiratoire inférieur | |
| * L'un des nouveaux signes suivants au scanner : halo, croissant gazeux ou cavité à l'intérieur d'une zone de consolidation. | 1-Symptômes d'infection du tractus respiratoire inférieur (toux, douleur thoracique, hémoptysie, dyspnée). |
| | 2-Frottement pleural. |
| | 3.Tout nouvel infiltrat ne remplissant pas un critère majeur. |
| | 4-Pleurésie |
| Infection nasosinusienne | |
| * Signes radiologiques évocateurs d'infection invasive des sinus (ex: érosion des parois sinusiennes ou extension de l'infection aux structures de voisinage destruction de la base du crâne). | 1-Symptômes respiratoires supérieurs (écoulement nasal etc) |
| | 2-Ulcération nasale ou escarre de la muqueuse nasale ou épistaxis. |
| | 3-Oedèmes périorbitaires. |
| | 4-Douleur maxillaire. |
| | 5-Lésions nécrotiques ou perforation du palais et de la cloison nasale. |
| Infection du système central | |
| * Signes radiologiques suggérant une infection du SNC (ex : mastoïdite ou autre foyer paraméningé, empyème extradural, lésion intracrânienne ou médullaire). | 1-Signes en foyer (crise comitiale localisée, hémiparésie, paralysie des nerfs crâniens). |
| | 2-Modifications du comportement. |
| | 3-Signes d'irritation méningée. |
| | 4-Anomalies de la chimie et du compte cellulaire du LCR (LCR négatif pour les autres agent pathogènes en culture, microscopie, et absence de cellules malignes). |
| Infection fongique disséminée | |
| 1- Papules ou nodules cutanés sans autre explication. | |
| 2- Anomalies au fond de l'œil évocatrices de choroïdite ou d'endophtalmie fongique par voie hématogène. | |
| Candidose chronique disséminée | |
| * Petits abcès périphériques en cible dans le foie et/ou la rate ,mis en évidence par scanner, IRM ou échographie, et augmentation des phosphatases alcalines. Critères microbiologiques non requis pour la catégorie probable. | |
| Candidémie | |
| * Aucun critère clinique requis pour le diagnostic de candidémie probable. Absence de définition de candidémie possible. | |

Tableau traduit de l'anglais (EORTC et MSG) par Botterel F., Bretagne S., Diagnostic des mycoses invasives, tests de sensibilité in vitro et nouveaux antifongiques. Spectra Biologie, 2003 Mars-avril, Vol 22 (130) p 50

ANNEXE n°5

Milieu chromogène CHROMagar Candida BD®



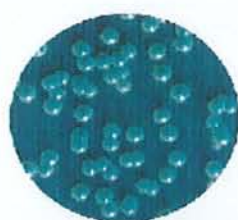
Après 48h de culture à 37°C sur le milieu **CHROMagar Candida BD®**, les quatre espèces peuvent être distinguées de part leur apparence : deux colonies roses+/- foncé de *C.glabrata*, deux colonies bleu-violettes de *C tropicalis*, quatre colonies vertes de *C.albicans* et deux colonies de *C.kruséi* : larges, rose pâle et rugueuses.

Aspect des colonies après 48h de culture à 37°C sur le milieu **CHROMagar Candida BD®**

| | | |
|---|--|---|
| Colonies rose foncées, lisses et grasses, à bord pâles de <i>C.glabrata</i> | | Colonies pâles de <i>C.parapsilosis</i> |
| Colonies vertes à bord pâles de <i>C.albicans</i> | | <i>Géotrichum</i> : petites colonies pâles et rugueuses avec un halo vert en périphérie |
| Colonies bleu foncé à bleu-gris foncé avec un bord violet à rose pâle de <i>C.tropicalis</i> | | Petites colonies "rose-sâle" avec une nuance gris-vert de <i>Trichosporon</i> sp. |
| Colonies larges, sèches, rugueuses et extensives, de couleur "vieux-rose" à bord pâles de <i>C.kruséi</i> | | Colonie de <i>C.norvegensis</i> Ressemblantes de <i>C.krusei</i> mais plus lisse et plus grasse |

