

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 2013

N° 036

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 06 Novembre 2013

Par Charline Miossec

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Septicémies à *Candida spp.* :

**mise au point d'une technique d'extraction d'ADN de levures à partir de
sang total et d'une PCR *Candida* en temps réel.**

Président: Mme Nathalie Caroff, Professeur de Bactériologie

Membres du jury :

Mr Patrice Le Pape, Professeur de Parasitologie et Mycologie (directeur de thèse)

Mr David Boutoille, Professeur de Maladies infectieuses et tropicales

Mr Cédric Bretonnière, Praticien hospitalier en Réanimation médicale

Remerciements

A Madame le Professeur Nathalie Caroff,

Pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury et pour l'ensemble des enseignements et des conseils que vous m'avez donné tout au long de mon cursus universitaire. Soyez assurée de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Patrice Le Pape,

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail de thèse et pour l'ensemble de vos enseignements qui ont motivé mon choix de spécialisation. Votre écoute attentive, votre compréhension et vos conseils professionnels et personnels ont été précieux et déterminants pour le reste de ma carrière. Soyez assuré de mon respect et de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur David Boutilie,

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury malgré vos nombreuses obligations et pour vos enseignements lors de mon stage clinique. Soyez assuré de ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Cédric Bretonnière,

Pour avoir accepté avec spontanéité et amabilité de siéger dans ce jury. Soyez assuré de ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Michel Miegville,

Pour l'intérêt que vous avez porté à ma formation, vos enseignements et vos conseils. Vous m'avez permis d'avoir des bases solides pour la suite de ma carrière. Je tiens également à vous remercier pour votre écoute, votre compréhension et votre soutien. Recevez tout mon respect et mon estime.

A Monsieur le Docteur Florent Morio,

Pour tous tes conseils et ton perfectionnisme qui m'ont tant apporté pendant mon internat et lors de ce projet. Merci pour ta disponibilité et ton enthousiasme, je t'en suis très reconnaissante.

A Madame le Docteur Françoise Gay-Andrieu,

Pour vos enseignements au cours de mon semestre dans le service, vos conseils et nos échanges au sujet de la Guyane. Merci pour tout.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes,

Travailler avec vous a toujours été un plaisir. Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur, et votre disponibilité pour répondre à toutes mes questions. Passer autant de temps à vos côtés était un vrai bonheur. J'espère vous revoir au plus vite.

Aux techniciens du laboratoire de Virologie du CHU de Nantes,

Merci pour vos bons conseils apportés au cours de la mise au point de cette PCR. Merci plus particulièrement à Bernard pour ta disponibilité et ton expérience qui m'ont permis d'avancer à plusieurs reprises.

A l'ensemble du personnel du LHUPM du CHAR de Cayenne,

Merci à tous de m'avoir laissé du temps pour la rédaction de ce manuscrit. Merci particulièrement aux Docteurs Christine Aznar et Denis Blanchet pour vos enseignements et précieux conseils et astuces apportés lors de ce travail.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Parasitologie- Mycologie du CHRU de Fort-de-France,

Merci plus particulièrement au Docteur Nicole Desbois pour votre enseignement au cours de mon semestre d'internat et vos bons conseils. Je suis heureuse de pouvoir travailler de nouveau à vos côtés.

A mes parents,

Merci de m'avoir encouragée pendant toutes ces années et de m'avoir accompagnée dans mes projets qui vous ont parfois parus un peu fous. Merci plus particulièrement à toi, maman, pour les longues heures passées à mes côtés pendant mes révisions où tu t'occupais bien de moi. Cette thèse est l'occasion de te dire merci.

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	1
LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTE DES ANNEXES.....	8
ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	10
CANDIDA SPP. ET CANDIDEMIES : REVUE DE LA LITTERATURE.....	13
I. Le genre <i>Candida</i>	14
<i>I.1. Taxonomie</i>	<i>14</i>
<i>I.2. De nombreuses espèces.....</i>	<i>15</i>
<i>I.3. Caractéristiques des <i>Candida spp.</i>.....</i>	<i>17</i>
II. Les candidémies	20
<i>II.1. Epidémiologie des Candidémies</i>	<i>20</i>
II.1.1. Incidence.....	20
II.1.2. Populations concernées.....	23
II.1.3. Distribution des espèces	23
II.1.4. Mortalité	27
II.1.5. Impact économique.....	28
<i>II.2. Facteurs de risques d'infection à <i>Candida spp.</i></i>	<i>28</i>
<i>II.3. Physiopathologie des infections à <i>Candida spp.</i></i>	<i>30</i>
III. Prise en charge thérapeutique des candidémies	33
<i>III.1. Principaux antifongiques.....</i>	<i>33</i>
<i>III.2. Sensibilité aux antifongiques</i>	<i>34</i>
III.2.1. Résistance des levures du genre <i>Candida</i> aux antifongiques.....	34
III.2.2. Méthodes de détermination de la sensibilité.....	37
III.2.2.1. Méthodes de référence.....	37
III.2.2.2. Méthode E-test®	38
III.2.2.3. Autres méthodes	39
<i>III.3. Interprétation de l'antifongigramme</i>	<i>40</i>
III.3.1. Seuils critiques de sensibilité	40
III.3.2. Seuils épidémiologiques.....	42
<i>III.4. Recommandations thérapeutiques</i>	<i>42</i>

III.4.1. Recommandations de l'IDSA.....	43
III.4.2. Recommandations de l'ESCMID.....	43
III.4.3. Délai d'initiation du traitement	45
IV. Diagnostic des candidémies : un enjeu majeur de la prise en charge.....	47
<i>IV.1. Méthode de référence : l'hémoculture.....</i>	<i>47</i>
IV.1.1. Sensibilité.....	47
IV.1.1.1. Des performances limitées	47
IV.1.1.2. Comment et quelles hémocultures prélever ?.....	48
IV.1.2. Délai de positivité	51
IV.1.3. Identification de l'espèce	52
IV.1.3.1. Milieux et techniques classiques d'identification.....	53
IV.1.3.2. MALDI-TOF.....	56
IV.1.3.3. Biologie moléculaire	57
<i>IV.2. Méthodes de diagnostic indirect.....</i>	<i>60</i>
IV.2.1. Antigène mannane et anticorps anti-mannane.....	60
IV.2.2. β -D-glucane.....	62
<i>IV.3. Apport de la biologie moléculaire pour un diagnostic précoce</i>	<i>63</i>
IV.3.1. Rappels sur les techniques de PCR	64
IV.3.2. De nombreuses mises au point : des stratégies très variées.....	68
IV.3.2.1. Choix de l'ADN cible	68
IV.3.2.2. Choix du prélèvement biologique	68
IV.3.2.3. Choix des espèces détectées.....	69
IV.3.3. Des performances encourageantes	70
IV.3.4. Les MIQE, un pas vers la standardisation des techniques.....	72
IV.3.4.1. Limiter les faux-positifs	72
IV.3.4.2. Limiter les faux-négatifs	73
IV.3.5. L'extraction de l'ADN fongique, une étape clé mal évaluée	73
IV.3.5.1. Rappel des techniques utilisées	74
IV.3.5.2. Concentration de l'ADN fongique	75
IV.3.5.3. Evaluation de l'étape d'extraction.....	76
MATERIEL ET METHODES.....	78
I. Souches utilisées.....	79
II. Obtention d'extraits d'ADN à partir de souches	79
<i>II.1. Extraction à partir des souches fongiques.....</i>	<i>79</i>
<i>II.2. Extraction à partir des souches bactériennes.....</i>	<i>80</i>
<i>II.3. Quantification de l'ADN.....</i>	<i>80</i>
III. Mise au point de l'extraction d'ADN de levures à partir de sang total.....	81
<i>III.1. Les différents protocoles d'extraction</i>	<i>81</i>

III.1.1. Protocole initial	81
III.1.2. Kit commercial MoLYsis™ Basic 5	82
III.1.3. Protocole amélioré.....	82
III.2. Mode d'évaluation des protocoles d'extraction	83
III.2.1. Critère de rendement	83
III.2.2. Contamination de l'extrait par l'ADN humain.....	84
III.3. Conception d'un témoin interne d'extraction (TIE).....	85
III.3.1. Choix du TIE.....	86
III.3.2. Mise au point et standardisation de la PCR TIE.....	86
III.3.3. Choix de la quantité de levure à inoculer	87
III.3.4. Extraction d'ADN du TIE à partir de sang total.....	87
IV. Mise au point de la PCR <i>Candida</i> en temps réel TaqMan® : PCR CPAN	88
IV.1. Choix des amorces pour la PCR CPAN.....	89
IV. 2. Sélection d'un couple d'amorces pour la PCR CPAN	89
IV.3. Mise au point de la PCR CPAN.....	90
IV.3.1. Choix final du couple d'amorces	90
IV.3.2. Spécificité de la PCR CPAN.....	91
IV.3.3. Standardisation de la PCR CPAN	91
V. Evaluation de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR CPAN	92
V.1. Sensibilité.....	92
V.2. Reproductibilité et répétabilité	92
RESULTATS	94
I. Mise au point de l'extraction d'ADN de levures à partir de sang total.....	95
I.1. Evaluation des protocoles d'extraction.....	95
I.1.1. Protocole initial.....	95
I.1.2. Kit commercial MoLYsis™ Basic 5	95
I.1.3. Protocole amélioré	96
I.1.4. Comparaison de la durée, de la facilité de mise en œuvre et du coût.....	97
I.2. Evaluation de la quantité d'ADN humain dans l'extrait.....	98
I.3. Mise au point et standardisation de la PCR TIE	100
I.3.1. Choix de la température d'hybridation	100
I.3.2. Reproductibilité	100
I.3.3. Répétabilité	102
I.3.4. Choix de la quantité à inoculer	103
I.3.5. Extraction d'ADN du TIE à partir de sang total	104

II. Mise au point de la PCR <i>Candida</i> en temps réel TaqMan® : PCR CPAN.....	105
<i>II. 1. Sélection d'un couple d'amorces pour la PCR CPAN.....</i>	<i>105</i>
II.1.1. PCR <i>Candida</i> SYBR® Green I.....	105
II.1.2. PCR CPAN.....	105
<i>II.2. Température d'hybridation.....</i>	<i>107</i>
<i>II.3. Spécificité de la PCR.....</i>	<i>108</i>
<i>II.4. Standardisation de la PCR CPAN.....</i>	<i>109</i>
II.4.1. Reproductibilité.....	109
II.4.2. Répétabilité.....	109
II.4.3. Limite de détection et seuil de positivité.....	111
III. Evaluation de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR CPAN.....	112
<i>III.1. Sensibilité.....</i>	<i>112</i>
<i>III.2. Reproductibilité et répétabilité.....</i>	<i>113</i>
DISCUSSION.....	115
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	131
ANNEXES.....	140

Liste des figures

Figure 1. Blastospores de <i>Candida albicans</i> (x1000 ; collection personnelle).	14
Figure 2. Cycle reproductif des levures du genre <i>Candida</i>	15
Figure 3. Production de chlamydospores sur milieu RAT par <i>C. albicans</i> et <i>C. dubliniensis</i> (Staib & Morschhauser, 2007).	18
Figure 4. Mode de formation d'un biofilm à <i>C. albicans</i> (Photographies tirées de Ramage <i>et al</i> , 2009 ; illustrations tirées de Finkel & Mitchell, 2011).	19
Figure 5. Nombre de cas de sepsis aux Etats-Unis en fonction du germe de 1979 à 2000 (Adapté de Martin <i>et al</i> , 2003).....	20
Figure 6. Distribution des espèces responsables de candidémies par service d'hospitalisation (Adapté de Pfaller <i>et al</i> , 2012c).....	24
Figure 7. Espèces de <i>Candida</i> responsables de candidémies par pays. Etude Européenne de l'ECCM (European Confederation of Medical Mycology) (Adapté de Tortorano <i>et al</i> , 2006).....	24
Figure 8. Distribution des espèces isolées d'hémocultures entre 2004 et 2010 au CHU de Nantes (n = 193) (Tadec, 2011).....	25
Figure 9. Distribution des espèces de <i>Candida</i> en fonction de l'âge des patients (n = 193) (Tadec, 2011).....	26
Figure 10. Physiopathologie des candidoses invasives (Adapté de Eggimann <i>et al</i> , 2003).	31
Figure 11. Physiopathologie des infections associées à des cathéters (Adapté de Eggimann <i>et al</i> , 2004).....	32

Figure 12. Exemples d'antifongigrammes réalisés avec la méthode E-test (http://www.biomerieux.com).....	38
Figure 13. Dernières recommandations de l'IDSA pour le traitement des candidémies de l'adulte (Adapté de Pappas <i>et al</i>, 2009).	44
Figure 14. Relation entre mortalité et délai à l'instauration du traitement antifongique (Adapté de Morell <i>et al</i>, 2005).	45
Figure 15. Détection de <i>Candida spp.</i> et de bactéries présentes de façon simultanée dans des échantillons de Bactec® Mycosis IC/F et BacT/Alert® FA (Adapté de Ericson <i>et al</i>, 2012).....	50
Figure 16. Schéma des régions 18S, 5,8S et 28S de l'ADNr fongique (Adapté de White <i>et al</i>, 1990).	58
Figure 17. Place de la PCR en tant qu'outil diagnostique des candidémies.	63
Figure 18. Principe de la PCR en temps réel SYBR® Green I et TaqMan® (Adapté de Poitras & Houde, 2002).....	66
Figure 19. Principe de la PCR nichée.	67
Figure 20. Principe général des protocoles d'extraction d'ADN de levures à partir de sang total.	75
Figure 21. Principe général de l'utilisation du TIE.....	85
Figure 22. Déroulement des réactions de PCR.	88
Figure 23. Schéma résumé de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR CPAN. ...	93
Figure 24. Extraction d'ADN de <i>C. albicans</i> à partir de sang total de patients hyperleucocytaires par le protocole amélioré : produits de la PCR ITS1-ITS4 révélés par électrophorèse en gel de polyacrylamide.....	96
Figure 25. Evaluation de la quantité d'ADN humain extraite.	99
Figure 26. Gamme établie à partir de 6 dilutions de l'extrait d'ADN de LTI.....	101
Figure 27. Etude de répétabilité intra-essai de la PCR TIE.....	102

Figure 28. Choix de la quantité de LTI à inoculer.	103
Figure 29. Sélection de couples d'amorces par PCR <i>Candida</i> SYBR® Green I.....	106
Figure 30. Gamme établie à partir de 4 dilutions de l'extrait d'ADN de <i>C. albicans</i>. ...	107
Figure 31. Etude de la répétabilité intra-essai de la PCR CPAN.....	110
Figure 32. Evaluation de la totalité de la procédure, extraction et PCR, réalisée sur une gamme de sang inoculé.	113

Liste des tableaux

Tableau I. Principales espèces de <i>Candida</i> dont la forme sexuée est connue (Adapté de Johnson, 2009).	15
Tableau II. Espèces de <i>Candida</i> impliquées en pathologie humaine (Adapté de Johnson, 2009).	16
Tableau III. Distribution des espèces de <i>Candida</i> provenant d'isolats de tous sites corporels sur une période de 10,5 ans dans 41 pays* (Adapté de Pfaller <i>et al</i>, 2010c). ...	17
Tableau IV. Evolution de l'incidence des candidémies en Europe (Adapté de Eggimann <i>et al</i>, 2003).	21
Tableau V. Incidence des candidémies rapportée dans différentes études en Europe et aux USA (Adapté de Eggimann <i>et al</i>, 2003 ; Tortorano <i>et al</i>, 2006 ; Pfaller & Diekema, 2007).	22
Tableau VI. Variations géographiques du pourcentage de candidémies communautaires vs nosocomiales entre 2008 et 2009. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Pfaller <i>et al</i>, 2011e).	23
Tableau VII. Taux de mortalité 30, 60 et 90 jours après le diagnostic de candidémie en fonction de l'espèce de <i>Candida</i> isolée, à Nantes, en Europe, et aux U.S.A (Adapté de Tortorano <i>et al</i>, 2006 ; Tadec, 2011 ; Pfaller <i>et al</i>, 2012c).	28
Tableau VIII. Principaux facteurs de risque de développer une candidémie (Adapté de Eggiman <i>et al</i>, 2003).	29
Tableau IX. Facteurs de risque cliniques pris en compte pour le calcul du « <i>Candida</i> score » et leur coefficient (Adapté de Leon <i>et al</i>. 2006).	30
Tableau X. Principaux antifongiques disponibles pour le traitement des candidémies et modes d'action.	33

Tableau XI. Sensibilité de différentes espèces de <i>Candida</i> aux principaux antifongiques (Adapté de Pappas <i>et al</i>, 2009 ; Miceli <i>et al</i>, 2011).	34
Tableau XII. Sensibilité <i>in vitro</i> de <i>C. glabrata</i> au fluconazole déterminée lors d'études européennes multicentriques (Adapté de Tortorano <i>et al</i>, 2006).	35
Tableau XIII. CMI vis-à-vis des échinocandines des cinq espèces principales de <i>Candida</i> (Pfaller <i>et al</i>, 2008).	35
Tableau XIV. Sensibilité aux principaux antifongiques en fonction de l'espèce de <i>Candida</i> (Adapté de Gicquel, 2011).	36
Tableau XV. Taux de concordance entre les résultats donnés par le système Vitek 2, le Sensititre® YeastOne®, les bandelettes E-test® et les méthodes de référence, en fonction de l'antifongique (Adapté de Cuenca-Estrella <i>et al</i>, 2010 ; Pfaller <i>et al</i>, 2010b ; Peterson <i>et al</i>, 2011 ; Pfaller <i>et al</i>, 2012a ; Pfaller <i>et al</i>, 2013a).	40
Tableau XVI. Seuils critiques de sensibilité en fonction de l'espèce de <i>Candida</i> établis par l'EUCAST et/ou par le CLSI. (Adapté de Pfaller <i>et al</i>, 2010a ; Pfaller <i>et al</i>, 2011a ; Pfaller <i>et al</i>, 2011c; http://www.eucast.org).	41
Tableau XVII. Seuils critiques épidémiologiques pour l'amphotéricine B, la 5-FC, l'itraconazole et le posaconazole en fonction de l'espèce de <i>Candida</i> (Pfaller <i>et al</i>, 2011b ; Pfaller <i>et al</i>, 2012b).	42
Tableau XVIII. Dernières recommandations de l'ESCMID pour le traitement des candidémies de l'adulte (Adapté de Cornely <i>et al</i>, 2012 ; Ullmann A.J. <i>et al</i>, 2012).	45
Tableau XIX. Taux de positivité, selon l'espèce de <i>Candida</i>, de paires d'hémocultures avec les flacons Bactec® Mycosis IC/F et Bactec® Plus aerobic/F (Adapté de Meyer <i>et al</i>, 2004).	49
Tableau XX. Délai de positivité (ddp) moyen retrouvé pour différents flacons d'hémocultures de patients dans différentes études (Adapté de Meyer <i>et al</i>, 2004 ; Ericson <i>et al</i>, 2012 ; Huang <i>et al</i>, 2013).	52
Tableau XXI. Amorces panfungiques permettant l'amplification des régions ITS de l'ADNr fongique (Adapté de White <i>et al</i>, 1990).	58

Tableau XXII. Valeurs compilées de sensibilité et de spécificité de la détection de l'antigène mannane et de l'anticorps anti-mannane, séparée et combinée (Adapté de Marchetti <i>et al</i>, 2012).	61
Tableau XXIII. Principaux critères à prendre en compte pour le design d'une sonde TaqMan® (Adapté de Poitras & Houde, 2002).	67
Tableau XXIV. Evaluation des protocoles en termes de durée et de coûts.....	97
Tableau XXV. Test de températures d'hybridation, PCR TIE : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN du TIE à chaque température.	100
Tableau XXVI. Etude de la reproductibilité inter-essais de la PCR TIE : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN de LTI à chaque série.	101
Tableau XXVII. Etude de la répétabilité intra-essai de la PCR TIE : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN de LTI à chaque test au sein d'une même série..	102
Tableau XXVIII. Evaluation de la reproductibilité inter-essais de la procédure d'extraction sur le TIE : Ct obtenus à chaque série.....	104
Tableau XXIX. Sélection de couples d'amorces par PCR CPAN avec les couples retenus en PCR <i>Candida</i> SYBR® Green I : Ct obtenus avec chaque couple sur une gamme d'ADN de <i>C. albicans</i> (CAAL-117).	106
Tableau XXX. Test de température avec le couple P1H1-CanP04 : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN de <i>C. albicans</i> (CAAL-117) à 58 et 60°C.	107
Tableau XXXI. Test de spécificité de la PCR CPAN : Résultats de la PCR CPAN réalisée sur différents extraits d'ADN.	108
Tableau XXXII. Etude de la reproductibilité inter-essais de la PCR CPAN : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN de <i>C. albicans</i> (CAAL-117) à chaque série.	109
Tableau XXXIII. Etude de la répétabilité intra-essai de la PCR CPAN : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN de <i>C. albicans</i> (CAAL-117) à chaque test.....	110
Tableau XXXIV. Limite de détection et limite de sensibilité : Ct des 10 PCR réalisées sur 7 dilutions d'ADN de <i>C.albicans</i> (CAAL-117).	111

Tableau XXXV. Influence du TIE sur la sensibilité de la PCR CPAN : Ct obtenus avec la PCR CPAN pour des échantillons de sang inoculés à 10 CFU/mL (CAAL-117) contenant ou non le TIE..... 112

Tableau XXXVI. Etude de la reproductibilité inter-essais de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR : Ct obtenus avec chacune des PCR pour des échantillons de sang inoculés à 10 CFU/mL (CAAL-117) contenant le TIE..... 114

Tableau XXXVII. Etude de la répétabilité intra-essais de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR : Ct obtenus avec chacune des PCR pour des échantillons de sang inoculés à 10 CFU/mL (CAAL-117) contenant le TIE..... 114

Liste des annexes

Annexe 1 : Extraction d'ADN à partir de souches fongiques	141
Annexe 2 : Protocole commercial d'obtention de sphéroplastes de levures à partir de sang total (MolYsis™ Basic5, Molzym).....	143
Annexe 3 : Extraction d'ADN sur automate iPrep™ Purification Instrument (kit iPrep™ PureLink™ Virus Kit, Invitrogen).....	144
Annexe 4 : PCR panfongique ITS1-ITS4.....	146
Annexe 5 : PCR en temps réel pour la détection et la quantification de l'albumine	147
Annexe 6 : PCR TIE en temps réel TaqMan® pour la détection de LTI	148
Annexe 7 : PCR <i>Candida</i> en temps réel SYBR® Green I.....	149
Annexe 8 : PCR CPAN en temps réel TaqMan®.....	150
Annexe 9 : Protocole amélioré d'extraction d'ADN de levures à partir de sang total...	151

Abréviations

ATCC :	American Type Culture Collection
CFU:	Colony Forming Unit
CMI:	Concentration Minimale Inhibitrice
ddp :	Délai De Positivité
dUTP :	Deoxy Uridine Triphosphate
EDTA :	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
EPPI :	Eau Pour Préparation Injectable
GFP :	Green Fluorescent Protein
ITS :	Internal Transcribed Spacer
LTI :	Levure Témoin Interne
MIQE :	Minimum Information for Publication of Quantitative RealTime PCR Experiments
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PSM :	Poste de Sécurité Microbiologique
SCG :	Sabouraud-Chloramphenicol-Gentamycine
TIE :	Témoin Interne d'Extraction
Tm :	melting temperature
TS :	Trypticase-Soja
UNG:	Uracil-DNA glycosylase
USI:	Unité de Soins Intensifs
YPD :	Yeast Peptone Dextrose

Introduction

Les levures du genre *Candida* représentent 83%, des levures isolées chez l'homme (Herbrecht *et al.*, 2001). Certains facteurs de risque tels qu'une neutropénie majeure et prolongée ou une chirurgie lourde favorisent les candidoses invasives, formes graves souvent mortelles. Ces infections comprennent alors les septicémies à *Candida* (une hémoculture positive pose le diagnostic) et les infections viscérales (présence de *Candida* dans plusieurs tissus non contigus). Environ 50% des candidémies sont dues à *C. albicans* mais l'on assiste depuis quelques années à une augmentation de la proportion des espèces non-*albicans* (Pfaller *et al.*, 2012c). Parmi ces espèces, *C. krusei* et *C. glabrata* sont respectivement résistantes et de sensibilité diminuée aux antifongiques azolés, *C. lusitaniae* est naturellement résistante à l'amphotéricine B et *C. parapsilosis* présente des CMI élevées aux échinocandines.

En ce qui concerne le diagnostic des candidoses invasives, l'hémoculture est la technique de référence mais la sensibilité dépasse rarement 75% et le délai de positivité varie de 1 à 5 jours, auquel s'ajoute le délai de 2 à 3 jours nécessaire à l'identification de l'espèce avec les techniques classiques. L'enjeu d'une prise en charge précoce du patient a favorisé le développement de techniques d'identification plus rapides telles que le MALDI-TOF, permettant de rendre au clinicien un diagnostic d'espèce en quelques heures. A l'inverse, les alternatives aux hémocultures pour un diagnostic plus précoce des candidémies sont peu nombreuses. La sérologie et l'antigénémie ont des performances limitées, avec notamment le risque de faux-négatifs pour les infections à *Candida* non-*albicans* et le risque de faux-positifs chez les patients fortement colonisés ou ayant subi une chirurgie. La détection du β -D-glucan n'est quant à elle pas spécifique d'une candidémie mais d'une infection fongique au sens large. De plus, ces techniques ne permettent pas d'identifier l'espèce et par conséquent ne donnent pas d'information sur son profil de résistance intrinsèque.

Les techniques de biologie moléculaire ne sont pas encore utilisées en routine dans les laboratoires hospitaliers pour le diagnostic des candidémies, toutefois, l'étude de la littérature montre l'intérêt de leur application (Avni *et al.*, 2011). Les variations des différentes approches par PCR portent sur l'ADN cible, la méthode de détection des amplicons, le type de prélèvement biologique utilisé, la stratégie concernant les espèces détectées, et surtout, l'extraction de l'ADN fongique à partir de l'échantillon du patient, étape limitante de l'ensemble de la procédure. L'absence de standardisation des techniques d'extraction et de

PCR rend difficile les comparaisons entre les études et freine leur application à grande échelle (Khot & Fredricks, 2009).

Compte tenu de cette problématique, notre travail portera sur la mise au point d'une PCR en temps réel utilisant la technologie TaqMan® et l'évaluation de sa spécificité et de sa sensibilité. En ce qui concerne le choix des amorces, plusieurs couples seront testés en SYBR® Green I. Certains couples sont dessinés pour détecter toutes les espèces de *Candida*, d'autres pour détecter toutes les espèces sauf *C. glabrata*, *C. krusei* et *C. lusitaniae*, espèces généralement résistantes aux antifongiques. Les couples destinés à la détection de ces trois dernières espèces seront dessinés ultérieurement. Pour ce qui est du choix du prélèvement, les levures entières pouvant être de meilleurs marqueurs de l'infection que la détection de l'ADN libre dans le serum (Avni *et al.*, 2011), nous tenterons d'améliorer les protocoles d'extraction utilisés à partir du sang total (Einsele *et al.*, 1997) et comparerons notre protocole « maison » à un kit commercial, le MolYsis™ Basic 5 (Molzym). L'évaluation et la standardisation de la procédure d'extraction impliqueront le développement d'un témoin interne d'extraction, approche originale dans ce domaine.

Avant d'aborder la méthodologie de la mise au point du protocole d'extraction et de la PCR, une revue actualisée de la littérature reprendra les données importantes concernant le genre *Candida*, l'épidémiologie des candidémies, et les principaux éléments de la prise en charge thérapeutique. L'accent sera mis sur les principales techniques de diagnostic et le potentiel de la biologie moléculaire dans la prise en charge de ce type d'infections. Les résultats des mises au point des deux techniques seront exposés puis discutés à la lumière des données récentes de la littérature.

Candida spp. et
**candidémies : revue de la
littérature**

I. Le genre *Candida*

I.1. Taxonomie

Les espèces de levures du genre *Candida* sont des organismes microscopiques unicellulaires et eucaryotes faisant partie du règne des *Fungi*. Ces levures se reproduisent principalement de façon asexuée par bourgeonnement avec la formation de blastospores facilement observables en microscopie (figure 1).

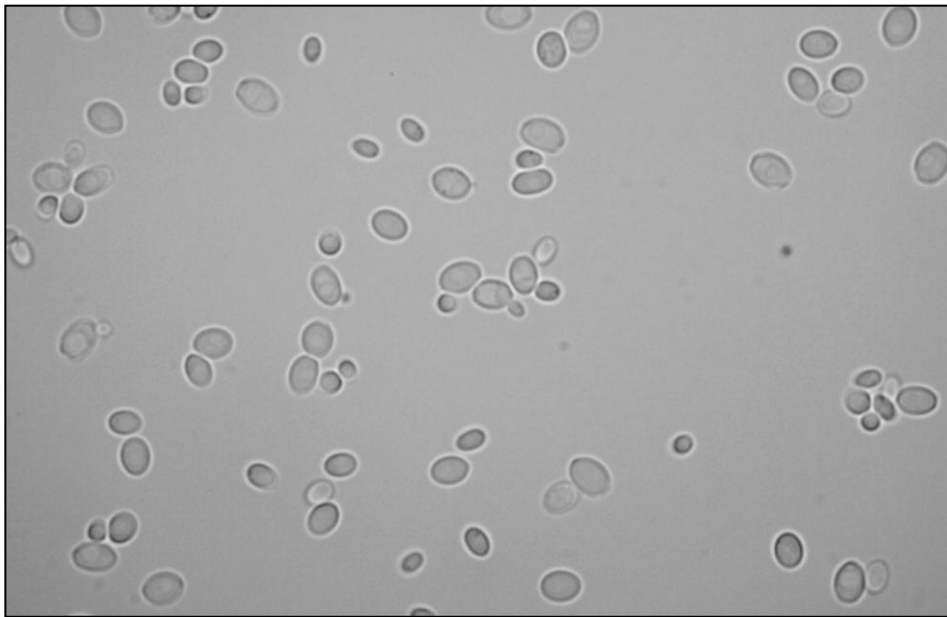
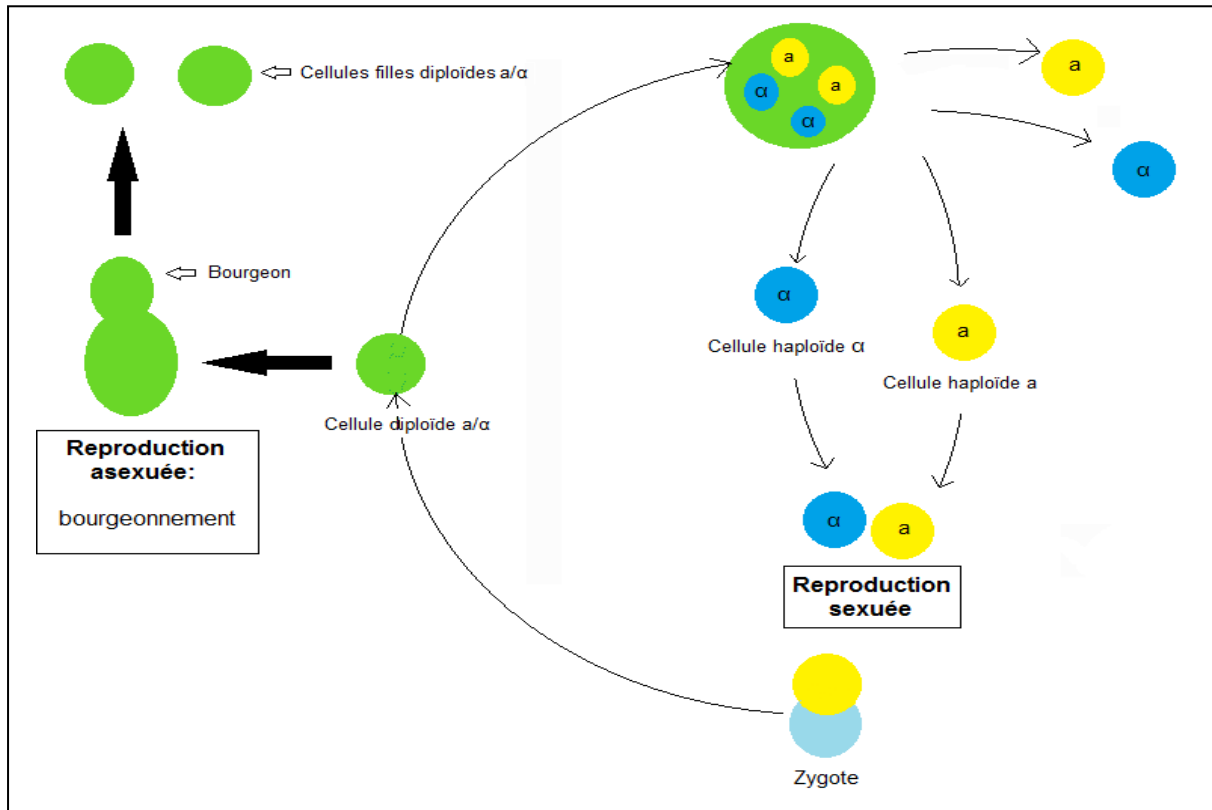


Figure 1. Blastospores de *Candida albicans* (x1000 ; collection personnelle).

La reproduction sexuée par asques est beaucoup plus difficile à mettre en évidence puisqu'elle n'a lieu que lorsque les conditions de culture sont défavorables. Le cycle de multiplication des levures du genre *Candida* est résumé dans la figure 2. Le stade sexué n'est connu que pour certaines espèces de *Candida* qui sont répertoriées dans le tableau I (Johnson, 2009).

Le code international de nomenclature botanique indique d'utiliser, quand elle est connue, le nom de la forme sexuée (téléomorphe) et non celui de la forme asexuée (anamorphe). Pour simplifier, les levures d'intérêt médical sont en pratique nommées par leur forme asexuée (Bouchara *et al.*, 2010).

Figure 2. Cycle reproductif des levures du genre *Candida*.Tableau I. Principales espèces de *Candida* dont la forme sexuée est connue (Adapté de Johnson, 2009).

Forme sexuée (anamorphe)	Forme asexuée (téleomorphe)
<i>C. famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>C. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>C. pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>C. norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
<i>C. utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>
<i>C. fermentati</i>	<i>Pichia caribbica</i>
<i>C. sphaerica</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>

I.2. De nombreuses espèces

Les *Candida spp.* sont des levures ubiquitaires et cosmopolites, présentes dans l'environnement et dans les flores commensales de l'homme et de nombreux animaux. Elles

se développent à l'état de saprophyte, c'est-à-dire aux dépens de matières organiques très variées (sol, fruits, plantes...) (ANOFEL, 2010). Le genre *Candida* compte plus de 200 espèces, de nouvelles espèces étant régulièrement décrites de l'environnement (Min *et al.*, 2012). Au moins 43 espèces du genre *Candida* sont présentées comme ayant été impliquées en pathologie humaine (tableau II). Cette liste continue de s'allonger, en raison du caractère opportuniste des infections à *Candida spp.*, et de l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés ou fragilisés (Pfuller *et al.*, 2011).

Tableau II. Espèces de *Candida* impliquées en pathologie humaine (Adapté de Johnson, 2009).

<i>Espèces communes</i>	<i>Espèces peu communes</i>	<i>Espèces rares</i>	
<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. blankii</i>	<i>C. membranaefaciens</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. bracarensis</i>	<i>C. nivariensis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. inconspicua</i>	<i>C. catenulata</i>	<i>C. palmioleophila</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. chiropterum</i>	<i>C. pararugosa</i>
<i>C. krusei</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. ciferri</i>	<i>C. pseudohaemulonii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. norvegensis</i>	<i>C. eremophila</i>	<i>C. pseudorugosa</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. fabianii</i>	<i>C. pintolopesii</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. fermentati</i>	<i>C. pulcherrima</i>
	<i>C. rugosa</i>	<i>C. freyschussii</i>	<i>C. thermophila</i>
	<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. utilis</i>
		<i>C. intermedia</i>	<i>C. valida</i>
		<i>C. lambica</i>	<i>C. viswanathii</i>
		<i>C. magnoliae</i>	

Seulement cinq espèces sont responsables d'environ 90% des candidoses invasives (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*) dont plus de la moitié sont dues à *C. albicans* (Herbrecht *et al.*, 2001). Depuis quelques années, l'épidémiologie des infections à *Candida* évolue avec une augmentation de la proportion des espèces non-*albicans*. Certaines espèces considérées il y a peu comme rares ou non pathogènes sont de plus en plus fréquemment rapportées. Le tableau III tiré d'une étude réalisée pendant plus de 10 ans dans 41 pays illustre cette tendance (Pfaller *et al.*, 2010c).

L'amélioration des techniques de laboratoire qui permettent maintenant de différencier certaines espèces confondues auparavant, s'ajoute à cette émergence de nouvelles espèces en pathologie humaine. Par exemple, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* et *C. orthopsilosis* sont maintenant différenciées par biologie moléculaire alors qu'elles ne l'étaient pas avec les méthodes classiques d'identification (Tavanti *et al.*, 2005). De la même façon, il est possible

de distinguer *C. nivariensis* (Alcoba-Florez *et al.*, 2005) et *C. bracarensis* de *C. glabrata* (Correia *et al.*, 2006).

Tableau III. Distribution des espèces de *Candida* provenant d'isolats de tous sites corporels sur une période de 10,5 ans dans 41 pays* (Adapté de Pfaller *et al.*, 2010c).

Espèce	Isolats testés sur la période:					
	1997-2000		2001-2004		2005-2007	
	Nombre	% du total	Nombre	% du total	Nombre	% du total
<i>Candida albicans</i>	39,152	70.9	71,027	62.9	57,598	65.0
<i>C. glabrata</i>	5,634	10.2	12,963	11.5	10,342	11.7
<i>C. tropicalis</i>	2,996	5.4	8,496	7.5	7,050	8.0
<i>C. parapsilosis</i>	2,633	4.8	7,783	6.9	5,005	5.6
<i>C. krusei</i>	1,207	2.2	2,840	2.5	2,239	2.5
<i>C. guilliermondii</i>	367	0.7	902	0.8	508	0.6
<i>C. lusitaniae</i>	276	0.5	674	0.6	559	0.6
<i>C. kefyr</i>	182	0.3	527	0.5	517	0.6
<i>C. inconspicua</i>	9	0.02	276	0.2	290	0.3
<i>C. famata</i>	123	0.2	375	0.3	247	0.3
<i>C. rugosa</i>	35	0.06	469	0.4	134	0.2
<i>C. dubliniensis</i>	1	<0.01	113	0.1	197	0.2
<i>C. norvegensis</i>	11	0.02	135	0.1	113	0.1
<i>C. lipolytica</i>	7	0.01	80	0.07	50	0.06
<i>C. sake</i>			20	0.02	67	0.08
<i>C. pelliculosa</i>	1	<0.01	47	0.04	40	0.05
<i>C. apicola</i>					57	0.06
<i>C. zeylanoides</i>	4	<0.01	50	0.04	20	0.02
<i>C. valida</i>			9	<0.01	12	0.01
<i>C. intermedia</i>			10	<0.01	14	0.01
<i>C. pulcherrima</i>			6	<0.01	8	<0.01
<i>C. haemulonii</i>			6	<0.01	3	<0.01
<i>C. stellatoidea</i>					7	<0.01
<i>C. utilis</i>					6	<0.01
<i>C. humicola</i>			2	<0.01	4	<0.01
<i>C. lambica</i>					5	<0.01
<i>C. ciferrii</i>					2	<0.01
<i>C. colliculosa</i>					2	<0.01
<i>C. holmii</i>					1	<0.01
<i>C. marina</i>					1	<0.01
<i>C. sphaerica</i>					1	<0.01
<i>Espèces non identifiées</i>	2,591	4.7	6,186	5.5	3,558	4.0
Total	55,229	100.0	112,996	100.0	88,647	100.0

*142 centres : 24 d'Asie et du Pacifique, 16 d'Amérique Latine, 18 d'Europe, 11 d'Afrique et du Moyen-Orient, 13 d'Amérique du Nord)

I.3. Caractéristiques des *Candida spp.*

Les espèces de levures rassemblées au sein du genre *Candida* présentent des caractéristiques communes. Comme les autres champignons, leur membrane cellulaire est essentiellement constituée d'un stérol spécifique, l'ergostérol. La paroi cellulaire des *Candida*

spp. est composée de protéines et de polysaccharides dont les β -(1,3) glucanes. L'ergostérol et les β -(1,3) glucanes jouent un rôle majeur pour l'intégrité de la membrane et de la paroi fongique. Les caractéristiques propres au genre *Candida* sont l'absence de capsule et de pigmentation, et l'absence d'activité uréasique. Elles sont capables d'assimiler et de fermenter certains sucres avec des profils différents selon les espèces. Certaines espèces sont capables de produire des filaments mycéliens sous la forme de pseudomycélium ou de mycélium vrai. D'autres comme *C. albicans* et *C. dubliniensis* sont capables de produire des formes de résistances appelées chlamydozoïdes lorsqu'elles sont en culture dans des milieux pauvres comme le RAT (Riz, Agar, Tween) ou le PCB (Pomme de terre, Carotte, Bile) (figure 3).

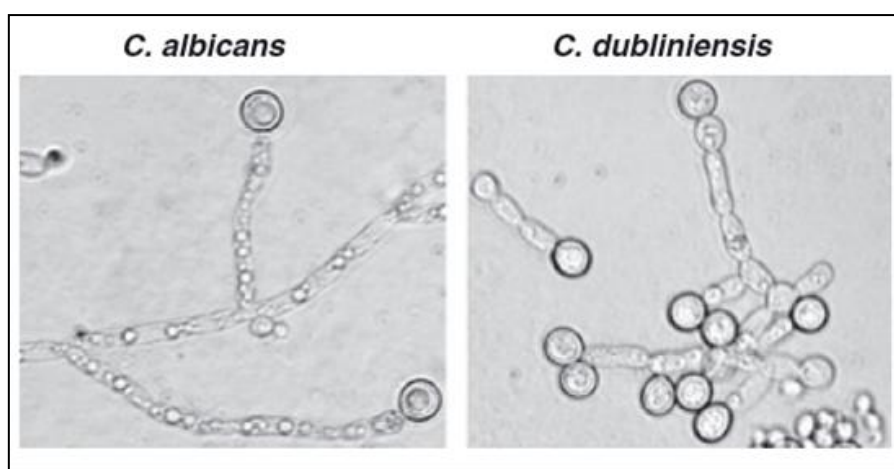


Figure 3. Production de chlamydozoïdes sur milieu RAT par *C. albicans* et *C. dubliniensis* (Staib & Morschhauser, 2007).