Images tirées de CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. F C Odds and R Bernaerts

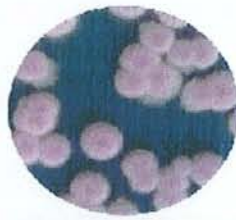
J Clin Microbiol. 1994 August; 32 (8): 1923-1929



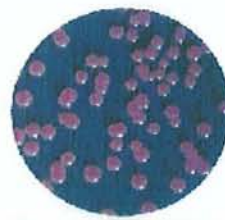
C. albicans



C. tropicalis



C. krusei

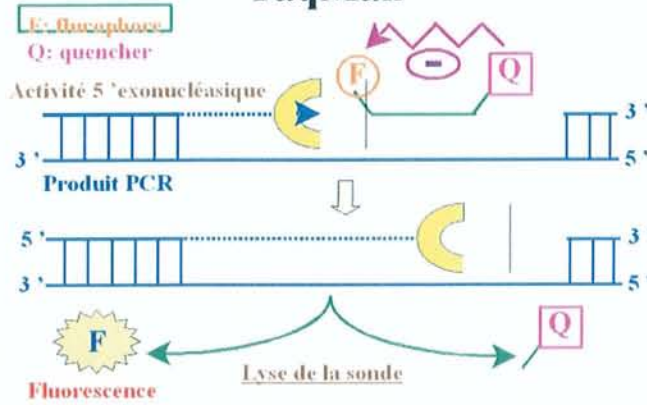


C. glabrata

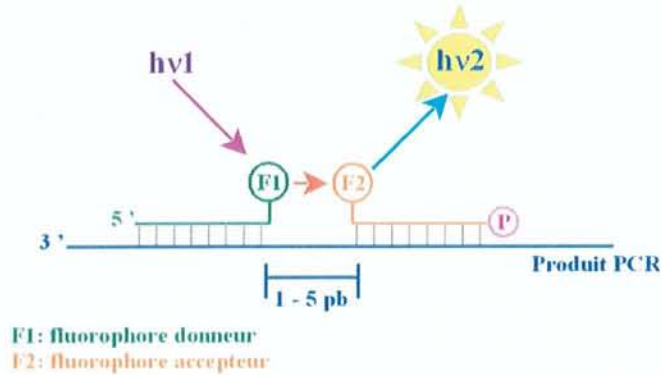
ANNEXE n°6

PCR en temps réel : révélation par sondes (principes)

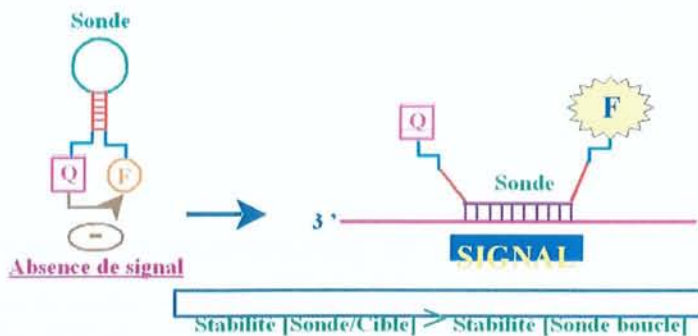
Principe de la technique TaqMan™



Sondes FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer



Sondes « Molecular beacons »

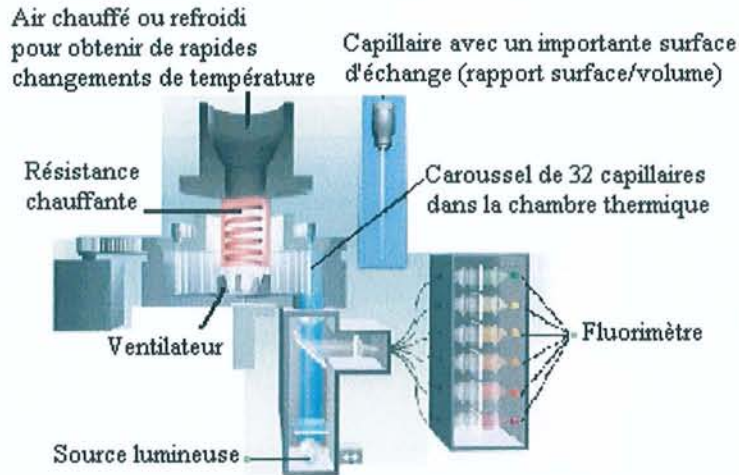


(Bogard M., Lamoril J. et al, 1998)

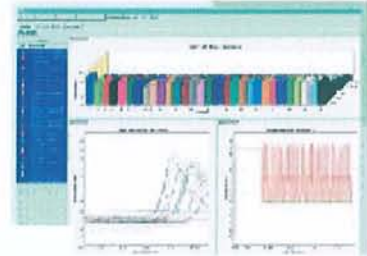
ANNEXE n°7

Automate de PCR en temps réel Le LightCycler® (Roche-Diagnostics®)

Coupe transversale de l'automate



Acquisition en temps réel et à chaque cycle des données



Le Lightcycler® permet, de suivre les produits d'amplification de la PCR, en simultané, en temps réel avec 6 canaux de lecture optique.

Ceci est possible grâce aux informations instantanément collectées et restituées par l'informatique.

Ce système de révélation permet d'arrêter plus rapidement une PCR défectueuse ou au contraire de la prolonger en cas de fluorescence de faible intensité.

L'informatique permet d'accéder à l'historique des données pendant un cycle de PCR.



Le LightCycler®



Carrousel pouvant accueillir 32 capillaires

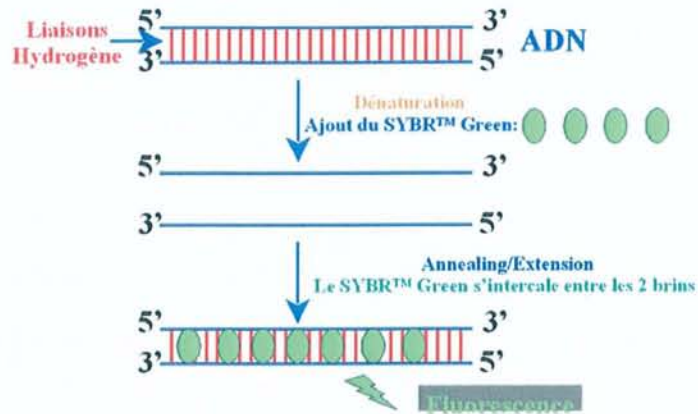


Capillaire en verre borosilicaté de 20µl et de 100µl

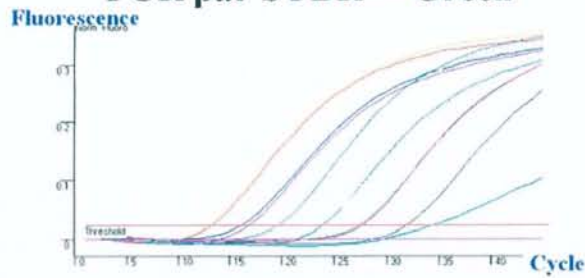
ANNEXE n°8

Principe de la PCR par SYBR[®] Green

PCR par SYBR[™] Green

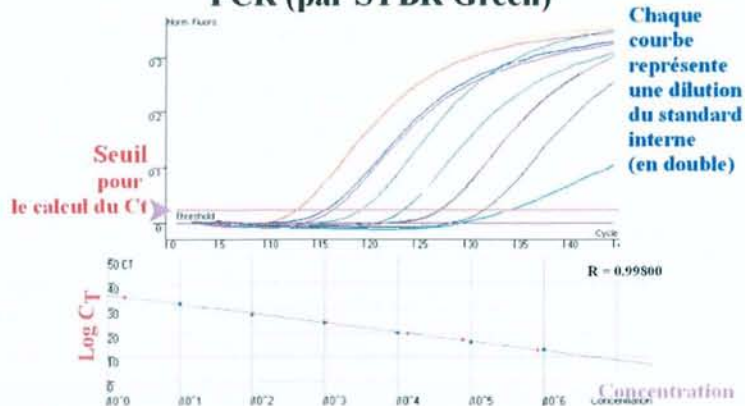


PCR par SYBR[™] Green



Chaque couleur représente un produit amplifié dans un tube

Exemple de quantification par PCR (par SYBR Green)