Une autre propriété importante de certaines levures du genre *Candida* est la capacité à former des biofilms. Ce mode de croissance s'oppose au mode de croissance planctonique, c'est-à-dire en milieu liquide. Il se produit dès lors que les levures vont adhérer à un substrat qui peut être vivant (épithélium des valves cardiaques) ou inerte (surface de matériel et dispositifs médicaux). Les levures vont coloniser le substrat puis proliférer tout en produisant des polysaccharides qui, en s'accumulant, vont constituer une matrice extracellulaire dans laquelle les levures vont être enchassées. La formation de biofilms par *C. albicans* est la plus étudiée à l'heure actuelle mais il a été montré que d'autres espèces de *Candida* étaient capables de former du biofilm, telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* (Silva *et al.*, 2011), *C. dubliniensis* (Ramage *et al.*, 2001), ou encore *C. krusei* (Samaranayake *et al.*, 2005).

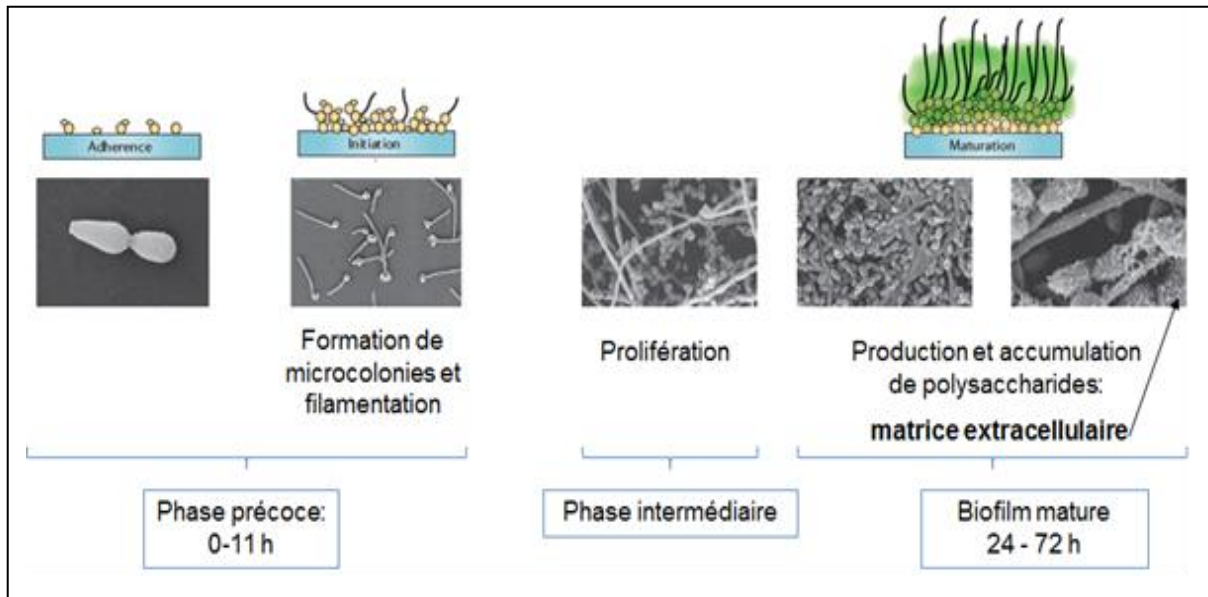


Figure 4. Mode de formation d'un biofilm à *C. albicans* (Photographies tirées de Ramage *et al*, 2009 ; illustrations tirées de Finkel & Mitchell, 2011).

Les levures du genre *Candida* sont des commensaux de l'homme mais possèdent un pouvoir pathogène majeur. Les infections humaines sont majoritairement dues à cinq espèces et principalement à *C. albicans*, mais peuvent être causées par de nombreuses autres espèces.

II. Les candidémies

II.1. Epidémiologie des Candidémies

II.1.1. Incidence

Les sepsis fongiques sont moins fréquents que les sepsis bactériens. Une étude prospective réalisée sur plus de 20 ans aux Etats-Unis (1979 à 2000) (Martin *et al.*, 2003), illustre cette différence (figure 5).

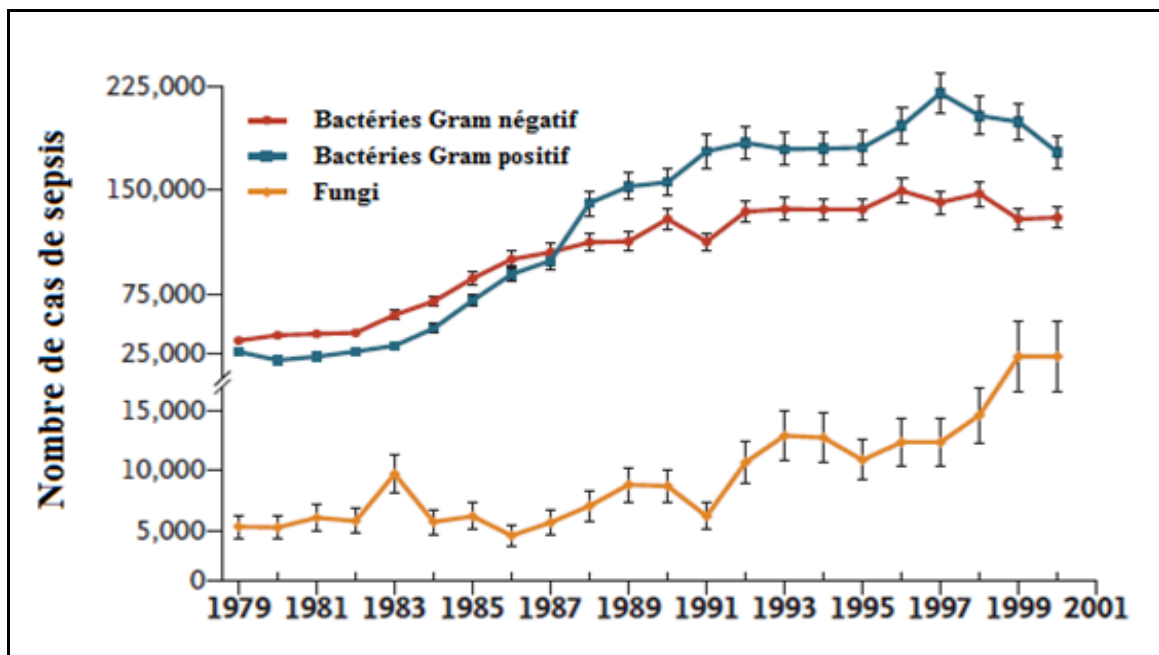


Figure 5. Nombre de cas de sepsis aux Etats-Unis en fonction du germe de 1979 à 2000 (Adapté de Martin *et al.*, 2003).

Pour autant, on ne peut pas considérer les sepsis fongiques, majoritairement dus à des levures, comme des infections rares. Les populations à risque étant de plus en plus importantes, on observe globalement une augmentation de ce type d'infections. Dans l'étude de Martin aux Etats-Unis, il était observé une augmentation de plus de 200% des fongémies sur la période étudiée. On retrouve la même tendance en Europe (tableau IV).

Tableau IV. Evolution de l'incidence des candidémies en Europe (Adapté de Eggimann *et al.*, 2003).

Pays	Population	Période d'observation	Pourcentage d'augmentation (%)
Europe			
France	Centre spécialisé dans le traitement du cancer	1983-1987	320
Suisse	Hopitaux Universitaires	19887-1992	558
	Hopitaux Universitaires	1989-2000	75
	Hopitaux Universitaires et de référence	1991-2000	130
Pays-bas	Hopitaux Universitaires	1987-1995	195
	USI	1987-1994	157
Allemagne	Séries d'autopsies	1978/82-1983/87	145
	Séries d'autopsies	1983/87-1988/92	159
Italie	Centre spécialisé dans le traitement du cancer	1983/86-1991/94	185 pour <i>C. albicans</i> 987 pour <i>C. parapsilosis</i>
	Hopitaux Universitaires	1992-1997	113
Norvège	Tous hôpitaux confondus	1991-1996	9
Hongrie	Hopitaux Universitaires	1996-2000	205

Globalement, les levures du genre *Candida* font partie des dix germes responsables le plus fréquemment de septicémies. Les *Candida spp.* ont été rapportées comme étant le 4ème agent pathogène isolé dans les hémocultures aux Etats-Unis (Wisplinghoff *et al.*, 2004) et le 7ème en Europe (Bourgeois *et al.*, 2010) et en France (Eloy *et al.*, 2006).

Il est difficile de donner une incidence moyenne des candidémies. Beaucoup d'études sont réalisées mais le type de population recrutée est très variable, et les résultats rendus sous différentes formes. Il y a une dizaine d'années, le taux de candidémies variait de 0.008 à 34/1000 admissions, 0.17 à 22/10000 patients-jours et 1.9 à 11/100000 habitants/an selon différentes études (tableau V).

Il est donc indispensable de connaître l'épidémiologie de l'établissement dans lequel nous exerçons pour mieux appréhender les attentes en matière de prévention, de diagnostic et de prise en charge thérapeutique des candidémies. Une étude rétrospective a été réalisée dans ce but au CHU de Nantes sur environ sept ans (mars 2004 - décembre 2010). L'incidence moyenne était de 0,37 épisodes de candidémie pour 1000 hospitalisations, avec une augmentation constante de cette incidence de 0,27 à 0,45‰ hospitalisations entre 2005 et 2009, et une diminution brutale à 0,31‰ admissions en 2010 dont l'origine n'était pas déterminée (Tadec, 2011).

Tableau V. Incidence des candidémies rapportée dans différentes études en Europe et aux USA (Adapté de Eggimann *et al*, 2003 ; Tortorano *et al*, 2006 ; Pfaller & Diekema, 2007).

Pays	Période		Taux/ 1000 admissions	Taux/ 10 000 patients-jours	Taux/ 100000 habitants / an
Population générale					
Europe					
Islande	1980-1999		-	-	2,85
Norvège	1991-1996		0,17	0,26	2,17
	2001-2003		0,17	0,4	3
Danemark	2003-2004		-	-	11
Finlande	1995-1999		0,17	0,4	1,9
USA					
Iowa	1998-2001		0,006	-	6
Californie	1992-1993		0,008	-	7,1
Centre spécialisés dans le traitement du Cancer					
Europe					
France	1995		0,71	0,16	-
Italie	1986-1997		15,5	-	-
USA					
	1988-1992		6	-	-
		Leucémies	20	-	-
		Lymphomes	10	-	-
		Myéломes et tumeurs	34	-	-
Unités de Soins Intensifs					
Europe					
France	1995-1997	Mixtes	2	-	-
	1998	Mixtes	3,1	22	-
Belgique	1992-2000	Mixtes	2,5	-	-
Espagne	1991-1992	Mixtes	2	-	-
Pays-Bas	1989-1993	Mixtes	-	5,5	-
Suisse	1990-1999	Mixtes	1,12	2,8	-
Allemagne	1989-1990	Mixtes	20	-	-
USA					
	1993-1995	Chirurgicales	9,8	9,9	-
	1993-1995	Chirurgicales	9,81	9,8	-
	1993-1995	Pédiatriques	12,3	6,4	-
	1990-1995	Néonatalogie	28,5	-	-
Hôpitaux					
Europe					
France	1995		0,29	0,35	-
		Non-universitaires	0,17	0,17	-
		Universitaires	0,38	0,52	-
	1998-2001		0,28	-	-
Norvège	1991-1996	Tous types	0,17	0,26	-
		Universitaires	-	0,36	-
		Hôpitaux de campagne	-	0,19	-
Hongrie	1996-2000	Universitaires	0,2 - 0,4	-	-
Suisse	1991-2000	Universitaires et affiliés	0,27	0,5	-
	1987-1992	Universitaires	0,12-0,67	-	-
	1990-1999	Universitaire	0,62	0,27	-
	2000		-	0,49	-
Italie	1997-1999	Hôpitaux généraux	0,38	0,44	-
	1997	Universitaires	-	1,2	-
Pays-Bas	1995	Universitaires	-	0,71	-
	1987-1995		-	0,51	-
Espagne	1995-1997	Universitaire	0,76	-	-
	1995-1999	Universitaire	0,81	-	-
	2002-2003		0,53	0,73	4,3
Royaume-Uni	2003		-	-	2,53
Danemark	2003-2004		0,49	-	11
USA					
	1989	Non-universitaires	0,28	-	-
		Petits hôpitaux	0,37	-	-
		Grands hôpitaux	0,61	-	-
	1990	Tous hôpitaux confondus	0,5	-	-
	1977-1985	Universitaires	0,85	-	-
	1983-1992	Universitaires	0,96	1,12	-
	1988-1989	Hôpitaux de référence	3,3	-	-
Etude de l'ECCM (European Confederation of Medical Mycology)					
France	1997-1999		0,2	-	-
Allemagne/Autriche	1997-1999		-	0,31	-
Italie	1997-1999		0,38	0,44	-
Espagne	1997-1999		-	-	3,5
Suisse	1997-1999		0,32	-	-
Royaume-Uni	1997-1999		-	0,3	-

II.1.2. Populations concernées

Les candidémies sont majoritairement des infections nosocomiales (après 48h d'hospitalisation), mais peuvent être communautaires, dans des proportions parfois non négligeables. Une étude mondiale réalisée entre 2008 et 2009 (Pfaller *et al.*, 2011e) rapportait 36.5% d'infections communautaires avec des taux variables selon les régions (tableau VI). Une étude française de 2004 relevait une proportion de candidémies communautaires d'environ 20% (Eloy O. *et al.*, 2006). Ceci implique de ne pas exclure une candidémie devant un sepsis communautaire (Kollef M.H. *et al.*, 2008).

Tableau VI. Variations géographiques du pourcentage de candidémies communautaires vs nosocomiales entre 2008 et 2009. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Pfaller *et al.*, 2011e).

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

Concernant les candidémies nosocomiales, certains services d'hospitalisation sont plus concernés, les patients cumulant les facteurs de risque. Globalement, les services de chirurgie, d'hématologie et les USI, regroupent la majorité des épisodes de candidémies. L'étude nantaise réalisée récemment a en effet montré que 58 % des épisodes de candidémies avaient eu lieu chez des patients de ces trois services. On estime à travers le monde que 33 à 55% des cas de candidémies ont lieu chez des patients d'USI (Bouza & Munoz, 2008).

II.1.3. Distribution des espèces

Globalement, le nombre de *Candida non albicans* isolé du sang est en constante augmentation. Une étude récente réalisée aux USA entre 2004 et 2008 sur 4067 isolats de *Candida spp.* (Pfaller *et al.*, 2012c) a mis en évidence que, même si l'espèce la plus fréquemment isolée est toujours *C. albicans* (42.1%), la proportion de candidémies dues à des espèces non-*albicans* est majoritaire (57.9%) dans la quasi-totalité des services d'hospitalisation (figure 6).

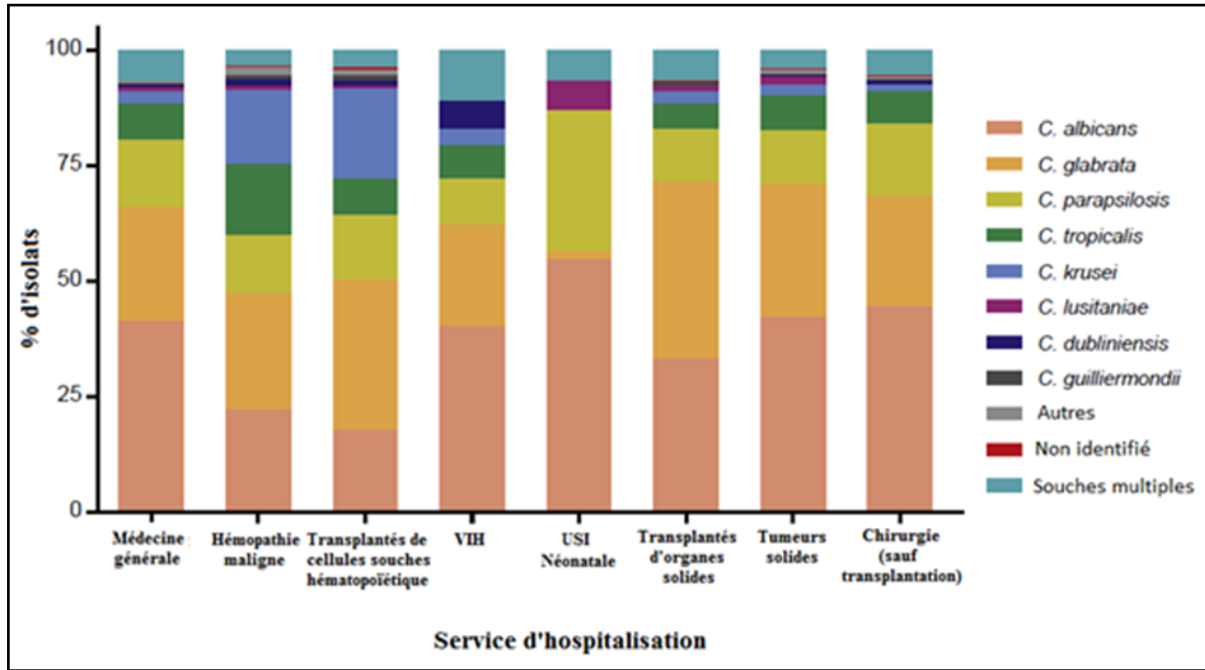


Figure 6. Distribution des espèces responsables de candidémies par service d'hospitalisation (Adapté de Pfaller *et al.*, 2012c).

En Europe (Tortorano *et al.*, 2006), *C. albicans* reste également l'espèce la plus fréquemment isolée avec des différences entre les pays concernant le rang des autres espèces (figure 7).

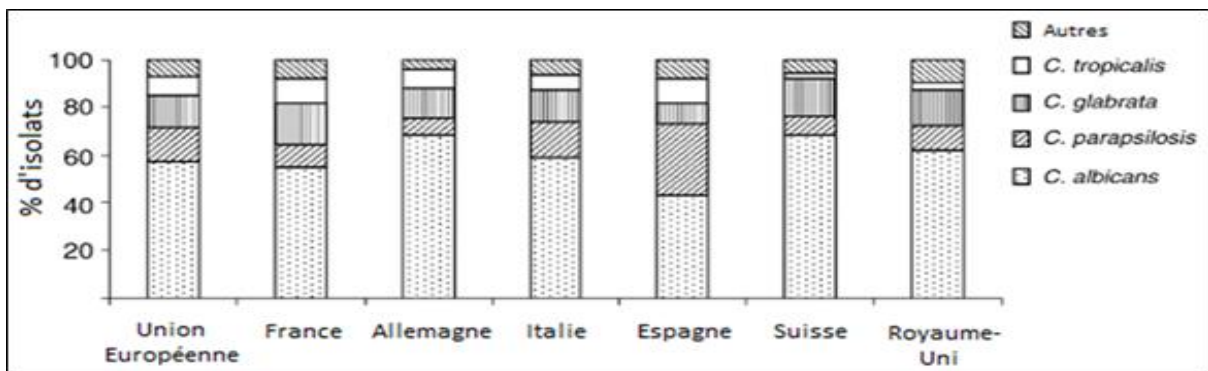


Figure 7. Espèces de *Candida* responsables de candidémies par pays. Etude Européenne de l'ECCM (European Confederation of Medical Mycology) (Adapté de Tortorano *et al.*, 2006).

A Nantes (Tadec, 2011), *C. albicans* est majoritaire, suivie de *C. parapsilosis* (figure 8).

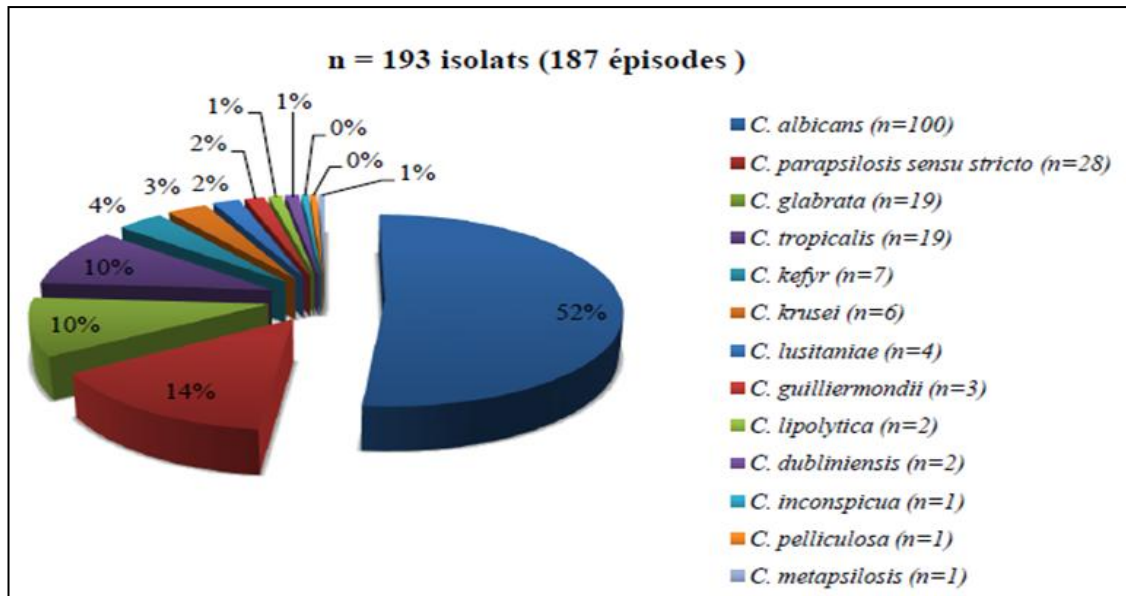


Figure 8. Distribution des espèces isolées d'hémocultures entre 2004 et 2010 au CHU de Nantes (n = 193) (Tadec, 2011).

La distribution des espèces de *Candida* impliquées dans les candidémies varie selon la population de patients considérée :

- *C. parapsilosis* est plus fréquemment isolée en pédiatrie (Pfaller & Diekema, 2007), comme nous pouvons le constater à Nantes (figure 9). De plus, du fait de sa présence majoritaire dans la flore commensale cutanée de l'homme, elle est également fréquemment associée aux candidémies liées aux cathéters intra-vasculaires (Kojic & Darouiche, 2004).

- La proportion de *C. tropicalis* est plus importante chez les patients neutropéniques ou atteints d'une hémopathie maligne. Plusieurs études indiquent cette tendance dont une étude publiée en 2009 avec une proportion de *C. tropicalis* de 20 % dans cette population (Sipsas *et al.*, 2009). Cette tendance est confirmée au CHU de Nantes avec une proportion de *C. tropicalis* de 27% sur la période 97-2004 (Vigouroux *et al.*, 2006) ainsi que sur la période 2004-2010 (Tadec, 2011) pour les services d'hématologie.

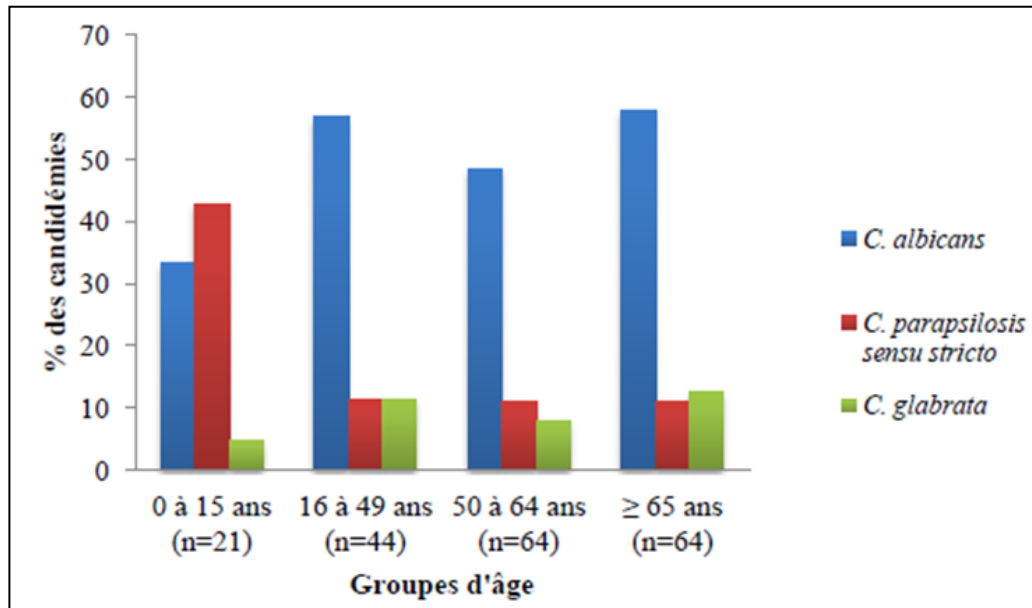


Figure 9. Distribution des espèces de *Candida* en fonction de l'âge des patients (n = 193) (Tadec, 2011).

La prévention des infections fongiques par fluconazole ou caspofungine pourrait selon certaines études influencer la distribution des espèces responsables de candidémies (Hope *et al.*, 2002; Bouza & Munoz, 2008). Le fluconazole augmenterait la proportion de *C. krusei* et de *C. glabrata*, la caspofungine celle de *C. parapsilosis*. Certains auteurs ne confirment pas cette tendance (Shorr *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2010).

Enfin, il est important de noter que les sepsis pluri-microbiens sont de plus en plus rapportés. Une étude de 2007 réalisée sur 372 patients candidémiques indiquait que 27% des patients avaient des hémocultures pluri-microbiennes dont 24% avaient simultanément une bactériémie et 3% plus d'une espèce de *Candida*. Une revue de la littérature réalisée par les auteurs comprenant 8000 épisodes de candidémies retrouvait des chiffres semblables : 23% d'hémocultures pluri-microbiennes dont 4% avec plus d'une espèce de *Candida* (Klotz *et al.*, 2007). La dernière étude de la PATH Alliance® réalisée sur 3648 épisodes de candidémies retrouvait 5,7% de candidémies dues à plusieurs espèces (Pfaller *et al.*, 2012c).

II.1.4. Mortalité

Il est très difficile d'évaluer la mortalité attribuable à un épisode de candidémie. C'est une donnée peu précise puisqu'elle diffère beaucoup en fonction de la sévérité de la pathologie sous-jacente. À titre d'exemple, une revue publiée à ce sujet relevait une mortalité attribuable variant de 5 à 71 % (Falagas *et al.*, 2006). Ainsi, on retrouve généralement des taux de mortalité plus élevés chez les patients atteints d'un cancer et dans les USI, en lien avec la gravité du terrain (Tortorano *et al.*, 2006).

En considérant les taux de mortalité bruts à 30 jrs ou à 90 jrs après l'épisode de candidémie, environ 1/3 des patients décèdent, avec des variations selon l'espèce impliquée (tableau VII). Un meilleur pronostic est observé pour les candidémies à *C. parapsilosis* et un pronostic très péjoratif pour les candidémies à *C. krusei* (non retrouvé dans l'étude nantaise probablement en raison d'un faible effectif de candidémies à *C. krusei*) et *C. tropicalis* (figure 10). Cette observation est elle aussi liée au terrain sous-jacent des patients, *C. krusei* et *C. tropicalis* étant plus fréquemment isolés chez des patients greffés de cellules souches de moelle osseuse hématopoïétique ou atteints de cancers hématologiques. A l'inverse, il est moins probable d'isoler *C. parapsilosis*, espèce moins virulente (Trofa *et al.*, 2008), chez des patients neutropéniques ou immunodéprimés. De plus, *C. parapsilosis* est, de par son habitat préférentiel qu'est la flore commensale cutanée, plus souvent impliquée dans des infections associées aux dispositifs intra-vasculaires, souvent de meilleur pronostic puisque la source de la contamination peut être le plus souvent retirée.

Certaines études notent une amélioration de la survie des patients ces dernières années (Pfaller *et al.*, 2012c), tandis que d'autres ne voient aucune évolution (Fortun *et al.*, 2012). La tendance est tout de même à une absence d'augmentation du nombre de décès en dépit d'un nombre plus important de patients infectés. L'explication serait la meilleure prise en charge thérapeutique préventive et curative des patients à risques, associée à une proportion importante de candidémies liées aux cathéters intra-vasculaires, de meilleur pronostic.

Tableau VII. Taux de mortalité 30, 60 et 90 jours après le diagnostic de candidémie en fonction de l'espèce de *Candida* isolée, à Nantes, en Europe, et aux U.S.A (Adapté de Tortorano *et al*, 2006 ; Tadec, 2011 ; Pfaller *et al*, 2012c).

Lieu	Mortalité à	Taux de mortalité en fonction de l'espèces de <i>Candida</i> isolée (%)						
		Total	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	Autres
Nantes (Tadec L., 2011)	90 jrs	29,5	33	26,3	17,9	47,4	0	23,8
Europe (Tortorano A.M. <i>et al</i> , 2006)	30 jrs	37,9	38,5	45	25,9	41,4	55,3	48
U.S.A (Pfaller M.A. <i>et al</i> , 2012)	30 jrs	29,4	30,2	31	22,4	36,2	34,8	
	60 jrs	35,4	35,8	37,8	26,3	41,9	43	
	90 jrs	38,7	37,9	42,4	30	44,1	46,4	

II.1.5. Impact économique

Les candidémies nécessitent des traitements antifongiques coûteux, associés à une surveillance biologique, des examens paracliniques complémentaires et éventuellement des actes invasifs (retrait de dispositifs médicaux invasifs par exemple). L'ensemble de la prise en charge d'une candidémie implique donc des coûts supplémentaires, ainsi qu'une durée d'hospitalisation plus longue (Pfaller & Diekema, 2007; Hassan *et al.*, 2009). Cet impact médico-économique des candidémies sur le système de santé est un argument supplémentaire pour intensifier les efforts à réaliser en matière de prévention, de diagnostic, et de traitement des candidémies.

II.2. Facteurs de risques d'infection à *Candida spp.*

Les infections à *Candida spp.* sont dues au passage de levures saprophytes des flores commensales à un état de germe infectieux dit alors opportuniste. Ce passage à l'infection peut être la conséquence de plusieurs facteurs qui sont liés à une diminution des défenses immunitaires, une rupture des barrières naturelles de l'hôte, ou encore une modification de l'environnement local au profit d'un développement fongique.

Les facteurs liés à l'hôte comprennent des causes physiologiques comme les âges extrêmes de la vie où les défenses immunitaires sont plus faibles (prématurés, nourissons, personnes âgées), des causes liées au type de population (diabète, toxicomanie...), ou des

causes locales propices à la croissance fongique (transpiration, macération...). Les autres facteurs de risque sont le plus souvent iatrogènes, comme l'antibiothérapie à large spectre qui déséquilibre les flores commensales bactériennes au profit des levures, les corticoïdes et autres immunosuppresseurs qui diminuent les défenses immunitaires de l'hôte, les chimiothérapies et radiothérapies qui entraînent des ulcérations des muqueuses, les actes de chirurgie digestive ou encore les effractions cutanées pour poses de dispositifs invasifs (cathéters, chambres implantables...) (Eggimann *et al.*, 2003; Tortorano *et al.*, 2006). Les principaux facteurs de risque de candidémies sont résumés dans le tableau VIII, la présence de dispositifs invasifs et la colonisation des muqueuses par *Candida spp.* représentant des facteurs de risque majeurs de candidose invasives.

Tableau VIII. Principaux facteurs de risque de développer une candidémie (Adapté de Eggiman *et al.*, 2003).

Facteurs de risque	Nombre d'études positives en analyse multivariée
Colonisation à <i>Candida</i>	7
Accès vasculaire central	6
Antibiothérapie antérieure	5
Chirurgie	5
Neutropénie	4
Gravité de la maladie	4
Nutrition parentérale	2
Âges extrêmes	2
Chimio prophylaxie	2
Insuffisance rénale	2
Sondage vésical	1
Diarrhée	1
Anti-H ₂	1
Hémodialyse	1
Durée de séjour	1
Ventilation mécanique	1

Des scores cliniques ont été développés afin de mieux cibler les patients à risque de candidémies, notamment en réanimation. L'index de colonisation de Pittet est largement utilisé (Pittet *et al.*, 1994). Il correspond à un score établi d'après les résultats de prélèvements superficiels réalisés à l'aide d'un écouvillon au niveau de plusieurs orifices: l'oropharynx ou

le liquide gastrique, le nez, l’anus, et les urines. Le nombre de sites colonisés avec la même espèce est ensuite rapporté au nombre de sites testés, un test étant considéré comme positif lorsqu’il est supérieur ou égal à 0,5. Plus le score est élevé, plus le patient est considéré comme à risque de développer une candidose invasive à l’espèce isolée. D’autres scores tels que le « *Candida* score » (Leon *et al.*, 2006) intègrent aux données de colonisation d’autres facteurs de risques cliniques (tableau IX). Un score > 2,5 permet de sélectionner les patients à fort risque de candidose invasive.

Tableau IX. Facteurs de risque cliniques pris en compte pour le calcul du « *Candida* score » et leur coefficient (Adapté de Leon *et al.* 2006).

Nutrition parentérale	1
Chirurgie	1
Colonisation à <i>Candida spp.</i>	1
Sepsis sévère	2

Enfin, il est intéressant de noter que de plus en plus d’études concernent la mise en évidence de facteurs génétiques prédisposant aux infections à levures. Une revue de 2012 (Plantinga *et al.*, 2012) rapporte ainsi plusieurs immunodéficiences primaires et des variants génétiques associés à une susceptibilité augmentée aux infections à *Candida spp.*

II.3. Physiopathologie des infections à *Candida spp.*

Les *Candida spp.* peuvent être responsables de deux types d’infections : les candidoses superficielles ou les candidoses invasives dont font partie les candidémies. On entend par candidose superficielle les atteintes cutanées et unguéales ainsi que les candidoses des muqueuses digestives (muguet, perlèche, anite) et génitales. Les facteurs de risques sont alors principalement les modifications locales favorisant la croissance fongique (antibiotiques, macération...). Ces atteintes concernent donc aussi bien des patients immunocompétents que des patients immunodéprimés. Elles sont relativement bénignes et n’engagent pas le pronostic vital, contrairement aux candidoses invasives.

Les candidoses invasives concernent exclusivement les patients à risque énoncés précédemment. On parle de candidose invasive lorsque l'on met en évidence des levures dans un prélèvement de site normalement stérile, de candidémie lorsque la levure est mise en évidence dans le sang et enfin de candidose disséminée lorsque la levure est retrouvée dans deux sites stériles non contigus. Ces infections sont dues à la pénétration des levures en profondeur au niveau cutané-muqueux pour atteindre les vaisseaux sanguins sous-jacents. La porte d'entrée est alors soit endogène, à partir par exemple d'un foyer digestif, ou exogène, le plus souvent à partir d'un cathéter intra-vasculaire (figure 10).

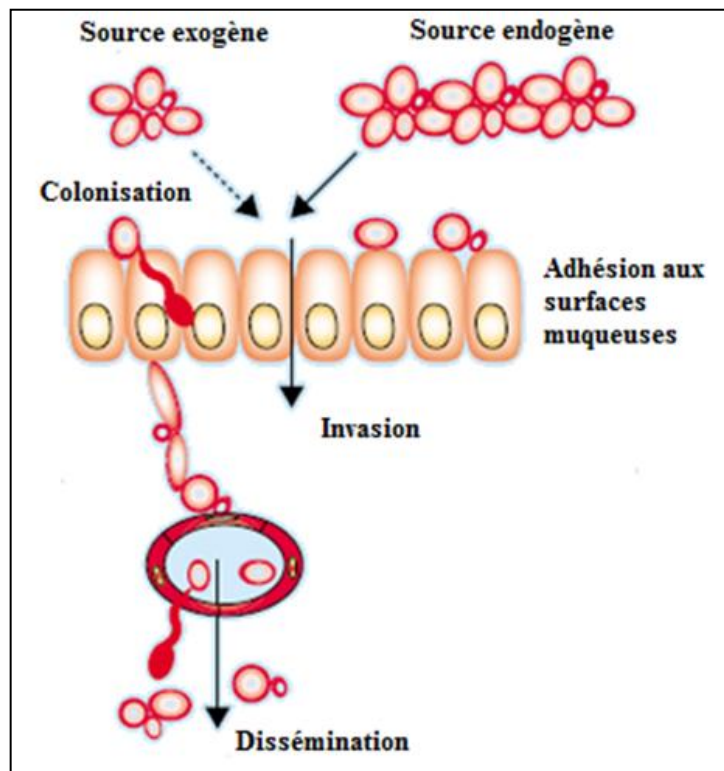


Figure 10. Physiopathologie des candidoses invasives (Adapté de Eggimann *et al*, 2003).

La contamination d'un cathéter peut être due à des levures faisant partie de la flore commensale cutanée du sujet mais aussi à une transmission manuportée de levures par le personnel soignant lors de la manipulation du cathéter, ou, plus rarement, par les produits de perfusion (figure 11). Les levures se développent alors en biofilm à la surface du matériel avec le risque de détachement de levures et leur relargage dans la circulation sanguine, entraînant une candidémie.

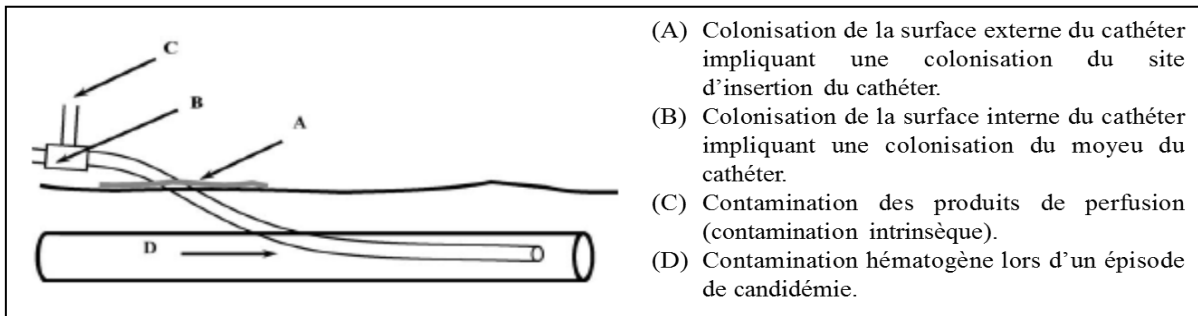


Figure 11. Physiopathologie des infections associées à des cathéters (Adapté de Eggimann *et al.*, 2004).

Les localisations secondaires à un épisode de candidémie sont très variées, les levures pouvant atteindre n'importe quel organe. On observe le plus fréquemment des endocardites et des candidoses oculaires mais aussi, plus rarement, des candidoses hépatospléniques, méningées, oculaires ou encore des ostéomyélites (Fernandez *et al.*, 2000; Oude Lashof *et al.*, 2011; Rammaert *et al.*, 2012; Neofytos *et al.*, 2013). La symptomatologie des candidoses invasives n'est pas spécifique et en l'absence de localisation secondaire, la présentation habituelle repose sur la présence d'une fièvre prolongée inexplicée avec échec du traitement antibiotique et la présence d'un syndrome inflammatoire.

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

Les levures du genre *Candida* sont responsables d'infections invasives chez les patients les plus fragiles. Les candidémies, moins fréquentes que les sepsis bactériens, ne sont pas pour autant des infections rares du fait d'une population à risque de plus en plus importante. Les espèces non-*albicans* sont de plus en plus fréquemment isolées, élément à prendre en compte pour la prise en charge des patients. La mortalité est élevée et varie selon le type de patient et l'espèce impliquée.

Les candidémies représentent un réel enjeu de santé publique du fait de leur impact médico-économique majeur.

III. Prise en charge thérapeutique des candidémies

III.1. Principaux antifongiques

L'ensemble des molécules disponibles pour le traitement des candidémies est récapitulé dans le tableau X.

Tableau X. Principaux antifongiques disponibles pour le traitement des candidémies et modes d'action.

Classe thérapeutique	Dénomination Commune Internationale	Nom commercial	Voies d'administration	Cible	Mode d'action	Type d'action
Polyènes	Amphotéricine B . Desoxycholate . Lipidique . Liposomale	Fungizone® Abelcet® Ambisome®	Parentérale	Membrane	Liaison à l' ergosterol : formation de pores aqueux entraînant la fuite des composants cytoplasmiques	Fongicide
Azols	Fluconazole Voriconazole	Fluconazole® Vfend®	Parentérale et <i>per os</i>	Membrane	Inhibition de la 14α-lanosterol demethylase : inhibition de la synthèse de l' ergostérol	Fongistatique
Analogue de la pyrimidine	5-Fluorocytosine (5-FU)	Ancotil®	Parentérale et <i>per os</i>	Noyau	Entrée dans la cellule par une cytosine perméase puis désamination en 5-fluorouracile (5-FU) qui inhibe la synthèse des acides nucléiques fongiques	Fongistatique
Echinocandines	Caspofungine Micafungine Anidulafungine	Cancidas® Mycamine® Ecalta®	Parentérale	Paroi	Inhibition de la β-1,3 glucane synthase : inhibition de la synthèse du β-1,3 glucane	Fongicide

III.2. Sensibilité aux antifongiques

III.2.1. Résistance des levures du genre *Candida* aux antifongiques

C. albicans est rarement résistant aux antifongiques. La dernière étude du SENTRY Antimicrobial Surveillance programme réalisée dans 34 pays entre 2010 et 2011 (Pfaller *et al.*, 2013b), indiquait que seulement 0,1% des isolats de *C. albicans* étaient résistants aux échinocandines et 0,4% au fluconazole. En Europe il avait été précédemment estimé que 0,41%, 1,88% et 1,27% seulement des isolats de *C. albicans* étaient respectivement résistants à l'amphotéricine B, à la 5-FC et au fluconazole (Tortorano *et al.*, 2006).

Certaines espèces non-*albicans*, sont naturellement résistantes ou de sensibilité diminuée à certaines molécules (tableau XI).

Tableau XI. Sensibilité de différentes espèces de *Candida* aux principaux antifongiques (Adapté de Pappas *et al.*, 2009 ; Miceli *et al.*, 2011).

Espèce	Fluconazole	Voriconazole	5-FC	Amphotéricine B	Echinocandines
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	SDD/R	SDD/R	S	S/I	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S/R
<i>C. krusei</i>	R	S	I/R	S/I	S
<i>C. lusitaniae</i>	S	S	S	S/R	S

S = Sensible ; I = Intermédiaire ; R = Résistant ; SDD = Sensibilité Dose Dépendante (une augmentation des doses peut être nécessaire pour maintenir une efficacité)

- *C. krusei* est naturellement résistant au fluconazole et à la 5-FC.
- *C. glabrata* est de sensibilité fréquemment diminuée au fluconazole (Tableau XII).
- *C. parapsilosis* présente *in vitro* une sensibilité diminuée aux échinocandines (Pfaller *et al.*, 2008) en raison d'un polymorphisme présent sur le gène FKS1 (tableau XIII). L'impact clinique de cette observation n'est toujours pas clair à l'heure actuelle mais les recommandations thérapeutiques sont en faveur d'un traitement par une molécule ne faisant pas partie de cette classe lors de l'isolement de *C. parapsilosis* (Pappas *et al.*, 2009).