(Bogard M., Lamoril J. et al, 1998)

ANNEXE n°9

Etude bio-informatique : alignements des séquences avec les amorces EXTERNES ITS1-ITS4

Amorces externes gauche

| | | | | | | | | |
|-------------|-------------------------------|-----|--|-----------------|-------------|--------------------|----------------|---------|
| 1.L47111 | <i>Candida albicans</i> | (1) | -----TCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | | |
| 2.L47112 | <i>Candida tropicalis</i> | (1) | -----TCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | | |
| 3.L47110 | <i>Candida guilliermondii</i> | (1) | -----TCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | | |
| 4.L47109 | <i>Candida parapsilosis</i> | (1) | -----TCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | | |
| 5.L47113 | <i>Candida krusei</i> | (1) | -----TCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | | |
| 6.L47108 | <i>Candida glabrata</i> | (1) | -----TCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | | |
| 7.AF078892 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | (1) | -----ATCAT | | AC | -----CGAGTGAG | | |
| 8.AJ493575 | <i>Crypt.Neo. var. gattii</i> | (1) | -----GT | AGAGAATAC | | -----TGGACTTCGGTCC | | |
| 9.U07222 | <i>Pneumocystis carinii</i> | (1) | -----GAAAAC | | | -----ACTT | | |
| 10.AJ279478 | <i>Fusarium sp</i> | (1) | TTCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTC | TCCGT | AGGTG | AAC | -----TAGCGGAGG | |
| 11.AJ279476 | <i>Penicillium sp.</i> | (1) | -----TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTT | TCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | |
| 12.AJ278365 | <i>Rhizomucor pusillus</i> | (1) | -----AAGGACATAAAATT | GTGGAATC | GT | -----GGTGACTCTATTG | GTGACCCGC | |
| 13.AB097383 | <i>Rhizopus oryzae</i> | (1) | -----TTTCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | | |
| 14.AB113027 | <i>Mucor indicus</i> | (1) | -----TTTCCGT | AGGTG | AAC | -----CTGCGGAAG | | |
| 15.U11780 | <i>Staphylococ. aureus</i> | (1) | -----CGGTGGAGTAACCTT | TTAGGAGCTAGCCGT | CGAAGGTGGGA | CAAAATGAT | TGGGTGA | |
| 16.AY7281 | <i>Staphylococ sp</i> | (1) | ACACCCCGAAAGCCGGTGGAGTYCCAT | TTATGGAGCTAG | CCGT | CGAAGGTGGGA | CAAAATGAT | TGGGTGA |

Amorces externes droite (pour *C. glabrata*)

| | | |
|----------|--------|--|
| 1.L47111 | (314) | TTGAGCGTC-GTTTCTC-CCTCAAACCCGCTGGGTTTGGTGT-AGC-----AATAC |
| 2.L47112 | (314) | TTGAGCGTC-ATTTCTC-CCCCAAACCCCGGGTTTGGTGTGAGC-----AANA |
| 3.L47110 | (345) | TTGGGCGTC-ANNCTC-TCTCAAACCCCGGGTTTGGTANTGAGTGANACTCTTAGTCG |
| 4.L47109 | (325) | TTGAGCGTC-ATTTCTC-CCTCAAACCCCTGGGTTTGGTGTGAGC-----GATA |
| 5.L47113 | (278) | TTGAGCGTC-GTTTCCA--TCTTGCGC--GTGCGCAGAGTTGGG-----GAGC |
| 6.L47108 | (455) | GCTCGCATCGATGAGCA-ACCGAGC----- |

Séquence de l'amorce ITS4
chez *C. glabrata* : plus courte

| | | |
|-------------|--------|--|
| 7.AF078892 | (337) | CCGAGCGTC-ATTGCTGCCCTCAAGCAC--GGCTTGTGTGTGGGCCCCCGTCCCCTCT |
| 8.AJ493575 | (270) | TTGAGAGTC-ATGAAAA-TCTCAATCCCTCGGGTTTATACCTGT-----TG |
| 9.U07222 | (301) | TTGAGCGTT-ATTTTTA-----AGTTCCTTTTTTCAAG--CAGAAAAAGG |
| 10.AJ279478 | (366) | TCGAGCGTC-ATTTCAACCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGTGGGG----- |
| 11.AJ279476 | (383) | CCGAGCGTC-ATTTCTGCCCTCAAGCAC--GGCTTGTGTGTGGGC-CCCGTCTCCGAT |
| 12.AJ278365 | (330) | TTCAATATC-TTTATTAACCCCTAA---AGGTTTATTTTTTGATA-----A |
| 13.AB097383 | (424) | TTCAATATC-ATAACCA-ACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGG-----TGATGGACA |
| 14.AB113027 | (381) | TTCAATATCAAAAACAACCTTATTCAA--AATTCTTTTTTGAAT----- |

| | | | | | |
|-------------|--------|-------------------------|----------------------|-------------------------------|---|
| 1.L47111 | (493) | GTAGGACTACCCGCTGAACTTAA | GCATATCAATAAGCGGAGGA | <i>Candida albicans</i> | Séquences homologues aux amorces externes |
| 2.L47112 | (482) | GTAGGACTACCCGCTGAACTTAA | GCATATCAATAAGCGGAGGA | <i>Candida tropicalis</i> | |
| 3.L47110 | (566) | GNAGGAATANCCGCTGAACTTAA | GCATATCAATAAGCGGAGGA | <i>Candida guilliermondii</i> | |
| 4.L47109 | (478) | GTAGGCTACCCGCTGAACTTAA | GCATATCAATAAGCGGAGGA | <i>Candida parapsilosis</i> | |
| 5.L47113 | (468) | GTAGGAATACCCGCTGAACTTAA | GCATATCAATAAGCGGAGGA | <i>Candida krusei</i> | |
| 6.L47108 | (479) | ----- | ----- | ----- | Les séquences de l'amorce ne peuvent pas s'apparier |
| 7.AF078892 | (524) | ----- | ----- | <i>Aspergillus fumigatus</i> | |
| 8.AJ493575 | (464) | ----- | ----- | <i>Crypt.Neo. var. gattii</i> | |
| 9.U07222 | (480) | ----- | ----- | <i>Pneumocystis carinii</i> | Séquences quasi-complètes assurant un bon appariement |
| 10.AJ279478 | (559) | GTAGGAATACCCGCTGAACTTAA | GCATATCAATAAGCGG | <i>Fusarium sp</i> | |
| 11.AJ279476 | (576) | GTAGGATACCCGCTGAACTTAA | GCATATCAATAAGCGGA | <i>Penicillium sp</i> | |
| 12.AJ278365 | (537) | TTTCAACTA---TGGATCTGA- | ----- | <i>Rhizomucor pusillus</i> | Séquences plus courtes et/ou incomplètes |
| 13.AB097383 | (608) | CTAG---CCAGCAGA----- | TATTTTAATGA | <i>Rhizopus oryzae</i> | |
| 14.AB113027 | (561) | ----- | ----- | <i>Mucor indicus</i> | ne pouvant pas s'apparier |
| 15.U11780 | (611) | ATAGCA-TA---TCAGA---AG | SCACACCG | <i>Staphylococ. aureus</i> | |
| 16.AY7281 | (685) | GTAGAAMT-CANACGGA----- | ----- | <i>Staphylococ sp</i> | |

Cette étude bio-informatique montre que les amorces externes ITS1-ITS4 permettent l'amplification par PCR du genre *Candida* et des genres *Fusarium* sp. et *Penicillium* sp.