- *C. lusitaniae* est généralement rapporté comme étant résistant à l'amphotéricine B. Il semblerait cette résistance ne soit pas naturelle mais se développe secondairement sous traitement par amphotéricine B, les CMI observées n'étant pas élevées en l'absence de traitement (Pfaller & Diekema, 2007; Atkinson *et al.*, 2008).

Tableau XII. Sensibilité *in vitro* de *C. glabrata* au fluconazole déterminée lors d'études européennes multicentriques (Adapté de Tortorano *et al.*, 2006).

Nombre de souches testées	CMI ₅₀	CMI ₉₀
23	4	4
80	4	8
25	4	≥ 64
12	8	24
47	16	32
31	ND	16
100	8	16

ND : Non Déterminé

Tableau XIII. CMI vis-à-vis des échinocandines des cinq espèces principales de *Candida* (Pfaller *et al.*, 2008).

Espèces	Caspofungine	Micafungine	Anidulafungine
<i>C. albicans</i>	0,06	0,03	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	1	2	2
<i>C. glabrata</i>	0,06	0,015	0,12
<i>C. tropicalis</i>	0,06	0,06	0,06
<i>C. krusei</i>	0,25	0,12	0,06

Les espèces de *Candida* plus rarement isolées ont des profils de sensibilité aux antifongiques moins connus. Elles sont généralement sensibles aux antifongiques (Diekema *et al.*, 2009), même si des résistances peuvent être mises en évidence chez certaines espèces. Dans une étude réalisée entre 1997 et 2007 dans 142 sites de 41 pays, 90% des isolats étaient sensibles au fluconazole mais *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. norvegensis*, *C. valida*, *C. humicola*, *C. lambica*, *C. ciferrii*, et *C. marina* montraient une sensibilité diminuée au fluconazole du même ordre de ce que l'on retrouve chez *C. glabrata*. Certaines de ces levures dont *C. rugosa*, *C. humicola*, *C. lambica* et *C. ciferrii* montraient également une sensibilité diminuée au voriconazole. Globalement, moins de 30% des isolats résistants au fluconazole restaient sensibles au voriconazole (Pfaller *et al.*, 2010c). Dans une autre étude

mondiale réalisée entre 2001 et 2007 sur les espèces rares de *Candida*, *C. lipolytica*, *C. guilliermondii*, *C. famata* et *C. rugosa* étaient de sensibilité diminuée aux azolés (Diekema *et al.*, 2009). Des CMI élevées aux échinocandines étaient retrouvées pour *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, et *C. famata* mais les isolats restaient sensibles dans 80% des cas pour *C. guilliermondii* et 100% pour *C. rugosa*. Concernant l'amphotéricine B, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. kefyri*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. rugosa* étaient de faible sensibilité à l'amphotéricine B, c'est à dire nécessitant des doses élevées (1 mg/kg/jour) pour un traitement optimal. Toujours dans cette étude, *C. dubliniensis* se révélait sensible à tous les antifongiques étudiés mais elle a précédemment été rapportée comme pouvant être résistante au fluconazole (Coleman *et al.*, 1997). Une étude multicentrique réalisée récemment en France, l'étude EPICANDI (Gicquel, 2011), a étudié la sensibilité des levures du genre *Candida* isolées de patients hospitalisés dans les principaux services à risque de candidose invasive. Les résultats sont résumés dans le tableau XIV et confirment les tendances énoncées précédemment.

Tableau XIV. Sensibilité aux principaux antifongiques en fonction de l'espèce de *Candida* (Adapté de Gicquel, 2011).

Espèce	Nombre de souches testées	Pourcentage de souches sensibles à l'antifongique				
		Fluconazole	Voriconazole	5-fluorocytosine	Amphotéricine B	Caspofungine
<i>C. albicans</i>	518	99,4	100	97,1	100	100
<i>C. glabrata</i>	120	40,3	80,8	98,3	99,1	100
<i>C. tropicalis</i>	53	96,2	100	69,8	98,1	100
<i>C. parapsilosis</i>	49	95,9	100	98	100	95,9
<i>C. kefyri</i>	39	100	100	79,5	100	100
<i>C. krusei</i>	30	0	100	0	96,7	100
<i>C. dubliniensis</i>	22	95,5	95,5	86,4	100	100
<i>C. lusitanae</i>	16	93,8	100	37,5	100	100
<i>C. inconspicua</i>	12	0	100	91,7	100	100
<i>C. guilliermondii</i>	5	80	80	100	100	60
<i>C. fabianii</i>	4	100	100	100	100	100
<i>C. fermentati</i>	3	100	100	100	100	100
<i>C. orthopsilosis</i>	3	66,7	66,7	33,3	100	100

Les espèces présentant une sensibilité diminuée plus marquée à l'antifongique testé apparaissent en gras

Il ne semble pas y avoir eu ces dernières années d'augmentation de la résistance des levures du genre *Candida* vis-à-vis du fluconazole (Pfaller *et al.*, 2010c) ou des

échinocandines (Pfaller *et al.*, 2013b). Il est cependant observé une tendance à une augmentation de la résistance de *C. glabrata* aux échinocandines (Pfaller *et al.*, 2013b). Régulièrement, des cas d'apparition de résistance sous traitement sont rapportés dans la littérature, telles que des souches de *C. tropicalis* résistantes aux azolés ou *C. glabrata* aux échinocandines (Chong *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2013). Certaines souches peuvent poser de réels problèmes thérapeutiques en présentant des résistances à plusieurs antifongiques. A titre d'exemple, il a été rapporté des cas de souches de *C. glabrata* (Krogh-Madsen *et al.*, 2006) ou de *C. haemulonii* (Muro *et al.*, 2012), exprimant alors une CMI élevée, une sensibilité diminuée, ou une résistance à la fois aux azolés, à l'amphotéricine B, et aux échinocandines.

III.2.2. Méthodes de détermination de la sensibilité

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

III.2.2.1. Méthodes de référence

Deux comités d'experts, le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour les Etats-Unis et l'EUCAST (EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) pour l'Europe, proposent des méthodes standardisées qui servent de référence pour les autres tests.

Ces techniques reposent sur le principe de microdilution en milieu liquide. Une suspension de levures calibrée est ensemencée dans des puits contenant des concentrations croissantes d'antifongiques. La croissance fongique de chaque cupule est comparée à celle d'une cupule témoin sans antifongique qui constitue le témoin de croissance. La lecture est différente selon la molécule antifongique testée et la technique utilisée. Les deux techniques sont similaires, avec quelques différences notamment au niveau de l'inoculum de départ, et

sont bien corrélées entre elles notamment pour les azolés (Pfaller *et al.*, 2011d). Ces techniques ne sont pas réalisables en routine au sein d'un laboratoire de mycologie médicale et sont réservées aux laboratoires de recherche. D'autres techniques plus simples ont donc été développées.

III.2.2.2. Méthode E-test[®]

Cette méthode repose sur le principe de diffusion en milieu gélosé. En pratique, un milieu gélosé est ensemencé avec un inoculum standardisé de la souche de levure à tester. La bandelette E-test[®], imprégnée d'un gradient d'antifongique, est déposée sur le milieu de cette gélose puis l'ensemble est incubé 24 à 48 heures à 37°C. La lecture de la CMI se fait à l'intersection entre la bandelette et l'ellipse d'inhibition de la croissance fongique. La lecture ne doit pas tenir compte de certains artéfacts de croissance et ne se fait pas de la même manière selon l'antifongique utilisé (figure 12).

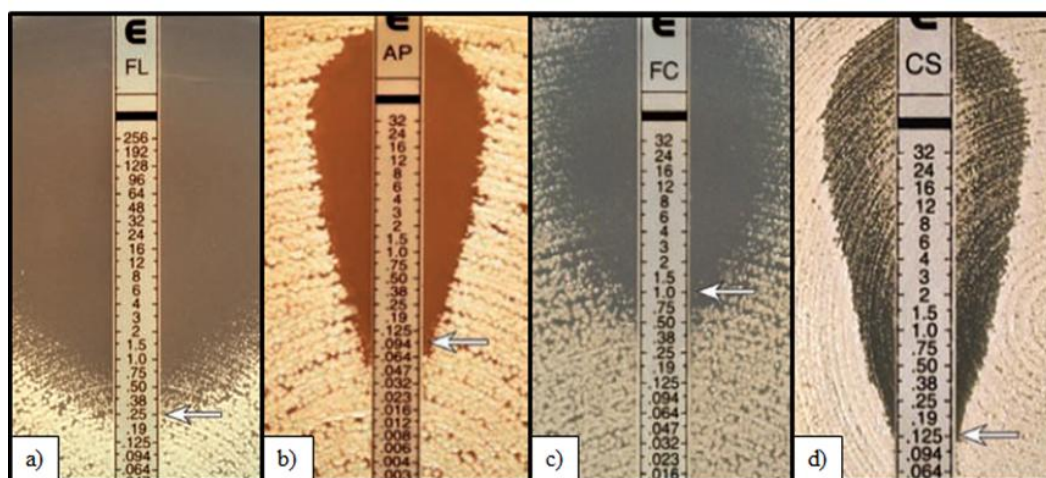


Figure 12. Exemples d'antifongigrammes réalisés avec la méthode E-test (<http://www.biomerieuxdiagnostic.com>).

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

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

III.2.2.3. Autres méthodes

D'autres méthodes utilisant le principe de microdilution en milieu liquide et utilisables en routine sont disponibles dans le commerce tel que le Sensititre[®] YeastOne[®] ou la galerie ATB[®] Fungus 3. Elles permettent de tester toutes les classes d'antifongiques à l'exception des échinocandines pour l'ATB fungus 3. La première semble bien corrélée aux méthodes de référence (tableau XV), tout comme la dernière version de l'ATB[®] Fungus (97.5% avec le CLSI et 94.3% avec l'EUCAST d'après le fabricant ; [http :www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)). La lecture est automatisable et réalisée à 24h ou à 48h selon la croissance fongique mais celle-ci peut se révéler difficile pour certaines espèces. Le système automatisé Vitek 2 AST-YS[®] permet de tester le fluconazole, le voriconazole, l'amphotéricine B, la 5-FC et la caspofungine. La corrélation est globalement bonne (tableau XV). La durée nécessaire à la réalisation de l'antifongigramme donnée par le fabricant est de 13h mais peut aller jusqu'à plus de 26h comme par exemple pour *C. glabrata* (Lai *et al.*, 2012).

D'autres techniques sont disponibles mais peu utilisées comme la méthode de diffusion par disques (CLSI M44A), ou encore réservées à la recherche comme l'évaluation de la viabilité cellulaire par l'incorporation de molécules telles que le MTT ou la résazurine. Certaines équipes travaillent sur la mise en évidence de souches résistantes grâce à la spectrométrie de masse, technique qui révolutionne actuellement l'identification des espèces de levures dans les laboratoires de mycologie médicale (cf chapitre IV.1.3.2). A titre d'exemple, une équipe italienne a récemment publié une technique permettant de détecter les souches de *C. albicans* résistantes aux échinocandines par mutation du gène FKS1 après seulement 3h d'incubation avec 3 concentrations (0 ; 0.03 ; 32 µg/mL) de caspofungine (Vella *et al.*, 2013). Cette technique n'est à l'heure actuelle qu'au stade expérimental et non applicable à tous les antifongiques mais pourrait être une perspective intéressante pour un rendu plus rapide, en quelques heures, de l'antifongigramme.

Tableau XV. Taux de concordance entre les résultats donnés par le système Vitek 2, le Sensititre® YeastOne®, les bandelettes E-test® et les méthodes de référence, en fonction de l'antifongique (Adapté de Cuenca-Estrella *et al*, 2010 ; Pfaller *et al*, 2010b ; Peterson *et al*, 2011 ; Pfaller *et al*, 2012a ; Pfaller *et al*, 2013a).

Antifongique	% de corrélation entre:								
	Vitek 2 et EUCAST	Vitek 2 et CLSI 24h	Vitek 2 et CLSI 48h	Etest et EUCAST	Etest et CLSI 24h	Etest et CLSI 48h	Sensititre YeastOne et EUCAST	Sensititre YeastOne et CLSI 24h	Sensititre YeastOne et CLSI 48h
Amphotéricine B	98,7	99,3	100,0	98,4	97,4	96,4	97,9	97,4	96,0
5-FC	98,0	98,6	96,0	96,4	95,2	95,2	96,0	95,2	95,2
Fluconazole	97,5	96,6/96,8	96,2	97,2	96,4	95,2	97,2	96	95,6
Voriconazole	97,5	96,8/96,5	96,6	95,2	95,2	95,2	95,5	95,6	95,2
Caspofungine	-	99,5	-	-	90,2	-	-	93,6	-
Micafungine	-	98,6	-	-	95,5	-	-	99,6	-
Total	97,9	97,8	97,3	96,8	96,1	95,5	96,6	96,1	95,5

III.3. Interprétation de l'antifongogramme

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

III.3.1. Seuils critiques de sensibilité

Le CLSI et l'EUCAST ont chacun définis des seuils critiques de sensibilité pour les différents antifongiques, résumés dans le tableau XVI. Concernant le fluconazole, les seuils critiques ont été harmonisés entre les deux comités d'expert (Pfaller *et al.*, 2010a).

Tableau XVI. Seuils critiques de sensibilité en fonction de l'espèce de *Candida* établis par l'EUCAST et/ou par le CLSI. (Adapté de Pfaller *et al*, 2010a ; Pfaller *et al*, 2011a ; Pfaller *et al*, 2011c; <http://www.eucast.org>).

Espèces	CLSI												EUCAST											
	Echinocandines						Azolés						Polyènes											
	Caspofungine		Micafungine		Anidulafungine		Micafungine		Anidulafungine		Fluconazole		Voriconazole		Posaconazole									
S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R							
<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1	≤0,25	0,5	≥1	≤0,25	0,5	≥1	≤0,016	-	>0,016	≤0,03	-	>0,03	-	>0,03							
<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤0,002	-	>0,002	≤0,002	-	>0,002	-	>0,002							
<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1	≤0,25	0,5	≥1	≤0,25	0,5	≥1	-	-	-	≤0,06	-	>0,06	-	>0,06							
<i>C. glabrata</i>	≤0,12	0,25	≥0,5	≤0,06	0,12	≥0,25	≤0,12	0,25	≥0,5	≤0,03	-	>0,03	≤0,06	-	>0,06	-	>0,06							
<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1	≤0,25	0,5	≥1	≤0,25	0,5	≥1	-	-	-	≤0,06	-	>0,06	-	>0,06							
<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	-	-	-	-	-	-	-	-							
Espèces	Fluconazole		Voriconazole		Fluconazole		Voriconazole		Fluconazole		Voriconazole		Posaconazole											
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R									
	≤2	4	≥8	≤0,125	0,25-0,5	≥1	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤0,12	>0,12	>0,06									
	≤2	4	≥8	≤0,125	0,25-0,5	≥1	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤0,12	>0,12	>0,06									
	≤2	4	≥8	≤0,125	0,25-0,5	≥1	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤0,12	>0,12	>0,06									
	≤32	≥64		*	*	*	≤32	≥64		naturelle														
Espèces	Amphotéricine B		Amphotéricine B		Amphotéricine B		Amphotéricine B		Amphotéricine B		Amphotéricine B													
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R												
	≤1		>1	≤1		>1	≤1		>1	≤1		>1												
	≤1		>1	≤1		>1	≤1		>1	≤1		>1												
	≤1		>1	≤1		>1	≤1		>1	≤1		>1												
	≤1		>1	≤1		>1	≤1		>1	≤1		>1												

* : pour *C. glabrata* il n'y a pas de seuil critique de sensibilité défini pour le fluconazole, les données étant insuffisantes pour montrer une corrélation entre une CMI obtenue in vitro et une efficacité clinique. On dit que la souche est sauvage lorsque sa CMI est ≤0,5 µg/mL.

III.3.2. Seuils épidémiologiques

Lorsqu'il n'y a pas de seuil critique de sensibilité établi, des seuils épidémiologiques peuvent être utiles pour définir si une souche est sauvage ou non. Le CLSI a publié récemment ces seuils pour l'amphotéricine B et le posaconazole mais aussi pour la 5-FC et l'itraconazole (tableau XVII) dont les seuils critiques de sensibilité établis jusqu'alors ont été jugés "imparfaits" (Pfaller *et al.*, 2011b; Pfaller *et al.*, 2012b). Ces seuils ne prennent pas en considération les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'antifongique ni les données cliniques. Ils ne sont donc pas à utiliser comme des seuils critiques de sensibilité puisqu'il n'y a pas de corrélation démontrée entre la CMI obtenue *in vitro* et l'efficacité clinique. Ils permettent de classer une souche comme sauvage lorsque la CMI est inférieure au seuil défini pour l'espèce en question et permettent ainsi de surveiller l'émergence de souches de sensibilité diminuée à ces antifongiques.

Tableau XVII. Seuils critiques épidémiologiques pour l'amphotéricine B, la 5-FC, l'itraconazole et le posaconazole en fonction de l'espèce de *Candida* (Pfaller *et al.*, 2011b ; Pfaller *et al.*, 2012b).

Espèce	Seuil critique épidémiologique (µg/mL)							
	Amphotéricine B		Flucytosine		Itraconazole		Posaconazole	
	CLSI 24h	CLSI 48h	CLSI 24h	CLSI 48h	CLSI 24h	CLSI 48h	CLSI 24h	CLSI 48h
<i>C. albicans</i>	2	2	0,5	1	0,12	12	0,06	0,06
<i>C. glabrata</i>	2	2	0,5	0,5	2	4	2	4
<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25
<i>C. tropicalis</i>	2	2	0,5	1	0,5	0,5	0,12	0,25
<i>C. krusei</i>	2	4	32	32	1	2	0,5	1
<i>C. lusitaniae</i>	2	4	0,5	1	0,5	0,5	0,12	0,25
<i>C. dubliniensis</i>	-	2	0,5	0,5	0,25	0,25	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	2	2	1		1	2	0,5	0,5
<i>C. kefyr</i>	-	-	-	-	-	-	0,25	0,5

III.4. Recommandations thérapeutiques

Nous ne détaillerons que les recommandations concernant le traitement curatif des candidémies, c'est-à-dire après confirmation du diagnostic, et ne traiterons pas des traitements prophylactiques, pré-emptifs et empiriques des candidoses profondes.

Plusieurs sociétés savantes ont établi des recommandations concernant le traitement thérapeutique des candidémies, dont :

- L'IDSA (Infectious Diseases Society of America)
- L'ESCMID (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases)
- La SFAR (Société Française d'Anesthésie et de Réanimation)

Nous détaillerons les dernières recommandations établies par l'IDSA (Pappas *et al.*, 2009) et par l'ESCMID (Cornely *et al.*, 2012), plus récentes, plus faciles à mettre en œuvre et donc plus souvent adoptées que celles de la SFAR (SFAR *et al.*, 2004) qui sont peu respectées (Leroy *et al.*, 2008). Elles reposent sur la mise en place d'un traitement antifongique de première intention lorsqu'une hémoculture est positive à levures, puis à un traitement de deuxième intention adapté à l'espèce de levure identifiée.

III.4.1. Recommandations de l'IDSA

Deux situations sont envisagées chez l'adulte : neutropéniques vs non-neutropéniques. Les recommandations concernant le traitement de ces trois populations après la positivité d'une hémoculture à levures sont récapitulées dans la figure 13. Le traitement de 2^{ème} intention est réalisé après identification de la souche.

III.4.2. Recommandations de l'ESCMID

Elles sont plus simples et reposent sur l'administration en 1^{ère} intention d'échinocandines chez l'adulte (tableau XVIII). La durée de traitement préconisée est là aussi de 14 jours après négativation des hémocultures. Une désescalade thérapeutique par du fluconazole *per os* n'est recommandée qu'après 10 jours de traitement intraveineux, seulement si le patient est stable, tolère la voie orale, et si l'espèce isolée est sensible au fluconazole. Le retrait des cathéters est fortement recommandé mais s'il est impossible, il est préférable de traiter le patient par une formulation lipidique de l'amphotéricine B ou une échinocandine, molécules plus efficaces sur le biofilm.

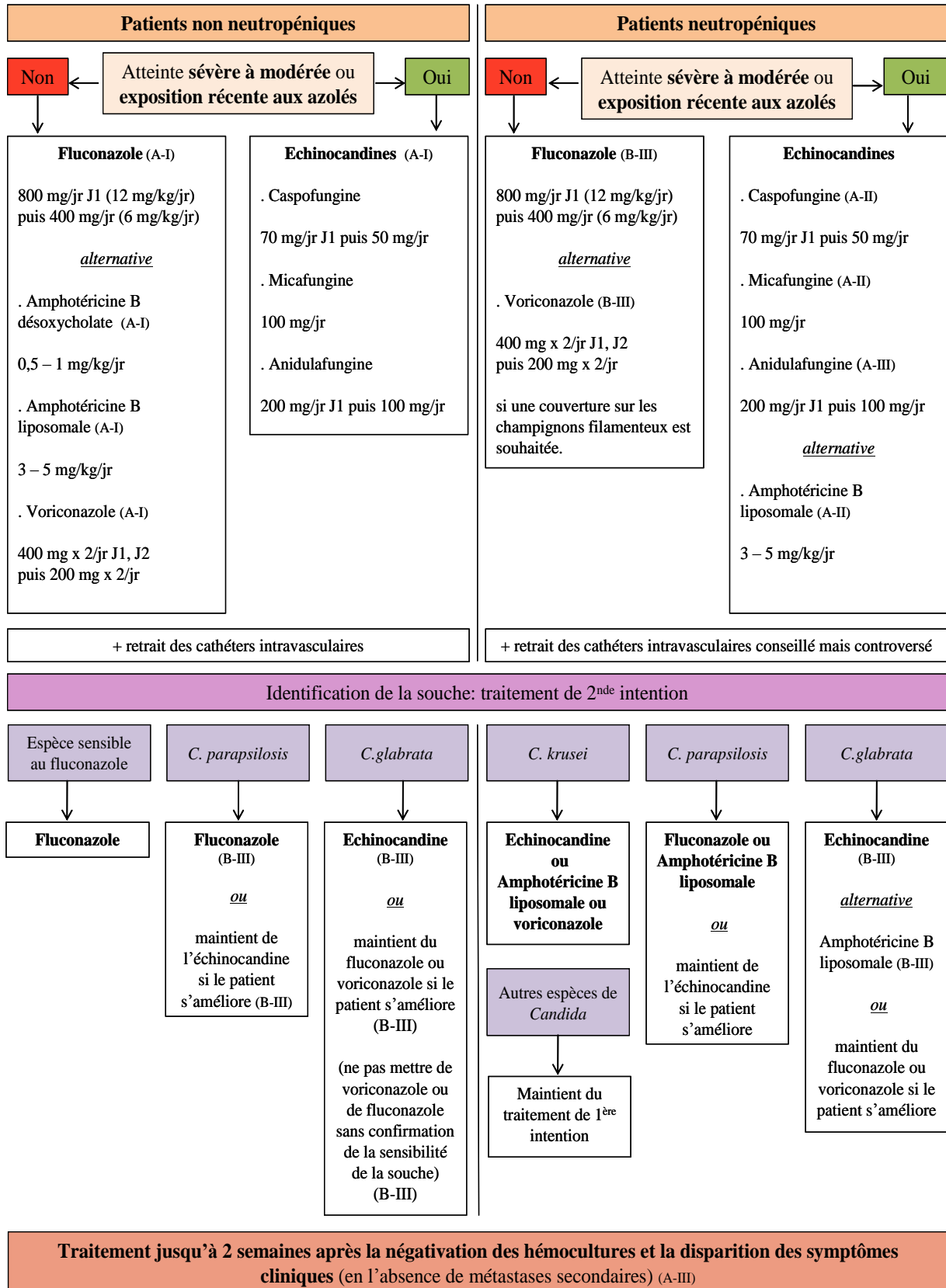


Figure 13. Dernières recommandations de l'IDSA pour le traitement des candidémies de l'adulte (Adapté de Pappas *et al*, 2009).

Tableau XVIII. Dernières recommandations de l'ESCMID pour le traitement des candidémies de l'adulte (Adapté de Cornely *et al.*, 2012 ; Ullmann A.J. *et al.*, 2012).

Antifongique	Niveau de preuve	Antifongique	Niveau de preuve
Adulte non neutropénique		Adulte neutropénique	
Caspofungine	A-I	Caspofungine	A-II
Micafungine	A-I	Micafungine	A-II
Anidulafungine	A-I	Anidulafungine	B-II
Amphotéricine B liposomale	B-I	Amphotéricine B liposomale	B-II
Voriconazole	B-I	Voriconazole	C-II
Fluconazole	C-I	Fluconazole	C-II
Amphotéricine B désoxycholate	D-I	Amphotéricine B désoxycholate	D-II
		Itraconazole	D-III
		Posaconazole	D-III

III.4.3. Délai d'initiation du traitement

Il est important d'insister sur le fait qu'une seule hémoculture positive à levure pose le diagnostic de candidémie et l'indication immédiate d'un traitement antifongique. Plusieurs études ont démontré l'effet dramatique du délai d'initiation d'un traitement antifongique adapté, même court, sur la mortalité des candidémies. L'étude la plus connue est celle de Morell (Morrell *et al.*, 2005) qui indique qu'un traitement donné dans les 12h après la positivité de l'hémoculture entraîne une diminution du taux de mortalité d'environ trois fois par rapport à un traitement donné après 12h (figure 14). Plusieurs études plus récentes confirment que la mise en place rapide d'un traitement antifongique adéquat entraîne une diminution significative de la mortalité chez les patients candidémiques (Garey *et al.*, 2006; Parkins *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2009).

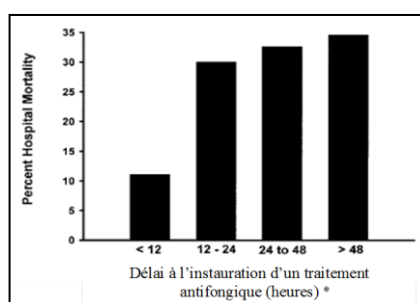


Figure 14. Relation entre mortalité et délai à l'instauration du traitement antifongique (Adapté de Morell *et al.*, 2005).

*Le délai à l'instauration d'un traitement correspond au délai entre la première hémoculture positive et la première administration du traitement.

Certaines levures présentent un profil de sensibilité connu aux antifongiques telles que *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. lusitaniae* : leur identification précoce permet la mise en place rapide d'un antifongique adapté, facteur de meilleur pronostic. La réalisation d'un antifongigramme (24h-48h) pour les prélèvements profonds reste indispensable, notamment pour les espèces rares, même si la résistance aux antifongiques reste relativement faible à l'heure actuelle.

IV. Diagnostic des candidémies : un enjeu majeur de la prise en charge

Comme nous l'avons vu précédemment, la mise en place précoce d'un traitement antifongique adapté est significativement associée à de plus faibles taux de mortalité. Le diagnostic précoce des candidémies est donc un élément clé dans la prise en charge des candidémies et représente un réel challenge à l'heure actuelle.

IV.1. Méthode de référence : l'hémoculture

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

IV.1.1. Sensibilité

IV.1.1.1. Des performances limitées

Le manque de sensibilité des hémocultures est fréquemment rapporté dans la littérature. Elle est généralement estimée entre 50 et 75%. Les seules études évaluant de façon précise cette sensibilité sont les études réalisées sur des autopsies. Ainsi, la sensibilité des hémocultures ante-mortem dans ce type d'études va de 21 à 71% (Clancy & Nguyen, 2013), tout en sachant que peu d'études ont été menées avec une stratégie standardisée de prélèvement des hémocultures.

La réalisation d'hémocultures quantitatives a permis d'estimer que 26 à 65% des hémocultures positives contenaient moins de 1 CFU/mL (Telenti *et al.*, 1991). Une hémoculture négative peut donc être le reflet de concentrations insuffisantes en *Candida spp.* vivantes dans la circulation sanguine, de l'absence de *Candida spp.* vivantes, ou de relargages intermittents de *Candida spp.* viables à partir d'un foyer profond ou d'un cathéter par

exemple. La sensibilité des hémocultures est aussi limitée par le fait que les *Candida spp.* viables sont rapidement éliminées de la circulation sanguine, d'autant plus lorsqu'il s'agit d'une candidémie liée à une translocation au travers de la muqueuse gastro-intestinale dans le compartiment vasculaire. Les levures sont alors rapidement retenues par le foie. Il est ainsi indispensable de respecter les volumes de sang à inoculer ainsi que de multiplier le nombre de prélèvements pour limiter ce problème de sensibilité limitée.

IV.1.1.2. Comment et quelles hémocultures prélever ?

Les dernières recommandations de l'ESCMID concernant le diagnostic des candidémies préconisent la réalisation de 3 (2 à 4) séries d'hémocultures par jour pendant au moins 5 jrs, comprenant à chaque ponction un flacon aérobie et un flacon anaérobie (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012). Les volumes recommandés sont de 40 à 60 mL chez l'adulte et de 2 à 4 mL, 6 mL et 20 mL pour les enfants de moins de 2 kg, de 2 à 12 kg, et de 12 à 36 kg respectivement. Une fois le diagnostic de candidémie posé, le prélèvement d'hémocultures devrait être réalisé chaque jour jusqu'à négativation (Cornely *et al.*, 2012). Il est recommandé d'utiliser un système automatique validé d'hémocultures. Deux systèmes automatiques sont disponibles sur le marché français : Bactec® (Becton Dickinson), utilisé à Nantes, et BacT/Alert® (Biomérieux). Le premier détecte la croissance de micro-organismes par mesure du CO₂ par fluorescence, le second grâce à un indicateur de pH. La lecture des flacons est réalisée toutes les 10 min et les flacons agités en continu par balancement. Seul le système Bactec® dispose de flacons spécifiques pour la croissance fongique : le flacon Bactec® Mycosis-IC/F. Il est simplement noté que son utilisation permet d'améliorer la sensibilité pour certaines espèces mais il n'y a pas de recommandations précises à ce sujet. Plusieurs études ont évalué son intérêt :

- Bactec® Mycosis-IC/F vs Bactec® Plus Aerobic/F

Une étude de 2004 portant sur 550 paires d'hémocultures pour comparer les performances des deux flacons (Meyer *et al.*, 2004), indiquait des taux de positivité supérieurs

avec le flacon Bactec® Mycosis-IC/F pour la détection des *Candida spp.*, notamment concernant *C. glabrata* (tableau XIX).

Tableau XIX. Taux de positivité, selon l'espèce de *Candida*, de paires d'hémocultures avec les flacons Bactec® Mycosis IC/F et Bactec® Plus aerobic/F (Adapté de Meyer *et al.*, 2004).

Espèce	Nombre de paires	Mycosis IC/F positives (%)	Plus Aerobic/F positives (%)
<i>C. albicans</i>	278	82	78,1
<i>C. parapsilosis</i>	65	96,9*	80
<i>C. glabrata</i>	64	95,3*	37,5
<i>C. tropicalis</i>	56	91,1	83,9
<i>C. krusei</i>	39	89,7	89,7
<i>C. famata</i>	16	100	93,7
Autres	32	93,7	73
Total	550	88	74,9

* Différence significative

- Bactec® Mycosis-IC/F vs BacT/Alert® FA (aérobie)

Une étude récente réalisée sur 179 hémocultures prélevées simultanément indiquait des performances similaires avec un taux de positivité d'environ 80% pour la détection des différentes espèces de *Candida* entre le flacon Bactec® Mycosis-IC/F et le flacon aérobie BacT/Alert® FA (Ericson *et al.*, 2012).

- Flacons anaérobies (Bactec® Plus Anaerobic/F et BacT/Alert® FN)

Ces flacons permettent presque exclusivement la détection de *C. glabrata* (Ericson *et al.*, 2012; Cobos-Trigueros *et al.*, 2013). La détection exclusive ou plus rapide d'une levure dans le flacon Bactec® anaérobie que dans le flacon aérobie augmenterait de 58% la probabilité de mettre en évidence *C. glabrata* (Cobos-Trigueros *et al.*, 2013).

- Performances en présence d'antifongiques

Les performances de tous les flacons sont diminuées en présence d'antifongiques, particulièrement pour le flacon Bactec® Mycosis-IC/F. L'étude de Koch publiée récemment avait pour objectif de comparer la détection de *C. albicans* et *C. glabrata* dans différents flacons d'hémocultures artificiellement inoculés en levures et contenant des concentrations

thérapeutiques d'antifongiques (caspofungine, micafungine, anidulafungine, amphotéricine B, fluconazole, ou voriconazole). Les résultats indiquaient que les flacons Bactec® Mycosis-IC/F, qui ne contiennent pas de résines inactivatrices d'agents anti-infectieux, avaient des taux de positivité inférieurs aux flacons Bactec® Plus Aerobic/F avec la caspofungine et l'amphotéricine B. Les azolés n'affectaient pas la détection pour les deux systèmes, contrairement à la micafungine et l'anidulafungine qui inhibaient presque totalement la détection (Kock *et al.*, 2013). Les flacons aérobies du système BacT/Alert® semblent également plus performants sous antifongiques que celles du flacon Bactec® Mycosis-IC/F (Ericson *et al.*, 2012).

- Influence de la présence de bactéries

La pousse rapide de bactéries dans les flacons aérobies classiques peut inhiber la pousse et la détection de *Candida spp* lors de sepsis pluri-microbiens à levures et à bactéries (Cateau *et al.*, 2012). La présence d'antibiotiques dans le flacon Bactec® Mycosis IC/F permet d'éviter ce phénomène et de permettre un taux de détection plus élevée qu'avec le flacon Bactec® Plus Aerobic/F (Meyer *et al.*, 2004; Klingspor *et al.*, 2012) ou BacT/Alert® FA (Arendrup *et al.*, 2011; Ericson *et al.*, 2012; Klingspor *et al.*, 2012) pour les infections mixtes levures/bactéries (figure 15). Les flacons Mycosis permettraient également une meilleure détection des candidémies causées par plusieurs espèces de levures que les flacons aérobies classiques, quel que soit le système (Klingspor *et al.*, 2012).

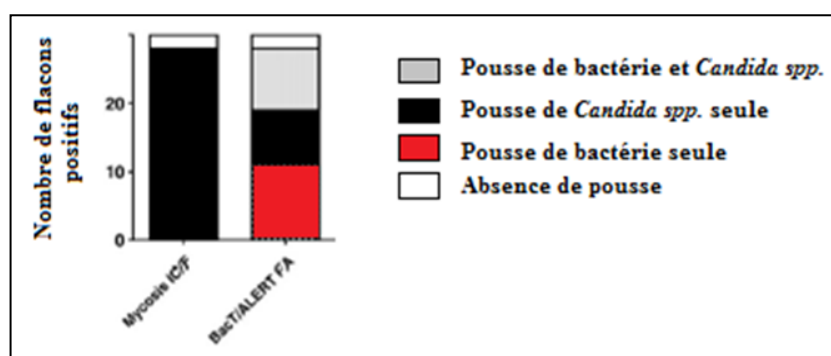


Figure 15. Détection de *Candida spp.* et de bactéries présentes de façon simultanée dans des échantillons de Bactec® Mycosis IC/F et BacT/Alert® FA (Adapté de Ericson *et al.*, 2012).

La faible sensibilité des hémocultures, liée à la faible charge fongique, peut être améliorée par la répétition des prélèvements et l'utilisation de flacons spécialement conçus pour le diagnostic des fongémies, notamment pour la détection de *C. glabrata* et dans le cadre d'hémocultures pluri-microbiennes. L'intérêt est plus limité pour le suivi de l'efficacité du traitement antifongique.

IV.1.2. Délai de positivité

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

- Performances des différents systèmes

Le ddp des hémocultures fongiques est globalement compris entre 1 et 5 jours, avec des différences selon les flacons utilisés et les espèces impliquées (Tableau XX).

L'étude de Meyer retrouvait un ddp plus court d'environ 7,6 h pour le flacon Bactec® Mycosis-IC/F par rapport au flacon Bactec® Plus Aerobic/F lorsque toutes les espèces de *Candida* étaient prises en compte (Meyer *et al.*, 2004). Dans l'étude d'Ericson, il ne semblait pas y avoir de différences entre le flacon Bactec® Mycosis-IC/F et le flacon BacT/Alert® FA, sauf pour *C. glabrata* avec un ddp significativement plus faible pour le flacon Bactec® Mycosis-IC/F (12,9h vs 37,3h) (Ericson E.L. *et al.*, 2012). Il a été retrouvé la même différence avec le flacon Bactec® Plus Aerobic/F (17,8h vs 61,5) (Meyer *et al.*, 2004).

- Lien entre ddp et espèce

Lorsqu'une hémoculture se positive, un examen direct microscopique est réalisé immédiatement pour confirmer la présence d'un agent fongique mais aucun diagnostic d'espèce n'est possible et n'est rendu au clinicien à cette étape. Certains auteurs ont essayé d'établir un lien entre ddp et l'espèce impliquée pour avoir une première orientation

diagnostic dès que l'hémoculture se positive. Une étude récemment publiée a ainsi mis en évidence des différences de ddp entre les différentes espèces de *Candida* avec le système Bactec® Plus Aerobic/F. Le ddp était significativement plus court pour *C. tropicalis*, et plus long pour *C. glabrata*, à la fois pour des hémocultures artificiellement inoculées, donc avec la même charge fongique initiale, et des hémocultures de patients (Huang *et al.*, 2013). D'autres études sont arrivées à la même conclusion avec ce même système d'hémoculture, certains auteurs appliquant même un seuil au-dessous duquel on pourrait éliminer la présence de *C. glabrata* : un ddp $\leq 56,5$ h avec une paire d'hémocultures Bactec® aérobie/anaérobie permettrait d'exclure une candidémie à cette espèce (Cobos-Trigueros *et al.*, 2013). Cette observation n'est pas retrouvée pour le système BacT/Alert® FA ou le flacon Bactec® Mycosis-IC/F.

Tableau XX. Délai de positivité (ddp) moyen retrouvé pour différents flacons d'hémocultures de patients dans différentes études (Adapté de Meyer *et al.*, 2004 ; Ericson *et al.*, 2012 ; Huang *et al.*, 2013).

Espèces	Délai de positivité moyen en heures +/- écart-type (n=nombre d'isolats)					
	Bactec® Plus Aerobic/F		BacT/Alert®FA	Bactec®Mycosis IC/F		
	Huang L. <i>et al.</i> , 2013	Meyer M.H. <i>et al.</i> , 2004	Ericson E.L. <i>et al.</i> , 2012	Meyer M.H. <i>et al.</i> , 2004	Ericson E.L. <i>et al.</i> , 2012	
<i>C. albicans</i>	42,2 ± 17,3 (n=31)	39,9 ± 23,7 (n=194)	40,0 ± 21,8 (n=68)	31,1 ± 23,3 (n=220)	57,4 ± 63,2 (n=68)	
<i>C. parapsilosis</i>	43,2 ± 12,1 (n=26)	24,4 ± 14,5 (n=51)	- -	32,0 ± 26,1 (n=60)	- -	
<i>C. glabrata</i>	62,7 ± 22,6 (n=16)	61,5 ± 31,4 (n=19)	37,3 ± 26,2 (n=10)	17,8 ± 9,1 (n=61)	12,9 ± 7,7 (n=10)	
<i>C. tropicalis</i>	22,1 ± 9,2 (n=11)	18,5 ± 11,7 (n=46)	- -	18,5 ± 16,3 (n=48)	- -	
<i>C. krusei</i>	21,9 (n=1)	26,7 ± 10,3 (n=28)	- -	22,7 ± 6,4 (n=35)	- -	
<i>C. famata</i>	42,7 (n=1)	31,9 ± 8,9 (n=15)	- -	36,1 ± 22,4 (n=16)	- -	
<i>C. guilliermondii</i>	42,1 (n=1)	- -	- -	33,0 (n=1)	- -	
<i>C. inconspicua</i>	- -	53,0 (n=1)	- -	34,8 ± 1,6 (n=3)	- -	
Autres	- -	- -	43,0 ± 27,2 (n=13)	- -	55,3 ± 80,3 (n=13)	
Total	39,5 (n=87)	36,6 (n=354)	40,1 ± 22,9 (n=91)	28,3 (n=444)	52,2 ± 63,5 (n=91)	

IV.1.3. Identification de l'espèce

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

IV.1.3.1. Milieux et techniques classiques d'identification

Le milieu de Sabouraud est le principal milieu utilisé en mycologie. Il est plus ou moins additionné d'antibiotiques tels que le chloramphénicol ou la gentamicine qui permettent d'inhiber la pousse d'éventuelles bactéries. Après 1 à 3 jrs à 37°C, les levures ont suffisamment poussé pour permettre une identification. L'aspect macroscopique et microscopique des colonies peut donner une indication sur l'espèce, mais il est impossible de faire une identification d'espèce sur ces seuls critères. A titre d'exemple, *C. krusei* pousse en colonies d'aspect très mat et a un aspect allongé en microscopie. Si plusieurs espèces sont présentes, il peut être très délicat de les distinguer. Des milieux chromogènes peuvent être utilisés pour permettre une première orientation du diagnostic d'espèces. Ces milieux contiennent des substrats chromogéniques qui révèlent une activité enzymatique plus ou moins spécifique d'espèce (β -galactosaminidase, β -glucosidase, phosphatases...) en conférant aux colonies une coloration variable en fonction du type de milieu utilisé. À titre d'exemple, le milieu *Candida* ID 2® (Biomérieux) permet de mettre en évidence le complexe *albicans/dublinsiensis* par la couleur bleue, alors que ces levures seront de couleur rose à violet sur le CandiSelect® 4 (Biorad). Ces milieux permettent de distinguer des espèces différentes de *Candida* dans un même prélèvement et de gagner du temps pour l'identification de l'espèce en orientant les tests complémentaires à réaliser.

Plusieurs tests dits « classiques » peuvent être utilisés sur des colonies isolées. Ces techniques ne nécessitent pas de technologies particulières et peuvent donc être utilisées dans n'importe quel laboratoire de Mycologie médicale.

- Test de blastèse ou test de filamentation en serum (2h) - orientation diagnostique

Ce test est basé sur la capacité de *C.albicans* à produire des tubes germinatifs. Une incubation de 2h à 37°C dans un serum décomplémenté suffit à observer la présence de tubes germinatifs sans étranglement à leur base, relativement spécifique de *C. albicans*. Ce test ne permet qu'une orientation diagnostique puisque certaines souches de *C. albicans* ne produisent pas de filaments, et d'autres espèces peuvent produire des pseudo-filaments avec

une constriction à leur base qui peuvent être confondus avec les tubes germinatifs de *C. albicans*. Surtout, il ne permet pas de distinguer *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

- Test de pseudo-filamentation et de chlamydosporulation sur lame (24 - 48h) - orientation diagnostique

Ce test est réalisé sur un milieu de culture pauvre, tels que le PCB (pomme de terre, carotte, bile) ou le RAT (riz, agar, tween) que l'on incube 24 à 48 heures entre 25 et 28°C. On peut alors mettre en évidence pour *C. albicans* et *C. dubliniensis* la présence de chlamydospores, formes de résistances. La production ou non de pseudofilaments permet également d'orienter le diagnostic vers certaines espèces. Un des facteurs limitant l'utilisation de ce test est le délai supplémentaire nécessaire à sa réalisation.