Nous remarquons ici que pour *Candida glabrata*, l'amorce ITS4 n'étant pas complète, nous ne trouvons pas la totalité de la séquence de droite. Par conséquent, nous pouvons nous attendre à une amplification légèrement plus faible que pour les autres *Candida*.

ANNEXE n°10



Etude bio-informatique : alignements des séquences avec les amorces INTERNES

Amorces internes gauches

```

1.L47111 (40) TGAATTGCACCAC-ATGTGTTTTTCTTTGAAACAAC-----TTGCTTTGGCGGTGGG-----CCGAGCCTGCCCGCAGAGGTCTAAACTTACAAC
2.L47112 (40) TTAATTGCACCAC-ATGTGT-TTTTTATTGAACAAAT-----CTTTGGTGGCGGTGGG-----AATCTACCGCCAGAGGTATAACTAAACCA
3.L47110 (66) AAAAACCTTACACaCAGTGTCTTTTGTATCAGAACT-----CTTCTTTGGTTTGGCC-TAGAGATAGGTTG-GCCAGAGGTTA-ACAAAACAC
4.L47109 (55) TTTTTTCTTACAC-ATGTGTTTTTCNTTT-----AT-----TGTAANCTTTC TTTGGTAGGCCT--TCTATATGGGGCTTCCGAGGTTTAACTGAGG
5.L47113 (37) -----TTTAGTTC-----TACA-TC-----TCCTGGAGCGGAACG-----AANACAACAACCT
6.L47108 (69) CTCTGGGGAGGAC-CAGTGTAGACACTCAGGAG-GCT-----CCTAAAATATTTTCTCTGTGTGAAT-ECTATTTCTCTGCTGCTGCTTTAAGTGCCTGGC
7.AF07889 (28) TCCAACCTCCCAC-----CCGTGTCTATCGT--AC--CT-----TGTGCTTCGGCGGGGCC-----GCCGTTTCGACGGCCCGGGGGAGGCC CCGCG
8.AJ49357 (37) -----ATCTACACC-----TGTGAACGTGT-----TATGTGC TTCGGCACGTTT-----TACATATTGATTGACTGACTTTGTTAAACAATG
9.U07222 (31) -----TTTAGCATTTTTCAACATCT-----GTGAATTTTTTTTTTGTGGCGA-----GGAGCTGGCTTTTTTGTCTGCCTGCCA
10.AJ2794 (79) --ACAACCTCCAA-----ACCCCTGTGAACATAC-----CTTAATGTTCCTCGGCGGATCA-----GCCGCGCCCGTAAACGGGACGGCCGCCAG
11.AJ2794 (84) TCCAACCTCCCAC-----CCGTGTTTTATTTT--AC--CT-----TGTGCTTCGGCGGGGCC-----GCCTTAACCTGGCCGGGGGGTACGCCCGCG
12.AJ2783 (66) TGAATGTCTCTGA-----GGGATTGCTCCAGATCTCT-----CGACCTTTTATTT-----TACATATTGATTGACTGACTTTGTTAAACAATG
13.AB0973 (63) CTCAGTATTGTTT--GCTTCTATCTGTGAACCTCTggcgatgaaGGTCGTAACCTCGGCGAGAGAC-TCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCGTTGCTG
14.AB1130 (42) ATAATTCAATAAT-TATCTTATTACTGTGAACGTGT-----TTTATTTATGACGTATAAGGGGATGCTTTAGGCTATAAGGGTAGGCTATGGG
15.U11780 (95) GATCACCTCCTTT-CTAAGGATATATTCGGAACATCT-----TCTT-CAGAAGATGCGGAATAACG-----TGACATATTGTATTGACTTTGAAATGTTATTTA
16.AY7281 (109) GATCACCTCCTTT-CTAAGGATATATTCGGAACATCT-----TCTTTAGAAGATGAAAAGGAATAACA--TTGACATATTGTATTGACTTTGAAATGCTCATT
    
```