- Tests immunologiques rapides (quelques minutes) - diagnostic d'espèce

Ces tests plus onéreux sont basés sur une réaction d'agglutination antigène/anticorps, les particules de latex étant sensibilisées avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de paroi. Ces tests sont disponibles pour l'identification de *C. albicans* (Bichrolatex®, Fumouze diagnostics), *C. dubliniensis* (Bichro-dubli®, Fumouze diagnostics) et *C. krusei* (Krusei-color® Fumouze diagnostics). Leur spécificité est élevée et le résultat immédiat (Freydiere *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 2012).

- Tests rapides enzymatiques (20 min) – diagnostic d'espèce

Un test rapide permet l'identification de *C. glabrata* en détectant la tréhalase par une réaction colorée issue de l'hydrolyse du tréhalose (Rapid Trehalose Test® Fumouze diagnostics). L'hydrolyse du maltose est également testée : positive elle élimine *C. glabrata* (*C. tropicalis* pouvant par exemple hydrolyser le tréhalose mais aussi le maltose). Ce test possède une bonne spécificité puisque même *C. nivariensis* et *C. bracarensis*, très proches de *C. glabrata*, ne semblent pas donner de résultats faussement positifs avec ce test (Fraser *et al.*, 2012)

- Galeries d'identification (24 – 72 h) - diagnostic d'espèce

Lorsque les tests précédents n'ont pas permis d'identifier l'espèce des galeries d'identification sont utilisées. Elles analysent l'assimilation des sucres (auxanogramme) ou leur fermentation (zymogramme) avec ou non, selon le système utilisé, une détection d'enzymes associée. Le profil obtenu est ensuite comparé à une base de données fournie par

le fabricant. La galerie la plus utilisée est l'API ID32C[®] qui permet d'identifier 63 espèces. Ses performances seraient bonnes pour les espèces les plus fréquentes de levures isolées du sang mais serait beaucoup moins performante pour les espèces plus rares (94% vs 56% d'identifications correctes en prenant comme référence la biologie moléculaire) (Meletiadiis *et al.*, 2011). La galerie Auxacolor[®] également utilisée à Nantes offrirait aussi de bonnes performances avec 95% d'identifications correctes mais seulement 43% sur les espèces rares, en comparaison à la biologie moléculaire (Meletiadiis *et al.*, 2011). Ceci s'explique notamment par le fait que beaucoup d'espèces rares récemment décrites ne sont pas différenciables par des méthodes biochimiques, mais seulement par biologie moléculaire. Toutefois, certaines études indiquent des problèmes d'identification par ces galeries pour des espèces fréquentes telles que *C. krusei* ou *C. tropicalis* (Seyfarth *et al.*, 2012). Il existe un système de galeries compatibles avec l'automate Vitek[®] pour l'identification des levures. Elles permettraient une identification correcte de 92% des espèces communes et 64% des espèces rares en prenant la biologie moléculaire comme référence. Des études réalisées sur des souches de *Candida* isolées d'hémocultures relevaient 91% d'identifications correctes (Vijgen *et al.*, 2011) mais seulement 76% pour les *Candida non – albicans* (Pulcrano *et al.*, 2013). Des problèmes d'identification d'espèces fréquentes telles que *C. glabrata* ont été rapportés comme dans une étude de 2004 où 27,8% des souches de cette espèce étaient mal identifiées (Massonet *et al.*, 2004).

On peut estimer que plus de 90% des souches sont identifiées correctement par les méthodes classiques d'identification. Un travail de thèse réalisé à Nantes dans le cadre de l'étude EPICANDI a montré que plus de 95% des souches étaient correctement identifiées en se référant à la biologie moléculaire, la précision de l'identification diminuant pour les espèces moins fréquentes.

La réalisation d'hémocultures, possède des performances limitées en termes de sensibilité et ne permet pas un diagnostic précoce (1 à 5 jrs) alors que la mise en place rapide d'un traitement antifongique est primordiale.

L'identification de l'espèce en cause, indispensable à l'adaptation du traitement, nécessite 1 à 3 jrs de culture auxquels s'ajoutent 1 à 3 jrs pour la réalisation des tests phénotypiques classiques. Ces techniques permettent une bonne identification mais les erreurs ne sont pas rares et peuvent mener à un traitement antifongique inapproprié lorsqu'elles concernent des espèces qui présentent naturellement une résistance aux antifongiques.

IV.1.3.2. MALDI-TOF

Le MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight) est une technique basée sur la spectrométrie de masse, en plein essor en mycologie pour l'identification des espèces fongiques. Cette technique ne s'intéresse pas au génome du micro-organisme mais à son protéome : il permet d'obtenir un spectre protéique de la souche à identifier. Ce spectre est ensuite comparé à une base de données de spectres de référence, ce qui permet d'obtenir une correspondance avec une espèce associée à un score qui reflète la fiabilité de l'identification. Les principaux avantages de cette technique sont sa rapidité et sa facilité de mise en œuvre mais surtout, un temps d'analyse très court, de moins d'une heure.

Le MALDI-TOF est de plus en plus répandu dans les laboratoires hospitaliers, comme c'est le cas depuis peu au CHU de Nantes où il est utilisé aujourd'hui en routine pour l'identification des levures. On commence ainsi à avoir une idée plus précise des performances de cette technique. Une revue de la littérature sur le MALDI-TOF en tant qu'outil d'identification des levures a été récemment publiée (Bader, 2013). Dans cette étude, les taux de succès cumulés sont de 95,7% avec le MALDI Biotyper™ (16 études), 98,4% avec le système SARAMIS™ (4 études), 98,4% pour le VITEK® MS (1 étude partiellement financée par le fabricant) et 100% pour Andromas™ (1 étude réalisée par le fabricant). Pour ce dernier système, une nouvelle étude réalisée sur 1383 isolats retrouve une identification correcte dans 98,3% des cas (Lacroix *et al.*, 2013). Ce qui ressort de ces études est l'absence d'erreurs majeures, les espèces non représentées dans la base de donnée étant rendues comme inconnues et non identifiées à tort. De plus, cette méthode permet, au même titre que la biologie moléculaire, d'identifier les souches proches phénotypiquement telles que *C. albicans* et *C. dubliniensis* par exemple. Lorsque l'on prend comme référence la biologie moléculaire, cette technique est supérieure aux techniques d'identification classiques.

Plusieurs équipes ont travaillé sur l'identification des espèces de levures directement à partir d'un flacon d'hémoculture positive. La présence de substances dans le milieu de culture et le sang du patient perturbent le processus d'identification par spectrométrie de masse, les spectres pouvant se superposer avec les spectres de levures. Quelques équipes ont donc mis au point des procédés de purification à réaliser en amont de l'analyse (Bader, 2013). En revanche, le problème posé par la présence de plusieurs espèces n'est pas résolu à l'heure actuelle (Lavergne *et al.*, 2013). Les performances de ce type de techniques, principalement

évaluées sur des hémocultures artificiellement inoculées, semblent prometteuses mais les protocoles de purification ne sont pas encore standardisés. Il existe tout de même un kit commercialisé, le sepsityper® (Bruker Daltonics). D'autres études sont nécessaires pour appliquer cette technique en routine.

Tout comme la biologie moléculaire, la limite principale concerne la base de donnée de spectres qui peut contenir des erreurs. L'autre limite reste le coût d'achat d'un tel appareil pour une plateforme de microbiologie, même si, une fois installé, le coût d'analyse est faible, d'environ 0,50 euros par identification (Dhiman *et al.*, 2011).

IV.1.3.3. Biologie moléculaire

La PCR permet également l'identification des espèces fongiques à partir de colonies isolées dans des laboratoires spécialisés. Elle est réservée aux problèmes d'identification de souches isolées de prélèvements profonds telles que les hémocultures lorsque les techniques citées précédemment n'ont pas permis de conclure.

- **Principe**

Il est nécessaire d'utiliser des amorces qui amplifient une région suffisamment conservée au sein du règne fongique mais au sein de laquelle il existe une variabilité suffisante pour différencier les espèces entre elles, mais aussi suffisamment stable au sein d'une même espèce pour affirmer le diagnostic d'espèce. Les régions d'ADNr codant pour les sous-unités 18S, 5,8S et 28S de l'ARNr sont bien conservées. Ces trois domaines sont séparés par deux régions variables non codantes sujettes à polymorphisme, appelées ITS (Internal Transcribed Spacer) : ITS1 et ITS2 (figure 16). Ces régions ITS sont répétées plusieurs fois au sein du génome fongique (50 à 100 copies) ce qui facilite leur détection. Lorsque l'analyse de ces régions n'est pas suffisamment discriminante, il est parfois nécessaire d'amplifier et de séquencer d'autres loci comme la région D1/D2 qui correspond à la grande sous-unité de l'ADNr, ou encore des régions de l'ADN mitochondrial (Mannarelli & Kurtzman, 1998; Mahe *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012).

Il est alors possible de réaliser une PCR panfongique suivie d'un séquençage des produits d'amplification, technique utilisée au CHU de Nantes. Plusieurs amorces

panfongiques ont été dessinées à partir des régions codant pour les sous-unités 18S, 5.8S et 28S (tableau XXI). Les séquences sont ensuite comparées aux séquences de la base de donnée GenBank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)), la plus utilisée, par alignement des séquences grâce au logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

Une limite à l'utilisation de la PCR comme outil d'identification de référence est la base de donnée qui est alimentée sans contrôle des séquences déposées ni mise à jour en cas de changement de taxonomie d'une espèce. Une nouvelle base de données, réservée à l'identification des espèces fongiques, vient justement d'être créée pour « filtrer » les séquences (Mahe *et al.*, 2012).

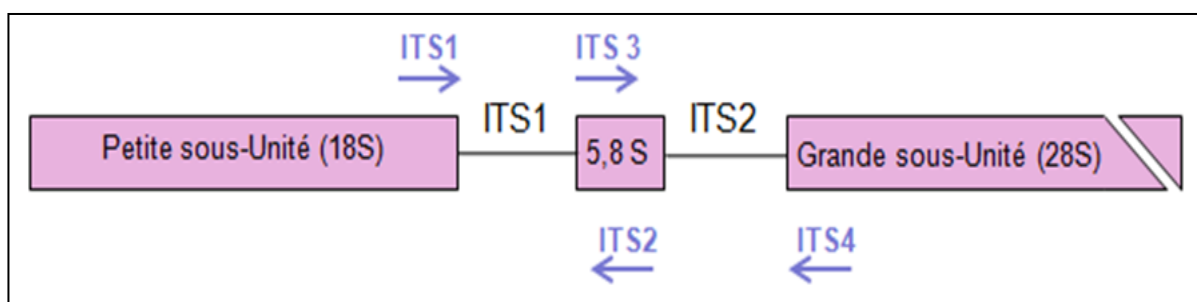


Figure 16. Schéma des régions 18S, 5,8S et 28S de l'ADNr fongique (Adapté de White *et al*, 1990).

Tableau XXI. Amorces panfongiques permettant l'amplification des régions ITS de l'ADNr fongique (Adapté de White *et al*, 1990).

Amorce	Séquence 5' → 3'
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

- Délai de rendu du résultat

Le délai de rendu du résultat dépend des technologies de PCR dont dispose le laboratoire, ainsi que de leur disponibilité.

L'étape d'extraction de l'ADN à partir des colonies de levures peut être longue et fastidieuse lorsque l'on ne dispose pas de système automatisé. Cette étape peut être supprimée. On parle alors de « PCR colony », c'est-à-dire que l'on dépose directement la colonie à identifier dans le tube contenant le mix réactionnel de PCR. Cette technique a permis l'identification de 395 souches parmi 403 testées dans le cadre de l'étude EPICANDI (Gicquel, 2011). Concernant l'étape de PCR, le temps nécessaire à l'amplification est de 2-3h.

Certaines techniques ne nécessitent pas de séquençage des produits de PCR pour identifier la souche. Ceci permet un gain de temps considérable, la disponibilité d'un séquenceur n'étant pas forcément quotidienne. Le résultat de l'identification à partir d'une colonie isolée peut alors être obtenu dans la journée. Ainsi, des équipes ont développé des stratégies pour ne cibler que certaines espèces, par exemple des espèces proches phénotypiquement, afin de les différencier. Il existe par exemple des PCR ciblées pour distinguer *C. albicans* et *C. dubliniensis* (Ahmad *et al.*, 2012), les espèces du complexe « *parapsilosis* » (Souza *et al.*, 2012) ou encore *C. nivariensis*, *C. bracarensis* et *C. glabrata* (Romeo *et al.*, 2009). De nombreuses mises au point de techniques de PCR « maison » utilisant des technologies variées ont été développées pour identifier, sans recourir au séquençage, quelques espèces communément isolées (Guiver *et al.*, 2001; Bergman *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009; Liguori *et al.*, 2010). Des systèmes encore plus performants, communément appelés « puces oligonucléotidiques », permettent l'identification de plusieurs dizaines d'espèces de *Candida*. En pratique, une PCR panfongique est réalisée puis le produit de PCR est hybridé avec un panel d'amorces préalablement fixées sur un support solide comme une membrane de nylon (Leaw *et al.*, 2007) ou des plaques de verre (Ferrari *et al.*, 2013), la méthode de révélation variant selon les technologies utilisées. Ces systèmes ouverts sont moins adaptés à la mycologie médicale où les agents pathogènes peuvent être également des champignons de l'environnement.

Certaines équipes ont travaillé sur l'identification des levures directement à partir de flacons d'hémocultures positives pour s'affranchir du délai de subculture nécessaire à l'obtention de colonies isolées. Plusieurs études concluantes ont été publiées, les différences entre les techniques étant nombreuses, chaque laboratoire utilisant sa propre technique d'extraction en y associant sa propre technique de PCR (Metwally *et al.*, 2007; Hsiue *et al.*, 2010; Aittakorpi *et al.*, 2012).

L'utilisation de la biologie moléculaire est la méthode de référence d'identification des espèces de *Candida* à partir de colonies isolées. Les performances excellentes du MALDI-TOF en termes de précision et de rapidité (~ 1h) en font une technique de choix, son utilisation étant tout de même restreinte à une certaine catégorie de laboratoires.

Ces deux techniques permettent une identification plus rapide, d'autant plus lorsqu'elles sont réalisées directement à partir de l'hémoculture positive, mais elles ne permettent pas de s'affranchir du manque de sensibilité et du délai de positivité des hémocultures.

IV.2. Méthodes de diagnostic indirect

L'objectif de ces techniques est d'identifier les cas de candidoses invasives qui ne sont pas mis en évidence par la réalisation d'hémocultures et de détecter plus précocement les cas confirmés ensuite par des hémocultures positives. Seuls les tests les plus couramment utilisés et donc les plus étudiés seront mentionnés.

IV.2.1. Antigène mannane et anticorps anti-mannane

Le mannane est un composant majeur de la paroi cellulaire de *Candida spp.* qui est relargué dans la circulation sanguine en cas d'infection invasive. Un test ELISA (Platelia™ *Candida* Ag Plus; Bio-Rad) permet de détecter la présence de mannane circulant dans le serum des patients infectés. Les anticorps anti-mannane sont également détectables dans la circulation avec le kit Platelia™ *Candida* Ag Plus (Bio-Rad). Les antigènes sont détectés plus précocement mais sont rapidement éliminés dans la circulation, de façon concomitante à l'apparition des anticorps, justifiant une utilisation combinée des deux tests. Une revue de la littérature publiée en 2012 (Marchetti *et al.*, 2012) rapportait en effet une sensibilité d'environ 60% seulement pour les tests pris de façon isolée, et de 83% pour leur utilisation combinée (tableau XXII). Cette revue concernait les anciennes versions de ces deux tests. Les dernières versions citées précédemment (« Plus »), n'utilisent pas les mêmes cut-offs et doivent être évaluées dans de nouvelles études cliniques. Deux études récentes ont justement été publiées sur ces nouvelles versions. Des performances équivalentes aux anciennes versions ont été

mises en évidence par l'équipe de Held, avec une sensibilité et une spécificité de 58,9% et 97,5% pour la détection du mannane, et de 62,5% et 65% pour la détection de l'anticorps. En abaissant le seuil de positivité pour la détection antigénique, la sensibilité était améliorée mais restait faible, à 69,6%, avec une spécificité de seulement 93,5% (Held *et al.*, 2013).

Tableau XXII. Valeurs compilées de sensibilité et de spécificité de la détection de l'antigène mannane et de l'anticorps anti-mannane, séparée et combinée (Adapté de Marchetti *et al.*, 2012).

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Mannane	58	93
Anti-mannane	59	83
Mannane ET anti-mannane	83	86

La sensibilité varie selon l'espèce de *Candida*, l'anticorps monoclonal utilisé étant généré par immunisation de rats par *C. albicans*. Elle est généralement meilleure pour *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. glabrata* (Marchetti *et al.*, 2012), et très mauvaise pour d'autres comme *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* (Held *et al.*, 2013) ou encore *C. krusei* (Fujita *et al.*, 2006). Ces dernières espèces ne sont pas détectées, expliquant en partie la faible sensibilité. La combinaison des deux tests limite la faible sensibilité de la détection des anticorps anti-mannanes chez l'immunodéprimé.

La faible spécificité peut s'expliquer par des faux-positifs pouvant survenir dans plusieurs situations : les taux d'antigène mannane, voir ceux des anticorps anti-mannane, peuvent être significativement plus élevés chez des patients ayant eu une chirurgie abdominale dans les 4 semaines précédant le prélèvement ou chez des patients colonisés à *Candida spp* (Lunel *et al.*, 2011; Held *et al.*, 2013).

Malgré ces limites, l'ESCMID recommande l'utilisation combinée de ces tests en complément des hémocultures pour le diagnostic des candidémies. Le principal argument reste la possibilité de détecter une candidémie 6 jours environ avant la positivité d'une hémoculture. La bonne valeur prédictive négative >85%, est également un argument en faveur de leur utilisation pour éliminer une infection et limiter la consommation d'antifongiques.

IV.2.2. β -D-glucane

Le β -D-glucane est un composant de la paroi cellulaire de la majorité des champignons, à l'exception des zygomycètes et du genre *Cryptococcus*. Sa détection dans le sang des patients n'est donc pas spécifique des candidémies mais des infections fongiques invasives au sens large. Un seul kit approuvé par la FDA est disponible en Europe et aux USA, le kit Fungitell® (Capecod). La technique, basée sur l'activation de la cascade de la coagulation par le β -D-glucane, est complexe et coûteuse. Le test doit être répété deux fois par semaine et un seul test positif est indicatif d'une infection. De meilleurs résultats ont été obtenus avec deux tests consécutifs positifs, permettant alors une sensibilité de 100%, une spécificité de 75% et une valeur prédictive négative de 100% (Hanson *et al.*, 2012).

La sensibilité de ce test est >65% dans la plupart des études, avec une spécificité >80% mais surtout, une valeur prédictive négative >85%. Il serait plus performant chez les patients d'USI que chez les patients d'hématologie (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012). Une méta-analyse de 2011 rapportait une sensibilité de 57 à 97% et une spécificité de 56 à 93% pour le diagnostic des candidoses invasives (Karageorgopoulos *et al.*, 2011). Des faux-positifs peuvent être observés dans plusieurs situations qui rendent l'interprétation délicate dans la pratique clinique, comme l'hémodialyse, la chirurgie abdominale, les traitements par β -lactamines et les bactériémies concomitantes (Clancy & Nguyen, 2013). Malgré ces limites l'ESCMID recommande la réalisation de ce test deux fois par semaine pour le diagnostic des candidémies, l'absence de β -D-glucane permettant d'écarter une infection.

Les méthodes de diagnostic indirect sont surtout à considérer comme de bonnes techniques d'exclusion d'une candidémie. Les nombreux problèmes de faux-positifs n'en font pas des techniques de choix pour poser un diagnostic de candidémie.
--

IV.3. Apport de la biologie moléculaire pour un diagnostic précoce

L'utilisation de la biologie moléculaire en tant que méthode de diagnostic sensible et précoce de nombreuses infections est désormais largement développée au sein des laboratoires hospitaliers. Comme nous l'avons vu précédemment, la technique de référence de diagnostic des candidémies par hémoculture n'est pas satisfaisante, justement de par son manque de sensibilité et de précocité. La PCR semble alors être un outil intéressant à développer pour la détection directe de *Candida spp.* à partir d'un prélèvement sanguin, qui permettrait de s'affranchir des limites de la culture et de poser ainsi un diagnostic plus précoce de plusieurs jours (figure 17).

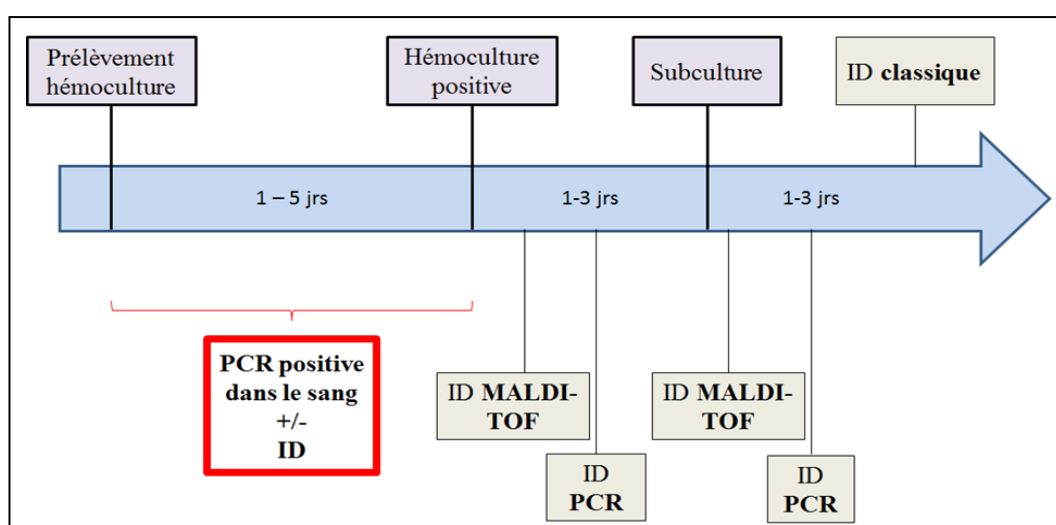


Figure 17. Place de la PCR en tant qu'outil diagnostique des candidémies.

ID = identification de l'espèce responsable de la candidémie.

Pourtant, malgré le grand nombre de PCR mises au point, la PCR n'est pas utilisée en routine pour le diagnostic des candidémies. La mise au point d'une PCR se heurte en effet à plusieurs difficultés telles que la réalisation d'une extraction efficace de l'ADN fongique ou encore des problèmes de contaminations dues à la présence de champignons environnementaux. Ce travail de thèse concerne la mise au point d'une technique d'extraction de l'ADN fongique et d'une PCR *Candida* à partir de sang total. Les différents points abordés dans ce chapitre permettent de mettre en évidence les paramètres à considérer pour ce type de mise au point.

IV.3.1. Rappels sur les techniques de PCR

On distingue les PCR classiques ou en point final, des PCR en temps réel. Avec la PCR classique, la mise en évidence des amplicons est réalisée à la fin de la réaction. De nombreuses techniques ont été mises au point pour permettre la détection des produits de PCR : migration électrophorétique des amplicons en gel, seule ou associée à une détection par ELISA, ou encore par Slot ou Southern Blot. Ces techniques ne seront pas détaillées ici, les développements actuels étant plutôt en faveur des PCR en temps réel.

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas à la fin mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Plusieurs technologies de PCR en temps réel ont été développées, les plus fréquemment utilisées étant la technologie SYBR® Green I et la technologie TaqMan®. Ces deux technologies ont été utilisées lors de ce travail. Les principes de ces deux techniques sont détaillés dans la figure 18.

Le SYBR® Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, sans spécificité par rapport à l'amplicon. Cette technologie ne nécessite pas de sondes et est donc applicable à tout couple d'amorce. Ceci lui confère un avantage économique et une facilité de mise au point mais la spécificité de la réaction ne repose que sur les amorces. Si les amorces forment des dimères ou présentent un défaut de sensibilité et qu'un amplicon non spécifique est amplifié, une fluorescence non spécifique sera observée. L'interprétation des courbes de fusion est alors primordiale pour vérifier que le bon gène a été amplifié. En effet, chaque produit d'ADN double brin synthétisé possède une température de fusion spécifique ou T_m (melting temperature), qui correspond à la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme double brin et l'autre moitié sous forme simple brin. Les courbes de fusion sont réalisées par augmentation progressive de la température dans les tubes de PCR au sein de l'automate à la fin du programme complet d'amplification. Les amplicons sont progressivement dénaturés jusqu'à ce que la température atteigne le T_m spécifique de l'amplicon. La dénaturation de l'amplicon provoque alors une diminution de la fluorescence qui peut être enregistrée.

La technologie Taqman® est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase. C'est l'hydrolyse d'un fragment nucléotidique, ou sonde, hybridé sur sa séquence cible qui permet l'émission de fluorescence. Ainsi, la fluorescence n'est émise qu'à condition que la sonde ne s'hybride correctement à la séquence cible : le design de la sonde et les conditions de température de l'étape de polymérisation doivent donc être parfaitement ajustés pour que la sonde reste hybridée pendant cette étape. Cette température se situe souvent autour de 60°C. À cette température, l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est optimale mais son activité de polymérase peut être réduite. Les concentrations en Mg²⁺ par exemple, ainsi que la durée de l'étape d'hybridation/polymérisation peuvent être modifiées pour obtenir des résultats optimaux. Concernant le design des sondes, un certain nombre de critères « théoriques » sont à prendre en compte (tableau XXIII). L'utilisation d'une sonde permet d'accroître la spécificité de la réaction par rapport au SYBR® Green, la spécificité de la sonde s'ajoutant à celle des amorces. Ainsi, la possibilité d'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou à des dimères d'amorces est considérablement réduite. De plus, l'utilisation de différents fluorochromes à l'extrémité des sondes permet la réaction de PCR multiplex, c'est-à-dire de PCR ciblant différents gènes au sein de la même réaction de PCR.

Pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la détection, la technique de PCR nichée ou nested-PCR peut être utilisée, en temps réel ou en point final. Cette technique permet de diminuer le risque d'amplification de séquences homologues non spécifiques grâce à l'utilisation de deux couples d'amorces (figure 19):

- Un couple d'amorces externes dont le manque de spécificité peut entraîner l'amplification d'un petit nombre de séquences homologues
- Un couple d'amorces internes qui permet d'amplifier spécifiquement une des séquences révélées par le couple d'amorces externes.

Une dizaine de cycles d'amplification est réalisée avec le couple d'amorces externes. A cette étape, une ou les deux amorces internes sont ajoutées en excès avant de prolonger l'amplification pour encore 25 cycles environ. Le principal inconvénient de ces techniques est le risque de contaminations croisées par des amplicons entre les deux étapes.

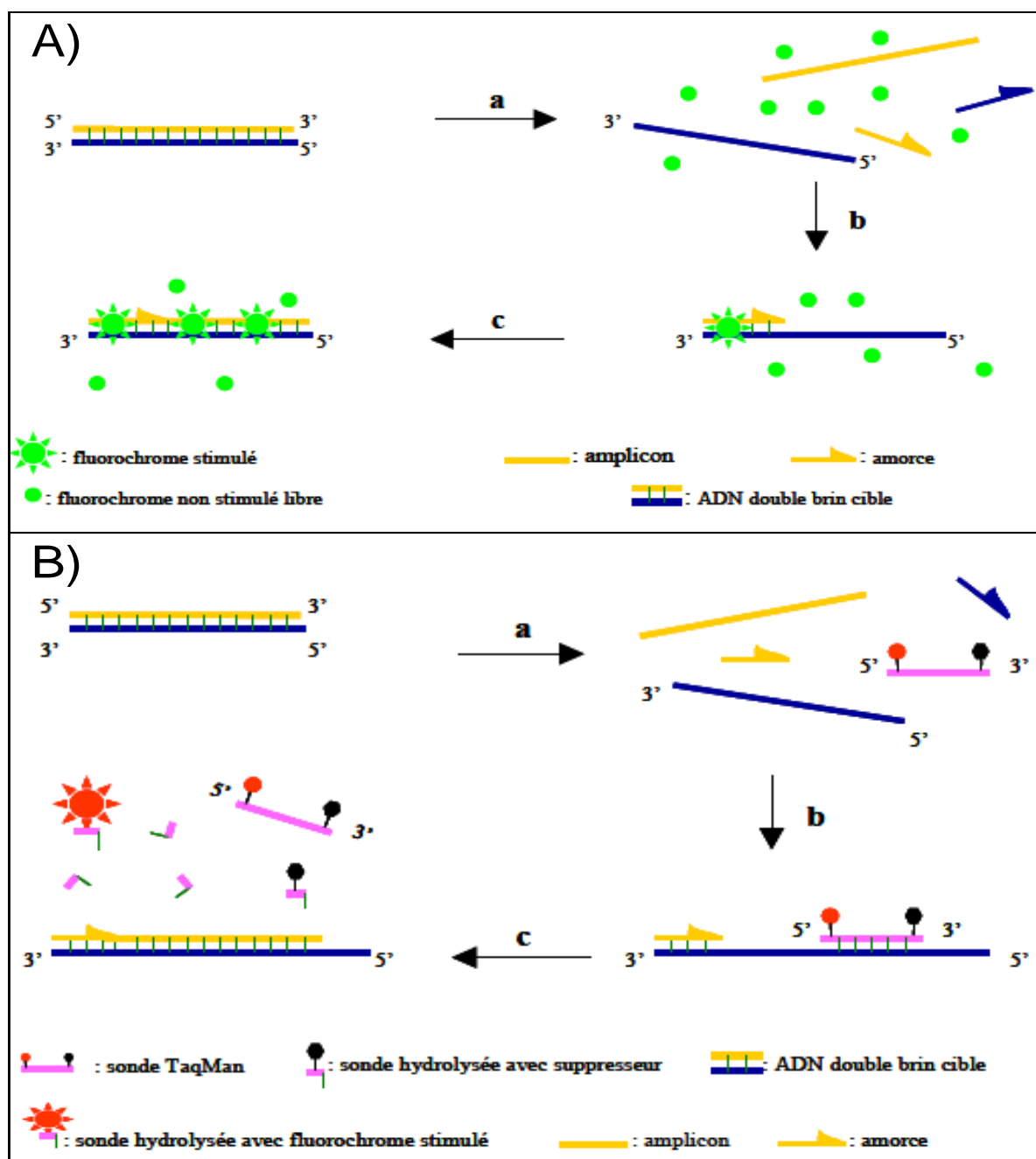


Figure 18. Principe de la PCR en temps réel SYBR® Green I et TaqMan® (Adapté de Poitras & Houde, 2002).

A) SYBR® Green I. a) Durant la dénaturation, le SYBR® Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel. B) TaqMan®. (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives. La proximité entre le fluorochrome émetteur de fluorescence (reporter) fixé en 5' de la sonde, et le fluorochrome inhibiteur de fluorescence (quencher) en 3', permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

Tableau XXIII. Principaux critères à prendre en compte pour le design d'une sonde TaqMan® (Adapté de Poitras & Houde, 2002).

Longueur: 20 à 40 nucléotides
% GC: 40 à 60%
Absence de séquence répétée
Absence de séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec l'amorce
Absence de GC en 5' (risque de suppression de la fluorescence de l'émetteur)
Tm 5 à 10°C > Tm de l'amorce (hybridation avec les amorces et stabilité pendant la polymérisation)



Figure 19. Principe de la PCR nichée.

Les PCR en temps réel utilisant le SYBR® Green I sont faciles à mettre au point et économiques, mais présentent l'inconvénient majeur d'un manque de spécificité contrairement à celles utilisant des sondes spécifiques de la technologie TaqMan®. Ces sondes offrent également des possibilités de multiplexage, avantage considérable pour le diagnostic des candidémies. Des PCR nichées peuvent être utilisées avec précaution pour augmenter la sensibilité et la spécificité des techniques de PCR en temps réel et en point final.

IV.3.2. De nombreuses mises au point : des stratégies très variées

IV.3.2.1. Choix de l'ADN cible

Une méta-analyse concernant les PCR mises au point pour le diagnostic des candidoses invasives et portant sur 54 études publiées entre 1993 et 2009, a récemment été publiée (Avni *et al.*, 2011). Les gènes cibles majoritairement utilisés sont les gènes codant pour l'ARNr (42/54) et plus particulièrement les régions 18S (32/54), 5,8S et 28S (8/54) et les régions variables ITS. Certaines équipes ont choisi d'utiliser pour cible les gènes *LIA1* du cytochrome P450 (6/54) ou encore les gènes *SAP*, *EO3*, *HSP*, *ERG11*, *CHS1*, et *ACT1*. L'essentiel est de choisir pour cible une région suffisamment conservée au sein du règne fongique mais au sein de laquelle il existe une variabilité suffisante pour différencier les espèces entre elles. Les gènes présents en plusieurs copies au sein du génome sont à privilégier pour garantir une limite de détection très basse. L'utilisation de gènes codant pour l'ARNr ou le cytochrome P450 sont associées à une meilleure sensibilité (Avni *et al.*, 2011).

IV.3.2.2. Choix du prélèvement biologique

La détection par PCR de *Candida spp.* peut être réalisée à partir de sang total, de serum ou de plasma, frais ou congelés. Presque toutes les études rassemblées dans cette méta-analyse ont été réalisées sur du sang congelé. Il n'y a donc aucun argument en faveur ou défaveur de l'utilisation de sang frais plutôt que de sang congelé. Plusieurs études ont évoqué une supériorité du serum ou du plasma vis-à-vis du sang total (Bougnoux *et al.*, 1999; Metwally *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012). Cependant, la mise au point au laboratoire d'une PCR-DEIA sur serum avait révélé la possibilité de faux-positifs chez des patients fortement colonisés au niveau digestif par *Candida spp.*, diminuant ainsi la valeur prédictive positive de la technique (Lièvre, 2003). Ce phénomène est probablement dû à la translocation d'ADN de *Candida* au travers de la muqueuse digestive. La méta-analyse de 2011 montrait une supériorité du sang total vis-à-vis du serum, sans distinction par rapport au type d'extraction utilisée (Avni *et al.*, 2011).

IV.3.2.3. Choix des espèces détectées

Les techniques de PCR utilisées pour le diagnostic des candidémies à partir d'un prélèvement de sang dérivent des PCR mises au point pour l'identification des espèces fongiques à partir de colonies isolées ou d'hémocultures positives. Ces PCR ont nécessité des adaptations, notamment pour améliorer leur sensibilité, la quantité d'ADN fongique de départ étant beaucoup plus faible. Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, les amorces et les sondes utilisées peuvent être dessinées de façon à mettre en évidence n'importe quelle espèce de champignon (amorces panfongiques), ou bien des genres/espèces en particulier.

Des PCR panfongiques ont été développées pour permettre la détection aussi bien des levures que des filamenteux dans le sang. Des techniques ont été mises au point en point final (El-Mahallawy *et al.*, 2006; Moreira-Oliveira *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2006), comme en temps réel (Jordanides *et al.*, 2005). L'identification de l'espèce fongique n'est alors possible qu'après séquençage. Le principal avantage de ces techniques est bien sûr la détection des fongémies au sens large en une seule réaction. A l'inverse, ceci peut être un inconvénient puisque de l'acide nucléique présent dans l'environnement, voir même dans les réactifs de laboratoire (Loeffler *et al.*, 1999), peut être amplifié et entraîner des résultats faussement positifs.

De nombreuses PCR spécifiques du genre *Candida* ont été mises au point, en point final et en temps réel, la plupart ne détectant que les espèces les plus fréquentes. En point final, l'identification se fait alors grâce à la taille des amplicons après leur migration électrophorétique en gel (Talluri *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 2002), ou grâce à des sondes spécifiques en associant la PCR à une technique enzymatique (Flahaut *et al.*, 1998; Lièvre, 2003; Badiee *et al.*, 2009), à une technique de Slot ou de Southern Blot (Jordan, 1994; Flahaut *et al.*, 1998; Polanco *et al.*, 1999), ou encore par une technique de REA (Restriction Enzyme Analysis) (Morace *et al.*, 1999). En temps réel, l'identification se fait grâce à l'analyse des courbes de fusion pour le SYBR® Green (White *et al.*, 2003; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007; Dunyach *et al.*, 2008; Fricke *et al.*, 2010) et grâce à l'utilisation de sondes spécifiques d'espèces pour la technologie TaqMan® (Innings *et al.*, 2007; McMullan *et al.*, 2008). Il existe également des PCR qui permettent la détection de genres différents dans le sang, associant par exemple la détection de plusieurs espèces de *Candida* à la détection de plusieurs

espèces d'*Aspergillus* (Einsele *et al.*, 1997; Hebart *et al.*, 2000; Loeffler *et al.*, 2000; Bu *et al.*, 2005; Klingspor & Jalal, 2006; Badiee *et al.*, 2009).

Quelques kits commerciaux sont disponibles pour la détection de levures pathogènes à partir d'un prélèvement sanguin, le plus connu étant le kit SeptiFast®, qui utilise la technologie de PCR en temps réel LightCycler® développée par Roche. Il a été conçu pour détecter plus d'une vingtaine d'agents pathogènes bactériens ou fongiques dont *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*. L'ESCMID ne recommande pas le kit SeptiFast® pour le diagnostic des candidémies puisque, même si certaines études rapportent des cas de candidémies diagnostiquées avec ce kit, peu ont été réalisées sur un grand nombre de candidémies. La méta-analyse de 2011 concernant le diagnostic des candidoses invasives par PCR retrouve d'ailleurs une meilleure sensibilité lorsqu'une PCR « maison » est préférée au kit SeptiFast® (Avni *et al.*, 2011). Les autres kits tels que le SepsiTst® (Molzym), le Magicplex™ Sepsis Real-Time Test (Seegene), le VYOO® (SIRS Lab) sont également conçus pour détecter de nombreuses espèces bactériennes et fongiques à partir de sang total. Le SepsiTst® et le kit VYOO® utilisent des PCR panfongiques et panbactériennes, la PCR étant positive si le patient présente une bactériémie et/ou une fongémie, sans précision sur le type de septicémie. Le MagicPlex™ Sepsis Real-Time Test permet quant à lui, en plus de PCR à large spectre, de détecter sans séquençage plusieurs espèces de *Candida* : *C. albicans*/*C. tropicalis*/*C. parapsilosis* d'une part et *C. glabrata*/*C. krusei* d'autre part, les autres espèces étant détectées par une PCR Panfongique. Peu d'études concernant le diagnostic des candidémies ont été réalisées avec ces derniers kits.

IV.3.3. Des performances encourageantes

Dans la méta-analyse publiée en 2011, la sensibilité de la PCR est de 100 % (12 études) ou comprise entre 77% et 93% (3 études), avec une spécificité de 100%, lorsque l'on s'intéresse aux candidémies prouvées par rapport aux individus sains (Avni *et al.*, 2011). La sensibilité et la spécificité sont de 95% et 92% respectivement lorsque l'on considère les candidémies prouvées par rapport aux individus à risque (49 études). Pour cette dernière population, la sensibilité est meilleure (98%) lorsque l'on sélectionne les études possédant les critères suivants (23 études): l'utilisation de sang total, l'utilisation de gènes codant pour

l'ARNr ou le cytochrome P450 comme cibles de la PCR, une limite de détection inférieure à 10 CFU/mL et une PCR utilisée autre que le kit SeptiFast®.

Le taux de positivité de la PCR est significativement supérieur à celui des hémocultures chez les patients ayant une candidose invasive prouvée ou probable (critères EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)) : 85% de PCR positives contre 38% d'hémocultures positives. Lorsque l'on s'intéresse aux candidémies prouvées et probables par rapport à une population à risque, les performances restent bonnes, avec une sensibilité et une spécificité de 93% et 95% respectivement. La sensibilité de la PCR chute logiquement à 73% lorsque l'on prend également en compte les patients avec une candidose invasive possible, mais la spécificité est maintenue à 95%.

Selon les techniques mises au point, la limite de détection se situe entre 1 à 200 CFU/mL. Une limite de détection <10 CFU/mL est associée à une meilleure sensibilité. La PCR serait positive plus précocément que les signes cliniques ou les hémocultures dans un délai allant de 1 jour à 4 semaines selon les études.

Aucune de ces études ne s'est intéressée à la sensibilité de la PCR sous antifongiques en curatif ou préventif, ne permettant pas de tirer de conclusions à ce sujet. La réalisation de prélèvements multiples ne diminuerait pas la spécificité voir l'améliorerait. La colonisation à *Candida spp.* pourrait diminuer la spécificité mais trop peu d'études permettent de l'affirmer.

Avec une sensibilité et une spécificité >95%, les techniques de PCR présentent des performances attrayantes pour un diagnostic précoce des candidémies. Un certain nombre de critères semblent préférables :

- l'utilisation de sang total
- l'utilisation de gènes codant pour l'ARNr ou le cytochrome P450 comme cibles
- une limite de détection <10 CFU/mL
- l'utilisation d'une PCR « maison »
- la multiplication des prélèvements.

IV.3.4. Les MIQE, un pas vers la standardisation des techniques

Avec un recul de plus de 15 ans et des performances rapportées meilleures que les méthodes de diagnostic indirect, la PCR n'est pas recommandée à l'heure actuelle pour le diagnostic des candidémies, en lien avec un manque de standardisation des techniques (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012). La grande diversité des techniques développées et l'absence de contrôles expérimentaux standardisés rend effectivement difficile leur évaluation et leur comparaison. On note tout de même depuis les années 2000 une plus grande homogénéité des techniques développées (Avni *et al.*, 2011).

La volonté de standardisation des techniques de PCR est une préoccupation actuelle. Des recommandations pratiques, les MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), ont d'ailleurs été publiées afin d'établir une sorte de consensus pour le développement des PCR en temps réel (Bustin *et al.*, 2009; Bustin *et al.*, 2010). Ces MIQE recommandent de respecter certains critères et de les faire figurer lors de la soumission pour la publication d'une nouvelle technique. Au-delà d'une plus grande transparence et d'une meilleure analyse des résultats de PCR publiés, le respect de ces MIQE peuvent permettre une comparaison plus aisée des techniques entre différents laboratoires.

En se basant sur ces MIQE, un travail récent a été réalisé pour évaluer la qualité des études publiées ces 10 dernières années en matière de diagnostic fongique par PCR, incluant les PCR panfongiques, *Candida spp.*, *Pneumocystis sp.* et *Aspergillus sp.* (Khot & Fredricks, 2009). Le but de cette étude était de mieux comprendre les variables analytiques qui peuvent influencer les performances de ce type de PCR. Nous ne citerons que les critères de PCR à respecter sur lesquels l'accent a été mis pour les PCR fongiques (Bustin *et al.*, 2009; Khot & Fredricks, 2009; Bustin *et al.*, 2010)

IV.3.4.1. Limiter les faux-positifs

S'ajoute aux risques bien connus de contaminations croisées lors des réactions de PCR, le risque de contamination par des champignons saprophytes de l'environnement. Elle peut se produire à chaque étape de la PCR, les réactifs commerciaux de PCR pouvant même être contaminés (Loeffler *et al.*, 1999). Les précautions à prendre sont identiques à celles prises pour n'importe quelle PCR (principe de marche en avant, utilisation d'UNG et réactifs DNA free pour éviter les contaminations croisées) associées à un travail sous hotte à flux

laminaire et une éventuelle décontamination des réactifs. **Un témoin ne contenant pas d'ADN cible est indispensable pour vérifier l'absence de contamination (NTC : Non Amplification Control).**

Les amorces/sondes peuvent s'hybrider de façon non spécifique avec de l'ADN humain, de l'ADN fongique ou de l'ADN d'autres micro-organismes non ciblés. Il est donc recommandé de tester la spécificité des couples d'amorces et des sondes *in silico* (BLAST) puis *in vitro* sur des extraits d'ADN humain et d'un panel de microorganismes. **Un témoin contenant de l'ADN non ciblé par les amorces et sondes peut être utilisé pour vérifier l'absence de dégradation de la sonde (NAC : Non Amplification Control).**

IV.3.4.2. Limiter les faux-négatifs

Il est recommandé d'utiliser des gènes présents en plusieurs copies (ARNr par exemple), d'optimiser les volumes de prélèvement initial, d'élution, du mix final de PCR, afin d'augmenter la sensibilité analytique de la technique. **L'utilisation de témoins positifs contenant de l'ADN cible en faible quantité est indispensable.**

L'utilisation d'un témoin interne d'amplification est recommandée afin de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'extrait d'ADN (IAC : Internal Amplification Control).

La présence de deux espèces, dont l'une serait en grande quantité par rapport à l'autre, pourrait entraîner une réaction faussement négative pour l'espèce en faible quantité dans le cadre d'une PCR multiplex. **Il est donc nécessaire de tester l'influence de la présence simultanée de plusieurs espèces ciblées.**

IV.3.5. L'extraction de l'ADN fongique, une étape clé mal évaluée

Un point critique a été particulièrement détaillé dans la revue de Khot et Fredricks : les techniques d'extraction de l'ADN fongique préalables à la réalisation de la PCR. Une évaluation précise de la technique choisie est fortement recommandée pour cette étape déterminante dans la sensibilité et la spécificité de la PCR.

IV.3.5.1. Rappel des techniques utilisées

- **A partir du serum**

L'extraction d'ADN à partir du serum ne nécessite pas de pré-traitement de l'échantillon. Il s'agit d'extraire de l'ADN libre, c'est-à-dire de l'ADN qui se trouve à l'extérieur des cellules fongiques. La procédure d'extraction ne nécessite donc que la séparation de l'ADN par rapport aux protéines sériques, suivie de sa purification. Les techniques manuelles ont peu à peu été remplacées par l'utilisation de kits commerciaux, plus rapides (Maaroufi *et al.*, 2004; Dunyach *et al.*, 2008; McMullan *et al.*, 2008). L'extraction est automatisable et dure généralement moins d'une heure.

- **A partir du sang total**

L'extraction d'ADN fongique à partir de sang total est plus compliquée puisqu'elle nécessite l'extraction d'ADN fongique à partir de levures entières présentes en faible quantité. Certaines équipes extraient directement l'ADN fongique grâce à des kits commerciaux conçus pour l'extraction d'ADN humain à partir de sang total ou d'ADN de levures à partir de cultures (Nguyen *et al.*, 2012). La plupart des équipes préfèrent une extraction divisée en deux étapes : l'extraction sélective du culot de levures puis l'extraction de l'ADN fongique à partir des sphéroplastes après la lyse de la paroi fongique (figure 20). Ces techniques permettent notamment de limiter l'extraction concomitante d'inhibiteurs de PCR tels que l'hémoglobine.

Les méthodes utilisées les plus fréquemment pour extraire le culot de levures sont des méthodes qui dérivent d'une technique manuelle décrite en 1997 : brièvement, une lyse hypotonique des hématies est suivie d'une lyse enzymatique des leucocytes par une solution tampon contenant de la protéinase K, puis d'une centrifugation permettant l'obtention d'un culot contenant les levures entières, résistantes aux tampons de lyse utilisés (Einsele *et al.*, 1997; Van Burik *et al.*, 1998; Hebart *et al.*, 2000; Maaroufi *et al.*, 2003; Bu *et al.*, 2005; Jordanides *et al.*, 2005; Moreira-Oliveira *et al.*, 2005; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007; Badiie *et al.*, 2009). La lyse chimique des leucocytes peut être remplacée par une lyse mécanique (utilisation de billes) (Klingspor & Jalal, 2006). Certaines équipes ne lysent que les hématies puis récupèrent le culot contenant les leucocytes et les levures (Baskova *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2010).

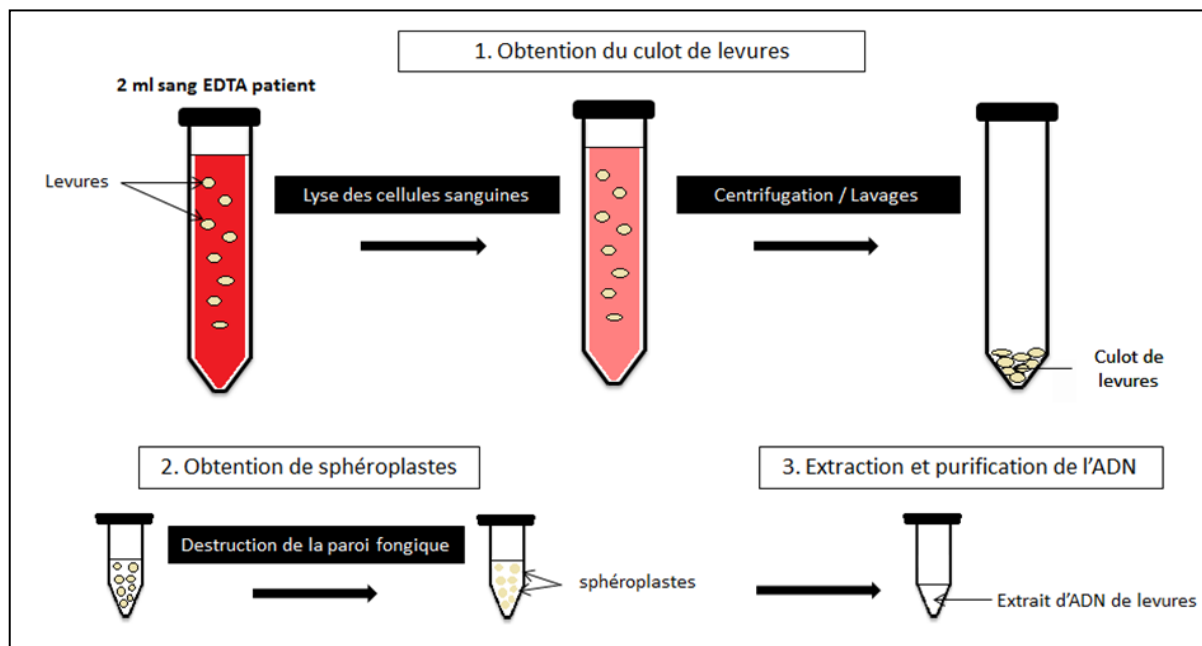


Figure 20. Principe général des protocoles d'extraction d'ADN de levures à partir de sang total.

L'extraction d'ADN fongique à partir du culot de levures nécessite classiquement une étape de lyse de la paroi fongique par des enzymes lytiques telles que la lyticase ou la zymolase, comme l'a également décrit Einsele en 1997 et repris depuis par la grande majorité des équipes. L'extraction de l'ADN des sphéroplastes ainsi obtenu peut être réalisée par les techniques d'extraction manuelles ou automatiques classiques.

IV.3.5.2. Concentration de l'ADN fongique

L'extraction à partir de sang total comme décrite précédemment implique l'extraction concomitante d'ADN humain relargué des leucocytes. Certaines équipes ont soulevé ce problème, la présence d'ADN humain en grande quantité pouvant être responsable d'amplifications non spécifiques ou de PCR faussement négatives, que ce soit pour des PCR fongiques (Klingspor & Jalal, 2006; Khot & Fredricks, 2009) ou d'autres PCR concernant des germes dont l'inoculum sanguin est faible (Zhou & Pollard, 2012). Il semble donc préférable de concentrer l'ADN des micro-organismes par rapport à l'ADN humain: cette technique est parfois nommée STEM pour Selective Target DNA Enrichment Method (Zhou & Pollard, 2012). Peu de techniques ont été décrites pour les levures mais certains kits commerciaux ont été développés pour être efficaces à la fois pour la concentration de l'ADN bactérien et de

l'ADN de levures, tels que le kit MolYsis™ (Molzym), déjà utilisé en association avec des PCR *Candida* (Wellington *et al.*, 2009).

IV.3.5.3. Evaluation de l'étape d'extraction

Dans la revue de Khot, l'accent a été mis sur l'absence d'évaluation correcte de l'étape d'extraction à partir de sang total pour les techniques de PCR fongiques publiées (Khot & Fredricks, 2009).

Sur 68 publications de PCR panfongiques, aucune n'avait quantifié le rendement d'extraction ou évalué l'efficacité de l'extraction de l'ADN fongique à partir de l'échantillon clinique (Klingspor & Jalal, 2006). En effet, les protocoles utilisant une lyse des hématies et des leucocytes permettent une diminution de la quantité d'ADN humain extraite mais aussi un risque de perte d'ADN fongique puisque des fractions de sang sont retirées au fur et à mesure de l'extraction : un résultat de PCR négatif peut être la conséquence de la réalisation d'une erreur lors de la technique d'extraction de l'échantillon. Dans une étude de 2003, 2% de témoins d'extraction positifs étaient négatifs en raison d'une erreur lors de la procédure d'extraction (White *et al.*, 2003). Les auteurs recommandent alors **l'utilisation d'un témoin positif exogène dans chaque tube à extraire, de préférence non lié phylogénétiquement aux cibles de la PCR (pour éviter les faux-positifs), qui permette d'évaluer l'efficacité de l'extraction dans chaque échantillon.** Il est recommandé **d'évaluer l'extraction concomitante d'ADN humain**, ce que peu d'équipes ont réalisé à ce jour (Klingspor & Jalal, 2006).

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, une contamination environnementale est possible à toutes les étapes de l'extraction, de l'ADN fongique contaminant pouvant même être déjà présent dans les réactifs commerciaux (Loeffler *et al.*, 1999). Ce phénomène paraît plus limité pour les PCR *Candida* que pour les PCR détectant des champignons filamenteux mais ne sont pas à exclure. A titre d'exemple nous avons pu constater lors d'un précédent travail la contamination d'un de nos réactifs d'extraction par des levures du genre *Candida* (données non publiées). L'inclusion de plusieurs témoins négatifs lors de l'étape d'extraction est indispensable pour permettre de mettre en évidence une éventuelle contamination de ce type :

- **Témoins négatifs d'extraction contenant les réactifs seuls**
- **Témoins négatifs d'extraction semblables à l'échantillon à extraire** (sang de volontaire sain par exemple), stocké de préférence de la même façon.

Les critères énoncés dans les MIQE pour harmoniser les techniques de PCR en temps réel permettent de mettre en évidence les lacunes des nombreuses techniques publiées ces dernières années. Il est ainsi nécessaire de développer de nouvelles techniques en respectant ces critères, notamment pour les techniques d'extractions en amont de la PCR, d'autant plus lorsqu'elles sont réalisées à partir de sang total. Ceci implique concrètement la mise en place de nombreux témoins pour limiter au maximum le risque de faux-positifs et de faux-négatifs.

Matériel et méthodes

I. Souches utilisées

Les souches de *Candida spp.* utilisées sont *C. albicans* (CAAL-93, CAAL-117, CAAL-61), *C. parapsilosis* (CAPA-2), *C. glabrata* (CAGL-2), *C. tropicalis* (CATR-2), *C. krusei* (CAKR-7), *C. dubliniensis* (CADU-1), *C. kefyr* (CAKE-1), *C. lusitaniae* (CALU-1), *C. guilliermondii* (CAGU-1). L'ensemble des souches provient de la mycothèque du laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale de l'EA1155 IICiMed où elles sont conservées à -80°C.

Un panel de souches de micro-organismes incluant des bactéries, des levures autres que *Candida spp.*, et des champignons filamenteux, a été sélectionné pour tester les réactions croisées. Les souches utilisées sont *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Les souches de *Salmonella enteritidis*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Scedosporium sp.*, *Penicillium sp.*, sont des souches isolées de patients dont l'identification a été confirmée par biologie moléculaire. L'ensemble des souches provient de la bactériothèque du laboratoire de bactériologie et hygiène hospitalière du CHU de Nantes (Pr A. Reynaud) et de la mycothèque du laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale du CHU de Nantes (Dr M. Miegville) où elles sont conservées à -20°.

II. Obtention d'extraits d'ADN à partir de souches

II.1. Extraction à partir des souches fongiques

Les souches fongiques sont mises en culture sur gélose SCG à 37°C pendant 24 à 48h pour les levures et 72 à 96h pour les champignons filamenteux. Les colonies fongiques sont congelées à -20°C dans des tubes en verre contenant l'équivalent de 3 ml de billes de verre de 3 mm de diamètre. L'ensemble est vortexé pendant plusieurs minutes puis repris par 2 ml de tampon Y1 (Sorbitol 1 M; EDTA pH 7,4 0,1 M), 2 µl de β-mercaptoéthanol (0,1 % final

[Sigma-Aldrich®, St. Louis, Mo.]), et 50 U de lyticase (Sigma-Aldrich®) pour fragiliser la paroi fongique. Après incubation à 30°C sous agitation constante durant 10 à 20 minutes, les sphéroplastés obtenus sont centrifugés à 3000 g pendant 5 min. L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel, Hoerd, France) selon le protocole fourni par le fabricant (annexe 1). Brièvement, le culot issu de la lyse enzymatique est repris dans 180 µL d'un tampon de pré-lyse et 25 µL de protéinase K. Après incubation, un tampon de lyse et de l'éthanol sont ajoutés. La préparation contenant l'ADN est transférée dans une colonne fournie avec le kit puis centrifugée et lavée avec deux tampons. Après ajout du tampon d'élution, la colonne est centrifugée et l'ADN est recueilli dans un volume de 100 µL. L'extrait est stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

II.2. Extraction à partir des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont mises en culture sur gélose TS pendant 24h pour les germes aérobies et sur gélose Schaedler pendant 72h pour les germes anaérobies. Les suspensions de bactéries sont préparées dans 150 µl d'EPPI dans des tubes eppendorf stériles autoclavés. Les suspensions sont portées à ébullition pendant 15 min puis centrifugées pendant 8 min à 11000 trs. Le surnageant contenant l'extrait d'ADN est ensuite repris dans un nouveau tube.

II.3. Quantification de l'ADN

La concentration et la qualité des extraits d'ADN de levures et de bactéries obtenus sont déterminées par spectrophotométrie (NanoDrop™ 1000 [Thermo Scientific, Nanodrop products, Wilmington, USA]). Les extraits sont ensuite dilués dans l'EPPI pour obtenir les concentrations souhaitées. L'ensemble des procédures est réalisée sous PSM à flux d'air laminaire

III. Mise au point de l'extraction d'ADN de levures à partir de sang total

III.1. Les différents protocoles d'extraction

Le principe général des protocoles d'extraction d'ADN de levures testés au cours de cette étude est résumé par la figure 20. Un protocole « maison » avait été initialement mis au point au laboratoire à partir de la méthode de référence (Einsele *et al.*, 1997). Il consiste en l'obtention d'un culot de levures à l'aide d'une lyse des cellules sanguines en un temps, contrairement à la méthode de référence de lyse en deux temps des hématies puis des leucocytes. La paroi des levures est ensuite lysée pour obtenir des sphéroplastes à partir desquels est réalisée l'extraction et la purification de l'ADN fongique. Ce protocole n'était pas optimal pour les échantillons de patients hyperleucocytaires. Une amélioration de ce protocole et un kit commercial (MoLYsis™ Basic5 ; [Molzym, Bremen, Germany]) seront évalués.

III.1.1. Protocole initial

Le protocole initial du laboratoire consiste en une lyse des hématies et des leucocytes par ajout de 10 ml de tampon 1 (10 mM Tris HCl pH 7,5 ; 10 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; SDS 1%) et 100 µl de protéinase K (200 µg/ml au final [Laboratoires Eurobio, Courtaboeuf, France ou Macherey-Nagel, Hoerd, France]) à 2 ml de sang total. L'échantillon est ensuite incubé à 60°C pendant 30 min et centrifugé à 3000 g durant 10 min à 4°C. Le culot est lavé par 5 ml de tampon 1, centrifugé à 3000 g 10 min à 4°C et repris par 400 µl de D-PBS 1X (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline ; Phosphate buffer 9,6 mM KCl 2,7 mM, NaCl 137,9 mM; [GIBCO®, Invitrogen™, life technologie™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA]) à pH 7,2. Le culot contenant les levures entières est transféré dans des tubes de 10 ml et repris par 2 ml Tampon Y1 (Sorbitol 1 M; EDTA pH 7,4 0,1 M), 2 µl de β-mercaptoéthanol (0,1 % final), et 50 U de lyticase (Sigma-Aldrich®) pour fragiliser la paroi fongique. Après incubation à 30°C sous agitation constante durant 10 à 20 minutes, les sphéroplastes obtenus sont centrifugés à 3000 g pendant 5 min. L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel), comme décrit ci-dessus pour l'extraction d'ADN à partir de souches fongiques (II.1)

III.1.2. Kit commercial MolYsis™ Basic 5

La lyse des cellules sanguines est assurée par un agent chaotropique non mentionné. Une enzyme est ensuite utilisée (MolDNase™) pour dégrader l'ADN libéré lors de la lyse des cellules sanguines humaines. Le culot de levures est obtenu après une première centrifugation puis un lavage. L'obtention des sphéroplastes est réalisée par incubation avec une seconde enzyme (BugLysis™). Le protocole a été effectué selon les instructions du fabricant (annexe 2) en adaptant les volumes de tampons au volume de nos échantillons de sang : 700 µl de buffer CM et 700 µL de buffer DB1 pour des échantillons de 2 ml. Une extraction d'ADN manuelle avec le kit Nucleospin Tissue et une extraction d'ADN sur automate (iPrep™ Purification Instrument ; Invitrogen™) sont testées. Pour l'extraction automatique, 100 µL de buffer RP est ajouté à la suspension de sphéroplastes obtenue après incubation avec l'enzyme BugLysis™ pour obtenir un volume final de 200 µL, directement transféré dans des tubes adaptés à l'automate. L'extraction d'ADN est ensuite réalisée selon les instructions du fabricant (annexe 3) avec le kit iPrep™ PureLink™ Virus Kit (Invitrogen™) déjà évalué et utilisé au CHU de Nantes pour l'extraction d'ADN fongique. Le volume initial est de 200 µl, la lyse par la protéinase K est réalisée au sein de l'appareil, et le volume d'élution est de 50 µl.

III.1.3. Protocole amélioré

Afin d'améliorer la lyse des cellules sanguines, quatre conditions (conditions A, B, C, D) modifiant le protocole initial sont évaluées. Les conditions A et B apportent des modifications chimiques au protocole de lyse, les conditions C et D ajoutent une étape de lyse mécanique. La condition A correspond à l'utilisation du tampon 1 modifié par ajout d'urée (8M) comme agent dénaturant et chaotropique. Les conditions B, C et D sont testées après l'étape initiale d'incubation de 30 min à 60°C avec la protéinase K. La condition B correspond à l'utilisation de 2,5 U/ml (au final) d'une enzyme lytique, 5 min à 37°C. La condition C correspond à une sonication (37 KHz [AL04-04 ; Advantage lab, Schilde, Belgium]), réalisée à température ambiante. La condition D correspond à l'ajout de billes métalliques de diamètre de 5 mm à l'échantillon qui est ensuite vigoureusement vortexé pendant 30 s. Leur diamètre suffisamment important doit permettre de ne pas provoquer la

destruction des levures, non souhaitée à ce stade du protocole. Une fois une des conditions retenue, le protocole sera optimisé au niveau des volumes de tampons utilisés, des durées et vitesses de centrifugation, ainsi que des durées d'incubation.

L'extraction manuelle d'ADN avec le kit NucleoSpin Tissue® utilisée pour le protocole initial est remplacée par une extraction automatique avec le kit iPrep™ PureLink™ Virus Kit. Le culot contenant les levures est repris par 135 µl de tampon Y1, 2 µl de β-mercaptoéthanol dilué au 10^{ème} (0,1 % final), et 63 µl de lyticase à 800 U/ml. Après une incubation de 20 min à 30°C, la suspension de sphéropastes obtenue est transférée directement dans les tubes adaptés pour l'automate. Le volume initial est de 200 µl, la lyse par la protéinase K est réalisée au sein de l'appareil, et le volume d'élution est de 50 µl.

III.2. Mode d'évaluation des protocoles d'extraction

Le rendement d'extraction des trois protocoles sera comparé sur des gammes croissantes de *C. albicans* (CAAL-93) à l'aide d'une PCR classique panfongique. Par ailleurs, les trois protocoles seront évalués en termes de simplicité, de rapidité, et de coût.

Le protocole d'extraction d'ADN fongique retenu sera ensuite évalué par rapport à la quantité d'ADN humain extraite simultanément à l'ADN de levure. Une PCR albumine est réalisée sur des extraits d'ADN obtenus à partir de 2 ml de sang inoculé à 1.10⁵ CFU/mL (CAAL-117). A titre de comparaison, 2 ml de sang du même patient inoculé à 1.10⁵ CFU/mL sont extraits avec un kit d'extraction d'ADN humain, le kit Quickgene DNA whole blood kit L sur Automate QuickGene-610 L (Fujifilm, Gurgaon, India).

III.2.1. Critère de rendement

Les extraits d'ADN obtenus avec chacun des trois protocoles, dont les conditions A,B,C et D, sont amplifiés par PCR en point final utilisant les amorces panfongiques ITS1 et ITS4 et un protocole mis en place antérieurement au laboratoire (Lièvre, 2003), afin d'évaluer de façon semi-quantitative le rendement d'extraction.

Le mix réactionnel est préparé avec le kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega®, Thermo Fisher Scientific) avec une concentration finale de 1X de tampon, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP ATCG, 0,5 µM de chaque amorce, 0,03 U/µl de GoTaq® Flexi DNA Polymerase et de l'EPPI pour un volume final de 45 µL. Un volume de 5 µl d'extrait d'ADN est ajouté au mix (annexe 4). Un témoin négatif (5 µL d'EPPI) et un témoin positif (5 µl d'extrait d'ADN de *C. albicans*) sont inclus dans chaque série. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, Life technologies™, Thermo Fisher Scientific). Après une dénaturation initiale à 94°C pendant 7 min, le protocole d'amplification comprend 35 cycles composés d'une étape de dénaturation à 94°C durant 30 s, d'une étape d'hybridation à 55°C pendant 45 s suivie d'une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min. Le dernier cycle est suivi de 7 min à 72°C.

La révélation des amplicons est réalisée sur un gel de polyacrylamide à 9%. La migration est de 40 minutes à 180 V. La visualisation des bandes se fait sous une lampe UV après révélation par le bromure d'éthidium.

III.2.2. Contamination de l'extrait par l'ADN humain

Un échantillon de sang d'un volontaire sain inoculé à 1.10⁵ CFU/mL (CAAL-117) est extrait par le protocole d'extraction d'ADN fongique retenu puis testé avec une PCR en temps réel utilisée en routine au laboratoire ayant pour cible une portion du gène de l'albumine humaine (fragment amplifié de 74 pb) (Laurendeau *et al.*, 1999)

La sonde ALB S utilisée (Eurogentec®, Seraing, Belgique) est une sonde TaqMan® de 26 pb marquée en 5' à la cyanine 5. Pour s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de PCR, un contrôle interne (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, IPC ; Applied Biosystems®, Foster city, CA) est ajouté à chaque réaction. La sonde utilisée pour l'IPC est marquée en 5' à l'aide d'un fluorophore différent (VIC) de celui utilisé pour la sonde ALB S, permettant une PCR duplex. Le mix réactionnel est préparé avec le TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems® ; contenu : AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Ultra Pure, dNTP ATCG et dUTP, UDG) avec une concentration finale de 1X de Master Mix, 0,5 µM d'amorces, 0,2 µM de sonde, 0,5X d'IPC mix et 0,5X d'IPC DNA. Un volume de 5 µl d'extrait d'ADN est ajouté au mix (annexe 5). Un témoin négatif de PCR (5 µL d'EPPI) ainsi qu'une gamme permettant de quantifier l'ADN présent dans les extraits de patients, sont

inclus dans chacune des deux séries réalisées. La gamme est préparée à partir de dilutions d'un extrait d'ADN génomique humain (Human Genomic DNA ; Roche Diagnostics, Bâle, Suisse) de concentration connue. Quatre points de gamme sont utilisés correspondant à 10^4 , 10^3 , 10^2 et 10 cellules humaines dans 5 μ l ajoutés au mix. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur Rotor Gene™ 3000 (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Après une étape de décontamination à 50°C durant 120 s (activité de l'UNG sur d'éventuels produits de PCR d'UTP), la Taq polymérase est activée à 95°C pendant 900 s. Le protocole d'amplification comprend 45 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C durant 15 s suivie d'une étape d'hybridation et d'élongation à 59°C pendant 60 s. Le seuil de positivité (threshold) a été placé à la valeur de 0,025.

III.3. Conception d'un témoin interne d'extraction (TIE)

Pour valider une procédure d'extraction, un témoin interne d'extraction (TIE) doit être ajouté à chaque échantillon de sang à extraire. Le principe est schématisé dans la figure 21.

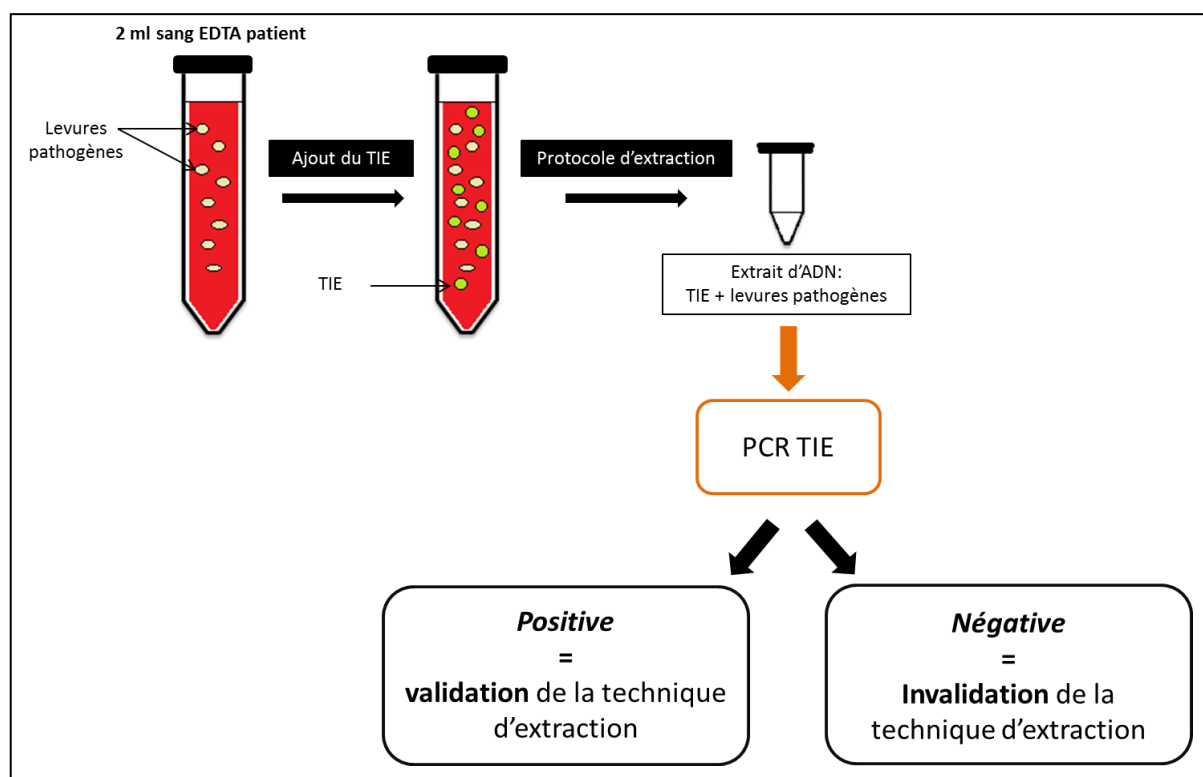


Figure 21. Principe général de l'utilisation du TIE.

III.3.1. Choix du TIE

Le TIE doit être une levure que l'on inocule dans l'échantillon, extraite dans les mêmes conditions que les levures pathogènes infectant le patient.

Il doit s'agir d'une levure non pathogène et non saprophyte de l'homme pour éviter les faux-positifs. Le TIE ne doit pas être détecté en PCR *Candida* et être facilement cultivable *in vitro*. Sa détection ne doit pas croiser avec l'ADN de pathogènes, ni l'ADN humain. La levure choisie est codée LTI (Levure Témoin Interne).

III.3.2. Mise au point et standardisation de la PCR TIE

Le couple d'amorces LTI1-LTI2 et la sonde ALTI ont été dessinés par le laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicale du CHU de Nantes. Ce couple amplifie une région de 135 pb du gène inséré. La sonde ALTI (Eurogentec®) est une sonde TaqMan® de 20 pb marquée en 5' au fluorophore FAM et dessinée pour s'hybrider sur une région du gène amplifiée par le couple d'amorces LTI1 – LTI2. La spécificité des amorces est vérifiée vis-à-vis d'autres génomes infectieux et non infectieux à l'aide du programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Le mix réactionnel est préparé avec le TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems® ; contenu : AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Ultra Pure, dNTP ATCG et dUTP, UDG) avec une concentration finale de 1X de Master Mix, 0,5 µM d'amorces et 0,2 µM de sonde. Un volume de 5 µL d'extrait d'ADN est ajouté au mix (annexe 6). Un témoin négatif de PCR (5 µL d'EPPI) est inclus dans chaque série. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur Rotor Gene™ 3000 (Qiagen). Après une étape de décontamination à 50°C durant 120 s (activité de l'UNG sur d'éventuels produits de PCR dUTP), la Taq polymérase est activée à 95°C pendant 900 s. Le protocole d'amplification comprend 45 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C durant 15 s suivie d'une étape d'hybridation à la température d'hybridation du couple (plusieurs températures testées) pendant 60 s. Le cycle se termine par une étape d'élongation à 72°C pendant 20 s. Le seuil de positivité (threshold) a été placé à la valeur de 0,025.

Le choix de température fixé, la reproductibilité et la répétabilité de la PCR TIE seront évaluées sur une gamme d'ADN de la levure témoin interne (LTI) réalisée par dilution dans de l'EPPI d'un extrait d'ADN obtenu comme cité précédemment pour les souches fongiques (II.1).

III.3.3. Choix de la quantité de levure à inoculer

Une gamme de LTI est préparée dans de l'EPPI à partir de cultures de 24h en milieu liquide YPS à 37°C. Ces suspensions de 100 µL sont centrifugées 5 min à 11000 rpm à 4°C. Le culot de levures ainsi obtenu, mimant un culot de levures extrait à partir de sang total, est repris par 135 µl de tampon Y1, 2 µl de β-mercaptoéthanol dilué au 10^{ème} (0,1 % final), et 63 µl de lyticase à 800 U/ml. Le reste de la procédure est la même que celle décrite précédemment pour le protocole amélioré d'extraction d'ADN du culot de levures (III.1.3).

Les extraits d'ADN obtenus sont testés en PCR TIE pour déterminer la concentration la plus adaptée en LTI à inoculer dans les échantillons de sang total pour constituer le TIE.

III.3.4. Extraction d'ADN du TIE à partir de sang total

Une suspension de LTI à la concentration retenue est préparée extemporanément comme décrit ci-dessus. Un volume de 100 µL de la suspension est inoculé dans 2 ml de sang de volontaire sain. L'échantillon est extrait puis passé en PCR TIE. Trois séries sont réalisées afin d'évaluer la reproductibilité de la méthode.

IV. Mise au point de la PCR *Candida* en temps réel TaqMan® : PCR CPAN

La stratégie de mise au point d'une PCR *Candida* en temps réel utilisant la technologie TaqMan® implique la réalisation de plusieurs PCR (figure 22). Une PCR permettant la validation de la technique d'extraction, la PCR TIE, qui sera mise au point au cours de notre travail. La sonde ALTI correspondant à cette PCR est marquée en 5' au fluorophore FAM. Une PCR IPC permettant de s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de PCR, déjà utilisée en routine au laboratoire. Un contrôle interne d'inhibition (Exogenous Internal Positive Control, IPC ; Applied Biosystems®) est ajouté dans le mix réactionnel à chaque réaction de PCR. La sonde IPC est marquée en 5' au fluorophore VIC. Enfin, la PCR *Candida* à proprement parler pour laquelle plusieurs stratégies peuvent être explorées : une PCR pan – *Candida* puis une PCR pour chacune des espèces, ce qui nécessite plusieurs PCR multiplex parfois complexes à valider, ou une PCR permettant d'emblée de détecter toutes les espèces de *Candida* à l'exception d'espèces possédant une résistance innée à certains antifongiques (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*), guidant ainsi le plus rapidement et le plus simplement possible la prise en charge thérapeutique. Cette dernière stratégie a été également envisagée dans le projet pour la mise au point de la PCR CPAN en se basant sur des travaux antérieurs du laboratoire en PCR DEIA (Lièvre, 2003), avec par ailleurs la nécessité d'une PCR permettant de détecter les trois espèces, partie du projet qui ne fait pas partie du travail présenté. La sonde dessinée en fonction du ou des couples retenus au cours de ce travail sera marquée en 5' à la cyanine 5, ce qui permettra de réaliser une PCR duplex CPAN-IPC.

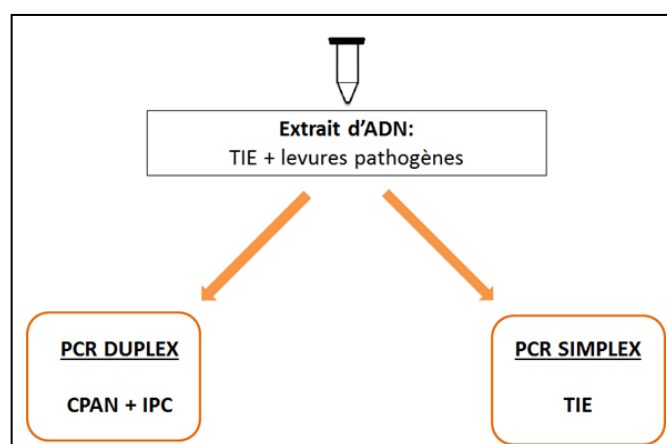


Figure 22. Déroulement des réactions de PCR.

IV.1. Choix des amorces pour la PCR CPAN

Plusieurs amorces ont été dessinées par le département de Parasitologie et Mycologie médicale de l'UFR de Pharmacie de Nantes (EA1155 IICiMed) : P1H1, P1P2, P1A3, P2Y1, P3Y et CanP04 et validées par le logiciel primer 3. Elles ont été conçues pour amplifier les régions ITS1 et ITS2 de l'ADN codant pour les ARN ribosomiaux. Les huit couples suivants ont été testés : P1H1-P2Y1 ; P1P2-P2Y1 ; P1A3-P2Y1 ; P1H1-P3Y ; P1P2-P3Y ; P1A3-P3Y ; P1H1-CanP04 et P1P2-CanP04. Ces couples doivent permettre la détection de toutes les espèces de *Candida* à l'exception de P1H1-CanP04 et P1P2-CanP04 qui sont dessinés pour ne pas détecter *C. krusei*, *C. glabrata* et *C. lusitaniae*. La spécificité des amorces est vérifiée vis-à-vis de *C. albicans* (accession EU266569 ; accession EU266566 ; accession DQ231531 ; accession EU266569), *C. parapsilosis* (accession EU564209), *C. kefyr* (accession EU019227), *C. guilliermondii* (accession EU568993), *C. dubliniensis* (accession AB369916), *C. tropicalis* (accession EU589208), *C. lusitaniae* (accession EU568925 ; accession AY174089), *C. glabrata* (accession AM492798), *C. krusei* (accession EU315756 ; accession DQ674354 ; accession DQ674351 ; accession EU330187 ; accession EU315753) et plus largement vis-à-vis d'autres génomes infectieux et non infectieux à l'aide du programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

IV. 2. Sélection d'un couple d'amorces pour la PCR CPAN

Les couples sont testés dans un premier temps sur de l'ADN de *C. albicans* (CAAL-93 ; 1 pg au final dans le mix réactionnel) avec une PCR *Candida* en temps réel SYBR® Green I précédemment mise au point par l'équipe EA 1155 IICiMed.

Le mix PCR est composé du IQ™ SYBR® Green Supermix (référence : 170-8880 ; Bio-rad, Hercules, California ; contenu : dNTP, MgCl₂, SYBR® Green 1, fluorescéine) à une concentration finale de 1X, 0,4 µL de chaque amorce et de l'EPPI pour un volume final de 15 µL, auquel sont ajoutés 5 µL d'extrait d'ADN (annexe 7). Un témoin négatif contenant 5 µL d'EPPI à la place de l'ADN est inclus dans la manipulation. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur Rotor Gene™ 3000 (Qiagen). Après une dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min, le protocole d'amplification comprend 44 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C durant 30 s, d'une étape d'hybridation à 57°C, 58°C, 59°C ou 60°C selon les couples (P1A3-P2Y1 et P1A3-P3Y :57°C ; P1H1-P2Y1 et P1P2-P2Y1 : 58°C ; P1H1-P3Y

et P1P2-P3Y : 59°C ; P1H1-CanP04 et P1P2-CanP04 : 60°C) et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 10 s. L'acquisition se termine par une augmentation continue de la température jusqu'à 99°C, qui permet de déterminer les courbes de fusion des produits de PCR. La lecture de la fluorescence se fait à la fin de l'étape d'hybridation. Le seuil de positivité (threshold) a été placé à la valeur de 0,025. Les résultats obtenus avec la PCR en temps réel sont vérifiés dans un premier temps sur gel de polyacrylamide, comme précédemment décrit pour la PCR classique ITS1-ITS4.

IV.3. Mise au point de la PCR CPAN

IV.3.1. Choix final du couple d'amorces

La sonde CPAN (Eurogentec®) est ensuite dessinée pour s'hybrider sur une région ITS amplifiée par les couples d'amorces retenus pour la PCR TaqMan®. Cette sonde de 20 pb est testée avec les couples retenus sur une gamme d'ADN de *C. albicans* (CAAL-117) et sur de l'ADN de LTI pour vérifier l'absence de réactions croisées.

Le mix réactionnel est préparé avec le TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems® ; contenu : AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Ultra Pure, dNTP ATCG et dUTP, UDG) avec une concentration finale de 1X de Master Mix, 0,5 µM d'amorces, 0,2 µM de sonde, 0,5X d'IPC mix et 0,5X d'IPC DNA. Un volume de 5 µl d'extrait d'ADN est ajouté au mix (annexe 8). Un témoin négatif de PCR contenant 5 µL d'EPPI à la place de l'ADN est inclus dans la manipulation. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur Rotor Gene™ 3000 (Qiagen). Après une étape de décontamination à 50°C durant 120 s (activité de l'UNG sur d'éventuels produits de PCR dUTP), la Taq polymérase est activée à 95°C pendant 900 s. Le protocole d'amplification comprend 45 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C durant 15 s suivie d'une étape d'hybridation à la température d'hybridation du couple pendant 60 s. Le cycle se termine par une étape d'élongation à 72°C pendant 20 s. Le seuil de positivité (threshold) a été placé à la valeur de 0,025. Deux températures d'hybridation seront testées en PCR CPAN avec le couple retenu.

IV.3.2. Spécificité de la PCR CPAN

Après avoir fixé la température d'hybridation, la PCR CPAN réalisée avec le couple retenu est testée sur de l'ADN d'autres espèces de *Candida*, d'autres genres de levures, de micro-organismes infectieux fongiques et bactériens, et d'ADN humain. Les extraits d'ADN ont été dilués de façon à obtenir 100 pg d'ADN dans le mix réactionnel de PCR, à l'exception des extraits d'ADN de champignons filamenteux, non quantifiables au nanodrop. La présence d'ADN fongique en quantité suffisante pour ces extraits a été vérifiée par PCR classique panfongique suivie d'une révélation par gel de polyacrylamide, comme décrit précédemment (III.2.1).

IV.3.3. Standardisation de la PCR CPAN

La reproductibilité, la répétabilité et la sensibilité (limite de détection et seuil de positivité) de la PCR CPAN seront évaluées sur une gamme d'ADN de *C. albicans* réalisée par dilution dans de l'EPPI d'un extrait d'ADN obtenu comme cité précédemment pour les souches fongiques (II.1).

V. Evaluation de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR CPAN

V.1. Sensibilité

Afin d'évaluer si l'ajout du TIE entraîne une modification de sensibilité de la PCR CPAN, des échantillons à 10 CFU/mL avec et sans inoculation préalable du TIE sont extraits et testés en parallèle avec la PCR CPAN. Les Ct obtenus sont ensuite comparés.

Pour évaluer la limite de détection en termes de CFU/mL, une gamme de sang artificiellement inoculé à 1, 5, 10, 50 et 100 CFU/mL (CAAL-117) est testée au cours d'une série. Cette gamme est contrôlée par rétroculture de 250 µL d'une suspension de CAAL-117 ($2 \cdot 10^2$ cell/mL) utilisée pour la préparer.

V.2. Reproductibilité et répétabilité

Un échantillon de 2 ml de sang artificiellement inoculé à 10 CFU/mL (CAAL-117) est extrait après ajout de 100 µL d'une suspension de TIE préparée extemporanément à la concentration retenue. Les PCR TIE, CPAN et IPC sont réalisées sur l'extrait d'ADN obtenu dans deux mix réactionnels séparés (figure 23).

Trois séries différentes sont réalisées pour évaluer la reproductibilité et quatre échantillons différents sont testés au cours d'une même série pour évaluer la répétabilité.