Amorces internes droites

```

1.L47111 (175) -TC--AACACCGGATCTCTTG--GTT-----CTCGC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCGAA--ATG--CG--AT
2.L47112 (175) -TC--AACACCGGATCTCTTG--GTT-----CTCGC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCGAA--ATG--CG--AT
3.L47110 (206) -TC--AACACCGGATCTCTTG--GTT-----CTCGC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCGAA--ATG--CG--AT
4.L47109 (186) -TC--AACACCGGATCTCTTG--GTT-----CTCGC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCGAA--ATG--CG--AT
5.L47113 (140) -C--TAACAACCGGATCTCTTG--GTT-----CTCGC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCGAA--ATG--CG--AT
6.L47108 (294) NIT--NCTACTATTCTTTGtCGTTggggGAAAGCTCTCTTTCgGAGGAGTTG-----TCCCGAGTGGG--TNCACACACN
7.AF07889 (198) -TC--AACACCGGATCTCTTG--GTT-----CCGGC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCGAA--ATG--CG--AT
8.AJ49357 (131) -TC--AACACCGGATCTCTTG--GCT-----TCCAC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCGAA--ATG--CG--AT
9.U07222 (162) -TC--AACATGGATCTCTTG--GCT-----CTCGC-GTC-GATGAAGAAC-----GTGGCAAA--ATG--CG--AT
10.AJ2794 (227) -TC--AACACCGGATCTCTTG--GTT-----CTGGC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCAAA--ATG--CG--AT
11.AJ2794 (245) -TC--AACACCGGATCTCTTG--GTT-----CCGGC-ATC-GATGAAGAAC-----GCAGCGAA--ATG--CG--AT
12.AJ2783 (191) -TA--AGCAATGGATCACTTG--GTT-----CTCGC-ATC-GATGAAGAGC-----GTAGCAAAAT--TG--CG--AA
13.AB0973 (286) -TT--AACATGGATCTCTTG--GTT-----CTCGC-ATC-GATGAAGAAC-----GTAGCAAAAG--TG--CG--AT
14.AB1130 (243) -TT--AACATGGATCTCTTG--GTT-----CTCGC-ATC-GATGAAGAAC-----GTAGCAAAAG--TG--CG--AT
15.U11780 (301) ATA--AGTAAGTAAAATATAG--ATT-----TTAC--C--AAGCAAAAC-----CGATGAAATAAG--AG TTT
16.AY7281 (308) TTCaaAAAAATAATCGCTAG--KGTT--CSAAGAACACTYAC-AGATTAATAACattttgggkttTCMACCSACGGKGTG-TCMAGTT
    
```

```

1.L47111 (385) GT-----AGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGACRAATGGCTTAGGT-CTAACAAAAACATGCTTTGGCGGTAACTGCAACACGATATCTTCA-A
2.L47112 (384) TT-----ACGTGGAAACTTATTTAAGCGACTTAGGT-----TTANCCAAAATGCTTATTGCTAGTGTTCACCACAATTTATTTTATA
3.L47110 (449) GT-GCTGTCGACCTCTCAATGATTAGGTTTATCCAACCTCGNTGAATG-GTGGCGGATATTTCTGGTATTGTTGACCCGGCCTTACAAACAACCAACA
4.L47109 (395) GG-----CGGAGTATAAATAA-TGGATAGGTT-----TTTTCCACTCATTGGTAAGATGCAAAATTTTCTCA
5.L47113 (362) CC-----TGAAAGGAGCGAAGCTGCGAGCGAATGAGCT--TTTTTTCAGGAGCCTTGGCGCCGAGAGCGAGTGTTCGAGACAACAAAA
6.L47108 (479) -----AGCCGACACCCAACTTTATTTTTCTA
7.AF07889 (441) CG-AGCGTATGGGGCTTTGTCACTGTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCC-----AGCCGACACCCAACTTTATTTTTCTA
8.AJ49357 (374) TT-AGTGGGAAGGTGATTACCTGTGACCCCGCGTAATAAGTTTCGCTGGCCTATGGGG TAGTCTTCGGCTTGTGATAACAACCATCTC-----
9.U07222 (384) CT-AGTCTGAATTCAAAAGTAGCTTTTTTTCTTGTCTAGTGTGCTGA-----AAAATTCGCTGGGAAAGAGGAAAAAGCCTTTATAAATAACAAG
10.AJ2794 (473) AT-TGCGTAGTAGCTAACACCTCGCA-ACTGGAAGCGCGCGCGCCAT-----GCCGTAACCCCAAC--TTCTGA
11.AJ2794 (486) CG-AGCGTATGGGGCTTTGTCACTGTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCT-----TGCCGATCAACCCAAAT-TTTTATCC
12.AJ2783 (421) AaCAATTTGATGTTGTTGACCTTGATATTTCCTTGAGGCTTGCAT--TGGTATCTAATTTTTTACCAGTGTCTGAGATGATCAAGTATAAAGGT
13.AB0973 (499) AT-ACCATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTT-TCATTAATTCGAACTACCTAGCCATCGTCTTTTTTGGT-CCAACCAAAAAACATATT--
14.AB1130 (454) AG--ACATTTTAAATAAAGTCAGGCCATATCGTGGATTGAGTGCAGT-----ACTTTTTTAAATTTTAAAAAGGTAAGCATGTTGATGTC--
15.U11780 (504) TT-ACTAACGACGATATGCTTTGGGGAGCTGTAAGTA--AGCTTTGAT-----CCAGAGATTTCCGAATGGGAAACCCGACATGAGTTATGTC--
16.AY7281 (586) AM--CCGGAGAAGTAAAAATCT--TATCCCGSAGAAAGAAAAAAT-----TATTCCTGARTAGGGAASRAAAAGGAAAAGCCAAAMA--
    
```