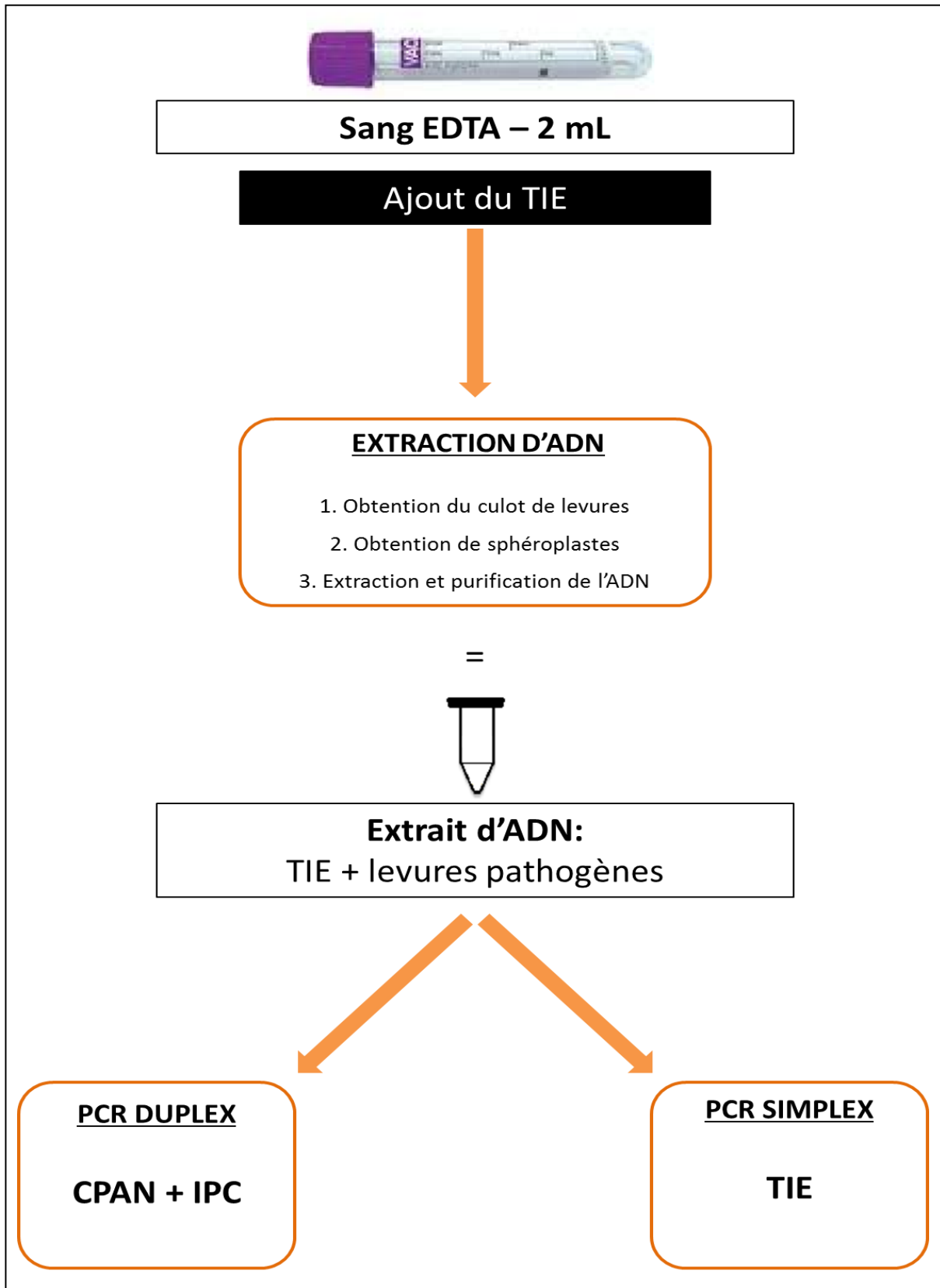


Figure 23. Schéma résumé de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR CPAN.

Résultats

I. Mise au point de l'extraction d'ADN de levures à partir de sang total

I.1. Evaluation des protocoles d'extraction

Les protocoles sont évalués sur des gammes croissantes de sang total inoculé à l'aide de suspensions de *C. albicans* (CAAL-93) préparées dans de l'EPPI. Les levures sont comptées à la cellule de Malassez et les suspensions diluées en série puis inoculées dans du sang de volontaire prélevé sur EDTA de façon à obtenir des gammes à 1, 5, 50, et 500 CFU/ml de sang. La rétroculture sur milieu solide Sabouraud à 37°C pendant 24h de 250 µL d'une des suspensions utilisée (2.10^2 CFU/mL) permet de corriger la gamme si nécessaire. Un tube contenant les réactifs d'extraction seuls et un tube contenant le sang non inoculé du volontaire sain utilisé, extraits dans les mêmes conditions, constituent les témoins négatifs de chaque série d'extraction.

I.1.1. Protocole initial

Pour des extraits issus de patients normocytaires, les résultats de la PCR classique ITS1-ITS4 sont concluants pour les échantillons à 50 et 500 CFU/mL (résultats non présentés). Pour les patients hyperleucocytaires, l'échantillon après lyse des leucocytes et hématies est très visqueux, rendant impossible le prélèvement du culot pour une extraction ultérieure.

I.1.2. Kit commercial MolYsis™ Basic 5

La suspension de sphéropastes obtenue après lyse des cellules sanguines et de la paroi fongique contient de nombreux résidus de lyse. L'ajout de 1,4 µL de β-mercaptoéthanol pendant l'étape de lyse de la paroi fongique n'améliore pas la lyse. La présence de ces résidus ne permet pas le pipetage automatique sur iPrep, même après une pré-lyse d'une nuit par la protéinase K. L'extraction manuelle permet de s'affranchir d'une partie des particules en suspension grâce au passage sur colonne mais l'ADN de *C. albicans* n'est pas détecté en PCR ITS1-ITS4 pour de nombreux échantillons.

1.1.3. Protocole amélioré

La PCR ITS1-ITS4 réalisée sur les extraits obtenus par extraction automatique révèle la présence d'ADN en quantité équivalente à l'extraction manuelle : l'extraction automatique est conservée pour ce protocole.

Les différentes conditions envisagées pour améliorer la lyse des cellules sanguines sont testées sur des échantillons de patients hyperleucocytaires (au minimum plus de 12 G/L), échantillons dont la lyse est impossible avec le protocole initial. La condition A avec un tampon urée ne permet aucune diminution de la viscosité du prélèvement. La condition C utilisant la sonication sur une durée allant de 5s à 3 min, n'apporte pas de meilleurs résultats. La condition D avec les billes n'est pas satisfaisante : l'échantillon est suffisamment liquide mais la procédure est contraignante (nécessité de retirer les billes sans perdre de prélèvement) et les extraits ne migrent pas dans le gel, preuve que l'échantillon présente une viscosité résiduelle. Seule la condition B permet d'obtenir des échantillons complètement fluides en augmentant peu la durée de la manipulation. Cette modification permet de conserver une extraction efficace confirmée par PCR ITS1-ITS4 avec une sensibilité au moins identique à celle obtenue sur sang normocytaire avec le protocole initial puisque les échantillons à 50 et 500 CFU/mL sont détectés (figure 24).

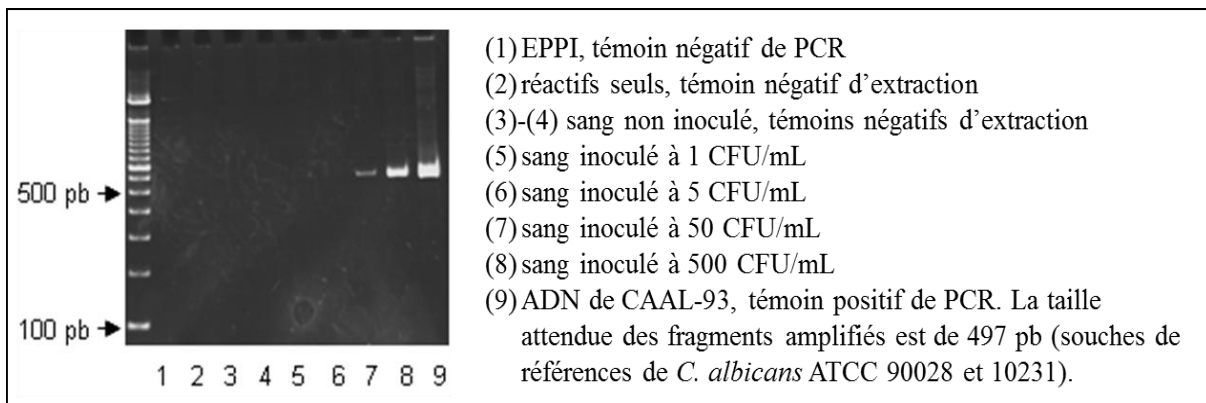


Figure 24. Extraction d'ADN de *C. albicans* à partir de sang total de patients hyperleucocytaires par le protocole amélioré : produits de la PCR ITS1-ITS4 révélés par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

I.1.4. Comparaison de la durée, de la facilité de mise en œuvre et du coût

Une fois la condition B choisie, le protocole est optimisé en termes de rapidité et de facilité de mise en œuvre. Les volumes de tampon utilisés sont réduits ainsi que le nombre de lavages et la durée des centrifugations (annexe 9). La durée totale de notre protocole d’obtention d’ADN de *C. albicans* est alors de 2h10 environ pour trois tubes (un témoin négatif d’extraction contenant les réactifs seuls, un témoin positif d’extraction contenant du sang de volontaire sain inoculé et un échantillon de patient), permettant un gain de temps d’environ une heure par rapport aux deux autres (tableau XXIV). Notre protocole, plus rapide, permet le traitement de tous les échantillons de sang, y compris des échantillons de patients hyperleucocytaires, ce qui compense son coût plus élevé par rapport au protocole initial. Le kit commercial MolYsis™ Basic5 est donc non seulement plus long que notre protocole amélioré et la présence de nombreux résidus de lyse ne permet pas de l’adapter sur notre automate. De plus, même avec une extraction manuelle, les rendements ne sont pas reproductibles en raison de la présence de nombreuses particules en suspension pour certains patients. Ce kit est par ailleurs la plus coûteuse des procédures.

Tableau XXIV. Evaluation des protocoles en termes de durée et de coûts.

Protocole	Durée ^a			Coût ^b		
	Extraction des levures	Extraction d'ADN	Total	Extraction des levures	Extraction d'ADN	Total
Protocole initial	2h	1h, 20 min	3h, 20 min	1,47	1,79	3,26
MolYsis Basic5 (Molzym)	1h, 45 min	1h, 20 min	3h, 5 min	7,5	1,79	9,29
Protocole amélioré	1h, 30 min	40 min	2h 10	0,84	4,36	5,2

^aDurée estimée pour le traitement de trois échantillons et ^bcoûts exprimés en euros (frais de port exclus) pour le traitement d’un échantillon.

Le protocole d’extraction d’ADN de levures à partir de sang total retenu est le protocole développé par le laboratoire, amélioré par l’ajout d’une étape de lyse enzymatique.

I.2. Evaluation de la quantité d'ADN humain dans l'extrait

Les résultats de la PCR albumine réalisée sur deux extraits d'ADN obtenus à partir de 2 ml de sang inoculé à 1.10^5 CFU/mL (CAAL-117) sont présentés dans la figure 25. Pour chaque série le témoin négatif de PCR est négatif et la gamme est validée sur les résultats d'efficacité (figure 25. efficacité de 0,95 (b) et 1 (b')) et de linéarité (figure 25. $r = 1$ (b et b')).

L'échantillon inoculé est positif en PCR ITS1-ITS4 et en PCR albumine (figure 25) : de l'ADN humain est extrait simultanément à l'ADN des levures. Les Ct obtenus pour les deux échantillons alignés sur la gamme indiquent que l'équivalent de 17,6 cellules et 9,5 cellules sont contenus dans 5 μ L d'extrait, soit respectivement 1,2 ng et 0,67 ng d'ADN humain extraits dans 50 μ L à partir de 2 ml de sang total EDTA contenant 7G/L de leucocytes (150 000 cellules étant équivalentes à 1 μ g d'ADN).

À titre de comparaison, deux échantillons du même patient sont extraits avec un kit permettant l'extraction d'ADN humain à partir de 2 ml de sang total. La quantité d'ADN extrait est alors de 4,1 μ g et 4,9 μ g, 4000 fois supérieure à la quantité d'ADN humain extrait avec le protocole d'extraction d'ADN de levures retenu.

Le protocole retenu permet l'extraction d'ADN des levures à partir du sang total tout en garantissant une faible contamination par de l'ADN humain.

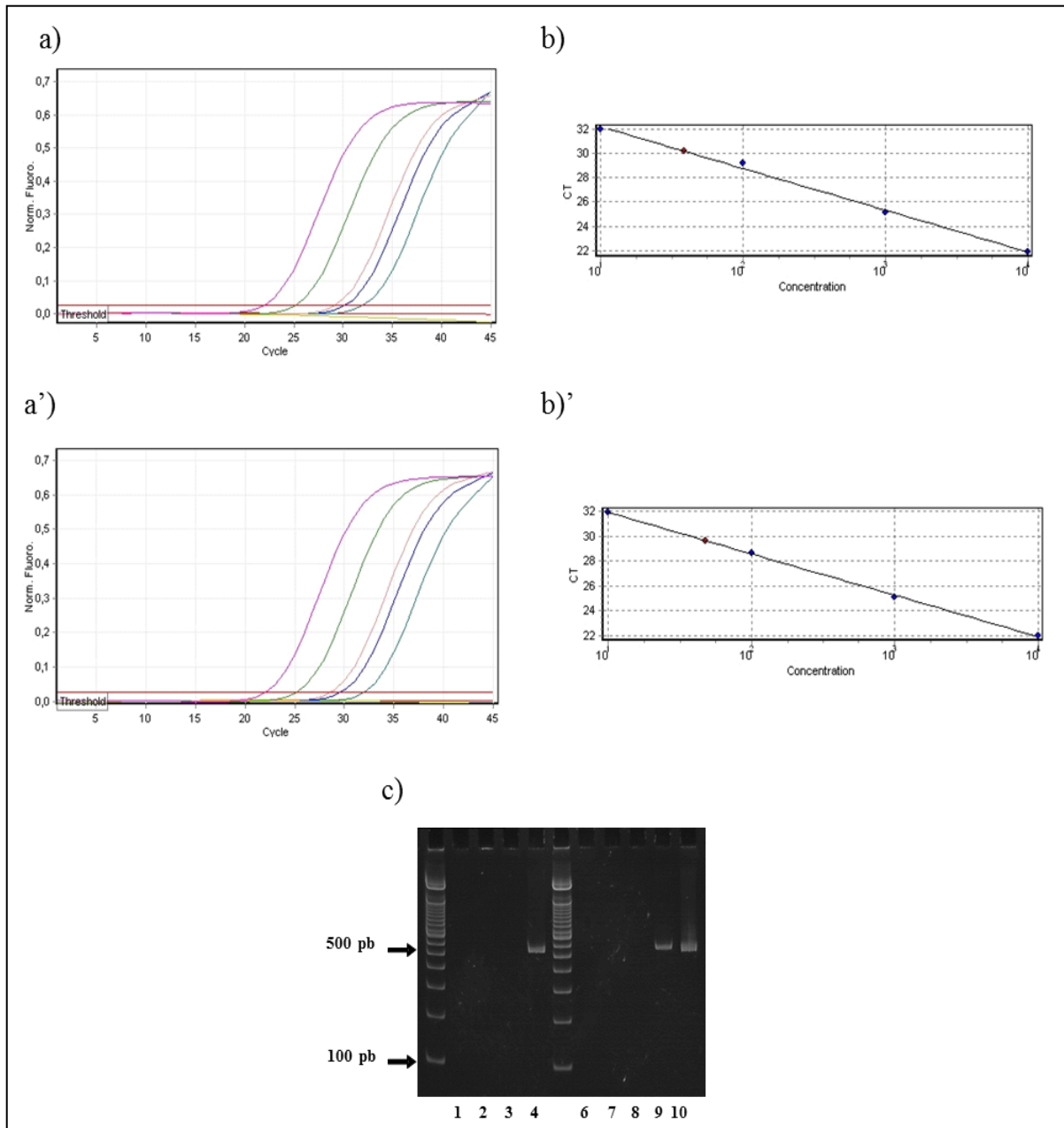


Figure 25. Evaluation de la quantité d’ADN humaine extraite.

a) et a’) Courbes d’amplification des PCR albumine : deux extraits différents d’échantillons de sang d’un patient inoculés à 1.10^5 CFU/mL ainsi qu’une gamme albumine, sont amplifiés. De gauche à droite: 1.10^4 cellules/PCR, 1.10^3 cellules/PCR, 1.10^2 cellules/PCR, sang inoculé, 10 cellules/PCR.

(b) et b’) Droites d’étalonnage représentant les valeurs de Ct en fonction de la quantité d’ADN cible contenu dans les 5 μ L d’extrait utilisé dans la réaction de PCR. Les points bleus correspondent aux valeurs de la gamme, les rouges aux valeurs des extraits de sang inoculé alignés sur la gamme.

(c) Contrôle de l’extraction de levures par la PCR panfongique ITS1-ITS4 pour chaque PCR (1,2,3,4 et 6,7,8,9) : (1,6) EPPi, témoin négatif de PCR ; (2,7) réactifs seuls, témoin négatif d’extraction ; (3,8) sang non inoculé, témoin négatif d’extraction ; (4,9) sang inoculé à 1.10^5 CFU/ml ; (10) ADN de CAAL-117, témoin positif de PCR. La taille attendue des fragments amplifiés est de 497 pb (souches de références de *C. albicans* ATCC 90028 et 10231).

I.3. Mise au point et standardisation de la PCR TIE

Pour valider la procédure d’extraction, une levure (LTI) non pathogène et non saprophyte de l’homme est ajoutée à chaque échantillon de sang à extraire pour constituer le témoin interne d’extraction (TIE).

I.3.1. Choix de la température d’hybridation

Des dilutions en série d’un extrait d’ADN de LTI ont permis d’obtenir une gamme comportant 6 points de dilution : 92,5 ng/PCR, 37 ng/PCR, 18,5 ng/PCR, 9,25 ng/PCR, 3,7 ng/PCR et 1,85 ng/PCR.

Trois températures sont testées sur cette gamme : 58, 59 et 60°C (tableau XXV). La PCR TIE fonctionne aux trois températures, avec une sensibilité qui semble inférieure (Ct plus élevés) aux températures plus élevées. En théorie, la spécificité d’une PCR est meilleure aux températures plus élevées. Pour la PCR TIE c’est la spécificité plus que la sensibilité qui est recherchée, c’est pourquoi la température de 60°C est retenue.

Tableau XXV. Test de températures d’hybridation, PCR TIE : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d’ADN du TIE à chaque température.

Température testée	Dilution d’ADN					
	92,5 ng	37 ng	18,5 ng	9,25 ng	3,7 ng	1,85 ng
58°C	27,47	28,71	29,82	29,85	31,78	33,83
59°C	27,57	28,94	30,26	30,9	32,08	33,17
60°C	28,59	30,3	31,04	32,13	33,02	34,24

I.3.2. Reproductibilité

Après validation de cette gamme par PCR sur les résultats d’efficacité et de linéarité (figure 26. efficacité = 1,1 et r = 0.99), une évaluation de la reproductibilité de la méthode a été conduite en inter-essais sur ces 6 dilutions d’ADN de LTI. Chaque dilution a été testée dans 10 essais différents (tableau XXVI).

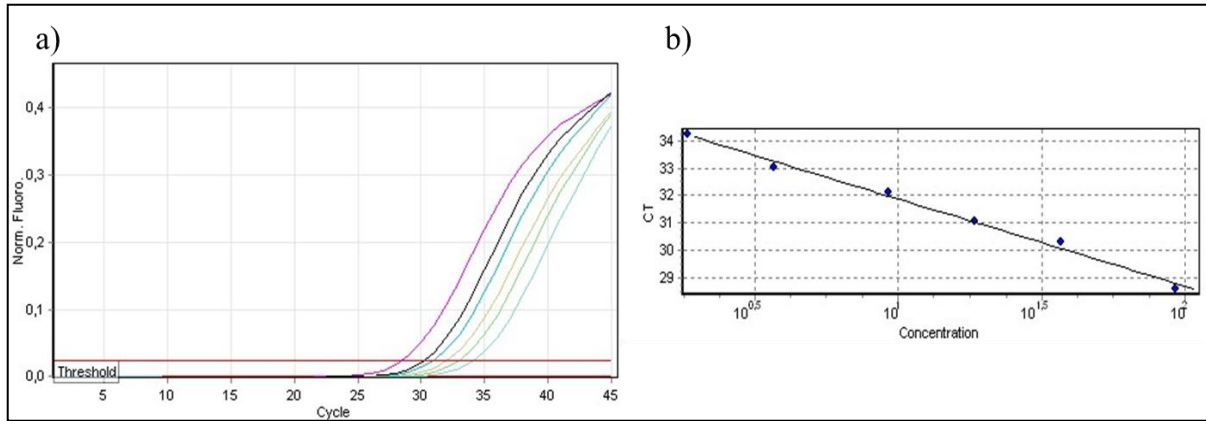


Figure 26. Gamme établie à partir de 6 dilutions de l’extrait d’ADN de LTI.

(a) Courbes d’amplification de la PCR TIE sur la gamme d’ADN de LTI. De gauche à droite : 92,5; 37; 18,5; 9,25; 3,7; 1,85 ng/PCR.

(b) Droite d’étalonnage représentant les valeurs de Ct en fonction de la quantité d’ADN cible contenu dans les 5 µL d’extrait utilisé dans la réaction de PCR.

Tableau XXVI. Etude de la reproductibilité inter-essais de la PCR TIE : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d’ADN de LTI à chaque série.

Quantité d'ADN/réaction	92,5 ng	37 ng	18,5 ng	9,25 ng	3,7 ng	1,85 ng
Série 1	27,4	28,96	30,04	30,7	31,97	32,95
Série 2	28,61	29,67	30,52	31,47	32,72	34,07
Série 3	28,59	30,3	31,04	32,13	33,02	34,24
Série 4	27,88	29,15	30,4	31,36	32,49	33,8
Série 5	28,74	29,31	30,78	31,68	33,08	34,05
Série 6	27,94	29,15	29,9	31,23	32,56	33,72
Série 7	28,46	29,49	30,93	31,72	32,8	34,25
Série 8	28,16	29,5	30,68	31,74	32,95	34,2
Série 9	28,06	28,76	29,98	31,75	33,12	34,02
Série 10	28,42	29,42	30,43	31,54	32,25	33,55
Ct moyen	28,23	29,37	30,47	31,53	32,70	33,89
Ecart-type	0,42	0,43	0,40	0,38	0,38	0,40
Variance	0,17	0,18	0,16	0,15	0,14	0,16
CV (%)	1,47	1,45	1,31	1,22	1,16	1,19

L’ensemble des coefficients de variation (CV) étant inférieurs à 5 %, nous pouvons considérer que la PCR TIE permettant la détection et la quantification de l’ADN de LTI, est reproductible.

1.3.3. Répétabilité

Une évaluation de la répétabilité de la méthode a été réalisée en intra-essais sur 6 dilutions d’ADN de LTI. Chaque dilution a été testée 5 fois au cours d’une même PCR. Les résultats de cette étude sont illustrés par les courbes d’amplification obtenues (figure 27) et regroupés dans le tableau XXVII.

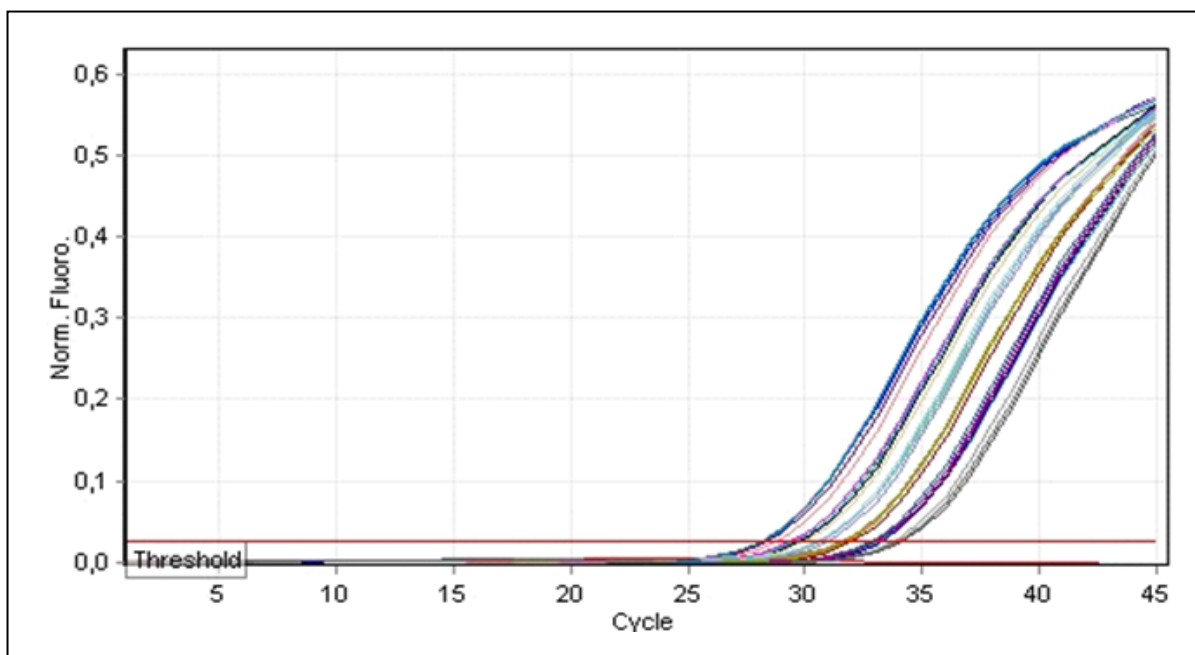


Figure 27. Etude de répétabilité intra-essai de la PCR TIE.

Courbes d’amplification de la PCR TIE sur 6 points de gamme d’ADN de LTI, testés 5 fois au cours d’une même série. De gauche à droite: 92,5; 37; 18,5; 9,25; 3,7; 1,85 ng/PCR.

Tableau XXVII. Etude de la répétabilité intra-essai de la PCR TIE : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d’ADN de LTI à chaque test au sein d’une même série.

Quantité d'ADN/réaction	92,5 ng	37 ng	18,5 ng	9,25 ng	3,7 ng	1,85 ng
Test 1	28,06	28,76	29,98	31,75	33,12	34,02
Test 2	28,36	29,64	30,71	31,67	32,8	33,91
Test 3	28,1	29,43	30,52	32,01	33,23	33,76
Test 4	28,14	29,74	30,66	31,59	32,94	33,98
Test 5	28,21	29,65	30,95	31,83	33,04	34,08
Ct moyen	28,17	29,44	30,56	31,77	33,03	33,95
Ecart-type	0,12	0,40	0,36	0,16	0,17	0,12
Variance	0,01	0,16	0,13	0,03	0,03	0,02
CV (%)	0,42	1,35	1,18	0,51	0,50	0,36

L'ensemble des coefficients de variation (CV) étant inférieurs à 5 %, nous pouvons considérer que la PCR TIE est répétable.

I.3.4. Choix de la quantité à inoculer

Les 5 suspensions testées (100 μ L à 2, 1, 0.5, 0.2 et 0.1 MacFarland) sont détectées à des Ct compris entre 28,87 et 32,40 (figure 28). La suspension à 2 MF sort logiquement au Ct le plus faible mais pour limiter le risque éventuel de réactions croisées avec la PCR CPAN, bien que les alignements théoriques aient éliminé ce risque, les concentrations plus faibles avec des Ct plus élevés sont privilégiées. Le choix va se porter sur une suspension avec un Ct autour de 30 qui permet par ailleurs la présence d'un culot visible lors de l'extraction, ce qui rend le protocole plus facile à réaliser. La suspension à 1 MF est retenue : un volume de 100 μ L de cette suspension sera inoculé dans chaque échantillon à extraire pour constituer le TIE.

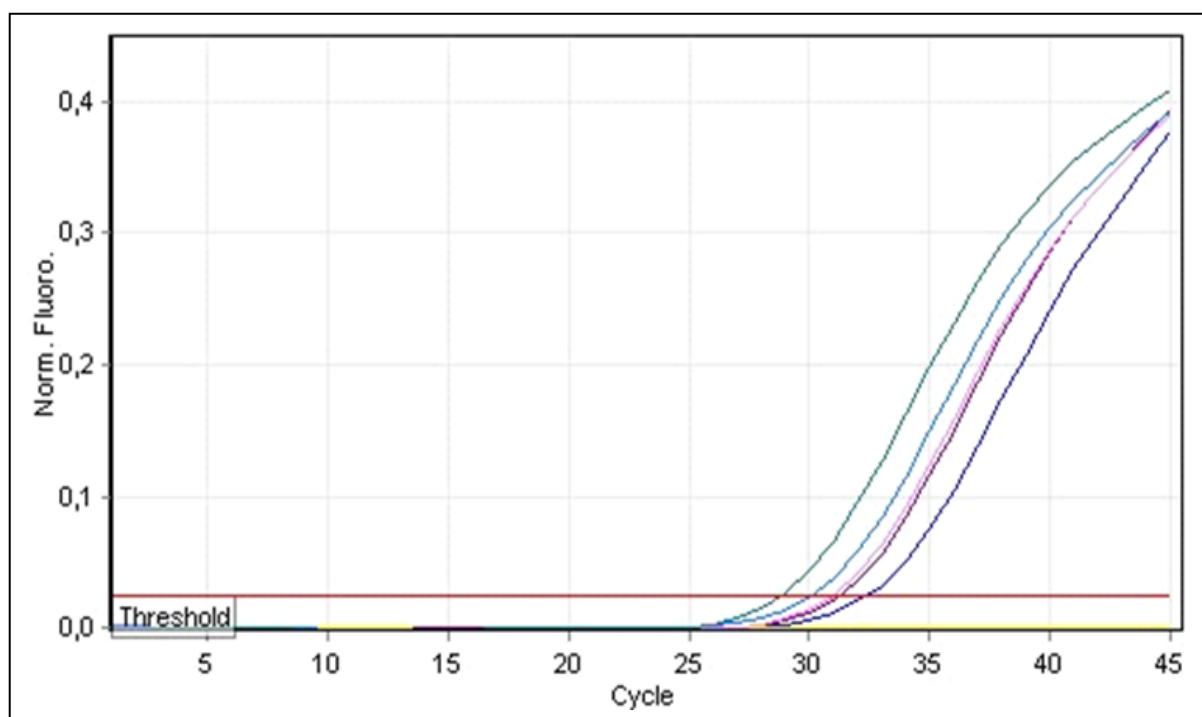


Figure 28. Choix de la quantité de LTI à inoculer.

Courbes d'amplification de la PCR TIE sur une gamme d'extraits d'ADN de suspensions de LTI. De gauche à droite : 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,2 et 0,1 MF. Les valeurs de Ct sont respectivement de 28,87 ; 30,14 ; 30,98 ; 31,27 ; 32,40.

1.3.5. Extraction d'ADN du TIE à partir de sang total

Les résultats des trois séries d'extraction de sang total inoculé avec 100 µL de suspension de LTI à 1 MF figurent dans le tableau XXVIII.

Tableau XXVIII. Evaluation de la reproductibilité inter-essais de la procédure d'extraction sur le TIE : Ct obtenus à chaque série.

Série N°	Ct
1	31,08
2	31,51
3	30,91
Ct moyen	31,17
Ecart-type	0,31
Variance	0,10
CV (%)	0,99

Le coefficient de variation (CV) étant inférieur à 5 %, nous pouvons considérer que la procédure d'extraction vis-à-vis du TIE est reproductible.

Afin de pouvoir exploiter les résultats correspondant aux patients analysés de manière fiable et reproductible, il est décidé que la valeur de Ct obtenu pour chaque échantillon en PCR TIE doit impérativement se trouver entre 30 et 32. Cet intervalle est établi d'après cet essai de reproductibilité en appliquant 3 écarts types au Ct moyen obtenu. Ce critère de validation est valable pour un threshold positionné à 0.025.

Un volume de 100 µL d'une suspension à 1 MF de TIE (LTI) est inoculé dans chaque échantillon de sang total à tester avant la procédure d'extraction.

L'ensemble de la technique est validée si le Ct de l'échantillon en PCR TIE est compris entre 30 et 32.

II. Mise au point de la PCR *Candida* en temps réel TaqMan® : PCR CPAN

II. 1. Sélection d'un couple d'amorces pour la PCR CPAN

*II.1.1. PCR *Candida* SYBR® Green I*

L'ADN de *C. albicans* est amplifié par 6 des 8 couples testés : P1H1-P2Y1, P1P2-P2Y1, P1A3-P2Y1, P1P2-P3Y, P1P2-CanP04 et P1H1-CanP04. Toutefois l'analyse des courbes de fusion révèle un épaulement important pour le couple P1P2-P3Y et l'analyse du gel révèle une double bande pour P1A3-P2Y1 (résultats non présentés). Les quatre couples retenus à l'issue de cette étape sont alors P1P2-P2Y1, P1H1-P2Y1, P1P2-CanP04 et P1H1-CanP04 (figure 29).

II.1.2. PCR CPAN

La sonde CPAN fonctionne avec les quatre couples P1P2-P2Y1, P1P2-CanP04, P1H1-P2Y1, P1H1-CanP04 pour l'amplification d'ADN de *C. albicans*. Les Ct sont plus faibles lorsque l'on utilise l'amorce CanP04 par rapport à P2Y1 (tableau XXIX), en raison de la taille plus courte des fragments amplifiés (figure 29. c).

Ces quatre couples ont été testés en duplicate sur un échantillon de LTI : seul le couple P1H1-CanP04 ne croise pas, critère clé de la validation de la PCR. Nous retenons donc ce couple pour la mise au point de la PCR CPAN.

Les quatre couples retenus en SYBR® Green fonctionnent avec la sonde TaqMan® CPAN mais seul le couple P1H1-CanP04 n'amplifie pas l'ADN du TIE : P1H1-CanP04 est le couple retenu pour la PCR CPAN.

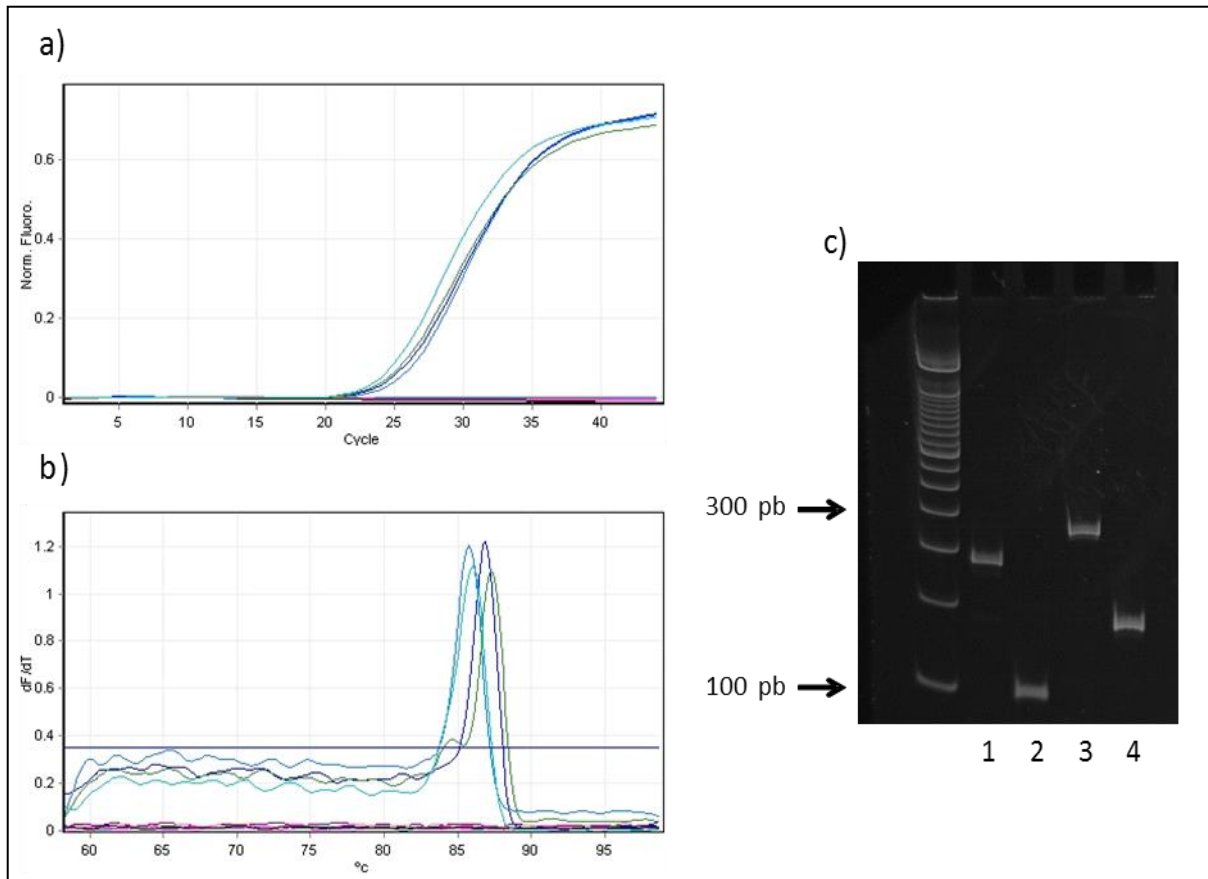


Figure 29. Sélection de couples d'amorces par PCR *Candida* SYBR® Green I.

a) Courbes d'amplification de la PCR *Candida* SYBR® Green I sur 1 pg d'ADN de *C. albicans* (CAAL-73) avec différents couples. De gauche à droite: P1P2-CanP04, P1P2-P2Y1, P1H1-P2Y1 et P1H1-CanP04.

b) Courbes de fusion des produits de chaque PCR. P1P2-P2Y1 (84,65°C), P1H1-CanP04 (85,75°C), P1P2-CanP04 (86°C) et P1H1-P2Y1 (86,85°C).

c) Contrôle de l'amplification par révélation des amplicons de chaque PCR en électrophorèse sur gel de polyacrylamide. (1) P1H1-P2Y1, (2) P1H1-CanP04, (3) P1P2-P2Y1 et (4) P1P2-CanP04. La taille attendue des fragments amplifiés est respectivement de 277, 103, 352 pb, et 174 pb (souches de références de *C. albicans* ATCC 90028 et 10231).

Tableau XXIX. Sélection de couples d'amorces par PCR CPAN avec les couples retenus en PCR *Candida* SYBR® Green I : Ct obtenus avec chaque couple sur une gamme d'ADN de *C. albicans* (CAAL-117).

Couple testé	Dilution d'ADN			
	1.10 ⁵ fg	1.10 ⁴ fg	1.10 ³ fg	1.10 ² fg
P1P2-P2Y1	23,91	27,24	31,48	35,43
P1P2-CanP04	20,79	25,13	28,84	33,88
P1H1-P2Y1	24,37	27,76	31,59	35,57
P1H1-CanP04	21,31	24,50	28,19	32,10

II.2. Température d'hybridation

Des dilutions en série d'un extrait d'ADN de *C. albicans* ont permis d'obtenir une gamme comportant 4 points de dilution : 1.10^5 , 1.10^4 , 1.10^3 et 1.10^2 fg/PCR.

Deux températures d'hybridation sont testées sur cette gamme : la température théorique optimale pour le couple en PCR TaqMan®, 58°C, et celle choisie pour la PCR TIE, 60°C. L'amplification à 60°C semble entraîner une diminution de sensibilité (tableau XXX) mais l'efficacité et la linéarité de la PCR sont bonnes (figure 30. Efficacité = 0,8 et $r = 1$). La température de 60°C est conservée, pour permettre la réalisation simultanée des PCR GFP et CPAN (PCR multiplex).

Tableau XXX. Test de température avec le couple P1H1-CanP04 : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN de *C. albicans* (CAAL-117) à 58 et 60°C.

Température testée	Dilution d'ADN			
	1.10^5 fg	1.10^4 fg	1.10^3 fg	1.10^2 fg
58°C	21,31	24,5	28,19	32,1
60°C	23,4	26,76	31,32	34,99

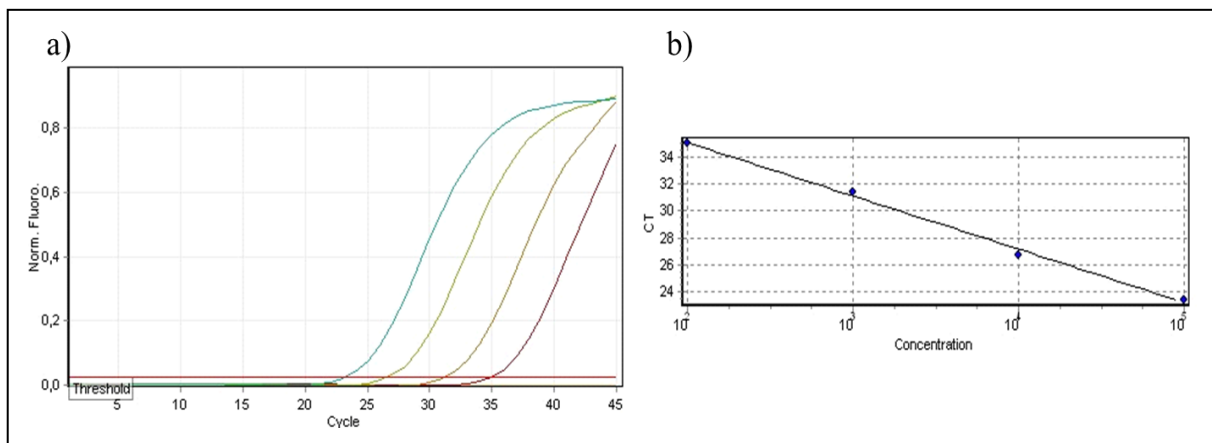


Figure 30. Gamme établie à partir de 4 dilutions de l'extrait d'ADN de *C. albicans*.

a) Courbes d'amplification de la PCR CPAN à 60°C sur la gamme d'ADN de *C. albicans* (CAAL-117). De gauche à droite : 1.10^5 ; 1.10^4 ; 1.10^3 et 1.10^2 fg/PCR.

b) Droite d'étalonnage représentant les valeurs de Ct en fonction de la quantité d'ADN cible contenu dans les 5 µL d'extrait utilisé dans la réaction de PCR.

II.3. Spécificité de la PCR

La PCR CPAN est testée sur de l'ADN de différentes espèces de *Candida*, de l'ADN humain, de l'ADN de bactéries et de l'ADN fongique autre que *Candida spp.* Les résultats sont regroupés dans le tableau XXXI. La PCR CPAN avec le couple P1H1-CanP04 à 60°C amplifie l'ADN de toutes les espèces de *Candida* testées, à l'exception de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, comme le prévoit le design du couple. Aucun des extraits d'ADN de bactéries et d'ADN humain ne sont amplifiés.

Parmi les micro-organismes fongiques testés autres que *Candida spp.*, les extraits d'ADN de *Cryptococcus neoformans* (Ct = 37.61), de *Mucor sp.* (Ct = 25.54), et de *Fusarium sp.* (Ct = 25.83) sont amplifiés par la PCR CPAN.

Tableau XXXI. Test de spécificité de la PCR CPAN : Résultats de la PCR CPAN réalisée sur différents extraits d'ADN.

<i>Candida spp.</i>		Fungi autres que <i>Candida spp.</i>		Bactéries		Homme	
<i>C. albicans</i>	+	<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	<i>Escherichia coli</i>	-	V1762	-
<i>C. glabrata</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	V1443	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	<i>Geotrichum candidum</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	V0984	-
<i>C. tropicalis</i>	+	<i>Trichosporon asahii</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	V1358	-
<i>C. krusei</i>	-	<i>Mucor sp.</i>	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		
<i>C. lusitaniae</i>	-	<i>Fusarium sp.</i>	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-		
<i>C. guilliermondii</i>	+	<i>Scedosporium sp.</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-		
<i>C. dubliniensis</i>	+	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-		
<i>C. kefyr</i>	+	<i>Penicillium sp.</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-		
				<i>Haemophilus influenzae</i>	-		
				<i>Streptococcus agalactiae</i>	-		
				<i>Listeria monocytogenes</i>	-		
				<i>Bacteroides sp.</i>	-		
				<i>Clostridium sp.</i>	-		

(+) : amplification ; (-) : absence d'amplification.

La PCR CPAN réalisée à 60°C permet l'amplification de l'ADN de toutes les espèces de *Candida* sauf *C. krusei*, *C. glabrata* et *C. lusitaniae*. Il n'y a pas de réaction croisée avec l'ADN de bactéries et l'ADN humain. Il y a des réactions non spécifiques avec de l'ADN d'autres champignons pathogènes : *C. neoformans*, *Fusarium sp.* et *Mucor sp.*

II.4. Standardisation de la PCR CPAN

II.4.1. Reproductibilité

Une évaluation de la reproductibilité de la méthode a été conduite en inter-essais sur les 6 dilutions de la gamme d'ADN de *C. albicans*, dans 10 essais différents (tableau XXXII).

Tableau XXXII. Etude de la reproductibilité inter-essais de la PCR CPAN : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN de *C. albicans* (CAAL-117) à chaque série.

Quantité d'ADN/réaction	1.10⁵ fg	1.10⁴ fg	1.10³ fg	1.10² fg
Série 1	21,77	25,03	29,39	32,47
Série 2	22,87	26,09	30,64	34,65
Série 3	22,8	26,11	30,73	34,47
Série 4	22,76	26,02	31,09	33,57
Série 5	23,4	26,76	31,32	34,99
Série 6	23,07	26,66	31,48	34,25
Série 7	24,07	27,02	31,52	35,63
Série 8	23,38	26,99	31,23	35,22
Série 9	23,26	26,62	31	34,46
Série 10	22,71	26,53	31,19	34,97
Ct moyen	23,01	26,38	30,96	34,47
Ecart-type	0,60	0,60	0,62	0,90
Variance	0,36	0,35	0,39	0,81
CV (%)	2,60	2,26	2,01	2,62

L'ensemble des coefficients de variation (CV) étant inférieurs à 5 %, nous pouvons considérer que la PCR CPAN est reproductible.

II.4.2. Répétabilité

Une évaluation de la répétabilité de la méthode a été réalisée en intra-essais sur 4 dilutions d'ADN de *C. albicans*. Chaque dilution a ainsi été testée 5 fois au cours d'une même PCR. Les résultats de cette étude sont illustrés par les courbes d'amplification obtenues (figure 31) et regroupés dans le tableau XXXIII.

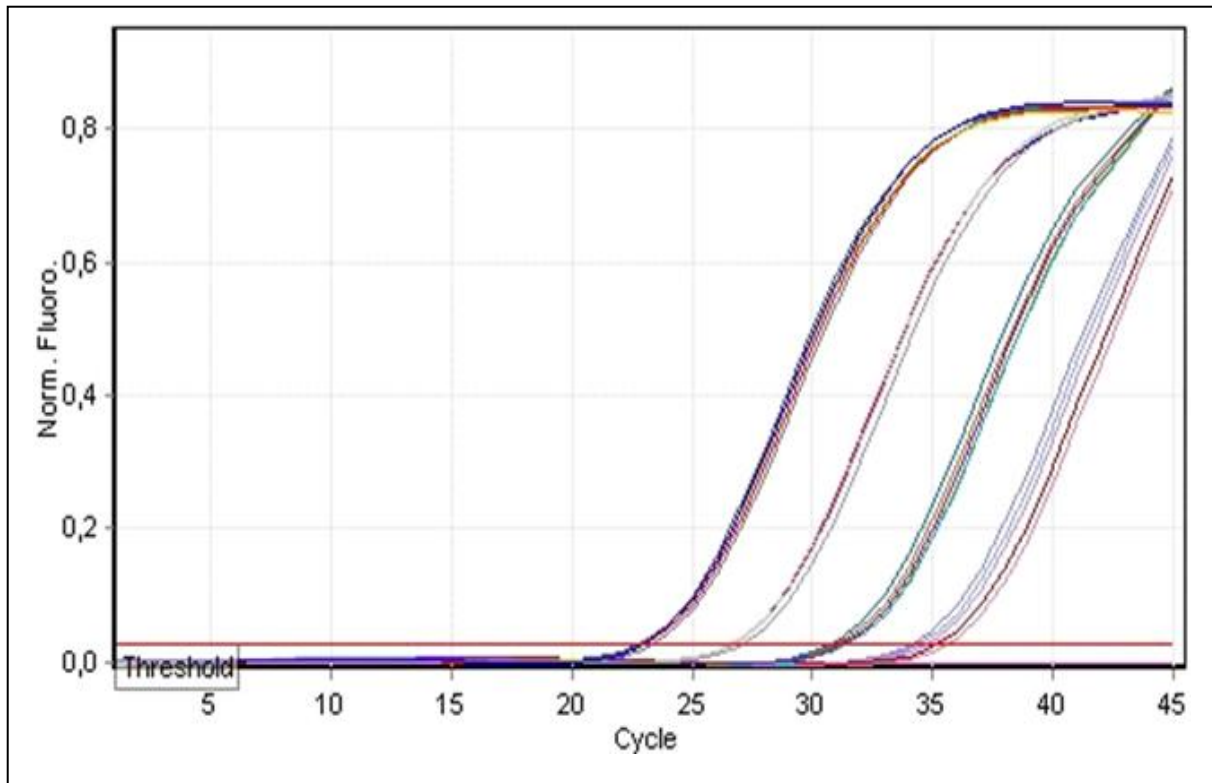


Figure 31. Etude de la répétabilité intra-essai de la PCR CPAN.

Courbes d'amplification de la PCR CPAN sur 4 points de gamme d'ADN de *C. albicans* (CAAL-117), testés 5 fois au cours d'une même série. De gauche à droite: 1.10^2 , 1.10^3 , 1.10^4 , 1.10^5 fg/PCR.

Tableau XXXIII. Etude de la répétabilité intra-essai de la PCR CPAN : Ct obtenus pour chaque dilution de la gamme d'ADN de *C. albicans* (CAAL-117) à chaque test.

Quantité d'ADN/réaction	1.10^5 fg	1.10^4 fg	1.10^3 fg	1.10^2 fg
Test 1	23,26	26,62	31	34,46
Test 2	22,79	26,62	31,41	34,08
Test 3	22,99	26,51	31,44	34,67
Test 4	22,86	26,67	30,75	35,56
Test 5	22,9	27,07	31,23	35,12
Ct moyen	22,960	26,698	31,166	34,778
Ecart-type	0,183	0,216	0,291	0,576
Variance	0,033	0,047	0,085	0,332
CV (%)	0,795	0,809	0,935	1,657

L'ensemble des coefficients de variation (CV) étant inférieurs à 5 %, nous pouvons considérer que la PCR CPAN est répétable.

II.4.3. Limite de détection et seuil de positivité

Six dilutions de l'extrait d'ADN de *C.albicans* (CAAL-117) ont été testées au cours de 10 PCR différentes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XXXIV.

Tableau XXXIV. Limite de détection et limite de sensibilité : Ct des 10 PCR réalisées sur 7 dilutions d'ADN de *C.albicans* (CAAL-117).

Quantité d'ADN/réaction	Nombre de PCR positives
1.10 ² fg	10 sur 10
10 fg	5 sur 10
7,5 fg	5 sur 10
5 fg	3 sur 10
2,5 fg	2 sur 10
1 fg	2 sur 10

La limite de détection correspond au nombre de copies pour lequel la réaction de PCR s'est avérée positive pour au moins 1 essai. Elle correspond ici à la valeur de 1 fg d'ADN par réaction de PCR.

Le seuil de positivité correspond au nombre de copies pour lequel la réaction de PCR est positive dans 100% des essais. Elle correspond ici à 100 fg d'ADN par réaction de PCR. Au-dessous de cette quantité la PCR n'est pas fiable.

Le Ct le plus élevé obtenu avec l'extrait à 100 fg est de 35,63. Nous décidons de fixer dans un premier temps le seuil de positivité à un Ct de 36 pour un threshold placé à 0.025. Les échantillons détectés par la PCR CPAN avec des Ct inférieurs à 36 seront donc qualifiés d'échantillons positifs. Ce seuil de positivité est provisoire et sera adapté en fonction des résultats de tests réalisés sur des échantillons de patients candidémiques.

La limite de détection de la PCR CPAN est évaluée à 1 fg.

La fiabilité de la détection est assurée jusqu'à 100 fg.

Le seuil de positivité provisoire est fixé à un Ct de 36.

III. Evaluation de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR CPAN

III.1. Sensibilité

Les résultats de la PCR CPAN sur des échantillons à 10 CFU/mL sans TIE, testés en parallèle d'échantillons à 10 CFU/mL avec TIE, sont rapportés dans le tableau XXXV. Les Ct sont du même ordre de grandeur avec ou sans TIE : la présence du TIE dans l'échantillon à analyser ne semble pas modifier la sensibilité de la PCR CPAN.

Tableau XXXV. Influence du TIE sur la sensibilité de la PCR CPAN : Ct obtenus avec la PCR CPAN pour des échantillons de sang inoculés à 10 CFU/mL (CAAL-117) contenant ou non le TIE.

Série n°	Ct PCR CPAN	10 CFU/mL sans TIE	10 CFU/mL avec TIE
1		32,9	31,41
2		32,06	31,03
3		30,92	32,4
	Ct moyen	31,96	31,61

Les PCR CPAN, TIE et IPC ont été réalisées sur les extraits d'une gamme de sang inoculé à 1, 5, 10, 50 et 100 CFU/mL (figure 32). Les PCR TIE et IPC sont validées pour chaque point de la gamme (figure 32. a et b). Notre procédure permet la détection de 1 CFU/mL à un Ct de 35,80 (figure 32. c), Ct très proche du seuil fixé arbitrairement à 36. Les échantillons à 5, 10, 50 et 100 CFU/mL sont détectés respectivement à : 33,84 ; 32,09 ; 29,92 et 28,36 (figure 32. c). La linéarité de la PCR sur cette gamme est de 0,99 et l'efficacité de 0,86 (figure 32. d).

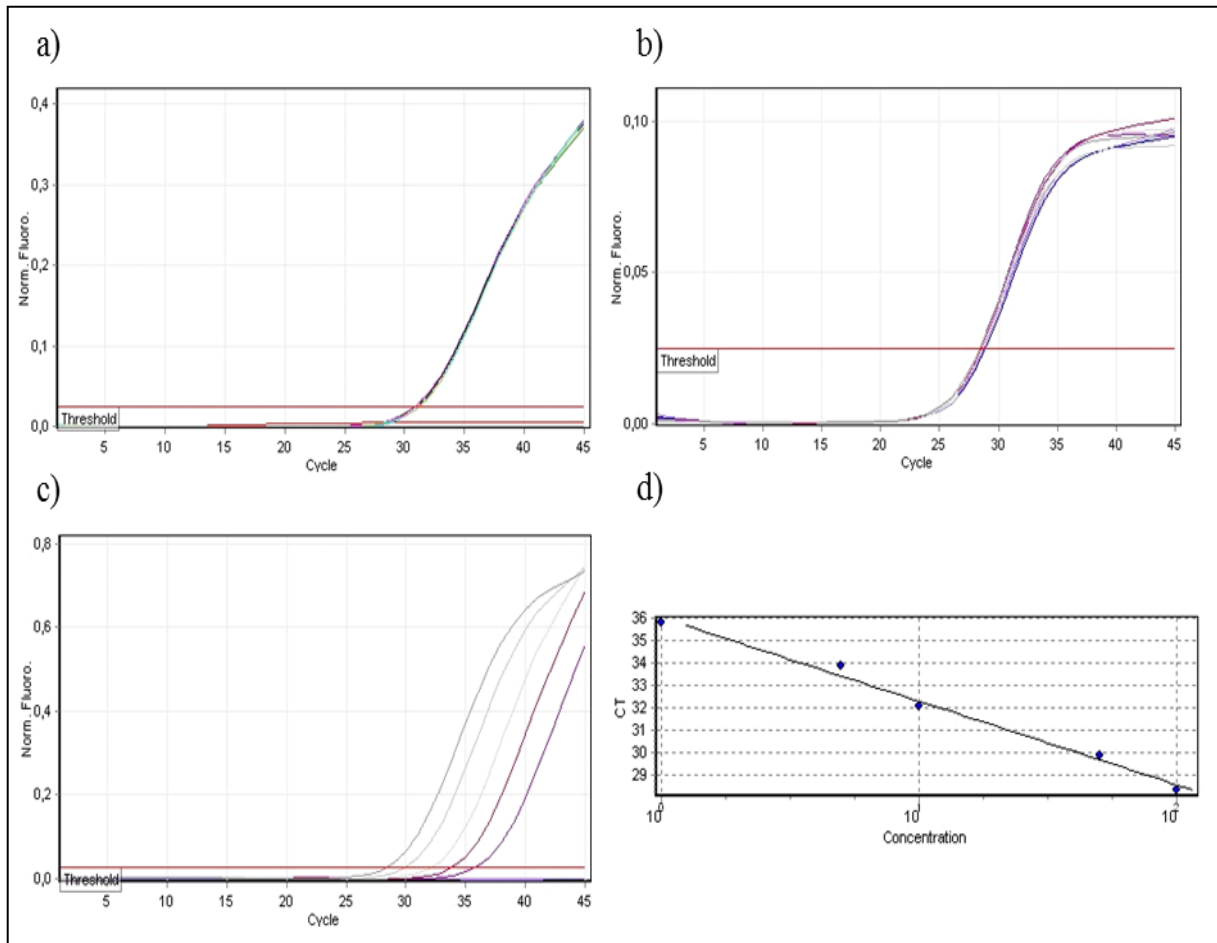


Figure 32. Evaluation de la totalité de la procédure, extraction et PCR, réalisée sur une gamme de sang inoculé.

a) Courbes d'amplification de la PCR TIE.

b) Courbes d'amplification de la PCR IPC.

c) Courbes d'amplification de la PCR CPAN. De gauche à droite : 100, 50, 10, 5 et 1 CFU/mL.

d) Droite d'étalonnage de la PCR CPAN représentant les valeurs de Ct en fonction de la concentration en CFU/mL.

III.2. Reproductibilité et répétabilité

Les résultats des 3 séries réalisées sur des échantillons de 2 ml de sang artificiellement inoculé à 10 CFU/mL (CAAL-117) contenant le TIE sont regroupés dans le tableau XXXVI et les 4 tests réalisés au cours d'une même série dans le tableau XXXVII. Les valeurs des Ct pour la PCR TIE sont comprises entre 30 et 32, ce qui valide les séries d'extraction. Les valeurs des Ct pour la PCR IPC sont inférieures à 30, ce qui valide l'absence d'inhibiteurs de PCR (d'après les résultats obtenus en PCR IPC en routine au laboratoire pour d'autres

techniques de PCR en temps réel). La valeur moyenne des Ct pour la PCR CPAN est de 31,61 lors de l'étude de répétabilité et de 32,04 lors de l'étude de répétabilité.

Tableau XXXVI. Etude de la reproductibilité inter-essais de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR : Ct obtenus avec chacune des PCR pour des échantillons de sang inoculés à 10 CFU/mL (CAAL-117) contenant le TIE.

Série N°	Ct PCR TIE	Ct PCR IPC	Ct PCR CPAN
1	31,61	27,63	31,41
2	31,41	29,08	31,03
3	31,82	28,82	32,4
Ct moyen	31,61	28,51	31,61
Ecart-type	0,21	0,77	0,71
Variance	0,04	0,60	0,50
CV (%)	0,65	2,71	2,24

Tableau XXXVII. Etude de la répétabilité intra-essais de l'ensemble de la procédure, extraction et PCR : Ct obtenus avec chacune des PCR pour des échantillons de sang inoculés à 10 CFU/mL (CAAL-117) contenant le TIE.

Test N°	Ct PCR TIE	Ct PCR IPC	Ct PCR CPAN
1	31,82	28,82	32,4
2	31,52	28,89	32,23
3	31,41	28,58	31,87
4	31,85	28,9	31,65
Ct moyen	31,65	28,80	32,04
Ecart-type	0,22	0,15	0,34
Variance	0,05	0,02	0,12
CV (%)	0,69	0,52	1,06

Les coefficients de variation (CV) étant inférieurs à 5 % pour chaque PCR, nous pouvons considérer que l'ensemble de la procédure, extraction et PCR, est reproductible et répétable.

L'ensemble de la procédure est sensible, reproductible, répétable, avec une détection de 1 CFU de *C. albicans*/mL de sang, soit 2 levures par PCR pour un échantillon initial de 2 mL.

Discussion

La présentation clinique non spécifique des candidémies, associée à la faible sensibilité des hémocultures, au délai nécessaire à leur positivité et à la nécessité de mise en route rapide d'un traitement antifongique efficace, implique le besoin de développer de nouvelles techniques de diagnostic précoce. De nombreuses techniques de PCR ont été développées ces dernières années avec cet objectif d'optimiser la prise en charge de ces infections au pronostic sombre (Avni *et al.*, 2011). Toutefois, aucune PCR « maison » ni commerciale n'est recommandée pour une utilisation en routine (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012), en lien avec l'absence de standardisation des techniques de PCR et d'extraction de l'ADN fongique à partir d'échantillons sanguins de patients. L'objectif de ce travail a donc été de mettre au point à partir des travaux déjà engagés dans l'EA1155 IICiMed, une technique d'extraction et une PCR *Candida* en accord avec les critères énoncés récemment dans les MIQE (Bustin *et al.*, 2009; Bustin *et al.*, 2010).

Technique d'extraction d'ADN de levures à partir de sang total

L'utilisation de serum ou de sang total pour le diagnostic des candidémies suscite toujours le débat, les comparaisons entre les études étant délicates puisque les techniques de PCR utilisées après l'extraction sont très variées. La méta-analyse réalisée récemment sur 54 études publiées de PCR est plutôt en faveur du sang total qui permettrait d'obtenir de meilleurs performances. L'utilisation du serum pose en effet le problème de la détection d'ADN libre de *Candida spp.* chez des patients fortement colonisés (Lièvre, 2003). La PCR *Candida* sera à terme réservée aux patients à risque de candidémies, incluant justement les patients fortement colonisés. La technique de PCR doit donc avoir une forte valeur prédictive positive pour permettre de prendre la décision d'instaurer ou non un traitement de candidémie. L'utilisation du serum pourrait alors diminuer la valeur prédictive positive de la PCR et faire perdre l'intérêt de son utilisation chez ce type de patients. Si la détection d'ADN libre dans le serum est pourtant souvent préférée (Bougnoux *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012), c'est pour sa simplicité, l'extraction d'ADN de levures entières à partir de sang total présentant un certain nombre d'inconvénients (Maaroufi *et al.*, 2004). Le procédé d'extraction mis au point au cours de ce travail permet de s'affranchir de la plupart des problèmes posés par ce type de techniques :

- La durée de l'extraction

La technique développée au cours de ce travail a été optimisée avec le souci d'obtenir une technique plus rapide. La lyse des cellules sanguines n'est pas séquentielle comme décrite initialement (Einsele *et al.*, 1997) mais est réalisée en un temps, avec une diminution du nombre de lavages nécessaires, des volumes de réactifs à utiliser, et des durées de centrifugation. A notre connaissance, une seule équipe a précédemment mis au point une technique de lyse en un temps mais à partir de 100 μ L de sang contrairement aux 2 mL utilisés avec notre protocole (Khan & Mustafa, 2001). Avec un volume de sang 200 fois plus important, la lyse des globules blancs entraîne un relargage massif d'ADN, responsable d'une viscosité très importante du prélèvement, d'autant plus lorsqu'il s'agit de patients hyperleucocytaires. L'amélioration de notre protocole a permis de s'affranchir de ce problème technique grâce à l'utilisation d'une enzyme lytique compatible avec le reste de notre procédure. L'extraction du culot de levures pour trois tubes dure alors environ 1h30, suivie de 40 minutes d'extraction d'ADN fongique à partir du culot. Cette technique est donc tout à fait applicable en routine au sein d'un laboratoire hospitalier.

- La variabilité des résultats causée par les difficultés de réalisation

L'extraction du culot de levures préalable à l'extraction de l'ADN fongique est effectivement une étape délicate. Les étapes de lavages nécessitent de la rigueur pour ne pas retirer une partie du culot de levures simultanément au retrait du surnageant. La diminution du nombre d'étapes diminue le risque de mauvaises manipulations, mais surtout, la présence du témoin interne d'extraction (TIE) permet de vérifier la qualité de l'extraction et de ne pas valider à tort une PCR faussement négative en raison d'une extraction mal réalisée. Le problème de la qualité de l'extraction avait justement été soulevé par Khot et Fredricks dans leur revue de la littérature visant à évaluer les techniques de PCR fongiques par rapport aux critères des MIQE (Khot & Fredricks, 2009). Les auteurs avaient alors jugé l'évaluation des techniques d'extraction insuffisantes. Effectivement, le témoin positif d'extraction, lorsqu'il est présent, est généralement constitué par du sang artificiellement inoculé avec une quantité connue de levures, extrait en parallèle des échantillons de patients au cours de la même série (White *et al.*, 2003; Jordanides *et al.*, 2005; Moreira-Oliveira *et al.*, 2005; Klingspor & Jalal,

2006). L'utilisation de ce type de témoins ne permet pas une évaluation satisfaisante de l'extraction pour chaque échantillon, c'est pourquoi Khot et Fredricks recommandent l'utilisation d'un TIE exogène phylogénétiquement éloigné du pathogène ciblé, qui reflète le passage de l'ADN de ce dernier au sein du processus d'extraction et permette ainsi d'évaluer l'efficacité de l'extraction dans chaque échantillon clinique. A notre connaissance, une seule équipe a publié une technique d'extraction utilisant un TIE (Nguyen *et al.*, 2012). Cette équipe a ajouté préalablement un bactériophage à l'échantillon du patient, l'extraction de l'ADN fongique étant réalisée directement à partir du sang total à l'aide d'un kit commercial, sans extraction préalable du culot de levures. Pour le développement d'un TIE avec notre procédure d'extraction, l'utilisation d'un bactériophage n'est pas possible, l'ADN libre étant éliminé au cours de la procédure. Ce TIE doit alors posséder à la fois des propriétés similaires aux levures du genre *Candida* mais doit être suffisamment éloigné phylogénétiquement pour ne pas croiser avec la PCR *Candida*. Cette levure ne doit être ni pathogène, ni commensale de l'homme, et sa détection par PCR dans le sang ne doit pas utiliser une cible génomique proche de celle utilisée pour la PCR *Candida* pour éviter les réactions croisées. La levure LTI choisie répond à ses critères et possède par ailleurs des propriétés communes aux levures du genre *Candida*, notamment au niveau de la composition de sa paroi et de sa membrane cellulaire, permettant un bon reflet de l'extraction simultanée de l'ADN d'éventuelles *Candida spp.* Dans un souci de spécificité, la température d'amplification de 60°C a été retenue : elle offre des conditions de stringence plus élevées qui permettent de limiter les amplifications non spécifiques. Le volume et la concentration retenus sont de 100 µL à 1 MF (environ 3.10^8 CFU/mL) de LTI inoculés dans le sang du patient pour constituer le TIE. Une concentration élevée est nécessaire puisque le gène cible n'est pas présent en nombreuses copies dans le génome de cette levure, rendant peu sensible la PCR. Une concentration plus élevée augmenterait le risque de réactions croisées ou d'inhibition de la PCR, les quantités d'ADN de *Candida* extraites simultanément étant déjà beaucoup plus faibles. Une concentration inférieure ne permet pas d'obtenir un culot visible au moment de l'extraction, facteur facilitant la réalisation de la procédure au moment des lavages et des retraits de surnageant. Une suspension extemporanée de TIE est réalisée, ce qui permet de s'affranchir d'une variabilité due à l'utilisation de suspensions congelées. La suspension est préparée aisément grâce à une mesure en MF plutôt qu'une numération des levures, plus fastidieuse.

- la présence de grandes quantités d'inhibiteurs de PCR

La présence d'inhibiteurs de PCR tels que l'hémoglobine est limitée par l'extraction du culot de levures après la lyse des cellules sanguines vis-à-vis d'une extraction directement réalisée à partir du sang total. Toutefois, il est indispensable d'utiliser un témoin interne d'amplification, qui correspond à la PCR IPC de notre protocole. Aucun inhibiteur de PCR n'a été mis en évidence au cours de ce travail.

- L'extraction concomitante d'ADN humain présent dans les leucocytes

L'utilisation d'une enzyme lytique au cours de notre protocole amélioré permet non seulement de s'affranchir de la viscosité de l'échantillon après la lyse des cellules sanguines en un temps, mais également de concentrer l'ADN fongique vis-à-vis de l'ADN humain, comme nous l'avons évalué grâce à l'utilisation d'une PCR albumine. L'ADN humain présent en grande quantité après la lyse des leucocytes peut être en effet responsable à la fois de faux-positifs en raison de réactions croisées en PCR *Candida*, notamment lorsque la cible est l'ARNr (Baskova *et al.*, 2007), mais aussi de faux-négatifs en inhibant la PCR fongique (Klingspor & Jalal, 2006). Une concentration de l'ADN fongique vis-à-vis de l'ADN humain semble alors préférable pour ce type de PCR où l'inoculum initial de levures est très faible (Khot & Fredricks, 2009). Peu d'études à ce jour ont évalué la quantité d'ADN fongique extrait au cours de leur protocole d'extraction (Khot & Fredricks, 2009). Klingspor et Jalal ont estimé qu'à partir de 500 ng d'ADN humain leur PCR était inhibée. La solution alors proposée par les auteurs était de mesurer la quantité d'ADN extrait et de le diluer à partir de ce seuil de 500 ng (Klingspor & Jalal, 2006). Notre protocole n'entraîne l'extraction que d'une faible quantité d'ADN humain, de l'ordre du nanogramme.

- Le risque de faux-positifs liés à l'introduction d'ADN fongique dans les préparations enzymatiques commerciales utilisées pour l'extraction.

Il a précédemment été démontré que de l'ADN fongique pouvait être présent dans les préparations commerciales de lyticase ou de zymolase (Loeffler *et al.*, 1999). Au cours d'un précédent travail, la présence d'ADN de levures du genre *Candida* avait été mise en évidence

dans de l'eau utilisée pour la préparation de nos réactifs d'extraction, en lien avec l'utilisation d'une résine défectueuse de l'instrument de purification de l'eau (données personnelles). L'utilisation d'un témoin négatif d'extraction « réactifs seuls » dans notre procédure permet de mettre en évidence ce type de contaminations et de déclencher une enquête pour en connaître l'origine. L'association d'un témoin négatif constitué par un échantillon de sang de volontaire sain permet d'avoir une première orientation sur l'origine de la contamination.

La technique d'extraction d'ADN fongique à partir de sang total développée au cours de ce travail permet donc une lyse en un temps des cellules sanguines, réalisable en routine au sein d'un laboratoire hospitalier et évaluée grâce à un TIE. La concentration de l'ADN fongique vis-à-vis de l'ADN humain garantit une extraction de qualité permettant d'extraire l'ADN de faibles quantités de levures présentes dans le sang. A l'heure actuelle, deux kits commerciaux validés cliniquement permettent l'extraction d'ADN de micro-organismes infectieux (bactéries et champignons) après concentration, le kit MoLYsis™ et le kit Pureprove®. Le kit Pureprove® utilise la reconnaissance de motifs de l'ADN de bactéries et de champignons. Il semblerait qu'une quantité totale d'ADN > 20 µg ou qu'une concentration > 1500 cellules/mL soit nécessaire pour que l'utilisation de ce kit ait un intérêt et n'entraîne pas, à l'inverse, une perte d'ADN fongique (Springer *et al.*, 2013). Cette condition fait alors perdre tout intérêt à ce kit pour le diagnostic des candidémies, la neutropénie sévère faisant partie des principaux facteurs de risque de candidémie. Le kit MoLYsis™ utilise quant à lui une enzyme lytique pour éliminer l'ADN libre et l'ADN humain issu de la lyse des cellules sanguines, avant de lyser les germes infectieux. Nous avons choisi de tester ce kit mais son utilisation a posé le problème d'une lyse insuffisante, ne permettant pas une extraction automatique sur l'automate iPrep® que nous souhaitons utiliser en amont de la PCR *Candida*. Nous n'avons pas testé pour l'extraction d'autres automates disponibles sur le CHU, ces derniers étant principalement utilisés pour des séries importantes, hebdomadaires ou quotidiennes, et se prêtant moins à des extractions « au coup par coup » que l'iPrep®. Le kit MoLYsis™ a pourtant précédemment montré son efficacité, notamment dans une publication de Wellinghausen où son utilisation à partir de sang total en association à une PCR *Candida* permettait d'obtenir une limite de détection de 3 CFU/mL (Wellinghausen *et al.*, 2009).

Cependant, plusieurs équipes émettent des réserves vis-à-vis de ce kit. Une publication récente indique que des échantillons de 1 mL traités avec le kit MolYsis™ présentent une viscosité importante par rapport à ceux de 5 mL. Cette viscosité serait responsable d'une élimination très variable de l'ADN humain, ainsi qu'un manque de reproductibilité des Ct par la suite en PCR (Loonen *et al.*, 2013). D'autre part, même pour des échantillons contenant des bactéries en grande quantités, son utilisation entraînerait une perte importante d'ADN bactérien (Horz *et al.*, 2010). Notre protocole amélioré semble donc plus efficace, notamment grâce à une lyse optimale, même pour un volume de sang inférieur à 5 mL et chez des patients hyperleucocytaires. Un nouveau kit développé très récemment, le kit Polaris® (Biocartis), a été testé sur des échantillons de sang artificiellement inoculé avec *C. albicans* (Loonen *et al.*, 2013). Ce kit permet la lyse sélective des cellules sanguines et la fragmentation de l'ADN libre et de l'ADN humain relargué grâce à un détergent actif à pH élevé. Leur protocole d'une durée annoncée de 45 min nécessite plusieurs étapes de neutralisation, le reste du protocole étant similaire au notre ou à celui du kit MolYsis™. Le kit Polaris® n'est pas encore validé cliniquement mais il serait plus performant que le kit MolYsis™ sur du sang artificiellement inoculé par des levures et des bactéries, et des résultats prometteurs ont été obtenus sur quelques échantillons de patients bactériémiques (Loonen *et al.*, 2013). Le kit est en cours d'automatisation et son association à des kits déjà commercialisés de PCR est en cours d'étude prospective à partir de 5 mL de sang total EDTA. Aucun des kits cités ne sont fournis avec un TIE.

PCR *Candida* : mise au point de la PCR CPAN

Ce travail de thèse est à intégrer au sein de la mise au point d'une PCR *Candida* qui puisse permettre à la fois la détection précoce d'une candidémie, mais aussi une première orientation sur l'espèce en cause, particulièrement s'il s'agit ou non d'une espèce connue pour avoir un profil de résistance ou de sensibilité diminuée aux antifongiques. Les choix réalisés pour la réalisation de la PCR CPAN, ainsi que les résultats obtenus sont discutés point par point.

- Mise au point d'une PCR spécifique de genre

La mise au point d'une PCR spécifique de genre, et non pas d'une PCR panfongique, limite le risque de PCR faussement positives à cause de contaminations environnementales. Ces contaminants posent moins de problèmes lorsqu'il s'agit d'identifier des colonies isolées ou des levures présentes dans un flacon d'hémoculture positif. La quantité de champignon pathogène est alors suffisamment importante pour qu'un contaminant présent en très faible quantité ne modifie pas le résultat de la PCR. En revanche, lorsque l'on utilise une PCR panfongique pour détecter de très faibles quantités de champignons, comme c'est le cas pour les candidémies, la présence de contaminants représente un risque important de rendre un résultat faussement positif. Dans un contexte où de plus en plus de champignons sont décrits comme agents pathogènes opportunistes chez l'homme (Kontoyiannis *et al.*, 2010), faire le diagnostic différentiel entre un contaminant ou un réel agent d'infection fongique peut s'avérer délicat avec ce type de PCR.

- Technique de PCR utilisée

Une PCR *Candida* classique associée à une détection enzymatique (PCR-DEIA) avait été préalablement mise au point par notre laboratoire (Lièvre, 2003). Les techniques évoluant, il semblait intéressant de poursuivre le développement de cette PCR non plus en point final mais en temps réel. Le principal inconvénient du SYBR® Green est la fréquence des amplifications non spécifiques en lien avec son principe même de fonctionnement. Ceci peut ne pas poser de problème lorsque l'on cherche à amplifier une seule cible, l'analyse des courbes de fusion permettant de s'assurer qu'il s'agisse du bon amplicon et non d'une amplification non spécifique. Toutefois, il arrive qu'une amplification non spécifique donne un T_m proche de l'amplicon du gène d'intérêt, entraînant un risque de rendre un résultat positif à tort. Ces amplifications non spécifiques ont pu être observées lors d'un précédent travail au laboratoire (résultats personnels non publiés) et par d'autres équipes (White *et al.*, 2003). A l'inverse, dans un contexte où de plus en plus d'espèces rares de *Candida* sont isolées, la présence d'une espèce dont le T_m n'a pas été étudié lors de la mise au point risque d'entraîner de faux-négatifs. Etant donné ces limites, la technologie SYBR® Green ne semble pas être optimale pour la mise au point d'une PCR *Candida* pour le diagnostic des

candidémies. Sa facilité de mise en œuvre a tout de même été mise à profit pour le screening en amont de différents couples d'amorces. La meilleure spécificité qu'offre la technologie TaqMan®, auxquelles s'ajoutent les possibilités de multiplexage, en font une technique de choix pour la mise au point d'une PCR *Candida*.

- Espèces ciblées

Ce travail a consisté en la mise au point d'une première technique de PCR, la PCR CPAN. Les autres PCR qui y seront associées seront mises au point ultérieurement. Le couple retenu permet la détection de toutes les espèces de *Candida* à l'exception de *C. glabrata*, *C. krusei*, et *C. lusitaniae*. Les couples permettant la détection de toutes les espèces de *Candida* sans exception n'étaient pas suffisamment spécifiques pour ne pas détecter le TIE. Peu d'équipes utilisent une PCR de genre destinée à détecter toutes les espèces de *Candida* mais préfèrent la détection des espèces les plus fréquemment isolées (Ahmad *et al.*, 2002; Bu *et al.*, 2005; Dunyach *et al.*, 2008; McMullan *et al.*, 2008; Badiie *et al.*, 2009; Fricke *et al.*, 2010). Le nombre d'espèces rares de *Candida* isolées chez l'homme étant de plus en plus important, il semble préférable d'associer à la détection spécifique de certaines espèces une PCR de genre au sens large et de ne pas cibler que les espèces fréquentes de candidémies, ce qui est rarement le cas (Klingspor & Jalal, 2006; Innings *et al.*, 2007). Certaines équipes ont inclus au sein de leur PCR une détection spécifique de *C. glabrata* et de *C. krusei* pour avoir une indication sur la résistance aux azolés (Innings *et al.*, 2007; McMullan *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2012). L'association de la PCR CPAN à plusieurs PCR spécifiques des espèces les plus fréquemment retrouvées (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* et *C. tropicalis*) ainsi que de *C. lusitaniae*, permettra de donner une première orientation sur la sensibilité de l'espèce en cause, *C. glabrata* et *C. krusei* étant respectivement de sensibilité diminuée et résistante aux azolés, *C. lusitaniae* résistante à l'amphotéricine B, *C. parapsilosis* présentant des CMI élevées aux échinocandines et *C. albicans* et *C. tropicalis* sensibles aux antifongiques. La spécificité de notre PCR s'est révélée excellente vis-à-vis d'un panel d'ADN humain et bactérien, avec l'absence de mise en évidence de réactions croisées, indispensable à la validation de notre couple. Effectivement, de l'ADN humain résiduel est tout de même présent dans l'extrait final d'ADN et la présence

d'un sepsis bactérien concomitant n'est pas à exclure (Klotz *et al.*, 2007). En revanche, parmi les champignons testés, l'ADN de *C. neoformans*, *Fusarium sp.* et *Mucor sp.* a été détecté avec la PCR CPAN. Ces champignons étant de potentiels agents pathogènes responsables de septicémies, le couple sélectionné a tout de même été conservé pour la suite de la mise au point. L'équipe de Maaroufi a mis au point une PCR destinée à cibler les espèces les plus fréquentes de *Candida spp.* (Maaroufi *et al.*, 2003). De la même façon que notre PCR CPAN, leur PCR croisait finalement avec un grand nombre de levures et de filamenteux non ciblés initialement tels que *S. cerevisiae*, *Fusarium spp.*, *C. neoformans*, ou *S. apiospermum*, reflétant la difficulté de mettre au point une PCR totalement spécifique du genre *Candida*. Dans ce cas, seul le séquençage des produits de PCR permet d'affirmer qu'il s'agit d'un *Candida spp.* ou d'un autre champignon. Une autre possibilité serait de développer des sondes spécifiques de tous les champignons ciblés par notre PCR CPAN. Il faudrait alors tester un panel encore plus large d'ADN fongique, incluant également des contaminants environnementaux, pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'autres réactions croisées, ce qui resterait impossible à affirmer avec certitude. Un séquençage rapide des produits d'amplifications de la PCR CPAN pourrait être réalisé lorsque cette PCR sera la seule positive.

- Limite de détection.

La limite de détection de notre PCR est de 1 fg (soit l'équivalent d'un seul génome fongique) et le seuil de positivité est de 100 fg d'ADN par réaction de PCR, c'est-à-dire qu'à partir de 100 fg d'ADN, 100% des PCR sont positives. Le Ct seuil pour rendre un résultat de PCR CPAN positif a été fixé provisoirement à 36, d'après les Ct obtenus pour 100 fg lors de l'étude de reproductibilité. Le résultat sera alors rendu avec une limite de sensibilité ≥ 100 fg par réaction de PCR, c'est-à-dire ≥ 2 CFU environ par réaction de PCR. Le risque avec ce seuil est de rendre négatives à tort des PCR dont le Ct serait supérieur à 36 en raison d'un très faible inoculum fongique, mais à l'inverse, fixer un seuil au-delà de 36 Ct expose au risque de rendre des PCR positives à tort en raison d'amplifications non spécifiques. Dans tous les cas, chaque extrait d'ADN sera passé en duplicate et tout résultat proche du Ct seuil nécessitera de contrôler la PCR sur un nouveau prélèvement pour confirmer le résultat. L'ensemble de la procédure mise au point au cours de ce travail (extraction et PCR) n'a pu être testée que sur

une seule gamme de sang artificiellement inoculée avec *C. albicans*. L'ensemble de la gamme a été détectée (1, 5, 10, 50 et 100 CFU/mL), avec une détection de 1 CFU/mL à la limite du seuil de positivité provisoire. Dans tous les cas, seule la répétition d'extractions et de PCR réalisées sur des gammes de sang inoculé permettra de conclure quant à la réelle limite de détection et au seuil de positivité de l'ensemble de notre technique, ainsi qu'à notre rendement d'extraction. Dans la méta-analyse de Avni, une limite de détection <10 CFU/mL est significativement associée à une meilleure sensibilité des techniques de PCR (Avni *et al.*, 2011). En effet, une des principales difficultés à obtenir un diagnostic précoce des candidémies est le faible inoculum fongique présent dans le sang. Une étude récente s'est intéressée à la quantification du nombre de CFU présents dans les premières hémocultures positives de patients, en rétrospectif sur 152 épisodes de candidémies diagnostiqués grâce à des hémocultures quantitatives (Pfeiffer *et al.*, 2011). La quantité médiane de CFU était de 1 CFU/mL (0,1 - >1000), avec plus de 50% des hémocultures pour lesquelles moins de 1 CFU/mL était retrouvé. La sensibilité de notre technique pourrait être encore améliorée. Tout d'abord, il est possible d'optimiser les conditions de la PCR en tant que telle, avec notamment des tests de concentrations plus élevées de MgCl₂ dans le mix réactionnel. Ceci ne pourra être réalisé qu'après avoir défini les associations de PCR pour le multiplexage, la PCR CPAN n'étant associée à l'heure actuelle qu'à la PCR IPC, association testée au préalable pour vérifier l'absence de modification du nombre de Ct pour chacune des PCR (résultats non présentés). La PCR nichée, utilisée par certaines équipes pour augmenter la sensibilité de la technique (Khan & Mustafa, 2001; Khlif *et al.*, 2009), peut être intéressante dans le cas où la concentration de l'ADN fongique vis-à-vis de l'ADN humain et/ou d'autres inhibiteurs est souhaitée. Notre technique ayant une limite de détection proche de la limite maximale théorique, et notre extraction concentrant déjà l'ADN fongique, il n'y a pas de bénéfice à utiliser une PCR nichée qui risque d'autre part d'augmenter le risque de contaminations. Par ailleurs, il pourrait être envisagé d'utiliser un volume de sang total initial encore plus important, 5 mL par exemple (Loonen *et al.*, 2013). Les volumes de réactifs d'extraction seraient alors à adapter et le coût de la technique plus important. Concernant le volume d'élution de 50 µL pour obtenir l'extrait d'ADN, il n'est pas possible de le diminuer puisqu'il en faut une quantité suffisante pour réaliser les différentes PCR en duplicate, et éventuellement contrôler un résultat en cas de doute ou d'erreur au cours de la technique. Il en est de même pour le volume d'extrait de 5 µL à déposer dans les différents mix réactionnels.

Par ailleurs, la limite de détection de la PCR CPAN devra être au préalable évaluée sur des gammes d'ADN de *Candida non-albicans* et des gammes de sang inoculé avec des *Candida non-albicans*. En effet, lorsque la limite de détection des techniques de PCR est testée vis-à-vis de différentes espèces, il est fréquent qu'elle varie de façon importante. Ces différences sont peut être en lien avec une variabilité du nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 18S, comme l'on peut l'observer au sein même de l'espèce *A. fumigatus*, avec des différences observées entre les souches (Herrera *et al.*, 2009). A titre d'exemple, avec une PCR « maison », l'équipe de Lau rapportait une limite de détection de 10 CFU/mL pour *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* mais de 100 CFU/mL pour *C. krusei* (Lau *et al.*, 2010). De même, le kit commercial SeptiFast® annonce une limite de détection de 30 CFU/mL pour *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* mais de 100 CFU/mL pour *C. glabrata* (Westh *et al.*, 2009).

Conclusion et perspectives

L'utilisation de la PCR pourrait permettre un diagnostic plus précoce des candidémies que la réalisation d'hémocultures et par conséquent, l'initiation plus précoce d'un traitement antifongique (Bloos *et al.*, 2013). Toutefois, il n'est pas envisagé de substituer la PCR à la réalisation d'hémocultures, seule technique permettant d'isoler la ou les souches responsables et de tester leur sensibilité, mais plutôt d'utiliser la PCR en combinaison avec les hémocultures et les méthodes de diagnostic indirect (Mokaddas *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012). Le coût additionnel de la réalisation de la PCR pourrait être compensé par l'administration plus précoce d'un traitement moins coûteux que les échinocandines, comme il l'a été démontré pour l'utilisation de la PCR à large spectre pour les sepsis bactériens avec une désescalade plus précoce des antibiotiques (Lehmann *et al.*, 2010). Les recommandations thérapeutiques de l'IDSA sont en faveur, sous réserve que le patient soit stable, d'une désescalade thérapeutique rapide des échinocandines ou de l'amphotéricine B vers le fluconazole par voie orale dès l'identification de l'espèce, sauf pour *C. glabrata* où l'administration d'un azolé n'est recommandée qu'après vérification de sa sensibilité par antifongogramme (Pappas *et al.*, 2009). Les recommandations de l'ECMID sont plus floues à ce sujet, le relais par fluconazole par voie orale n'est recommandé qu'à J10 d'un traitement initié par échinocandines, sans précision sur la possibilité d'un relais plus précoce par voie intraveineuse (Cornely *et al.*, 2012). On peut imaginer que la mise au point d'une PCR *Candida* telle que nous l'envisageons, c'est à dire associant une PCR Pan *Candida* à des PCR spécifiques d'espèces, permettrait si l'espèce est connue comme sensible une désescalade thérapeutique plus précoce.

Plusieurs mises au point de PCR similaires à celle réalisée ici pour la PCR CPAN sont nécessaires à l'obtention de notre PCR *Candida*, chaque PCR nécessitant une validation individuelle avant d'évaluer les possibilités de multiplexage. Même si des kits commerciaux sont déjà disponibles, leurs faibles performances justifient l'intérêt de poursuivre le développement de notre technique. Le kit SeptiFast® possède par exemple une limite de détection qui semble trop élevée par rapport aux faibles charges fongique que l'on retrouve dans le sang au cours d'une candidémie (Pfeiffer *et al.*, 2011) : 100 CFU/mL pour *C. glabrata* et 30 CFU/mL pour les autres espèces (Westh *et al.*, 2009). Une étude réalisée en 2009 a d'ailleurs rapporté l'absence de détection de *C. glabrata* avec ce kit au cours d'une fongémie prouvée par hémoculture (von Lilienfeld-Toal *et al.*, 2009). Une étude de 2013 évaluant le kit VYOO®, le Sepsitest® et le SeptiFast® sur 50 patients suspects de septicémie, indiquait

qu'aucun de ces trois kits n'avait permis la détection de *C.albicans* chez le seul patient dont la candidémie était prouvée par hémoculture (Schreiber *et al.*, 2013). Un résultat similaire a été écrit en 2012 par une autre équipe concernant le kit VYOO® (Fitting *et al.*, 2012). À notre connaissance, aucune équipe n'a utilisé le schéma que nous envisageons, et une seule équipe a publié une procédure complète, extraction et PCR *Candida*, en accord avec les MIQE (Nguyen *et al.*, 2012). La différence principale de leur procédure vis-à-vis de la nôtre est l'utilisation du serum comme échantillon initial. Concernant la PCR, la stratégie est également différente de celle que nous envisageons, avec la détection de deux « paires » d'espèces, *C.albicans/C.tropicalis* et *C.glabrata/C.krusei*, et du complexe *C.parapsilosis*, mais sans détection de *C. lusitaniae* ni PCR Pan *Candida* associée. Une mise au point semblable de PCR spécifiques d'espèces devra être réalisée, c'est-à-dire grouper la détection des espèces en fonction de leur sensibilité aux antifongiques pour diminuer le nombre total de PCR et faciliter le multiplexage. A l'avenir, le respect des MIQE pour la mise au point de notre PCR facilitera les comparaisons inter-laboratoires, très peu nombreuses à l'heure actuelle (Reichard *et al.*, 2012), permettant ainsi la réalisation d'essais multicentriques.

La technique d'extraction développée au cours de ce travail est en revanche dès aujourd'hui applicable telle quelle en routine pour l'extraction d'ADN de levures à partir de sang total. À notre connaissance, il s'agit de la seule technique d'extraction à partir de sang total avec concentration préalable de l'ADN fongique, disposant d'un TIE. On peut imaginer que cette technique soit utilisée en amont d'autres PCR fongiques spécifiques de genre, après validation de l'absence de réactions croisées des amorces/sondes utilisées avec le TIE. Pour la lyse de champignons filamenteux, plus délicate, il serait alors approprié d'ajouter une lyse mécanique de la paroi fongique à la lyse par la lyticase, à l'aide de billes par exemple. Cette technique pourrait également être utilisée à partir d'autres échantillons biologiques, en ajoutant si nécessaire des étapes spécifiques au type de prélèvement (utilisation de billes en amont pour les biopsies, d'un mucolytique pour des crachats etc...).

Une fois la PCR *Candida* mise au point, l'évaluation de notre procédure sera réalisée en rétrospectif sur une centaine d'échantillons de 2 mL de sang de patients candidémiques prélevés immédiatement après la positivité de l'hémoculture fongique. Ces résultats permettront d'ajuster le seuil de positivité de la PCR et d'envisager si nécessaire l'utilisation

d'un volume de sang plus important. L'étape suivante serait de tester l'intérêt clinique de la PCR *Candida* lors d'une étude prospective développée en collaboration avec les services de réanimation du CHU de Nantes, chez les patients présentant :

- un tableau infectieux : une fièvre $\geq 39^{\circ}\text{C}$ et/ou des signes évocateurs d'une décharge infectieuse tels qu'un choc, des marbrures, des frissons...
- Et au moins un des éléments suivants : une pathologie hématologique, digestive (péritonite, pancréatite, infection des voies biliaires, ulcère gastroduodéal...), une greffe d'organes.
- Et au moins un des éléments suivants : une hospitalisation en réanimation depuis plus de 5 jours, un cathéter veineux central depuis plus de 5 jours, une antibiothérapie préalable depuis plus de 5 jours.

En fonction des résultats de cette étude, l'approche diagnostique sera transférée au sein du laboratoire hospitalier.

Références bibliographiques

- Ahmad, S., *et al.* (2012). Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Infect Dis*, 12, 230.
- Ahmad, S., *et al.* (2002). Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: Comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7), 2483-2489.
- Aittakorpi, A., *et al.* (2012). Accurate and rapid identification of *Candida spp.* frequently associated with fungemia by using PCR and the microarray-based Prove-it Sepsis assay. *J Clin Microbiol*, 50(11), 3635-3640.
- Alcoba-Florez, J., *et al.* (2005). Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis sp. nov.*, a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol*, 43(8), 4107-4111.
- ANOFEL. (2010). Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. (2e éd.). Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson.
- Arendrup, M. C., *et al.* (2011). Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *J Clin Microbiol*, 49(9), 3300-3308.
- Atkinson, B. J., *et al.* (2008). *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol*, 46(6), 541-546.
- Avni, T., *et al.* (2011). PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*, 49(2), 665-670.
- Bader, O. (2013). MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13(5), 788-799.
- Badiee, P., *et al.* (2009). Study on invasive fungal infections in immunocompromised patients to present a suitable early diagnostic procedure. *Int J Infect Dis*, 13(1), 97-102.
- Baskova, L., *et al.* (2007). The Pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. *J Med Microbiol*, 56(Pt 9), 1167-1173.
- Bergman, A., *et al.* (2007). Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26(11), 813-818.
- Bloos, F., *et al.* (2013). Attributable costs of patients with candidemia and potential implications of polymerase chain reaction-based pathogen detection on antifungal therapy in patients with sepsis. *J Crit Care*, 28(1), 2-8.
- Bouchara, J. P., *et al.* (2010). Les levures et levuroses (Vol. 44): Bioforma.
- Bougnoux, M., *et al.* (1999). Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol*, 37(4), 925-930.
- Bourgeois, N., *et al.* (2010). Antifungal susceptibility of 205 *Candida spp.* isolated primarily during invasive Candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and Etest methods. *J Clin Microbiol*, 48(1), 154-161.
- Bouza, E., & Munoz, P. (2008). Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*, 32 Suppl 2, S87-91.
- Bu, R., *et al.* (2005). Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *Journal of Medical Microbiology*, 54(3), 243-248.
- Bustin, S. A., *et al.* (2010). MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol*, 11, 74.
- Bustin, S. A., *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622.
- Carvalho, A., *et al.* (2007). Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol*, 45(7), 619-627.
- Cateau, E., *et al.* (2012). Impact of yeast-bacteria coinfection on the detection of *Candida sp.* in an automated blood culture system. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 72(4), 328-331.
- Chong, Y., *et al.* (2012). Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. *J Infect Chemother*, 18(5), 741-746.
- Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2013). Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*, 56(9), 1284-1292.
- Cobos-Trigueros, N., *et al.* (2013). Usefulness of time-to-positivity in aerobic and anaerobic vials to predict the presence of *Candida glabrata* in patients with candidaemia. *J Antimicrob Chemother*.
- Cohen, Y., *et al.* (2010). Early prediction of *Candida glabrata* fungemia in nonneutropenic critically ill patients. *Crit Care Med*, 38(3), 826-830.

- Coleman, D. C., *et al.* (1997). Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS*, 11(5), 557-567.
- Cornely, O. A., *et al.* (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 7, 19-37.
- Correia, A., *et al.* (2006). *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(Pt 1), 313-317.
- Cuenca-Estrella, M., *et al.* (2010). Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol*, 48(5), 1782-1786.
- Cuenca-Estrella, M., *et al.* (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 7, 9-18.
- Dhiman, N., *et al.* (2011). Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol*, 49(4), 1614-1616.
- Diekema, D. J., *et al.* (2009). In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J Clin Microbiol*, 47(10), 3170-3177.
- Dunyach, C., *et al.* (2008). Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 60(3), 263-271.
- Eggimann, P., *et al.* (2004). Catheter-related infections. *Microbes Infect*, 6(11), 1033-1042.
- Eggimann, Philippe, *et al.* (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(11), 685-702.
- Einsele, H., *et al.* (1997). Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol*, 35(6), 1353-1360.
- El-Mahallawy, H. A., *et al.* (2006). Evaluation of pan-fungal PCR assay and *Aspergillus* antigen detection in the diagnosis of invasive fungal infections in high risk paediatric cancer patients. *Med Mycol*, 44(8), 733-739.
- Eloy, O., *et al.* (2006). Epidemiologie des fongemies dans les hopitaux francais non universitaires en 2004: enquete multicentrique ColBVH. *Pathol Biol (Paris)*, 54(8-9), 523-530.
- Ericson, E. L., *et al.* (2012). Clinical comparison of the Bactec Mycosis IC/F, BacT/Alert FA, and BacT/Alert FN blood culture vials for the detection of candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73(2), 153-156.
- Falagas, M. E., *et al.* (2006). Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25(7), 419-425.
- Fernandez, M., *et al.* (2000). Candidal meningitis in neonates: a 10-year review. *Clin Infect Dis*, 31(2), 458-463.
- Ferrari, M. D., *et al.* (2013). Accurate visual DNA-microarray for the molecular identification of non-*albicans* *Candida* species isolated from candidemia episodes. *J Clin Microbiol*.
- Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*, 9(2), 109-118.
- Fitting, C., *et al.* (2012). DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PLoS One*, 7(6), e38916.
- Flahaut, M., *et al.* (1998). Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol*, 36(2), 395-401.
- Fortun, J., *et al.* (2012). Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect*, 65(1), 64-70.
- Fraser, M., *et al.* (2012). Evaluation of the commercial rapid trehalose test (GLABRATA RTT) for the point of isolation identification of *Candida glabrata* isolates in primary cultures. *Mycopathologia*, 173(4), 259-264.
- Freydiere, A. M., *et al.* (1997). Evaluation of latex reagents for rapid identification of *Candida albicans* and *C. krusei* colonies. *J Clin Microbiol*, 35(4), 877-880.
- Fricke, S., *et al.* (2010). A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species. *J Appl Microbiol*, 109(4), 1150-1158.

- Fujita, S., *et al.* (2006). Evaluation of a newly developed down-flow immunoassay for detection of serum mannan antigens in patients with candidaemia. *J Med Microbiol*, 55(Pt 5), 537-543.
- Garey, K. W., *et al.* (2006). Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis*, 43(1), 25-31.
- Gicquel, A. (2011). Epidémiologie des *Candida* dans les services à haut risque d'infections invasives : Résultats de l'étude nationale prospective et multi-centrique EPICANDI. (Médecine), Université de Nantes.
- Guiver, M., *et al.* (2001). Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol*, 54(5), 362-366.
- Hanson, K. E., *et al.* (2012). beta-D-glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a randomized pilot study. *PLoS One*, 7(8), e42282.
- Hassan, I., *et al.* (2009). Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. *J Infect*, 59(5), 360-365.
- Hebart, H., *et al.* (2000). Prospective screening by a panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia. *Br J Haematol*, 111(2), 635-640.
- Held, J., *et al.* (2013). Comparison of (1->3)-beta-D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and *Candida* Tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. *J Clin Microbiol*, 51(4), 1158-1164.
- Herbrecht, R., *et al.* (2001). Candidoses viscérales. *Rev Prat*, 51(7), 725-730.
- Herrera, M. L., *et al.* (2009). Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA Copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 47(5), 1325-1332.
- Hope, W., *et al.* (2002). Increase in prevalence of nosocomial non-*Candida albicans* candidaemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. *J Hosp Infect*, 50(1), 56-65.
- Horz, H. P., *et al.* (2010). New methods for selective isolation of bacterial DNA from human clinical specimens. *Anaerobe*, 16(1), 47-53.
- Hsiue, H. C., *et al.* (2010). Rapid identification of fungal pathogens in positive blood cultures using oligonucleotide array hybridization. *Clin Microbiol Infect*, 16(5), 493-500.
- Huang, L., *et al.* (2013). Time to positivity of blood culture can predict different *Candida* species instead of pathogen concentration in candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32(7), 917-922.
- Innings, A., *et al.* (2007). Multiplex real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol*, 45(3), 874-880.
- Johnson, E. M. (2009). Rare and emerging *Candida* species. *Current Fungal Infection Reports*, 3(3), 152-159.
- Jordan, J. A. (1994). PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol*, 32(12), 2962-2967.
- Jordanides, N. E., *et al.* (2005). A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Bone Marrow Transplant*, 35(4), 389-395.
- Karageorgopoulos, D. E., *et al.* (2011). beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 52(6), 750-770.
- Khan, Z., *et al.* (2009). Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp. *J Microbiol Immunol Infect*, 42(4), 290-295.
- Khan, Z. U., & Mustafa, A. S. (2001). Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res*, 156(1), 95-102.
- Khlif, M., *et al.* (2009). Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia. *Clin Microbiol Infect*, 15(7), 656-661.
- Khot, P. D., & Fredricks, D. N. (2009). PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7(10), 1201-1221.
- Klingspor, L., & Jalal, S. (2006). Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*, 12(8), 745-753.
- Klingspor, L., *et al.* (2012). Comparison of the two blood culture systems, Bactec 9240 and BacT/Alert 3D, in the detection of *Candida* spp. and bacteria with polymicrobial sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(11), 2983-2987.
- Klotz, S. A., *et al.* (2007). Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 59(4), 401-406.
- Kock, R., *et al.* (2013). Evaluation of Bactec Mycosis IC/F and Plus Aerobic/F blood culture bottles for the detection of *Candida* in the presence of antifungal agents. *J Clin Microbiol*.

- Kojic, E. M., & Darouiche, R. O. (2004). *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 255-267.
- Kollef, M. H., et al. (2008). Health care-associated infection (HAI): a critical appraisal of the emerging threat-proceedings of the HAI Summit. *Clin Infect Dis*, 47(2), S55-99; quiz S100-1.
- Kontoyiannis, D. P., et al. (2010). Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis*, 50(8), 1091-1100.
- Krogh-Madsen, M., et al. (2006). Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin Infect Dis*, 42(7), 938-944.
- Lacroix, C., et al. (2013). Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*.
- Lai, C. C., et al. (2012). Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. *J Med Microbiol*, 61(Pt 5), 701-704.
- Lau, A., et al. (2010). Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J Clin Microbiol*, 48(3), 811-816.
- Laurendeau, I., et al. (1999). TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clin Chem*, 45(7), 982-986.
- Lavergne, R. A., et al. (2013). An extraction method of positive blood cultures for direct identification of *Candida* species by Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Med Mycol*, 51(6), 652-656.
- Leaw, S. N., et al. (2007). Identification of medically important *Candida* and non-*Candida* yeast species by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol*, 45(7), 2220-2229.
- Lehmann, L. E., et al. (2010). Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit Care*, 14(5), R186.
- Leon, C., et al. (2006). A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*, 34(3), 730-737.
- Leroy, O., et al. (2008). Candidoses invasives en réanimation: analyse des traitements antifongiques au cours de l'enquête française AmarCand.. *Ann Fr Anesth Reanim*, 27(12), 999-1007.
- Lewis, J. S., 2nd, et al. (2013). Rapid Emergence of Echinocandin Resistance in *Candida glabrata* Resulting in Clinical and Microbiologic Failure. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(9), 4559-4561.
- Lièvre, N. (2003). Mise au point et évaluation d'une technique de PCR-DEIA pour le diagnostic des candidoses invasives. (Pharmacie), Université de Nantes.
- Liguori, G., et al. (2010). Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. identification. *New Microbiol*, 33(1), 63-67.
- Loeffler, J., et al. (1999). Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J Clin Microbiol*, 37(4), 1200-1202.
- Loeffler, J., et al. (2000). Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol*, 38(2), 586-590.
- Loonen, A. J., et al. (2013). Comparison of pathogen DNA isolation methods from large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoS One*, 8(8), e72349.
- Lunel, F. M., et al. (2011). Performance of the new Platelia *Candida* Plus assays for the diagnosis of invasive *Candida* infection in patients undergoing myeloablative therapy. *Med Mycol*, 49(8), 848-855.
- Maaroufi, Y., et al. (2004). 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*, 42(7), 3159-3163.
- Maaroufi, Y., et al. (2003). Rapid Detection of *Candida albicans* in Clinical Blood Samples by Using a TaqMan-Based PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3293-3298.
- Mahe, S., et al. (2012). PHYMYCO-DB: a curated database for analyses of fungal diversity and evolution. *PLoS One*, 7(9), e43117.
- Mannarelli, B. M., & Kurtzman, C. P. (1998). Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol*, 36(6), 1634-1641.
- Marchetti, O., et al. (2012). ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*, 47(6), 846-854.

- Martin, G. S., *et al.* (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348(16), 1546-1554.
- Massonet, C., *et al.* (2004). Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol*, 42(5), 2209-2211.
- McMullan, R., *et al.* (2008). A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis*, 46(6), 890-896.
- Meletiadiis, J., *et al.* (2011). Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. *J Clin Microbiol*, 49(7), 2722-2727.
- Metwally, L., *et al.* (2008). Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 57(3), 296-303.
- Metwally, L., *et al.* (2007). Rapid differentiation between fluconazole-sensitive and -resistant species of *Candida* directly from positive blood-culture bottles by real-time PCR. *J Med Microbiol*, 56(Pt 7), 964-970.
- Meyer, M. H., *et al.* (2004). Comparison of Mycosis IC/F and Plus Aerobic/F Media for Diagnosis of Fungemia by the Bactec 9240 System. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 773-777.
- Miceli, Marisa H., *et al.* (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(2), 142-151.
- Min, J. H., *et al.* (2012). Two New Species of *Cryptococcus sp.* and *Candida sp.* from Wild Flowers in Korea. *Mycobiology*, 40(4), 255-257.
- Mokaddas, E., *et al.* (2010). Levels of (1->3)-beta-D-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA in serum samples of pediatric cancer patients colonized with *Candida* species. *BMC Infect Dis*, 10, 292.
- Morace, G., *et al.* (1999). PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*, 37(6), 1871-1875.
- Moreira-Oliveira, M. S., *et al.* (2005). Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 24(11), 721-726.
- Morrell, M., *et al.* (2005). Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(9), 3640-3645.
- Muro, M. D., *et al.* (2012). Echinocandin resistance in two *Candida haemulonii* isolates from pediatric patients. *J Clin Microbiol*, 50(11), 3783-3785.
- Neofytos, D., *et al.* (2013). Treatment and outcomes of *Candida* osteomyelitis: review of 53 cases from the PATH Alliance(R) registry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Nguyen, M. H., *et al.* (2012). Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*, 54(9), 1240-1248.
- Oude Lashof, A. M., *et al.* (2011). Ocular manifestations of candidemia. *Clin Infect Dis*, 53(3), 262-268.
- Pappas, P. G., *et al.* (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 48(5), 503-535.
- Parkins, M. D., *et al.* (2007). Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections. *J Antimicrob Chemother*, 60(3), 613-618.
- Patel, G. P., *et al.* (2009). The effect of time to antifungal therapy on mortality in Candidemia associated septic shock. *Am J Ther*, 16(6), 508-511.
- Peterson, J. F., *et al.* (2011). Multicenter Comparison of the VITEK 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Caspofungin, Micafungin, and Posaconazole against *Candida spp.* *J Clin Microbiol*, 49(5), 1765-1771.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2011a). Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida spp.* revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70(3), 330-343.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2010a). Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat*, 13(6), 180-195
- Pfaller, M. A., *et al.* (2008). In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida spp.* to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol*, 46(1), 150-156.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2011b). Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazole and *Candida spp.* as determined by 24-hour CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol*, 49(2), 630-637.

- Pfaller, M. A., *et al.* (2010b). Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 48(5), 1592-1599.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2012a). Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida spp.*, using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73(4), 365-368.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 20(1), 133-163.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2011c). Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat*, 14(3), 164-176.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2010c). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*, 48(4), 1366-1377.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2013a). Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida spp.*, using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77(1), 37-40.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2011d). Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *J Clin Microbiol*, 49(3), 845-850.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2012b). Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida spp.* as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol*, 50(6), 2040-2046.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2013b). Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol*, 51(8), 2571-2581.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2011e). *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(2), 561-566.
- Pfaller, M. A., *et al.* (2012c). Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(4), 323-331.
- Pfeiffer, C. D., *et al.* (2011). Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *J Clin Microbiol*, 49(8), 2879-2883.
- Pfuller, R., *et al.* (2011). A novel flucytosine-resistant yeast species, *Candida pseudoaaseri*, causes disease in a cancer patient. *J Clin Microbiol*, 49(12), 4195-4202.
- Pittet, D., *et al.* (1994). *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*, 220(6), 751-758.
- Plantinga, T. S., *et al.* (2012). Human genetic susceptibility to *Candida* infections. *Med Mycol*, 50(8), 785-794.
- Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev Biol Biotechnol*, 2(2), 2-11.
- Polanco, A., *et al.* (1999). Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 34(3), 177-183.
- Pulcrano, G., *et al.* (2013). Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *J Microbiol Methods*, 94(3), 262-266.
- Ramage, G., *et al.* (2001). Biofilm Formation by *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3234-3240.
- Rammaert, B., *et al.* (2012). New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses*, 55(3), e74-84.
- Reichard, U., *et al.* (2012). Interlaboratory comparison of PCR-based identification of *Candida* and *Aspergillus* DNA in spiked blood samples. *Mycoses*, 55(5), 426-434.

- Rex, J. H., & Pfaller, M. A. (2002). Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis*, 35(8), 982-989.
- Ribeiro, P., et al. (2006). Polymerase chain reaction screening for fungemia and/or invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. *Support Care Cancer*, 14(5), 469-474.
- Romeo, O., et al. (2009). A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods*, 79(1), 117-120.
- Samaranayake, Y. H., et al. (2005). In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. *J Clin Microbiol*, 43(2), 818-825.
- Schabereiter-Gurtner, C., et al. (2007). Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 45(3), 906-914.
- Schreiber, J., et al. (2013). Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 108(4), 311-318.
- Seyfarth, F., et al. (2012). Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses*, 55(3), 276-280.
- SFAR, et al. (2004). Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte. *Rev Pneumol Clin*, 60(5 Pt 1), 289-293.
- Shorr, A. F., et al. (2007). Do clinical features allow for accurate prediction of fungal pathogenesis in bloodstream infections? Potential implications of the increasing prevalence of non-*albicans* candidemia. *Crit Care Med*, 35(4), 1077-1083.
- Silva, S., et al. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*, 19(5), 241-247.
- Sipsas, N. V., et al. (2009). Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer*, 115(20), 4745-4752.
- Souza, A. C., et al. (2012). Accurate identification of *Candida parapsilosis* (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 50(7), 2310-2314.
- Springer, J., et al. (2013). Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA in high-risk hematological patients. *J Clin Microbiol*, 51(5), 1445-1450.
- Staib, P., & Morschhauser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50(1), 1-12.
- Tadec, L. (2011). Épidémiologie des candidémies au CHU de Nantes : Etude rétrospective (2004 – 2010). (Médecine), Université de Nantes.
- Talluri, G., et al. (1998). Polymerase chain reaction used to detect candidemia in patients with candiduria. *Urology*, 51(3), 501-505.
- Taur, Y., et al. (2010). Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(1), 184-190.
- Tavanti, A., et al. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*, 43(1), 284-292.
- Telenti, A., et al. (1991). Quantitative blood cultures in candidemia. *Mayo Clin Proc*, 66(11), 1120-1123.
- Tortorano, A. M., et al. (2006). Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 27(5), 359-366.
- Trofa, D., et al. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21(4), 606-625.
- Ullmann, A. J., et al. (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: developing European guidelines in clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 7, 1-8.
- Van Burik, J. A., et al. (1998). Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol*, 36(5), 1169-1175.
- Vella, A., et al. (2013). Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol*, 51(9), 2964-2969.
- Vigouroux, S., et al. (2006). Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. *Haematologica*, 91(5), 717-718.
- Vijgen, S., et al. (2011). Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre YeastOne antifungal testing. *Med Mycol*, 49(1), 107-110.

- von Lilienfeld-Toal, M., *et al.* (2009). Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol*, 47(8), 2405-2410.
- Wellinghausen, N., *et al.* (2009). Rapid diagnosis of Candidaemia by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples. *J Med Microbiol*, 58(Pt 8), 1106-1111.
- Westh, H., *et al.* (2009). Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect*, 15(6), 544-551.
- White, P. L., *et al.* (2003). Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *Journal of Medical Microbiology*, 52(3), 229-238.
- White, T. J., *et al.* (2010). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky & W. T. (Eds.), *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). Orlando, Florida: Academic Press.
- Wisplinghoff, H., *et al.* (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 39(3), 309-317.
- Zhou, L., & Pollard, A. J. (2012). A novel method of selective removal of human DNA improves PCR sensitivity for detection of *Salmonella typhi* in blood samples. *BMC Infect Dis*, 12, 164.

Annexes

Annexe 1 : Extraction d'ADN à partir de souches fongiques

Extrait du GBEA du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes.

Etape de lyse enzymatique : obtention de sphéroplastes

- Congeler à -20°C une colonie du champignon à extraire dans un tube stérile (10 ml) avec l'équivalent de 2-3 ml de billes de verre (Ø 3 mm).
- Vortexer plusieurs minutes.
- Ajouter 2 ml de Buffer Y1 (Sorbitol 1 M, EDTA pH 7,4 0,1 M ; 4°C), 2 µL de β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, #M3148) et 100 µL de lyticase (500U/ml, 50U au final [Sigma-Aldrich, #L2524]).
- Vortexer pendant 1 à 2 min.
- Incuber 30 min à 30°C sous agitation constante à 200 rpm.
- Transvaser le liquide (sans les billes de verre) dans un tube stérile de 5 mL.
- Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 min.
- Enlever le surnageant avec précaution et conserver le culot de lyse enzymatique.

Etape d'extraction d'ADN : Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel)

- Reprendre le culot de lyse enzymatique par 180 µL de Buffer T1.
- Transférer dans un tube de 1,5 mL.
- Ajouter 25 µL de protéinase K. Bien vortexer.
- Incuber à 56°C pendant 2 heures. Vortexer vigoureusement.
- Ajouter 200 µL de tampon (Buffer B3). Vortexer vigoureusement.
- Incuber à 70°C pendant 10 min. Vortexer.
- Ajouter 210 µL d'Ethanol (96-100%). Vortexer vigoureusement.

- Transférer sur la colonne avec un tube collecteur de 2mL.
- Centrifuger 1min à $\geq 8000g$ ($\geq 10000rpm$). Eliminer le surnageant.
- Ajouter 500 μL de tampon (Buffer BW).
- Centrifuger 1min à $\geq 8000g$ ($\geq 10000rpm$). Eliminer le surnageant.
- Ajouter 600 μL de tampon (Buffer B5).
- Centrifuger 1min à $\geq 8000g$ ($\geq 10000rpm$). Eliminer le surnageant.
- Centrifuger 1min à $\geq 8000g$ ($\geq 10000rpm$). Eliminer le surnageant.
- Placer la colonne sur un tube de 1,5mL.
- Ajouter 100 μL de tampon d'élution (Buffer BE préalablement chauffé à 70°C).
- Incuber 1min à température ambiante.
- Centrifuger 1min à $\geq 8000g$ ($\geq 10000rpm$).
- Congeler l'extrait d'ADN obtenu à -20°C.

Annexe 2 : Protocole commercial d'obtention de sphéroplastes de levures à partir de sang total (MolYsis™ Basic5, Molzym)

Extrait, après traduction et adaptation des volumes au volume initial de sang EDTA, de la procédure fournie par le fabricant.

Obtention du culot de levures :

- Prélever 2 mL de sang dans un tube stérile en polypropylène de 5 mL et ajouter 700 µL de buffer CM. Vortexer vigoureusement pendant 15 s et laisser incuber 5 min.
- Ajouter 700 µL de buffer DB1 et 10 µL de MolDNase™ B au lysat et vortexer immédiatement pendant 15 s. Laisser incuber 15 min (température entre 20 et 25°C)
- Centrifuger à 13000 rpm (12100g) pendant 10 min. Retirer le surnageant avec précaution à l'aide d'une pipette sans aspirer le culot.
- Ajouter 1 mL de buffer RS et vortexer 10 s. Transférer la suspension dans un tube stérile de polypropylène de 2 mL. Centrifuger à 13000 rpm (12000g) pendant 5 min. Retirer le surnageant avec précaution à l'aide d'une pipette. On peut congeler à cette étape à -20°C puis décongeler à T°C ambiante.
- Ajouter 80 µL de buffer RL et remettre en suspension le culot en le cassant avec le cône de la pipette et par aspirations/refoulements. Vortexer pendant 10 s pour homogénéiser.

Obtention de sphéroplastes :

- Ajouter 20 µL de BugLysis™, vortexer pendant 10 s et incuber à 37°C pendant 45 min.

Extraction et purification de l'ADN :

- Procéder ensuite à l'extraction et la purification de l'ADN après avoir ajouté 100 µL de buffer RL.

Annexe 3 : Extraction d'ADN sur automate iPrep™ Purification Instrument (kit iPrep™ PureLink™ Virus Kit, Invitrogen)

Extrait de la procédure fournie par le fabricant et du GBEA du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes.

Matériel :

Automate iPrep™ Purification Instrument



iPrep™ Cartridge Rack



iPrep 11p and 1 tube rack



iPrep™ Sample Processing Tubes



iPrep™ Sample Processing Tubes



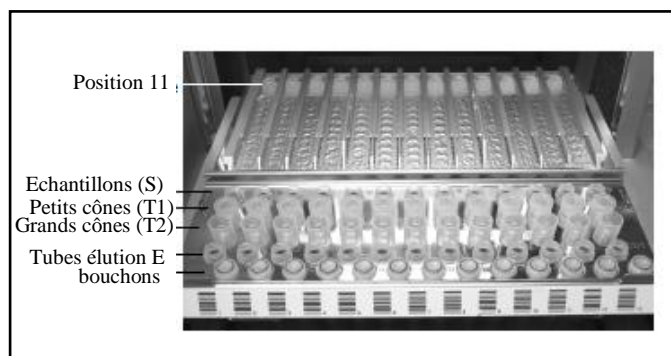
Cartouches



Réactif	Puit n°
Tampon de lyse	1
Protéinase K (20 mg/ml) dans un tampon de conservation	2
Tampon d'éluion	3
Vide	4
Tampon de lavage 2	5
Tampon de lavage 2	6
Tampon de lavage 1	7
Dynabeads® MyOne™ SILANE (4,8 mg/ml dans un tampon de conservation)	8
Tampon de rinçage	9
Isopropanol	10

Procédure :

1. Insérer la carte iPrep™ Viral DNA/RNA.
2. Allumer l'instrument.
3. Appuyer sur Start.
4. Ouvrir la porte de l'appareil.



5. Sortir le "iPrep™ Cartridge Rack" et le "iPrep™ Tip and Tube Rack" ainsi que le nombre de cartouches nécessaires (une par prélèvement, jusqu'à 13 par série). Taper le fond des puits sur un support pour collecter les gouttes de solutions qui se seraient déposées sur l'aluminium.
6. Insérer un tube "iPrep™ Sample Processing" dans la position 11 de chaque cartouche.
7. Charger les cartouches sur le " iPrep™ Cartridge Rack" et l'insérer sur la plateforme
8. Charger le "iPrep™ Tip and Tube Rack":
 - a) Charger la première rangée (E) avec les tubes prévus pour l'éluion sans leur bouchon.
 - b) Charger la seconde rangée (T1) avec les petits cônes préalablement insérés dans leur support si le volume d'éluion est de 20 µl.
 - c) Charger la troisième rangée (T2) avec les grands cones préalablement insérés dans leur support si le volume d'éluion est de 50 ou 100 µl.
 - d) Charger la quatrième rangée (S) avec les tubes "iPrep™ Sample and Elution Tubes" contenant l'échantillon à extraire.
9. Insérer le "iPrep Tip and Tube rack" dans l'appareil et fermer la porte de l'appareil.
10. Appuyer sur Enter et sélectionner le mode de lyse (inline ou offline), le volume de l'échantillon à extraire (200 µL ou 400 µL), et le volume d'éluion (20 µL, 50 µL, ou 100 µL).
12. Appuyer sur start. Le protocole d'extraction dure 40 min.
13. Congeler les extraits d'ADN ainsi obtenus à -20°C.

Annexe 4 : PCR panfongique ITS1-ITS4Amorces utilisées :

ITS1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC

Préparation du mix réactionnel :

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volumes pour 1 tube (μ l)
Tampon	5 X	1 X	10
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4
Primer ITS1	10 μ M	0,5 μ M	2,5
Primer ITS4	10 μ M	0,5 μ M	2,5
dNTP ATCG	5 mM	0,2 mM	2
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	5 U/ μ l	0,03 U/ μ l	0,3
Eau			23,7
DNA			5
Volume final			50

Programme :

- Etape 1 : 94°C 7 min
- Etape 2 :

35 Cycles :	. 94°C 30 s
	. 55°C 45s
	. 72°C 60 s
- Etape 3 : 72°C 7 min

Annexe 5 : PCR en temps réel pour la détection et la quantification de l'albumineAmorces et sondes utilisées :

ALB 1 : 5' GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T 3'

ALB 2 : 5' AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T 3'

ALB S: 5' CY5 CCT GTC ATG CCC ACA CAA ATC TCT CC BHQ3 3'

BHQ3: Black Hole Quencher 3 (= reporter)

Préparation du mix réactionnel :

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volumes pour 1 tube (µl)
Taqman® Gene Expression Master Mix	2 X	1 X	12,5
ALB 1	10 µM	0,5 µM	1,25
ALB 2	10 µM	0,5 µM	1,25
ALB S	10 µM	0,2 µM	0,5
IPC mix	10 X	0,5 X	1,25
IPC DNA	50 X	0,5 X	0,25
Eau			3
DNA			5
Volume final			25

Programme :

- Etape 1 : 50°C 120 s
- Etape 2 : 95°C 900 s
- Etape 3: 45 Cycles }
 - . 95°C 15 s
 - . 59°C 60 s

Annexe 6 : PCR TIE en temps réel TaqMan® pour la détection de LTIPréparation du mix réactionnel:

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volumes pour 1 tube (µl)
Taqman® Gene Expression Master Mix	2 X	1 X	12,5
LTI 1	10 µM	0,5 µM	1,25
LTI 2	10 µM	0,5 µM	1,25
Sonde ALTI	10 µM	0,2 µM	0,5
Eau			4,5
DNA			5
Volume final			25

Programme :

- Etape 1 : 50°C 120 s
- Etape 2 : 95°C 900 s
- Etape 3:

}	. 95°C 15 s	60 s
	. 58, 59 ou 60°C	
	. 72°C 20 s	

Annexe 7 : PCR *Candida* en temps réel SYBR® Green IPréparation du mix réactionnel :

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volumes pour 1 tube (µl)
Mix IQ™ SYBR® Green Supermix	2 X	1 X	10
Amorce 1	10 µM	0,2 µM	0,4
Amorce 2	10 µM	0,2 µM	0,4
Eau			4,2
DNA			5
Volume final			20

Programme :

- Etape 1 : 95°C 3 min
- Etape 2 :

44 cycles	. 95°C 15 s
	. T°C d'hybridation du couple 30 s
	. 72°C 10 s
- Etape 3 : 58°C 60 s
Puis augmentation continue de la température toutes les 2 s (58 - 99°C)

Annexe 8 : PCR CPAN en temps réel TaqMan®Préparation du mix réactionnel :

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volumes pour 1 tube (µl)
Taqman® Gene Expression Master Mix	2 X	1 X	12,5
Amorce 1	10 µM	0,5 µM	1,25
Amorce 2	10 µM	0,5 µM	1,25
Sonde CPAN	10 µM	0,2 µM	0,5
IPC Mix	10 X	0,5 X	1,25
IPC DNA	50 X	0,5 X	0,25
Eau			3
DNA			5
Volume final			25

Programme :

- Etape 1 : 50°C 120 s
- Etape 2 : 95°C 900 s
- Etape 3:

45 Cycles	. 95°C 15 s	
	. Température d'hybridation du couple	60 s
	. 72°C 20 s	

Annexe 9 : Protocole amélioré d'extraction d'ADN de levures à partir de sang total

L'ensemble du protocole est à réaliser sous PSM, avec du matériel stérile et DNA free.

Obtention du culot de levures :

Pour 2 mL de sang total (EDTA), dans un tube à fond conique

- Ajouter :

. 2 mL de tampon 1 :

{	10 mM Tris HCl pH 7,5
	10 mM NaCl
	5 mM MgCl ₂
	SDS 1% (poids/volume)

. 40 µL Protéinase K à 20 mg/ml (200 µg/mL au final)

- Vortexer 20 s puis incuber à 60°C pendant 30 min
- Laisser refroidir le tube à 4°C pendant 5 à 10 min
- Ajouter 40 µL d'enzyme lytique à 0.25 U/µL (10U soit 2,5 U/mL au final)
- Vortexer 20s
- Incuber à 37°C 5 min (durée à adapter en fonction de la viscosité du prélèvement)
- Vortexer 20s puis centrifuger à 3000xg (2000trs/min) à 4°C pendant 5 min
- Laver le culot avec 1 mL de tampon 1
- Vortexer jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de particule en suspension
- Transférer dans un tube de 1,5 ml à fond conique
- Centrifuger à 11000 rpm à 4°C 5 min

Obtention de sphéroplastés :

- Reprendre le culot par : (dans cet ordre)
 - . 135 μ L Tampon Y1 (frigo) :

{	1 M Sorbitol
	0,1 M EDTA pH 7,4
 - . 2 μ L β mercaptoéthanol dilué au 10^{ème} dans Y1 (0,1 % au final)
 - . 63 μ L lyticase 800 U/mL (C2)
- Incuber à 30°C sous agitation constante 20 min

Extraction et purification de l'ADN : Automate iPrepTM / kit iPrepTM PureLinkTM Virus Kit

- Sélectionner 200 μ L pour le volume initial et 50 μ L pour le volume fin

Nom – Prénoms : Miossec Charline, Odile, Josette

Titre de la thèse : Septicémies à *Candida spp.* : mise au point d'une technique d'extraction d'ADN de levures à partir de sang total et d'une PCR *Candida* en temps réel.

Résumé de la thèse :

En présence de certains facteurs de risque, les levures du genre *Candida* peuvent être responsables de candidémies, infections au pronostic sombre. Majoritairement dues à *C. albicans*, les candidémies sont toutefois de plus en plus fréquemment causées par des espèces non-*albicans* parmi lesquelles *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* et *C. parapsilosis*, sont naturellement résistantes ou de sensibilité diminuée à certains antifongiques. Le diagnostic des candidémies repose essentiellement sur la réalisation d'hémocultures dont la sensibilité est insuffisante et le délai de positivité trop important au regard de l'enjeu que représente une prise en charge thérapeutique précoce, gage de meilleur pronostic. Les techniques de diagnostic indirect, peu nombreuses, ont des performances limitées et ne donnent pas d'information sur le profil de résistance intrinsèque de la levure en cause. Les techniques de biologie moléculaire ne sont pas encore utilisées en routine dans les laboratoires hospitaliers pour le diagnostic des candidémies, l'absence de standardisation des protocoles d'extraction et de PCR freinant leur application. Le premier objectif de ce travail était la mise au point d'un protocole standardisé d'extraction d'ADN de levures à partir de sang total. Le protocole développé, applicable en routine dans un laboratoire hospitalier, permet de concentrer l'ADN fongique et dispose d'un témoin interne d'extraction permettant de valider la technique pour chaque échantillon extrait. Le second objectif était la mise au point d'une PCR *Candida* en temps réel utilisant la technologie TaqMan®. La PCR développée amplifie les régions ITS1 et ITS2 de l'ADNr. Elle permet la détection de l'ADN de *Candida spp.* au sens large, à l'exception de *C. krusei*, *C. glabrata* et *C. lusitaniae*, espèces intéressantes pour leur profil de résistance intrinsèque aux antifongiques. La mise au point des PCR complémentaires fera l'objet de futurs travaux. L'ensemble de la procédure, extraction et PCR, permet la détection de 1 CFU/mL de sang artificiellement inoculé par *C. albicans*, résultat prometteur pour l'utilisation de la PCR en tant qu'outil de diagnostic précoce des candidémies.

MOTS CLÉS : CANDIDA, CANDIDEMIE, DIAGNOSTIC, PCR, EXTRACTION

JURY :

PRÉSIDENT : Mme Nathalie Caroff, Professeur de Bactériologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Mr Patrice Le Pape, Professeur de Parasitologie et Mycologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

Mr David Boutoille, Professeur de Maladies infectieuses et
Tropicales - Faculté de Médecine de Nantes

Mr Cédric Bretonnière, Praticien hospitalier en Réanimation
médicale - CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : 49300 CHOLET