- L47111 *Candida albicans* L47112 *Candida tropicalis*
- L47113 *Candida glabrata* L47113 *Candida parapsilosis*
- L47113 *Candida krusei*

Cette étude bio-informatique montre que chaque couple d'amorces internes est bien spécifique d'une seule espèce de *Candida*.

VU

NANCY, le **10 novembre 2004**

Le Président de Thèse

Professeur **B. FORTIER**

NANCY, le **29 novembre 2004**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Par délégation

Professeur **II. COUDANE**

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, le **6 décembre 2004**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

Professeur **J.P. FINANCE**

RÉSUMÉ :

L'incidence des candidoses invasives est en augmentation depuis ces 30 dernières années ; notamment parmi les patients immunodéprimés. Ces infections à *Candida* sp., levure commensale du tube digestif, posent un problème diagnostique : colonisation ou véritable invasion ? Devant cette pathologie de pronostic péjoratif, il est nécessaire de fournir au clinicien un diagnostic précoce, rapide et précis permettant l'instauration d'une thérapeutique adaptée. Les outils actuels sont représentés par la culture, d'interprétation difficile selon le prélèvement, les hémocultures de sensibilité insuffisante et des méthodes sérologiques de performances modestes. Afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de ces tests, divers protocoles d'amplification génomique ont été publiés.

L'objet de ce travail est le développement d'une technique originale de PCR SYBRGreen® en temps réel sur automate LightCycler®. La cible génomique retenue est l'ADN ribosomal 5.8 S.

Notre stratégie diagnostique repose sur une première PCR d'orientation du genre *Candida* suivie, en cas de positivité, par une seconde amplification utilisant des amorces spécifiques d'espèces. Les 5 espèces de *Candida* recherchées ici sont les plus incriminées dans les candidoses à dissémination hématogène : *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*. Après avoir développé notre technique sur des suspensions de levure, nous avons cherché à l'appliquer à du sang total de patient.

Titre en anglais : Real time PCR for diagnosis of candidiasis

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2004

MOTS CLÉS : Candidémie – Infection a *Candida* sp. - Diagnostic biologique
- PCR en temps réel - SYBRGreen® - LightCycler®

Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex