

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2011

N° 50

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

**Conformément au décret n°2003-76 du 23 janvier 2003
teint lieu de :**

THESE
pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES de BIOLOGIE MEDICALE

par

Aurélie GICQUEL

née le 30/11/1981 à Angers

Présentée et soutenue publiquement le 22/06/2011

« Epidémiologie des *Candida* dans les services à haut risque d'infections invasives :
Résultats de l'étude nationale prospective et multi-centrique EPICANDI »

Président : Monsieur le Professeur Philippe MOREAU

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Florent MORIO

Membres du jury : Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE
Madame le Docteur Marie-Elisabeth BOUGNOUX
Madame le Docteur Claire LACROIX

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	Erreur ! Signet non défini.
TABLE DES MATIÈRES	2
INTRODUCTION	5
GENERALITES	7
I. LES LEVURES DU GENRE <i>CANDIDA</i>	8
A - Place des <i>Candida</i> dans le règne fongique.....	8
B - Le genre <i>Candida</i> : de nombreuses espèces.....	10
1) Habitat et réservoir des <i>Candida</i> spp.....	10
2) De plus en plus d'espèces isolées en pathologie humaine	12
C - Antifongiques et <i>Candida</i>	14
1) Les antifongiques	14
2) Sensibilités naturelles des principales espèces de <i>Candida</i>	14
3) Mécanismes de la résistance acquise aux antifongiques	16
D - Notion de complexe d'espèces	17
1) <i>Candida albicans</i> et <i>C. dubliniensis</i>	17
2) Complexe d'espèces et <i>C. parapsilosis</i>	20
3) Complexe d'espèces et <i>C. glabrata</i>	23
4) <i>Candida guilliermondii</i> et <i>C. famata</i>	24
5) <i>Candida kefyr</i> et <i>C. sphaerica</i>	26
6) <i>Candida inconspicua</i> et <i>C. norvegensis</i>	26
II. ROLE DU LABORATOIRE DE MYCOLOGIE MEDICALE: UNE EVOLUTION DES PRATIQUES	27
A - Conditions de cultures des levures du genre <i>Candida</i>.....	27
B - Outils d'identification traditionnels	27
1) Milieux chromogènes et milieux fluorogéniques.....	27
2) Test de germination	29
3) Test de chlamydosporulation	30
4) Tests rapides d'identification.....	30
5) L'étude des caractères physiologiques par les galeries d'identification	32
6) Stratégie d'identification.....	35
C - Apport de la biologie moléculaire dans l'identification des levures	36
1) Cibles de la PCR panfongique	36
2) Limites de la technique : la base de données	37
3) Applications et performances en routine dans un laboratoire de mycologie.....	38
D - Le MALDI-TOF : une solution innovante pour l'identification des levures	40
1) Principe du MALDI-TOF	40
2) Intérêts du MALDI-TOF pour l'identification des levures	41

E -	Etude de la sensibilité in vitro aux antifongiques.....	43
1)	Méthodes utilisées pour la détermination de la sensibilité aux antifongiques	43
2)	Interprétation de l'antifongogramme	47
III.	LES CANDIDA EN MILIEU HOSPITALIER : ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES	50
A -	Les candidoses : aspects cliniques et impact en santé publique	50
1)	Les candidoses superficielles	50
2)	Les candidoses profondes et systémiques	51
B -	Epidémiologie des <i>Candida</i> spp. : données actuelles	56
1)	Distribution des espèces.....	57
2)	Évolution de la sensibilité/résistance aux antifongiques	64
	ÉTUDE EPICANDI	69
I.	OBJECTIFS DE L'ETUDE	70
II.	MATERIELS ET METHODES	71
A -	Caractéristiques de l'étude.....	71
1)	Centres participants.....	71
2)	Services cliniques étudiés	71
3)	Durée d'inclusion.....	72
4)	Critères d'inclusion des souches	72
B -	Identification mycologique	73
1)	Identification phénotypique	73
2)	Identification moléculaire	74
3)	Identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	76
C -	Détermination de la sensibilité aux antifongiques.....	76
1)	Indications de la détermination des CMI	76
2)	Méthodologie et interprétation.....	77
D -	Collecte des données et analyse statistique	77
III.	RESULTATS	78
A -	Données démographiques.....	78
1)	Caractéristiques des patients	78
2)	Nature des prélèvements	79
B -	Résultats de l'identification mycologique et apport de la biologie moléculaire.....	80
1)	Performances de la méthode	80
2)	Résultats globaux et comparaison avec l'identification phénotypique	81
3)	Identification moléculaire des complexes d'espèces	83
C -	Étude EPICANDI : distribution des espèces	88
1)	Épidémiologie globale	88
2)	Epidémiologie locale et comparative	90

D - Étude EPICANDI : sensibilités in vitro aux antifongiques	92
1) Données globales	92
2) Épidémiologie locale et comparative.....	97
DISCUSSION	100
ANNEXES	113
ANNEXE n°1: Les levures identifiées par la galerie ID32C® avec leurs caractéristiques phénotypiques	114
ANNEXE n°2 : Principe du séquençage par la méthode de Sanger	115
ANNEXE n°3 : Mode opératoire : identification moléculaire des champignons.....	117
ANNEXE n°4 : Protocole de réalisation de gel pour électrophorèse des produits de PCR	120
ANNEXE n°5 : Protocole de réalisation de l'antifongigramme par technique Etest®	122
ANNEXE n°6 : Étude EPICANDI : feuille de recueil des données.....	123
ANNEXE n°7 : Taille des séquences ITS en fonction de l'espèce	124
ANNEXE n°8 : Exemples de résultats d'identification de levure.	125
ANNEXE n°9 : Distribution des souches en fonction de la valeur de leur CMI pour le fluconazole et la caspofungine.	126
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127
SERMENT MEDICAL.....	139

Introduction

Les levures du genre *Candida* sont responsables d'infections invasives, dont le pronostic est sombre avec un taux de mortalité qui reste élevé malgré une prise en charge adaptée. L'immunodépression, en particulier la neutropénie, et une hospitalisation en réanimation sont des facteurs de risques majeurs.

En quelques décennies, l'épidémiologie de ces infections a évolué, avec l'augmentation croissante du nombre de patients résultant notamment du développement des chimiothérapies et des stratégies d'immunodépression de plus en plus lourdes. Ainsi, on observe progressivement une diminution de la prévalence de *Candida albicans*, au profit d'autres espèces dont certaines sont naturellement moins sensibles aux antifongiques actuels. En parallèle, des cas de résistance acquise aux antifongiques, survenant sous traitement sont régulièrement décrits, et ce pour toutes les classes d'antifongiques. On observe également l'émergence d'espèces rares auparavant considérées non pathogènes et qui peuvent désormais être à l'origine d'infections invasives dont le pronostic est réservé.

Cependant, les données disponibles à ce jour montrent des variations spatiales significatives de cette épidémiologie, aussi bien à l'échelle des continents et des pays qu'à l'échelle locale, au sein même de nos centres hospitaliers. La plupart des études réalisées à ce jour portant sur l'épidémiologie des levures sont principalement nord-américaines, les études européennes, et en particulier françaises étant peu nombreuses. Or une bonne connaissance de l'épidémiologie locale des *Candida* est indispensable dans la mise en place des stratégies thérapeutiques et préventives et permet également de surveiller l'émergence d'espèces rares ainsi que les résistances aux antifongiques.

Ce manuscrit présente une partie des résultats de l'étude EPICANDI, étude épidémiologique prospective et multicentrique (8 Centres Hospitaliers Universitaires) dont l'objectif est de mieux connaître l'épidémiologie des *Candida* spp. dans les services à risques de candidoses invasives.

Dans une première partie de ce manuscrit, les principales caractéristiques des levures du genre *Candida* seront exposées en mettant notamment l'accent sur la description récente de nouvelles espèces ainsi que le rôle du laboratoire de mycologie dans le diagnostic des candidoses avant de présenter les dernières tendances épidémiologiques.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'étude EPICANDI en elle-même en particulier à la méthodologie puis aux résultats qui seront discutés à la lumière des données récentes de la littérature.

Généralités

I. Les levures du genre *Candida*

Si Hippocrate, au IV^{ème} siècle avant Jésus-Christ, avait déjà décrit le muguet, forme orale de candidose, les premières descriptions scientifiques de l'époque moderne des candidoses superficielles remontent au XVII^{ème} siècle. Ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que ces pathologies furent formellement attribuées à un champignon. Le pathogène responsable fut décrit par Robin en 1853 et nommé *Oidium albicans*. Sa dénomination et sa classification évoluèrent à plusieurs reprises par la suite.

Le terme *Candida albicans* fut utilisé pour la première fois en 1923 par Berkhout avant d'être officialisé en 1954 lors du 8^{ème} Congrès de Botanique. Au cours du XX^{ème} siècle, d'autres espèces furent progressivement décrites ou reclassées au sein de ce genre (CALDERONE 2002).

A - Place des *Candida* dans le règne fongique

Classiquement les champignons d'intérêt médical étaient classés selon leur mode de reproduction sexuée quand celle-ci était connue. Historiquement, les champignons sans forme sexuée (téleomorphe) connue et donc pour lesquels seul le stade asexué (anamorphe) est connu, étaient alors séparés et regroupés parmi les Deutéromycètes (ou champignons imparfaits).

Ainsi, dans cette classification historique, les espèces du genre *Candida* appartenaient à deux ensembles distincts :

- les espèces avec une forme sexuée connue, incluses dans les Ascomycètes, qui regroupent les champignons dont la reproduction sexuée se fait par ascospores.
- les autres espèces, sans forme sexuée connue (la plupart des *Candida* spp.), incluses dans les Deutéromycètes.

Le respect strict des règles taxonomiques imposerait de nommer les levures par leur forme sexuée quand celle-ci elle est connue mais, concernant les levures d'intérêt médical, il reste encore d'usage de nommer ces espèces par leur forme asexuée dans un souci de simplification et d'unité de cet ensemble de pathogènes (CHABASSE *et al.* 2006). Le Tableau 1, page 9, présente les principales espèces de *Candida* pour lesquelles une forme sexuée a pu être mise en évidence. Ces formes sexuées appartiennent à différents genres.

Tableau 1 : Principales espèces de *Candida* avec une forme sexuée décrite (JOHNSON and ELIZABETH 2009)

Forme anamorphe (asexuée)	Forme téléomorphe (sexuée)
<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>

La systématique des champignons microscopiques est complexe et évolue régulièrement du fait du développement croissant des méthodes de biologie moléculaire en particulier dans le cadre de la taxonomie. Dans la dernière classification phylogénétique du règne fongique proposée récemment par un collège d'experts, les espèces du genre *Candida* sont regroupées au sein de l'ordre des Saccharomycetales lui-même inclus dans le phylum des Ascomycota (HIBBETT *et al.* 2007).

♦ Caractéristiques communes des espèces du genre *Candida* :

Comme tous les champignons, les levures *Candida* spp. sont des organismes eucaryotes avec pour particularité la présence dans leur membrane cellulaire d'un stérol spécifique, l'ergostérol. Elles possèdent également une paroi cellulaire composée de protéines et de polysaccharides dont les β -(1,3)glucanes. Outre leur rôle important pour l'intégrité de la membrane et de la paroi fongique respectivement, l'ergostérol et les β -(1,3)glucanes sont les cibles des principaux antifongiques utilisés en thérapeutique.

Le genre *Candida* regroupe les levures non pigmentées et non capsulées dont la multiplication est assurée par bourgeonnement polaire ou bipolaire. Parmi leurs caractéristiques communes, on peut citer : une absence d'activité uréase, l'incapacité à assimiler l'inositol et la capacité de fermenter les sucres (CHABASSE *et al.* 2006).

B - Le genre *Candida* : de nombreuses espèces

Depuis la description de *C. albicans* au XIX^{ème} siècle, de nombreuses autres espèces ont été décrites ou reclassées dans le genre *Candida*, y compris récemment, si bien que le genre *Candida* compte aujourd'hui de l'ordre de 150 à 200 espèces (DEVELOUX and BRETAGNE 2005). En comparaison du nombre total d'espèces connues à ce jour, il est important de souligner que relativement peu d'entre-elles ont été isolées chez l'homme.

1) Habitat et réservoir des *Candida* spp.

Les *Candida* sont des levures ubiquitaires présentant une large répartition géographique. Ces levures vivent dans l'environnement à l'état saprophyte, c'est-à-dire aux dépens des matières organiques dont la nature est extrêmement diverse (sol, fruits, plantes, céréales, produits laitiers...).

De nouvelles espèces de *Candida* sont encore régulièrement découvertes et le plus souvent décrites à partir de l'environnement ou de biotopes spécifiques. A titre d'exemple, entre janvier et mars 2011, trois nouvelles espèces ont été décrites et isolées respectivement de bois en décomposition, de l'eau de mer ou de fruits (BURGAUD *et al.* 2011; GUO *et al.* 2011; LIMTONG *et al.* 2011). A ce jour, la majorité des espèces n'a été isolée que de l'environnement. En revanche, les espèces de *Candida* qui colonisent les animaux à sang chaud peuvent se retrouver indifféremment chez plusieurs espèces animales. Ainsi *C. albicans* fait ainsi partie de la flore microbienne intestinale normale de l'homme mais également d'autres mammifères, comme les primates, ou bien encore chez les oiseaux (CHABASSE *et al.* 2006).

Les espèces isolées chez l'homme se sont en général « spécialisées » pour un site anatomique préférentiel ou sont originaires du milieu extérieur (cf. Tableau 2). Il est intéressant de souligner que l'habitat d'une espèce donnée peut avoir des conséquences sur son spectre clinique. Par exemple, *C. parapsilosis*, espèce commensale de la peau, est associé à des infections dont la porte d'entrée est cutanée.

Tableau 2 : Réservoir des principales espèces de *Candida* impliquées en pathologie humaine (DEVELOUX and BRETAGNE 2005)

Espèces	Etat saprophyte	Particularité du spectre clinique
<i>C. albicans</i>	Tube digestif	Toutes les formes cliniques (candidoses profondes et cutanéomuqueuses)
<i>C. glabrata</i>	Tube digestif Voie génito-urinaire	Toutes les formes cliniques (candidoses profondes et cutanéomuqueuses)
<i>C. parapsilosis</i>	Peau	Candidémies liées aux cathéters ou aux solutions contaminées, chez les toxicomanes intra-veineux. Candidémie des nouveau-nés
<i>C. tropicalis</i>	Sol, végétaux, eau	
<i>C. krusei</i>	Produits laitiers, bière	
<i>C. guilliermondii</i>	Produits alimentaires	
<i>C. kefyr</i>	Produits laitiers	
<i>C. lusitaniae</i>	Tube digestif d'animaux	
<i>C. dubliniensis</i>		Candidoses orales chez des patients infectés par le VIH
<i>C. rugosa</i>	Eau, produits laitiers	
<i>C. lipolytica</i>	Peau	Candidémies liées aux cathéters

La colonisation des muqueuses à *Candida* spp. commence très tôt dans la vie puisque ces levures peuvent être retrouvées chez plus de 95% des nouveau-nés à un mois de vie. A l'âge adulte, les levures de cette espèce sont retrouvées dans la flore gastro-intestinale d'environ 70% des adultes sains, où elles sont alors présentes à l'état de commensal (SCHULZE and SONNENBORN 2009). Dans la définition du commensalisme (à la différence de la symbiose ou du parasitisme), le champignon puise sa nourriture à partir de son hôte, sans lui occasionner de nuisances ni pour autant lui apporter un avantage quelconque. Cette relation peut s'assimiler à un rapport de force équilibré entre la levure qui tend à se développer et l'hôte dont les défenses immunitaires contrecarrent le développement du champignon (CALDERONE 2002; CHABASSE *et al.* 2006).

Le passage du commensalisme à l'infection est en général le résultat de nombreux facteurs, à la fois liés à l'hôte (altération des défenses immunitaires non-spécifiques ou spécifiques) et à la levure (facteurs de virulence). Cela peut être assimilé à la rupture d'un équilibre.

La levure devient alors un pathogène opportuniste, et pénètre activement au niveau cutanéomuqueux. Cela peut se manifester de deux manières différentes : l'invasion reste relativement superficielle et focale, occasionnant un tableau d'infection cutanéomuqueuse, ou la levure pénètre plus profondément et est responsable d'une candidose invasive (cf. Figure 1, page 12). Comme nous le verrons si la première situation atteint le patient immunocompétent, la seconde est quasi exclusivement retrouvée chez le patient immunodéprimé ou présentant des facteurs de risque bien spécifiques.

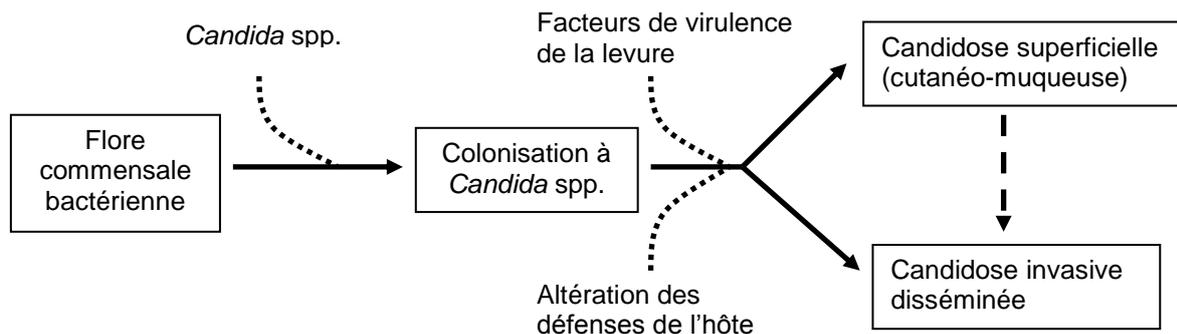


Figure 1 : Représentation schématique de la physiopathologie des infections candidosiques (CHABASSE *et al.* 2006).

2) De plus en plus d'espèces isolées en pathologie humaine

Au début du XX^{ème} siècle, *C. albicans* était la seule espèce considérée comme présentant une réelle importance médicale, les autres espèces (dont *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. guilliermondii*) n'étaient considérées que comme des pathogènes occasionnels.

À partir des années 1960, le développement des chimiothérapies, de la généralisation de l'utilisation de cathéters intraveineux ou d'antibiotiques, puis dans les années 1980, l'apparition du VIH et du SIDA, ont non seulement contribué à augmenter l'incidence des candidoses superficielles et profondes, mais ont également fait émerger des levures dites « opportunistes », car elles étaient auparavant considérées comme dénuées de pouvoir pathogène. En parallèle et comme nous allons le voir plus loin, les techniques de laboratoires se sont améliorées, permettant une identification mycologique de plus en plus précise.

Si les cinq espèces les plus fréquentes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*) restent encore à l'heure actuelle responsables de près de 90% des candidoses invasives, le nombre d'espèces rapportées comme responsables d'infection a nettement augmenté au cours des trois dernières décennies (PFALLER and DIEKEMA 2007). Ainsi, alors que seules 8 espèces étaient considérées comme pathogènes en 1988 (ODDS 1988), 31 étaient décrites dans le cadre d'un réseau de surveillance en 2010 (PFALLER *et al.* 2010c). Dans cette publication, il y avait une dernière catégorie, « *Candida spp.* », correspondant à des espèces non identifiées au-delà du genre, illustrant la difficulté d'établir une liste exhaustive, à la fois du fait de difficulté d'identification et/ou du faible nombre de cas rapportés dans la littérature. Dans une revue récente, au moins 43 espèces du genre *Candida* sont présentées comme ayant été impliquées en pathologie humaine (cf. Tableau 3, page 13) (JOHNSON and ELIZABETH 2009).

Tableau 3 : Espèces de *Candida* impliquées en pathologie humaine (JOHNSON and ELIZABETH 2009). Les formes sexuées sont indiquées quand elles sont connues.

Espèces fréquentes	Espèces moins fréquentes	Espèces rares
<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. blankii</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. famata (Debaryomyces hansenii)</i>	<i>C. bracarensis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. inconspicua</i>	<i>C. catenulata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lipolytica (Yarrowia lipolytica)</i>	<i>C. chiropterorum</i>
<i>C. krusei (Issatchenkia orientalis)</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. ciferrii</i>
<i>C. guilliermondii (Pichia guilliermondii)</i>	<i>C. norvegensis (Pichia norvegensis)</i>	<i>C. eremophila</i>
<i>C. lusitaniae (Clavispora lusitaniae)</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. fabianii</i>
<i>C. kefyr (Kluyveromyces marxianus)</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. fermentati (Pichia caribbica)</i>
	<i>C. rugosa</i>	<i>C. freyschussii</i>
	<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. haemulonii</i>
		<i>C. intermedia</i>
		<i>C. lambica</i>
		<i>C. magnoliae</i>
		<i>C. membranaefaciens</i>
		<i>C. nivariensis</i>
		<i>C. palmioleophila</i>
		<i>C. pararugosa</i>
		<i>C. pseudohaemulonii</i>
		<i>C. pseudorugosa</i>
		<i>C. pintolopesii</i>
		<i>C. pulcherrima</i>
		<i>C. thermophila</i>
		<i>C. utilis (Pichia jadinii)</i>
		<i>C. valida</i>
		<i>C. viswanathii</i>

Il n'est donc pas exclu et il est même probable que des espèces qui n'ont jamais été isolées chez l'homme à l'heure actuelle puissent dans l'avenir être responsables d'infections invasives dans certaines conditions ou chez certains hôtes, notamment chez les patients immunodéprimés. A titre d'exemple, en 1983 une étude portant sur *C. ciferrii* concluait sur l'insuffisance de preuves de sa pathogénicité, y compris concernant les candidoses superficielles (FURMAN and AHEARN 1983) alors que durant la dernière décennie plusieurs cas de candidoses invasives ont été rapportés dans la littérature chez des patients immunodéprimés (GARCIA-MARTOS *et al.* 2004; GUNSILIUS *et al.* 2001).

C - Antifongiques et *Candida*

1) Les antifongiques

Les principales classes d'antifongiques et molécules disponibles ainsi que leur mode d'action sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Principaux antifongiques et modes d'action (CALDERONE 2002).

Classe	Molécules / Spécialités	Mode d'action
Polyènes	Amphotéricine B	<u>Action sur la membrane :</u>
	Plusieurs formulations disponibles :	Liaison à l'ergostérol, aboutissant à la formation de pores aqueux puis à la fuite des composants cytoplasmiques
	- desoxycholate : Fungizone [®]	
	- liposomale : Ambisome [®]	⇒ Fongicide
Analogue de la pyrimidine	5-Fluorocytosine ou 5-FC (Ancotil [®])	<u>Action sur le noyau :</u> Inhibition de la synthèse d'ADN Entrée dans la cellule fongique par une cytosine perméase Désamination en 5-fluorouracil (5-FU) qui perturbe la synthèse des acides nucléiques
Azolés	Fluconazole (Triflucan [®])	<u>Action sur la membrane :</u>
	Itraconazole (Sporanox [®])	Inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol par inhibition de la 14 α -lanosterol demethylase (ERG11)
	Voriconazole (Vfend [®])	Entrée par diffusion facilitée dans la cellule fongique.
	Posaconazole (Noxafil [®])	⇒ Fongistatique
Echinocandines	Caspofungine (Cancidas [®])	<u>Action sur la paroi :</u>
	Micafungine (Mycamine [®])	Inhibition de la synthèse du β -1,3 glucane par inhibition de la β -1,3 glucane synthase
	Anidulafungine (Ecalta [®])	⇒ Fongicide

2) Sensibilités naturelles des principales espèces de *Candida*

Les différentes espèces de *Candida* n'ont pas toutes la même sensibilité naturelle aux antifongiques. Parmi les espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme certaines sont le plus souvent sensibles comme *C. albicans*, *C. parapsilosis* ou bien encore *C. tropicalis*. A l'opposé, *C. glabrata* présente une sensibilité fréquemment diminuée au fluconazole et *C. krusei* est intrinsèquement résistant au fluconazole (cf. Tableau 5).

Tableau 5 : Sensibilités naturelles des cinq espèces de *Candida* les plus fréquemment isolées en pathologie humaine vis-à-vis des azolés, de la 5-FC et de l'amphotéricine B (PAPPAS et al. 2009)

	Fluconazole	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	5-FC	Amphotéricine B
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	S-DD à R	S-DD à R	S-DD à R	S-DD à R	S	S à I
<i>C. krusei</i>	R	S-DD à R	S	S	I à R	S à I

S : sensible ; R : résistant ; I : intermédiaire
S-DD : sensibilité dose-dépendante (une augmentation des doses peut être nécessaire pour maintenir une efficacité)

La sensibilité aux antifongiques de la famille des échinocandines est également variable selon les espèces (cf. Tableau 6). Il a ainsi été démontré que *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* présentaient *in vitro* une sensibilité moindre aux échinocandines, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) plus élevées que les autres espèces. Toutefois, le retentissement clinique de cette moindre sensibilité *in vitro* aux échinocandines reste encore largement discuté et son impact en pratique clinique mal connu.

Tableau 6 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) vis-à-vis des trois échinocandines, (PFALLER *et al.* 2008a). Données exprimées en CMI90, en µg/ml (CMI inhibant au moins 90% des souches d'une espèce donnée).

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
<i>C. guilliermondii</i>	1	1	2
<i>C. lusitaniae</i>	0.5	0.25	0.5
<i>C. kefyr</i>	0.015	0.06	0.12

Les sensibilités naturelles aux antifongiques des espèces moins fréquemment isolées que celles présentées dans le Tableau 5 sont évidemment moins bien connues mais des tendances ont cependant été mises en évidence :

- Certaines souches de *C. lusitaniae* présentent une résistance naturelle à l'amphotéricine B ou peuvent l'acquérir sous traitement (FAVEL *et al.* 2003; PEREA and PATTERSON 2002).

- Plusieurs espèces dont *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. lipolytica* et *C. rugosa* sont décrites comme présentant une sensibilité diminuée au fluconazole. A noter que *C. rugosa* est également fréquemment résistante au voriconazole (DIEKEMA *et al.* 2007; PFALLER and DIEKEMA 2007).

- Des rares cas de *C. guilliermondii* et de *C. rugosa* résistants à l'amphotéricine B ont également été décrits (DIEKEMA *et al.* 2009).

- Enfin, d'autres espèces peuvent également présenter des résistances simultanées vis-à-vis de plusieurs antifongiques, comme *C. haemulonii* qui présente des CMI élevées vis à vis des azolés et de l'amphotéricine B (DROMER *et al.* 2010; KHAN *et al.* 2007).

Toutes les espèces du genre *Candida* n'ont donc pas la même sensibilité *in vitro* aux antifongiques, notamment vis-à-vis des azolés, molécules largement utilisées en pratique clinique.

L'identification précise des espèces moins fréquentes reste indispensable car celles-ci peuvent présenter des résistantes naturelles à un voire à plusieurs antifongiques.

3) Mécanismes de la résistance acquise aux antifongiques

Les mécanismes de résistances acquises sont multiples et ont essentiellement été étudiés pour *C. albicans* (SANGLARD and ODDS 2002). A noter que plusieurs mécanismes peuvent être associés chez une même souche (COSTE *et al.* 2007).

Pour les azolés, plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits :

- Augmentation de l'efflux par un transporteur multidrogue, de type proton dépendant (MFS) ou énergie dépendant (ABC)
- Diminution de l'affinité de la cible (ERG11p) pour l'antifongique résultant de substitutions sur le gène cible
- Surexpression de la cible (ERG11p)
- Altération dans la voie biosynthétique de l'ergostérol (mutations sur le gène ERG3)
- Gain d'un isochromosome (i51) codant pour le gène ERG11 et les systèmes d'efflux (SELMECKI *et al.* 2006).

Pour les échinocandines, le principal mécanisme de résistance consiste en des mutations conduisant à une diminution d'affinité de l'antifongique pour sa cible, la glucane synthase, codée par les gènes FKS1 et FKS2.

La résistance à l'amphotéricine B est secondaire à l'absence ou à la diminution de l'ergostérol dans la cellule, voire à une altération dans la voie biosynthétique de l'ergostérol (mutations sur le gène ERG3).

Plusieurs mécanismes de résistance à la 5-fluorocytosine ont été décrits :

- un défaut de cytosine perméase (bloque l'entrée de l'antifongique dans la cellule)
- la diminution ou l'absence des enzymes impliquées dans le métabolisme de la 5-FC, ce qui empêche sa transformation intracellulaire en 5-FU
- une dérégulation de la voie biosynthétique de la pyrimidine

D - Notion de complexe d'espèces

Les avancées récentes des méthodes de biologie moléculaire et leurs applications à la taxonomie de champignons ont permis de mettre en évidence que certaines espèces considérées de longue date comme un ensemble « unitaire », comme *C. albicans*, *C. parapsilosis* ou bien encore *C. glabrata*, regroupaient en fait plusieurs espèces distinctes. C'est ainsi qu'est née la notion de « complexe d'espèces » qui regroupe des espèces proches phylogénétiquement et phénotypiquement, mais présentant suffisamment de différences pour pouvoir les considérer comme des espèces distinctes.

Cette partie du manuscrit fait l'état des lieux des principaux complexes d'espèces qui ont pu être mis en évidence ces dernières années dans le genre *Candida* et dont l'identification en routine dans un laboratoire de mycologie reste difficile à l'aide des méthodes traditionnelles d'identification. Des travaux récents ont pu montrer que certaines de ces espèces cryptiques ou rares pouvaient éventuellement différer dans leurs profils de sensibilité aux antifongiques, justifiant donc leur identification précise.

1) *Candida albicans* et *C. dubliniensis*

L'espèce *C. dubliniensis* a été décrite en 1995 par Sullivan *et al.*, qui ont pu montrer chez certaines souches isolées de candidoses buccales de malades infectés par le VIH, initialement identifiées comme *C. albicans*, la présence de chlamydo-spores atypiques et inhabituellement nombreuses (cf. Figure 2). De plus, ces souches originales présentaient un profil génétique identique entre elles après restriction enzymatique mais distinct des souches habituelles de *C. albicans* (SULLIVAN *et al.* 1995). Cette nouvelle espèce a été nommée « dubliniensis » en référence à sa ville de découverte, Dublin. Le potentiel pathogène de cette nouvelle espèce a été rapidement prouvé, y compris dans des infections invasives (MEIS *et al.* 1999).

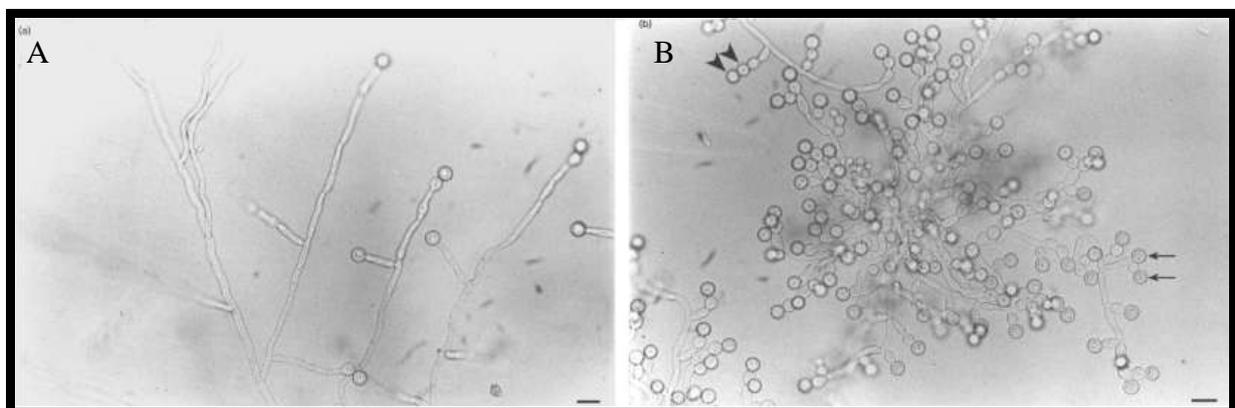


Figure 2 : Production de chlamydo-spores sur milieu RAT pour *C. albicans* (A) et *C. dubliniensis* (B) (SULLIVAN *et al.* 1995).

Cette espèce existait bien antérieurement à sa mise en évidence dans les années 1990, mais les isolats étaient probablement identifiés comme « *C. albicans* », du fait de leur grande proximité phénotypique. Ainsi, l'étude rétrospective de souches initialement identifiées à *C. albicans*, conservées dans les collections des laboratoires de référence, a montré qu'un certain nombre de ces souches était des *C. dubliniensis*, la plus ancienne étant une souche de la CBS (CentraalBureau voor Schimmelcultures) datant de 1952 (MEIS *et al.* 1999).

Plusieurs articles faisant état des différences phénotypiques entre *C. albicans* et *C. dubliniensis* ont été publiés ces dernières années (LORETO *et al.* 2010; PAUGAM *et al.* 2008; SULLIVAN *et al.* 2004). Ces deux espèces, très proches d'un point de vue phénotypique, diffèrent sur un nombre relativement limité de caractères, parfois non testés en routine dans un laboratoire de mycologie médicale, ce qui explique largement qu'elles aient longtemps été confondues (cf. Tableau 7).

Tableau 7 : Différences phénotypiques entre *C. albicans* et *C. dubliniensis* (PAUGAM *et al.* 2008)

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<u>Chlamydozoospores</u>	Peu nombreuses, isolées	Nombreuses, groupées
<u>Croissance</u>		
- à 42°C	+	-
- Sabouraud +6,5% NaCl	+	-
<u>Assimilation</u>		
- Glycérol	+	-
- D-xylose	+	-
<u>Méthyl-α-D-glucoside</u>	+	-
<u>Présence de β-glucosidase</u>	Oui	Non
<u>Aspect des colonies</u>		
- Milieu tétrazolium	Rose pâle	Rouge marron
- <i>Candida</i> ID2 [®]	Bleu cobalt	Bleu turquoise *
- CHROMagar [®] <i>Candida</i>	Vert	Vert foncé *

*Perte possible en subculture

Son identification est donc théoriquement possible par les techniques phénotypiques usuelles telles que les galeries d'identification commerciales à la condition que cette espèce soit incluse dans la base de données. Cependant, il a été montré que l'étude de ces carbohydrates ne permet de caractériser *C. dubliniensis* qu'avec une spécificité de 54 à 100% (LORETO *et al.* 2010). Par ailleurs, la différence de coloration des colonies sur les milieux chromogènes reste un critère nettement insuffisant pour garantir une identification précise, d'autant plus que cette

caractéristique a tendance à disparaître après repiquage des colonies ou lors de délais de culture prolongés (LORETO *et al.* 2010). Enfin, l'étude des chlamydozoïtes est difficilement réalisable en pratique de routine dans le laboratoire et son appréciation est subjective. A l'heure actuelle, l'identification de cette espèce nécessite donc être complétée par d'autres approches, notamment par des tests d'agglutination spécifiques utilisant un anticorps monoclonal, comme que le test Bichrodubli[®] commercialisé par le laboratoire Fumouze.

♦ **Épidémiologie**

Cette espèce a été initialement décrite chez les patients infectés par le VIH et il semble en effet que c'est dans cette population que l'on observe la plus forte prévalence de *C. dubliniensis*, même si celle-ci reste extrêmement variable en fonction des études, de l'ordre de 1,5 à 25% de l'ensemble *C. dubliniensis/C. albicans* (BROWN *et al.* 2000; FAGGI *et al.* 2005). Chez les patients non infectés par le VIH, la prévalence semble plus faible, de l'ordre de 1 à 5% (SULLIVAN *et al.* 2004). Il faut également souligner l'existence d'une disparité géographique, la prévalence de *C. dubliniensis* étant probablement plus importante aux Etats-Unis qu'en Europe pour le même type de patients (PAUGAM *et al.* 2008).

♦ **Résistance aux antifongiques**

Candida dubliniensis est, comme *C. albicans*, naturellement sensible aux antifongiques mais des cas de résistance acquise sous traitement quoique rare, ont été également décrits (RUHNKE *et al.* 2000). De manière intéressante, une équipe a suggéré, sur la base de données *in vitro*, que *C. dubliniensis* pourrait acquérir plus rapidement que *C. albicans* une résistance aux azolés suite à une exposition progressive aux antifongiques (MORAN *et al.* 1997). Par ailleurs, dans une étude longitudinale menée chez des patients infectés par le VIH et traités par fluconazole, *C. dubliniensis* a remplacé *C. albicans* comme commensal de la cavité buccale de certains patients suite à la mise en place du traitement antifongique (MARTINEZ *et al.* 2002). Il est donc possible qu'un traitement antifongique reposant sur les azolés puisse induire une pression de sélection suffisante pour favoriser *C. dubliniensis* par rapport à *C. albicans* dans la cavité orale.

2) Complexe d'espèces et *C. parapsilosis*

L'espèce *C. parapsilosis* a longtemps été considérée comme une espèce génétiquement hétérogène, avec trois groupes (I, II et III), définis sur la base d'études de biologie moléculaire reposant sur le RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), le séquençage de la région de l'ADN ribosomal, de l'ADN mitochondrial ou sur la comparaison des isoenzymes (cf. Figure 3) (LIN *et al.* 1995).

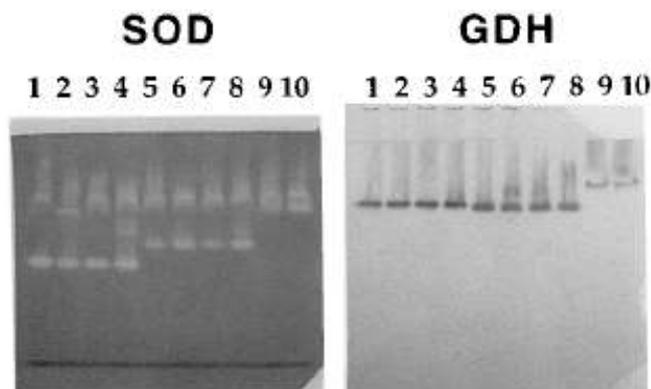


Figure 3 : Comparaison des isoenzymes SOD (superoxyde dismutase) GDH (glucose 6-phosphate dehydrogenase) par électrophorèse discontinue en gel de polyacrylamide permettant de distinguer les trois groupes de *C. parapsilosis* (LIN *et al.* 1995).

- Souches 1 à 4 : *C. parapsilosis* groupe I.
- Souches 5 à 8 : *C. parapsilosis* groupe II.
- Souches 9 et 10 : *C. parapsilosis* groupe III.

Plus récemment, une étude approfondie de cette espèce a pu révéler que les trois groupes de *C. parapsilosis* présentent une diversité génétique suffisante pour pouvoir les considérer comme des espèces distinctes (TAVANTI *et al.* 2005). En effet, entre les trois groupes, le pourcentage de similitude des séquences d'ADN varie de façon considérable, de 82.5 à 98.5% selon la région étudiée. Ces travaux ont donc abouti à la redéfinition de ces trois groupes génétiques en trois espèces distinctes:

- *C. parapsilosis stricto sensu* (anciennement *C. parapsilosis* groupe I)
- *C. orthopsilosis* (anciennement *C. parapsilosis* groupe II)
- *C. metapsilosis* (anciennement *C. parapsilosis* groupe III)

Ces trois nouvelles espèces sont morphologiquement et phénotypiquement très proches et donc encore non différenciables par les méthodes usuelles actuelles de mycologie. On parle fréquemment de complexe d'espèce de « *C. parapsilosis* » pour les désigner, cette notion regroupant *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis*. Leur

identification repose donc pour le moment exclusivement sur les techniques de biologie moléculaire, notamment sur l'étude de la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomal, ces trois espèces présentant des pourcentages de similitude significativement différents allant de 82,5% à 88,1% (cf. Figure 4, page 22) (TAVANTI *et al.* 2005).

D'un point de vue épidémiologique, la proportion de chacune des trois espèces dans le complexe « *C. parapsilosis* » varie selon la géographie, bien que des études récentes montrent que *C. parapsilosis* est encore l'espèce très largement majoritaire chez l'homme. Ainsi, dans une étude récente, la proportion de *C. metapsilosis* dans le complexe variait de 0,6% (Amérique du Nord) à 2,6% (Asie) et celle de *C. orthopsilosis* de 0,7% (Afrique) à 11% (Asie). En Europe, *C. metapsilosis* et *C. orthopsilosis* restent des isolats rares, représentant respectivement 2,9% et 3,5% des espèces du complexe *C. parapsilosis* (LOCKHART *et al.* 2008).

Du point de vue de leur sensibilité aux antifongiques, les données disponibles restent encore très limitées concernant les deux nouvelles espèces *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis*. Toutefois, dans une étude menée sur 175 isolats appartenant au complexe *C. parapsilosis* dont quatre *C. metapsilosis* et cinq *C. orthopsilosis*, tous les isolats de *C. metapsilosis* et de *C. orthopsilosis* étaient sensibles aux azolés, alors que certaines souches de *C. parapsilosis* présentaient un profil de résistance. Les CMI pour les échinocandines étaient également moins élevées pour *C. metapsilosis* et *C. orthopsilosis* que pour *C. parapsilosis* (SILVA *et al.* 2009).

Dans une autre étude menée sur 71 isolats cliniques, une des souches de *C. metapsilosis* était résistante au fluconazole alors que les souches de *C. parapsilosis* et de *C. orthopsilosis* étaient sensibles aux azolés. *Candida metapsilosis* avait des CMI significativement plus basses pour la caspofungine que les deux autres espèces et, à l'opposé, *C. parapsilosis* avaient des CMI significativement plus élevées pour la micafungine (CHEN *et al.* 2010). Au vu de ces derniers résultats, la sensibilité aux échinocandines pourrait donc différer entre ces trois espèces proches même si ces données restent à confirmer sur un grand nombre d'isolats afin de déterminer si ces différences peuvent avoir une implication en thérapeutique.

Alignements des séquences ITS des espèces des complexes « *parapsilosis* » et « *glabrata* »

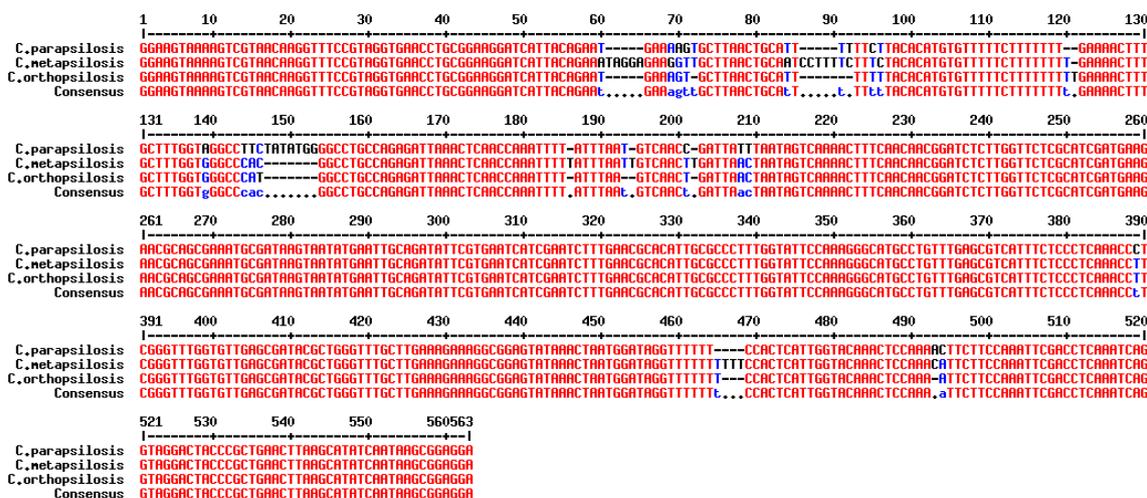


Figure 4 : Alignement des séquences nucléotidiques de la région ITS de l'ADN ribosomal de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis*. Les positions non conservées dans les trois espèces sont présentées en bleu ou en noir.

Document personnel, réalisé avec le logiciel Multalin : <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

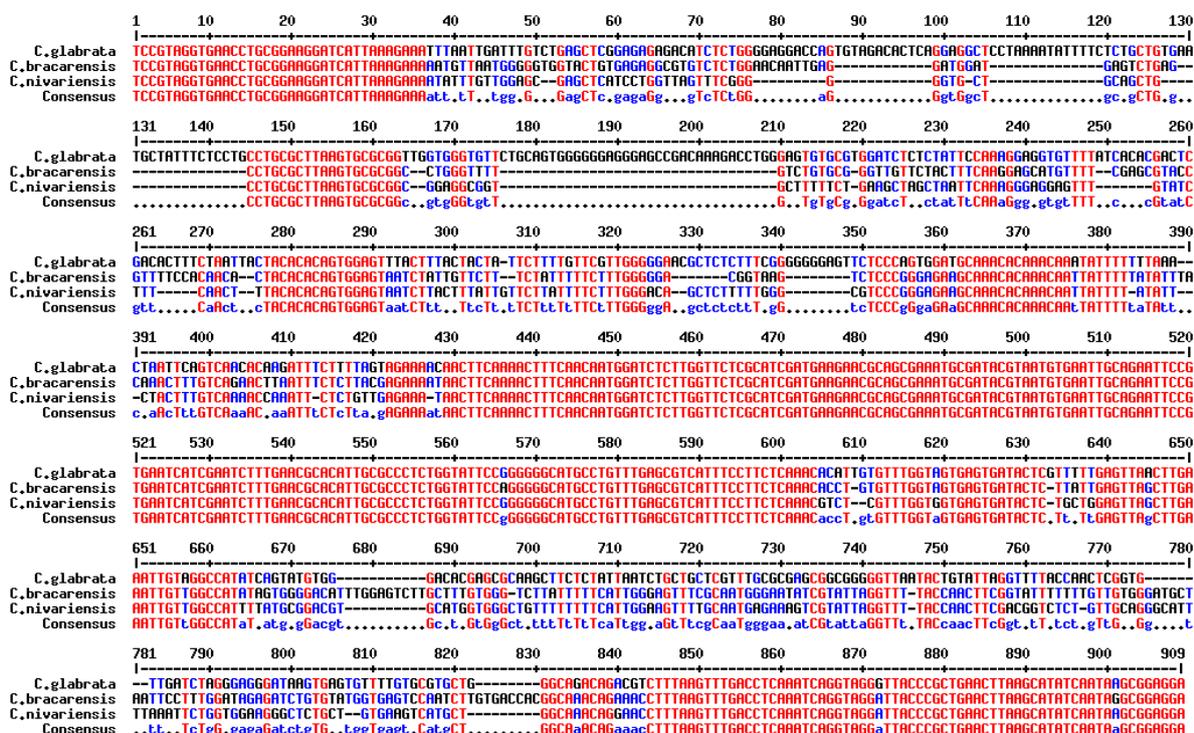


Figure 5 : Alignement des séquences nucléotidiques de la région ITS de l'ADN ribosomal de *C. glabrata*, *C. bracarensis* et *C. nivariensis*.

Document personnel, réalisé avec le logiciel Multalin : <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

3) Complexe d'espèces et *C. glabrata*

De la même façon que pour le complexe d'espèces de *C. parapsilosis*, deux nouvelles espèces auparavant confondues avec *C. glabrata* ont été récemment décrites : *C. nivariensis* en 2005 et *C. bracarensis* en 2006 (ALCOBA-FLOREZ *et al.* 2005; CORREIA *et al.* 2006). Ces deux espèces sont très proches de *C. glabrata* d'un point de vue taxonomique (cf. Figure 6).

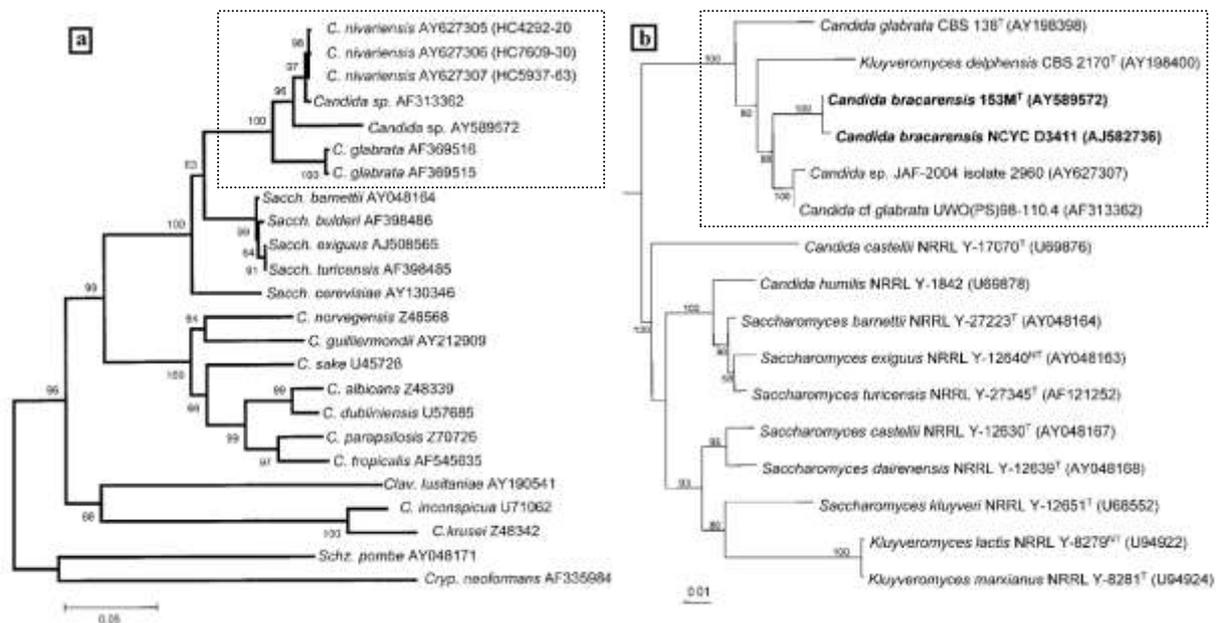


Figure 6 : Arbres phylogénétiques reposant sur l'analyse des séquences des régions D1/D2 de l'ARN ribosomal, montrant la proximité de (a) *C. glabrata* et *C. nivariensis* (ALCOBA-FLOREZ *et al.* 2005) et (b) *C. glabrata* et *C. bracarensis* (CORREIA *et al.* 2006)

Du point de vue phénotypique, il existe de rares différences dans leurs caractéristiques ; ainsi, contrairement à *C. glabrata*, *C. nivariensis* fermente le tréhalose et *C. bracarensis* assimile la L-Lysine. Certains auteurs ont également montré que ces deux nouvelles espèces peuvent présenter des couleurs différentes de *C. glabrata* sur les milieux chromogènes : sur gélose CHROMagar[®], *C. nivariensis* est habituellement blanc alors que *C. glabrata* est rose (ALCOBA-FLOREZ *et al.* 2005). Non incluses dans les galeries d'identification commercialisées du fait de leur découverte récente, ces deux espèces peuvent présenter, d'après les données de la littérature, des profils biochimiques soit identiques à *C. glabrata*, soit différents rendant l'identification impossible (ALCOBA-FLOREZ *et al.* 2005; BORMAN *et al.* 2008; CORREIA *et al.* 2006).

Leur identification définitive repose donc encore à ce jour quasi exclusivement sur des techniques de biologie moléculaire, notamment le séquençage de la région ITS de l'ADN ribosomal (cf. Figure 5, page 22).

Peu de données sont encore disponibles sur leur épidémiologie. Néanmoins, leur prévalence semble être faible. Dans une étude récente, portant sur environ 1600 souches initialement identifiées comme *C. glabrata* et provenant des différents continents, seuls deux isolats correspondaient à *C. bracarensis* et un à *C. nivariensis* (LOCKHART *et al.* 2009a). Dans une autre étude menée en Espagne, aucun des 143 isolats étudiés ne correspondait à *C. nivariensis* et trois étaient identifiés comme *C. bracarensis* (CUENCA-ESTRELLA *et al.* 2011).

Toutefois, leur pathogénicité n'est plus à démontrer, *C. nivariensis* ayant notamment été isolé d'hémocultures et d'abcès profond (BORMAN *et al.* 2008) et *C. bracarensis* d'hémocultures chez un patient allogreffé (WARREN *et al.* 2010).

Comme expliqué précédemment, les CMI de *C. glabrata* sont généralement élevées pour le fluconazole. Il existe encore peu d'études sur la sensibilité des deux nouvelles espèces même si dans une étude récente *C. nivariensis* présentait des CMI significativement plus élevées pour l'itraconazole et la 5-fluorocytosine que les isolats correspondants de *C. glabrata* (BORMAN *et al.* 2008). Les CMI pour le fluconazole et le voriconazole étaient également légèrement plus élevées. Une des trois souches de *C. bracarensis* identifiées dans une autre étude était résistante *in vitro* au fluconazole, à l'itraconazole, au voriconazole et au posaconazole (BISHOP *et al.* 2008). L'étude d'une plus grande collection de souches permettra de mieux apprécier la sensibilité aux antifongiques de ces espèces rares.

4) *Candida guilliermondii* et *C. famata*

Bien que ces deux espèces soient principalement isolées de l'environnement, *C. guilliermondii* de végétaux et des aliments, et *C. famata* de différents fromages, ces deux espèces sont régulièrement décrites comme responsables d'infections invasives chez l'homme. Ainsi, en fonction des études, *C. famata* représente 0.08 à 0.5% des souches isolées au cours de candidoses profondes, et *C. guilliermondii* 1 à 2% (PFALLER and DIEKEMA 2007; PFALLER *et al.* 2006). Cependant, au laboratoire de mycologie, ces deux espèces sont difficiles à distinguer sur les seuls critères phénotypiques habituels, permettant de douter sur la prévalence exacte de ces espèces dans les infections invasives.

Ainsi, un travail récent conduit par le Centre National de Référence de la Mycologie et des Antifongiques (Institut Pasteur, Paris) portant sur 62 souches identifiées initialement comme *C. famata* ou *C. guilliermondii*, a permis de révéler que la plupart de ces isolats étaient mal identifiés (DESNOS-OLLIVIER *et al.* 2008b). En effet, l'identification reposant sur les critères

phénotypiques était en accord avec l'identification moléculaire, prise comme référence, pour seulement 26 souches au total.

Les souches identifiées phénotypiquement comme *C. famata* étaient le plus souvent mal identifiées et correspondaient en général à des espèces peu éloignées phénotypiquement, mais bien distinctes (cf. Tableau 8), suggérant que l'importance de cette espèce en pathologie humaine est probablement surestimée.

Tableau 8 : Concordance entre l'identification phénotypique et l'identification moléculaire de *Pichia guilliermondii* et de *Debaryomyces hansenii* (DESNOS-OLLIVIER *et al.* 2008b)

Identification phénotypique		Identification moléculaire	
26	<i>C. famata</i> (<i>Debaryomyces hansenii</i>)	3	<i>C. famata</i> (<i>Debaryomyces hansenii</i>)
		6	<i>C. fermentati</i> (<i>Pichia caribbica</i>)
		10	<i>C. guilliermondii</i> (<i>Pichia guilliermondii</i>)
		3	<i>C. palmioleophila</i>
		2	<i>C. haemulonii</i>
		2	<i>C. lusitaniae</i> (<i>Clavispora lusitaniae</i>)
36	<i>C. guilliermondii</i> (<i>P. guilliermondii</i>)	23	<i>C. guilliermondii</i> (<i>Pichia guilliermondii</i>)
		12	<i>C. fermentati</i> (<i>Pichia caribbica</i>)
		1	<i>C. utilis</i> (<i>Pichia jadinii</i>)

Ce travail illustre donc que plusieurs espèces, non considérées jusqu'à présent dans les études épidémiologiques, sont très proches d'un point de vue taxonomique de *C. guilliermondii* et *C. famata*. Ainsi, *C. fermentati* (forme sexuée : *Pichia caribbica*) est une espèce proche de *C. guilliermondii* (VAUGHAN-MARTINI *et al.* 2005). Dans une autre étude, 8,7% des espèces identifiées phénotypiquement comme *C. guilliermondii* correspondaient à *C. fermentati* (LOCKHART *et al.* 2009b).

On peut également citer *C. intermedia*, *C. lusitaniae* et *C. palmioleophila*. Dans une étude récente, huit isolats de *C. palmioleophila* étaient identifiés en première intention comme *C. famata* ou *C. guilliermondii* (JENSEN and ARENDRUP 2011). Or, d'après les données de cette même étude, *C. palmioleophila* semble présenter un profil de sensibilité aux antifongiques différent de *C. guilliermondii*. En effet, les isolats testés de *C. palmioleophila* présentaient des CMI basses vis-à-vis des échinocandines (alors qu'elles sont habituellement élevées pour *C. guilliermondii*) et à l'inverse élevées vis-à-vis du fluconazole.

En conclusion, une méconnaissance de ces différentes espèces, même proches d'un point de vue taxonomique, peut induire l'introduction d'un traitement antifongique inadapté à la sensibilité du pathogène impliqué.

5) *Candida kefyr* et *C. sphaerica*

Ces deux espèces (formes sexuées : *Kluyveromyces marxianus* et *Kluyveromyces lactis* respectivement), isolées des produits laitiers, sont également proches taxonomiquement. *Candida kefyr* est considéré comme un pathogène émergent, fréquemment observé chez les patients d'hématologie ou de cancérologie (SENDID *et al.* 2006b).

Dans deux études très récentes, des souches de *C. sphaerica* avaient le même profil phénotypiques que *C. kefyr* (CENDEJAS-BUENO *et al.* 2010; GOMEZ-LOPEZ *et al.* 2010), l'identification de *C. sphaerica* ayant été réalisée par le séquençage de la région ITS de l'ADN ribosomal. Dans ces études, ces deux espèces ne présentaient pas de différences significatives de sensibilité aux antifongiques.

6) *Candida inconspicua* et *C. norvegensis*

Il s'agit à nouveau de deux espèces taxonomiquement proches et présentant une résistance naturelle vis-vis du fluconazole. Elles sont rarement isolées mais leur incidence semble en augmentation ces dernières années (PFALLER and DIEKEMA 2007).

Elles sont également très proches phénotypiquement. Elles ont ainsi le même profil biochimique sur la galerie ID32C[®] (bioMérieux) et se distinguent alors seulement par leur hydrolyse de l'esculine (NHO *et al.* 1997) : *C. norvegensis* l'hydrolyse contrairement à *C. inconspicua*. Ces difficultés d'identification sont connues et illustrées dans un travail au cours duquel toutes les souches (n=28) initialement identifiées comme *C. norvegensis* sur la base des critères phénotypiques (forme sexuée : *Pichia norvegensis*), correspondaient en fait à *C. inconspicua* après identification par biologie moléculaire (MAJOROS *et al.* 2003).

Les progrès réalisés dans l'identification des levures du genre *Candida*, notamment avec le développement des méthodes reposant sur l'analyse des séquences d'ADN, ont permis non seulement de définir des nouvelles espèces, mais également de montrer que des espèces rares et proches sur le plan phénotypique pouvaient être confondues. Ces progrès permettent d'établir une épidémiologie plus robuste et auront probablement un impact favorable dans l'avenir sur la prise en charge thérapeutique des infections invasives.

II. Rôle du laboratoire de mycologie médicale: une évolution des pratiques

Un des rôles principaux des laboratoires de mycologie médicale est d'identifier les levures isolées à partir de différents prélèvements qu'ils soient superficiels ou profonds (dont les hémocultures). En pratique courante, l'identification des différentes espèces de *Candida* fait principalement appel à la détermination de caractères morphologiques, physiologiques ou antigéniques. Il existe de nombreuses techniques d'identification commerciales, dont les intérêts et les limites sont présentées ci-dessous.

A - Conditions de cultures des levures du genre *Candida*

Les levures du genre *Candida* sont relativement peu exigeantes sur le plan nutritif et un grand nombre de milieux de cultures utilisés dans un laboratoire de microbiologie permettent aisément leur développement. Le milieu le plus utilisé pour la culture des champignons est le milieu de Sabouraud. L'adjonction d'antibiotiques, classiquement le chloramphénicol et la gentamicine, permet d'inhiber la croissance bactérienne.

Une durée d'incubation de 24 à 72 heures à 37°C est généralement suffisante pour isoler la majorité des *Candida* spp. Sur le milieu Sabouraud, les colonies mesurent alors quelques millimètres de diamètre, sont blanchâtres, avec une surface généralement lisse et brillante, ou plus rarement, terne, sèche, mate, ou ridée en fonction de l'espèce. Il est important de souligner que différentes espèces peuvent présenter le même aspect sur ce milieu standard, et de ce fait, les cultures mixtes associant plusieurs espèces ne sont pas toujours facilement décelables.

B - Outils d'identification traditionnels

De nombreuses techniques sont actuellement disponibles pour l'identification des levures du genre *Candida*. Certaines visent à identifier une espèce en particulier, notamment après une première orientation par des milieux chromogènes, alors que les galeries d'identification permettent d'identifier un plus grand nombre d'espèces.

1) Milieux chromogènes et milieux fluorogéniques

L'incorporation de substrats chromogéniques (ou fluorogéniques) directement dans le milieu de culture et révélant une activité enzymatique spécifique d'espèce peut permettre une discrimination plus facile que sur la gélose Sabouraud simple des cultures mixtes de plusieurs espèces de *Candida*. Cela aboutit également à une identification présomptive relativement

fiable de certaines espèces de *Candida* en particulier de *C. albicans*. Ces milieux, bien que plus onéreux que les milieux standards, présentent un réel avantage car ils permettent un gain de temps significatif dans l'identification et donc dans la prise en charge thérapeutique.

♦ **Les milieux chromogènes**

Plusieurs de ces milieux sont actuellement disponibles sur le marché (cf. Tableau 9). Le principe en est identique : les substances chromogènes, ajoutées au milieu, sont métabolisées par des enzymes fongiques plus ou moins spécifiques de certaines espèces et confèrent aux colonies une coloration particulière, qui varie en fonction de l'espèce et du milieu utilisé. La principale activité enzymatique explorée par ces milieux est la β -galactosaminidase, souvent complétée par la β -glucosidase ou des phosphatases.

Tableau 9 : Caractéristiques de trois milieux chromogènes commercialisés (ERASO *et al.* 2006a; SENDID *et al.* 2007).

Nom commercial	<i>Candida</i> ID 2 [®]	CandiSelect [®] 4	CHROMagar [®] <i>Candida</i>
Fabricant	bioMérieux	Bio-Rad	Becton-Dickinson
Activité enzymatique étudiée	β -galactosaminidase β -glucosidase	β -galactosaminidase Phosphatase	β -galactosaminidase Phosphatase
Espèces de <i>Candida</i> identifiés	<i>C. albicans</i> → bleu	<i>C. albicans</i> → rose-violet	<i>C. albicans</i> → vert <i>C. tropicalis</i> → bleu verdâtre à bleu métallisé <i>C. krusei</i> → rose pâle, blanchâtre en périphérie
Orientation de l'identification vers d'autres <i>Candida</i> spp.	<i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. kefyr</i> → rose	<i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> → turquoise	<i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. kefyr</i> → rose

Tous ces milieux permettent théoriquement, après 48 heures d'incubation, une identification directe du complexe *C. albicans/C. dubliniensis* avec une spécificité de plus de 90%, voire 100% dans certaines études (FREYDIERE *et al.* 2001). Comme décrit précédemment, ces deux espèces peuvent présenter des couleurs légèrement différentes (cf. Figure 8, page 34), mais ce caractère relativement subjectif, se perd progressivement avec les repiquages ou en cas d'incubation prolongée et des tests complémentaires sont donc généralement nécessaires pour distinguer définitivement ces deux espèces (ERASO *et al.* 2006b). Exceptionnellement, certaines espèces rares de *Candida* voire d'autres genres (*Trichosporon* spp.), peuvent prendre une couleur proche de *C. albicans* sur ces milieux chromogènes.

Concernant les autres espèces, certains de ces milieux chromogènes, permettent une identification présomptive mais nettement moins fiable que pour *C. albicans/C. dubliniensis*,

certaines couleurs pouvant être associées à une espèce particulière ou le plus souvent à un ensemble d'espèces, orientant alors les tests complémentaires pour obtenir l'identification finale. Ainsi, selon les recommandations du fabricant, la gélose CHROMagar[®] peut identifier directement *C. tropicalis* et *C. krusei*, mais ces données doivent toujours être prises avec précautions. Une étude a montré par exemple que certains isolats de *C. inconspicua* pouvaient présenter le même aspect que *C. krusei* sur ce milieu (HOSPENTHAL *et al.* 2006).

Il faut donc retenir que l'identification des espèces non-*albicans* demeure présomptive sur ces milieux et que le recours à des tests complémentaires reste indispensable.

♦ ***Les milieux fluorogéniques***

Ils permettent l'identification directe de *C. albicans*, dont les colonies présentent une fluorescence bleutée lorsqu'elles sont observées sous lumière ultraviolette (exemple : Fluoroplate[®] *Candida*, commercialisé par Merck). Mais la lecture de ces milieux nécessitant une lampe à ultraviolet, les milieux chromogènes leur sont donc généralement préférés car ils ne nécessitent pas d'équipement spécifique.

2) Test de germination

Le test de germination, également appelé test de blastèse ou test de filamentation en sérum, est utilisé depuis les années 1960 (Mackenzie 1962). Après une incubation dans du sérum pendant deux à quatre heures à 35-37°C, seul *C. albicans* et *C. dubliniensis* sont capables de développer de minces tubes germinatifs, sans étranglement à leur base, ou vrais hyphes à partir de la cellule mère (cf. Figure 7, page 30). Outre sa bonne sensibilité et spécificité (plus de 95%), ce test présente également l'avantage d'être peu coûteux.

Sa fiabilité présente cependant un certain nombre de limites car :

- il ne distingue pas *C. dubliniensis* de *C. albicans*
- certaines souches de *C. albicans* ne produisent pas de tubes germinatifs
- d'autres espèces telles que *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* peuvent développer une structure morphologiquement proche, un pseudo-hyphe, avec une constriction à sa base, ce qui peut entraîner un risque de confusion (SUDBERY *et al.* 2004).



Figure 7 : Différents aspects microscopiques de levures lors du test de germination : blastospores bourgeonnantes (A), pseudo-hyphes (B) et hyphes vrais (C) (SUDBERY et al. 2004).

3) Test de chlamydosporulation

Ce test a pour objectif de favoriser l'apparition de structures de morphologie particulière appelées chlamydo-spores qui correspondent à des formes de résistance et qui apparaissent sur des milieux pauvres comme le milieu PCB (pomme de terre, carotte, bile) ou le RAT (riz, agar, tween 80). Après 24-48 heures d'incubation à 25-28°C, la production de chlamydo-spores est observée au microscope. Il s'agit de structures arrondies de 10 à 15 µm de diamètre, isolées ou en grappes, à paroi épaisse, à l'extrémité du pseudomycélium.

Candida albicans et *C. dubliniensis* sont normalement les seules espèces impliquées en pathologie humaine à pouvoir former des chlamydo-spores. *Candida dubliniensis* en produit en plus grand nombre que *C. albicans* sur milieu RAT (cf. Figure 2, page 17). Dans ces conditions de cultures, la majorité des autres espèces ne produit que du pseudomycélium, à l'exception de *C. glabrata* qui ne produit que des blastospores (CALDERONE 2002). En pratique de routine, le temps technique nécessaire à ce test en limite la portée.

4) Tests rapides d'identification

Des tests spécifiquement orientés vers une espèce ont été développés et permettent l'identification rapide, avec une très bonne spécificité, de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* et *C. glabrata*. L'identification de *C. krusei* et *C. glabrata* est d'autant plus intéressante qu'il s'agit d'espèces fréquentes et présentant une sensibilité diminuée aux antifongiques. Par rapport aux galeries d'identification étudiant les caractères physiologiques et permettant l'identification de plusieurs espèces en 48 heures (cf. paragraphe suivant), ces tests donnent un résultat en quelques minutes et sont largement utilisés par les laboratoires.

a) *Candida albicans*

Il existe des tests immunologiques ou métaboliques permettant une identification rapide de *C. albicans*. Ils sont basés sur des particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal reconnaissant un antigène pariétal spécifique (Bichrolatex[®], Fumouze Diagnostics) ou sur la recherche d'activités enzymatiques spécifiques. Si ces tests sont plus

rapides de réalisation que le test de germination (quelques minutes versus minimum deux heures d'incubation) et présentent de bonnes sensibilités et spécificités, ils restent plus onéreux que ce dernier et sont donc peu utilisés (FREYDIERE *et al.* 2001).

b) *Candida dubliniensis*

Les milieux chromogènes ou le test de germination permettent aisément de distinguer le complexe *C. albicans/C. dubliniensis* des autres espèces de *Candida*. Pour distinguer rapidement ces deux espèces proches, un test immunologique qui fait référence, le Bichrodubli[®] (Fumouze Diagnostics), a été développé il y a plusieurs années. Des particules de latex, sensibilisées par des anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes pariétaux de surface de *C. dubliniensis* s'agglutinent en présence de cette espèce (cf. Figure 9 page 34). Parmi les limites de ce test, on peut noter l'absence de contrôle positif ou négatif fourni par le fabricant et une lecture parfois délicate de l'agglutination. Une étude a toutefois montré que la sensibilité et la spécificité de ce test rapide sont élevées, de 97% et 100% respectivement (SAHAND *et al.* 2006).

c) *Candida krusei*

Le Krusei color[®] (Fumouze Diagnostics) repose, comme pour le Bichrodubli[®] (Fumouze Diagnostics), sur un principe immunologique : des particules de latex sensibilisées par des anticorps monoclonaux reconnaissent des antigènes pariétaux de surface spécifiques (cf. Figure 10 page 34).

Dans une étude (FREYDIERE *et al.* 1997), la sensibilité du Krusei color[®] était de 100% et la spécificité de 95%, une agglutination non spécifique pouvant être observée pour certaines souches de *C. kefyr*, *C. inconspicua*, et de rares souches de *C. parapsilosis*, *C. sphaerica*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* et de *C. tropicalis*.

d) *Candida glabrata*

Cette espèce peut être spécifiquement identifiée à l'aide du test RTT *Glabrata*[®] (Fumouze Diagnostics). En pratique, il consiste à tester l'hydrolyse de deux sucres par la levure à identifier : le tréhalose et le maltose (cf. Figure 11, page 34).

Candida glabrata hydrolyse uniquement le tréhalose. Les autres espèces n'hydrolysent soit aucun sucre, soit uniquement le maltose, soit les deux sucres. Un témoin permet d'éviter les faux positifs liés au transfert concomitant du glucose contenu dans le milieu de culture des colonies prélevées. Le résultat est obtenu en 15 à 20 minutes.

La sensibilité de ce test est de l'ordre de 94% et sa spécificité de 94 à 100% (FREYDIERE *et al.* 2003). *Candida tropicalis*, *C. famata* et *C. lusitaniae* peuvent parfois donner des résultats faussement positifs. La spécificité dépend en partie du milieu de culture utilisé. Ainsi, sur gélose au sang (milieu classique de bactériologie), le test donne de l'ordre de 16% de faux positif (WILLINGER *et al.* 2005). Concernant les deux espèces proches de *C. glabrata*, *C. nivariensis* et *C. bracarensis*, ce test n'a pas été spécifiquement évalué. Cependant, dans une publication, le test RTT *Glabrata*[®] était négatif pour les deux souches de *C. nivariensis* et de *C. bracariensis* (WAHYUNINGSIH *et al.* 2008).

5) L'étude des caractères physiologiques par les galeries d'identification

Quand l'identification précise de l'espèce de *Candida* n'a pas pu être faite par les techniques précédentes, l'identification repose en routine sur l'utilisation de galeries. Il existe de nombreux dispositifs commercialisés (cf. Tableau 10). Ils étudient l'assimilation des carbohydrates (ou auxanogramme) ou leur fermentation (ou zymogramme). Le nombre de sucres testés dans chaque galerie varie selon le système commercialisé et peut parfois être complété par la détection d'enzymes. L'identification de l'espèce est possible à partir du profil obtenu et de sa comparaison avec la base de données correspondante.

Selon les dispositifs, le nombre d'espèces pouvant être identifiées dépend donc à la fois du nombre de caractères étudiés et de l'exhaustivité de la base de données. Il varie d'une quinzaine à plus de 60 espèces identifiables, pour le système ID32C[®], bioMérieux (cf. ANNEXE n°1, page n°114).

Tableau 10 : Principales galeries d'identification commerciales pour les levures (FREYDIERE *et al.* 2001)

Nom commercial	Fabricant	Techniques	Nombre de caractères étudiés	Nombre d'espèces identifiables
Api 20C AUX [®]	bioMérieux	manuelle	19	43
Auxacolor [®]	BioRad	manuelle	15	33
Fungifast [®]	ELITech Microbiology	manuelle	10	10
ID32C [®]	bioMérieux	automatisable	31	63
Vitek 2 YST [®]	bioMérieux	automatisée	46	53

La galerie ID 32C[®] (cf. Figure 12, page 34) est encore à l'heure actuelle la plus fréquemment utilisée notamment du fait de sa base de données importante (FREYDIERE *et al.* 2001). Chaque cupule teste un caractère qui est positif si la levure s'y multiplie : un trouble, mesuré visuellement ou par lecture automatisée, apparaît alors après 48 à 72 heures d'incubation. Cette galerie exprime le résultat de son identification avec un pourcentage de probabilité.

L'identification d'une espèce avec un pourcentage de probabilité supérieur ou égal à 98% est habituellement considérée comme une très bonne identification.

Pour les espèces les plus fréquentes, des études ont rapporté un pourcentage d'identification correcte de 94 à 98% des isolats étudiés après une incubation de 72 heures (FREYDIERE *et al.* 2001). Dans une autre étude, seul 85% d'un panel d'espèces rares, telle que *C. ciferrii*, *C. famata* ou *C. lambica*, étaient identifiés correctement (RAMANI *et al.* 1998).

La société bioMérieux propose une galerie d'identification automatisée (Vitek®). Cette technique a l'avantage d'être entièrement automatisée et plus rapide avec des temps d'incubation plus courts, mais restent moins performante avec 96% d'identifications correctes quand elle est comparée à la galerie ID32C® (PINCUS *et al.* 2007). Dans une étude portant sur 68 isolats des espèces les plus fréquentes (*C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. parapsilosis*), seul 91% (62 isolats) étaient identifiés correctement. Quatre autres souches (deux *C. glabrata* et deux *C. parapsilosis*) étaient identifiées mais avec une faible discrimination (VIJGEN *et al.* 2010) alors que pour deux souches de *C. glabrata*, l'identification était erronée. Ce système automatisé est également moins performant que la galerie ID32C® pour l'identification de *C. dubliniensis* : dans une étude, l'ID32C® identifiait correctement cette espèce 48 fois sur 50, contre 33 sur 50 pour la carte Vitek 2 ID YST® (CARDENES-PERERA *et al.* 2004). Les bonnes performances de la galerie d'identification ID32C® pour l'identification de *C. dubliniensis* ont été confirmées par d'autres auteurs qui rapportaient une spécificité relativement élevée, de l'ordre de 95% (PASLIGH *et al.* 2010).

Cependant, ces techniques phénotypiques, même reposant sur la galerie ID32C®, considérée comme une référence, ne permettent pas l'identification de toutes les espèces de *Candida*. Certaines espèces proches taxonomiquement ont en effet également des profils phénotypiques comparables, comme *C. inconspicua* et *C. norvegensis*, voire identiques, comme les espèces du complexe « *parapsilosis* ». Aussi, les espèces rares n'étant pas incluses dans les bases de données de ces systèmes commerciaux, elles ne sont donc pas identifiables par ces méthodes. Ainsi, la base de données de la galerie ID32C® ne contient que 35 levures appartenant au genre *Candida* alors que plus de 40 ont déjà été décrites en pathologie humaine et que près de 200 espèces de *Candida* ont été décrites !



Figure 8 : À gauche, *C. albicans* sur gélose OCCA[®] (Oxoid).
À droite, *C. albicans* (haut) et *C. dubliniensis* (bas) sur gélose *Candida* ID2[®] (bioMérieux)
Collection personnelle.

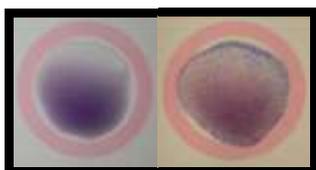


Figure 9 : le test Bichrodubli[®]
Collection personnelle.

A gauche : test négatif.

A droite : test positif, les particules de latex se sont agglutinées en présence de *C. dubliniensis*

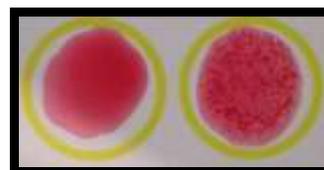


Figure 10 : Le test Krusei color[®]
Collection personnelle.

A gauche : test négatif.

A droite : test positif, les particules de latex se sont agglutinées : il s'agit d'un *C. krusei*.

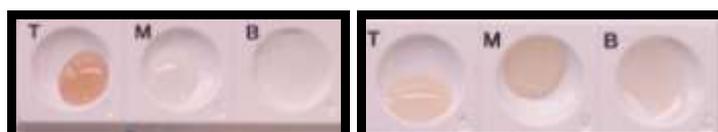


Figure 11 : Le test RTT *Glabrata*[®]
Collection personnelle.

A gauche, un test positif avec un *C. glabrata* : tréhalose (T) positif, maltose (M) et témoin (B) négatif.

A droite, un test négatif avec une autre espèce : T et M sont légèrement positifs.

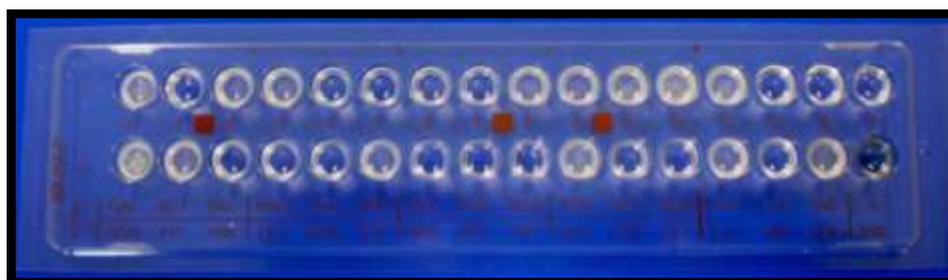


Figure 12 : La galerie d'identification ID32C[®] : exemple de profil phénotypique (*C. tropicalis*).
Collection personnelle.

6) Stratégie d'identification

Une démarche d'identification d'une levure du genre *Candida* grâce aux techniques usuelles est présentée dans la Figure 13.

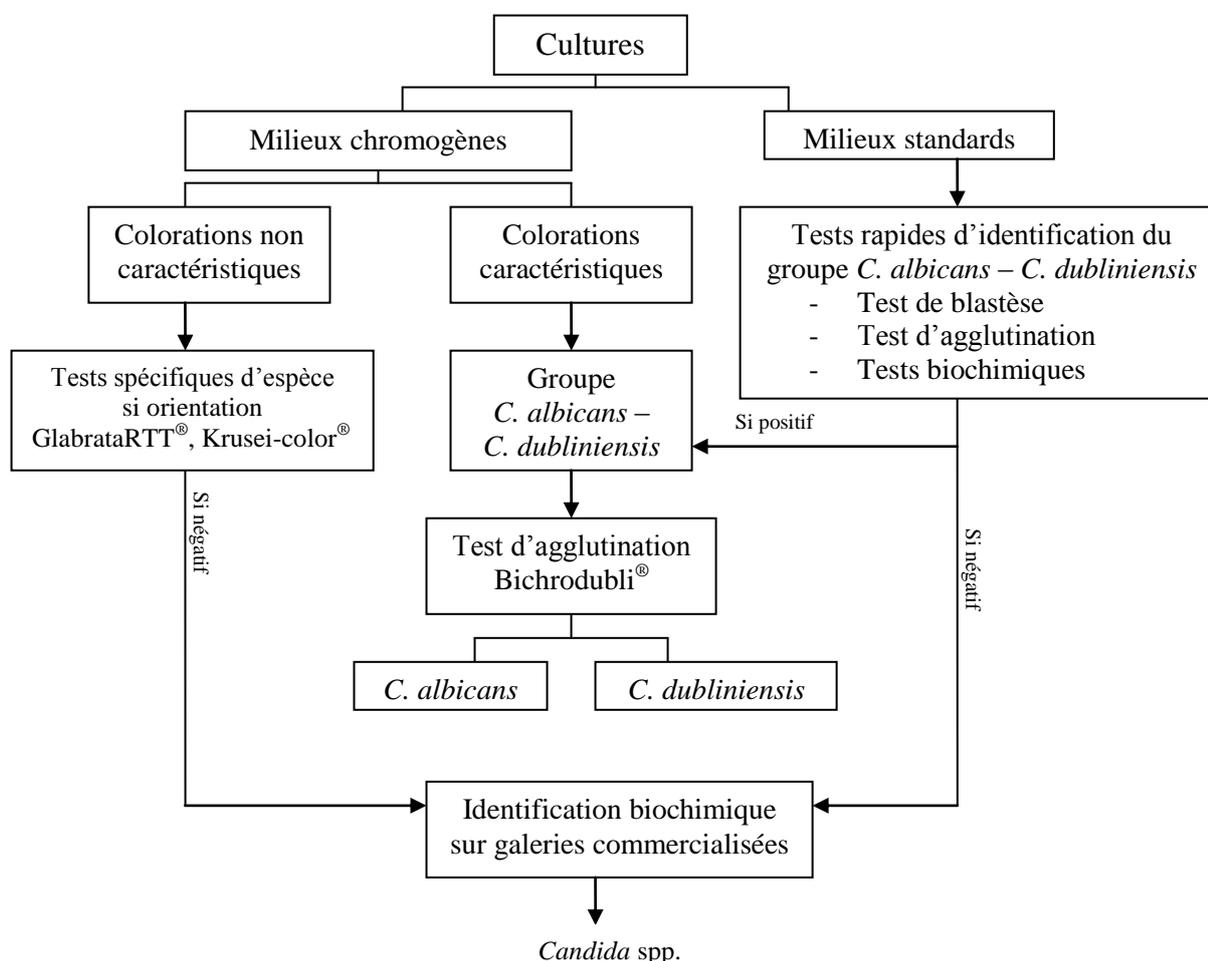


Figure 13 : Démarche pour l'identification au laboratoire d'une levure du genre *Candida* (CHABASSE *et al.* 2006).

Si l'identification par les techniques usuelles de mycologie permet le plus souvent d'obtenir une identification correcte de l'espèce isolée, elle peut être prise en défaut, notamment pour les espèces les moins fréquentes. Dans ce contexte, il faut avoir recours à des méthodes complémentaires, en particulier la biologie moléculaire.

C - Apport de la biologie moléculaire dans l'identification des levures

La méthode la plus utilisée, détaillée ci-dessous, repose sur une PCR (Polymerase Chain Reaction) panfongique suivi du séquençage des produits d'amplification obtenus (cf. ANNEXE n°2 : Principe du séquençage par la méthode de Sanger, page 115). Cela permet théoriquement d'identifier toutes les espèces fongiques. Il s'agit de la méthode la plus employée à l'heure actuelle et celle utilisée dans le cadre de l'étude EPICANDI qui fait l'objet de ce manuscrit.

1) Cibles de la PCR panfongique

Une région du génome est pertinente pour permettre l'identification d'une levure si elle contient à la fois :

- des domaines conservés chez toutes les espèces du groupe que l'on veut étudier (en l'occurrence, les *Candida* spp.) et cela afin de l'utiliser pour créer des amorces universelles
- des domaines variables avec des différences significatives entre les espèces mais relativement stables au sein d'une même espèce pour permettre un diagnostic d'espèce.

Une base de données concernant la séquence étudiée doit également être disponible, fiable et la plus exhaustive possible.

En ce qui concerne l'identification des champignons, les cibles les plus utilisées pour l'identification sont les régions d'ADN codant pour les ARN ribosomiaux (ADNr) (BOUGNOUX and ESPINASSE 2003).

En effet, les sous-unités de l'ADNr contiennent des domaines fortement conservés au sein du règne fongique et codant pour les sous-unités 18S, 5.8S et 28S de l'ARNr. Ils sont séparés par deux espaceurs internes transcrits ou ITS : ITS1 et ITS2 (pour « Internal Transcribed Spacer ») qui sont des séquences extrêmement variables d'une espèce à l'autre (cf. Figure 14).

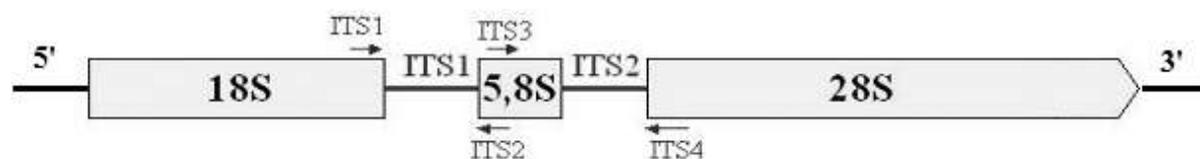


Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation des gènes de l'ADNr avec les régions ITS (BOUGNOUX and ESPINASSE 2003).

Cette région du génome a également l'avantage d'être présente en de multiples copies dans le génome des levures (de 50 à 100 copies pour les *Candida* spp.), ce qui augmente considérablement la sensibilité de la PCR par rapport à une cible présente en copie unique (PINCUS *et al.* 2007). Plusieurs couples d'amorces universelles correspondant aux régions fortement conservées ont été conçues à partir des régions codant pour les sous-unités 18S, 5.8S et 28S (cf. Tableau 11).

Le séquençage de la région D1/D2 qui correspond à la grande sous-unité de l'ADNr est également une cible couramment utilisée, le plus souvent en seconde intention, pour l'identification moléculaire des champignons.

Tableau 11 : Amorces universelles pour l'amplification de la région ITS (Bougnoux and Espinasse 2003).

Nom/couple	Amorces universelles : Séquence (5' → 3')	Régions amplifiées
ITS1 et ITS2	ITS1 : TCC GTA GGT GAA CCT GCG G' ITS2 : GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	Extrémité 3' 18S, ITS1 et extrémité 5' 5.8S
ITS3 et ITS4	ITS3 : GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC ITS4 : TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Extrémité 3' 5.8S, ITS2 et extrémité 5' 28S
ITS1 et ITS4	ITS1 : TCC GTA GGT GAA CCT GCG G ITS4 : TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Extrémité 3' 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 et extrémité 5' 28S
NL1 et NL4	NL1 : GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG NL4 : GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	Région D1/D2 (28S)

2) Limites de la technique : la base de données

Les séquences ainsi obtenues après séquençage doivent être comparées à une base de données contenant les séquences de la région correspondante pour les différentes espèces de levures.

Il existe plusieurs bases de données publiques disponibles et consultables en ligne. La plus connue et la plus largement utilisée est GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Elle répertorie de très nombreuses séquences, y compris celles des régions de l'ADN ribosomal des champignons, ce qui permet assez aisément de comparer la séquence à étudier avec la base de données grâce à un logiciel d'alignement inclus sur le site (BLAST, pour « Basic Local Alignment Search Tool », www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

Cependant, GenBank présente l'inconvénient majeur de l'absence de contrôle des séquences déposées. Les séquences de la base de données sont en effet sous la seule responsabilité de leur dépositaire. Il faut donc rester critique avec les résultats obtenus. Il est ainsi admis que pour certains genres de champignons, jusqu'à 20% des espèces pourraient être erronées (DE HOOG and HORRE 2002). De plus, il n'y a pas de mises à jour automatiques des séquences déposées pour les espèces ayant subi une révision de leur position taxonomique, cela restant à la charge de leur dépositaire (PINCUS *et al.* 2007).

D'autres bases de données, spécifiques des champignons sont disponibles, comme celle proposée par la CBS (CentraalBureau voor Schimmelcultures) qui contient les séquences d'environ 6.500 souches (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICSSequences.aspx>).

3) Applications et performances en routine dans un laboratoire de mycologie

Le séquençage de la région ITS permet généralement d'identifier sans difficulté les espèces difficilement ou non identifiables par les outils traditionnels, comme les espèces des complexes « *C. parapsilosis* » et « *C. glabrata* », de même que les espèces rares, notamment celles absentes des bases de données phénotypiques commerciales.

L'identification par biologie moléculaire est donc plus précise que l'identification phénotypique, y compris par galerie ID32C[®]. Dans une étude comparant ces deux méthodes pour l'identification d'espèces rares de *Candida*, la technique phénotypique identifiait correctement 85% des souches contre 98% pour l'identification moléculaire. Les souches mal ou non identifiées par la galerie ID32C[®] étaient des espèces n'appartenant pas à la base de données de la galerie, comme *C. blankii*, ou qui présentaient un profil biochimique identique à une espèce présente dans la base de données, par exemple *C. pararugosa* et *C. rugosa* (CIARDO *et al.* 2006).

Comme souligné dans une étude du laboratoire de mycologie de référence du Royaume-Uni, l'intérêt de l'identification moléculaire des levures est de compléter l'identification phénotypique classique quand celle-ci échoue ou est incapable d'identifier spécifiquement les espèces d'un même complexe (LINTON *et al.* 2007). Dans cette étude, sur plus de 3000 isolats cliniques isolés sur une période de deux ans, 90% ont en effet été identifiées correctement par les outils traditionnels. Il s'agissait d'espèces fréquentes, les espèces rares étant majoritairement mal ou non identifiées. L'identification des 153 autres isolats (représentant 47 espèces) n'a pas été possible par les techniques phénotypiques et a nécessité l'amplification et le séquençage de la région D1/D2. Il s'agissait d'espèces fréquentes qui présentaient des profils biochimiques atypiques, comme *C. dubliniensis*, ou d'espèces rares en pathologie humaine.

Dans une autre étude, 60 souches ont été identifiées par méthodes conventionnelles et par séquençage (CENDEJAS-BUENO *et al.* 2010). Ces souches correspondaient à des espèces rares, qui y sont définies comme représentant chacune moins de 1% des isolats de la collection Centre National de Référence espagnol (Instituto de Salud Carlos III, Madrid), comme par exemple *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. bracarensis*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. sphaerica*, ou bien encore *C. hæmulonii*, ainsi que d'autres levures n'appartenant pas au genre *Candida*. Dans ce travail, les techniques conventionnelles ont permis d'identifier de manière satisfaisante seulement 15 des 60 souches, les autres isolats étant soit mal identifiés, soit non identifiables par ces méthodes. A noter (et comme discuté précédemment), qu'une souche de *C. inconspicua* avait été identifiée dans ce travail comme *C. norvegensis*.

Cette étude montre également qu'un tiers des souches étudiées présentent des CMI élevées pour le fluconazole, les autres azolés ou les échinocandines.

Parmi ces souches de sensibilité diminuée, certaines étaient mal identifiées phénotypiquement. Par exemple, les isolats *C. hæmulonii*, espèce connue pour ses CMI élevées, n'avaient pas pu être identifiés phénotypiquement ou l'avaient été en tant que *C. sake*.

Une identification incorrecte peut donc amener à une prise en charge ou un traitement inapproprié : une levure non identifiée peut être négligée et une levure mal identifiée peut correspondre à une espèce résistante à plusieurs antifongiques.

L'identification des levures du genre *Candida* par les techniques de biologie moléculaire est plus précise que par les méthodes phénotypiques traditionnelles et constitue désormais la méthode de référence. Son intérêt concerne en premier lieu les espèces les moins fréquentes, car, si les outils d'identification phénotypique commercialisés sont très performants pour les espèces courantes, ces méthodes sont facilement prises en défaut pour l'identification des espèces rares et potentiellement émergentes.

D - Le MALDI-TOF : une solution innovante pour l'identification des levures

Le MALDI-TOF (pour Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight) est une technique basée sur la spectrométrie de masse développée depuis la fin des années 1980 (KARAS *et al.* 1987). Les premières applications pour la microbiologie apparaissent dans les années 1990 et concernaient initialement la bactériologie. Les applications dans le domaine de la mycologie, en particulier pour l'identification des levures et des champignons filamenteux, sont beaucoup plus récentes. L'utilisation de cette technologie dans les laboratoires de diagnostic est actuellement en plein essor.

1) Principe du MALDI-TOF

Le principe général de la spectrométrie de masse est de séparer les molécules d'un mélange selon leur taille et leur charge. Dans le MALDI-TOF, qui est un type particulier de spectromètre de masse, un faisceau laser pulsé, ionise le mélange à étudier. Les ions sont accélérés et « voyagent » dans un tube de vol. Les ions vont alors se déplacer à une vitesse inversement proportionnelle à leur taille et charge et sont enregistrés, produisant le spectre du temps de vol ou « Time-of-Flight » = TOF (cf. Figure 15).

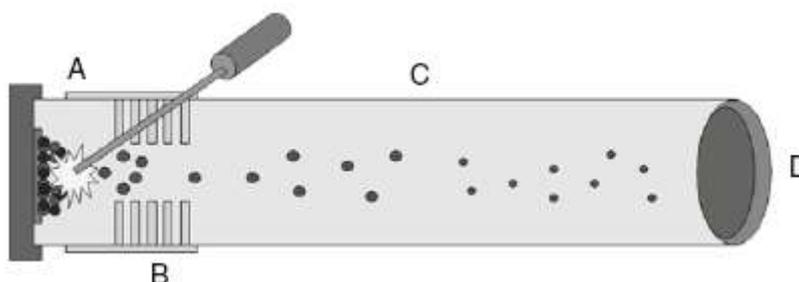


Figure 15 : Représentation schématique du principe du spectromètre de masse MALDI-TOF (GIEBEL *et al.* 2010)

A : L'échantillon est irradié par un laser ultraviolet, ce qui permet l'ionisation des molécules.

B : Les ions sont accélérés.

C : Les ions « voyagent » dans le tube de vol, les plus petits avec une vitesse plus élevée que les plus grands.

D : Ils sont enregistrés par un détecteur, ce qui permet d'établir le spectre du temps de vol.

En microbiologie, cela permet d'étudier le spectre des protéines d'une espèce bactérienne ou fongique dans le cadre des applications en mycologie. La comparaison du spectre obtenu avec une base de données de spectres de référence, permet d'obtenir une correspondance à une espèce associée à un score. Un score supérieur à 2.0 correspond à une très bonne identification ; une identification avec un score inférieur à 1.7 est incertaine.

Cette technique repose donc sur l'étude protéomique et non plus génomique des microorganismes.

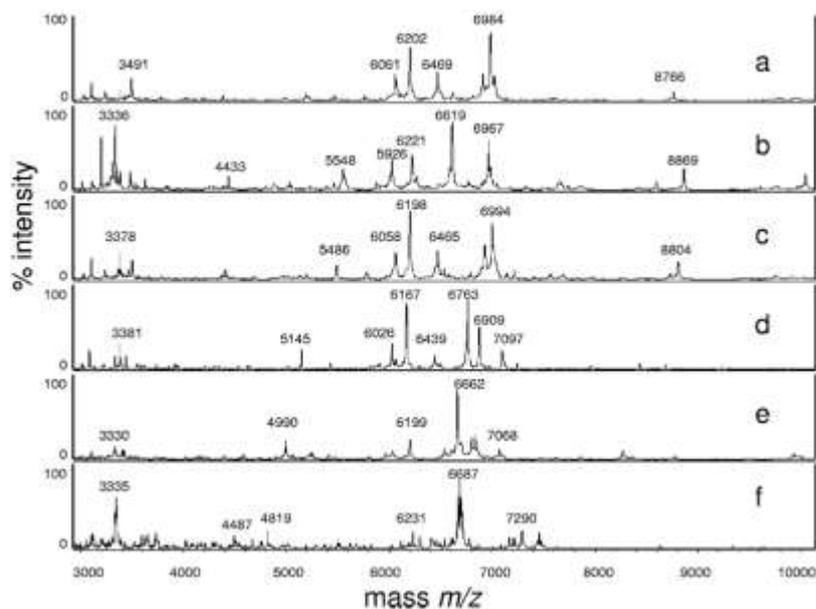


Figure 16 : Exemples de spectres obtenus pour six espèces de levures : (a) *C. albicans*, (b) *C. glabrata*, (c) *C. tropicalis*, (d) *C. krusei*, (e) *C. parapsilosis* et (f) *Cryptococcus neoformans* (MARKLEIN *et al.* 2009).

2) Intérêts du MALDI-TOF pour l'identification des levures

Un des avantages majeurs du MALDI-TOF réside dans la rapidité d'analyse. L'identification repose le plus souvent sur l'analyse d'une colonie obtenue à partir d'une culture et le résultat peut être connu en quelques minutes, donc beaucoup plus rapidement que par les techniques traditionnelles qui peuvent nécessiter 48 heures d'incubation pour les galeries d'identification. De plus, le temps technique est plus court que celui nécessaire pour l'identification par les méthodes de biologie moléculaire. Dans une étude récente, il a été évalué à 5 minutes, en incluant l'étape préalable de préparation de l'échantillon (DHIMAN *et al.* 2011).

Dans cette même étude, le coût par identification, estimé à environ 0,5 \$ (environ 0,3 €), est également largement inférieur à celui des outils traditionnels, de l'ordre de 5 à 7 €. Une limite de la spectrométrie de masse en termes de coût reste l'achat du matériel et du logiciel d'analyse avec la base de données, de l'ordre 200.000€. Deux sociétés proposent actuellement cette technologie sur le marché français : Bruker® et Shimadzu®. Les principales bases de données disponibles sont celles proposées par les sociétés Becton Dickinson et bioMérieux.

Plusieurs études récentes (DHIMAN *et al.* 2011; MARKLEIN *et al.* 2009) qui comparent l'identification par galerie ID32C®, biologie moléculaire et MALDI-TOF montrent que cette dernière méthode identifie correctement les levures du genre *Candida* tant que le spectre de l'espèce à identifier est dans la banque de données. Une des limites de cette technique est donc une fois de plus l'exhaustivité de la banque de données. Une mise à jour régulière de ces

bases de données, tout comme la possibilité d'ajouter soi-même des spectres de référence à partir d'espèces bien caractérisées permettra d'accroître encore plus l'intérêt de ces méthodes pour l'identification en mycologie.

L'identification par spectrométrie de masse offre donc des perspectives séduisantes pour l'identification à partir des cultures mycologiques. Toutefois, cette stratégie implique l'obtention de la souche en culture et donc nécessairement un retard de prise en charge du au délai de culture. Ces 24 ou 48 heures supplémentaires nécessaires à l'identification, donc à une éventuelle adaptation du traitement antifongique, peuvent être dommageables dans les candidémies où la rapidité de l'institution d'un traitement efficace constitue un facteur pronostic important (MORRELL *et al.* 2005).

Partant de ce principe, plusieurs études ont été publiées sur la faisabilité d'une identification par spectrométrie de masse directement à partir des flacons d'hémocultures. Une des réserves qui peuvent être émises est que dans la plupart de ces travaux, ils s'agissait non pas de prélèvements issus de patients mais d'hémocultures positives obtenues en inoculant le flacon avec des suspensions de levure, et ne correspondant donc pas à des conditions « réelles » (FERRONI *et al.* 2010; MARINACH-PATRICE *et al.* 2010). Dans ces conditions, l'identification pour les levures donne de bons résultats, avec une durée d'analyse réduite, de l'ordre de 20 minutes (FERRONI *et al.* 2010). Une autre étude montre également une identification correcte de six espèces fréquentes de *Candida* : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* et *C. tropicalis* (MARINACH-PATRICE *et al.* 2010). Cette démarche reste encore à évaluer en pratique de routine.

La biologie moléculaire et plus récemment la spectrométrie de masse MALDI-TOF permettent aujourd'hui d'obtenir une identification mycologique fiable avec des possibilités de rendu de résultats plus rapides, offrant des perspectives intéressantes pour les laboratoires de mycologie.

E - Etude de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques

Outre son rôle dans l'identification des levures isolées des patients, le laboratoire de mycologie est également amené à déterminer la sensibilité *in vitro* des levures aux antifongiques afin d'une part, de guider la prise en charge thérapeutique et d'autre part, de surveiller l'émergence de résistance. L'étude de cette sensibilité n'est pas systématique, mais elle est généralement réalisée pour les levures isolées des prélèvements profonds. Elle a également un intérêt en cas d'échec thérapeutique ou chez un patient soumis à une pression de sélection par un traitement antifongique au long cours.

1) Méthodes utilisées pour la détermination de la sensibilité aux antifongiques

Les facteurs techniques (pH, composition du milieu de culture, inoculum notamment) influencent les résultats *in vitro* de la sensibilité d'une levure à un antifongique. La standardisation des techniques et l'élaboration de méthodes de référence ont été permises grâce à des comités d'experts. Il existe deux comités, l'un américain, le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), l'autre européen, l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Ces deux institutions proposent des méthodes par dilution en milieu liquide qui servent de référence pour les autres tests.

a) Les techniques de référence

Les deux techniques de référence, américaine et européenne, reposent sur le même principe. Ce sont notamment des méthodes par microdilution en milieu liquide : une suspension de levure, calibrée, est ensemencée dans plusieurs puits avec une concentration croissante d'antifongique à tester. L'intensité de la croissance fongique dans les puits permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice, par comparaison avec la cupule témoin, sans antifongique.

Les techniques du CLSI et de l'EUCAST utilisent le même milieu de base (un milieu RPMI 1640) et la température d'incubation est également identique (35 à 37°C). Malgré quelques différences dans leur procédure comme l'inoculum de départ qui est 100 fois plus important pour l'EUCAST que pour le CLSI (cf. Tableau 12, page 44), les deux méthodes de référence sont bien corrélées entre elles, en particulier pour les azolés (PFALLER *et al.* 2010b; PFALLER *et al.* 2011d).

Tableau 12 : Différences techniques entre le CLSI et l'EUCAST (PFALLER *et al.* 2011d) pour la détermination de la sensibilité des levures aux antifongiques par microdilution en milieu liquide

	CLSI M27-A3	EUCAST
Densité de l'inoculum	0,5 x 10 ³ à 2,5 x 10 ³ CFU/ml	0,5 x 10 ⁵ à 2,5 x 10 ⁵ CFU/ml
Teneur en glucose du milieu	0.2%	2.0%
Durée d'incubation	48 heures	24 heures
Fonds des puits de dilution	rond	plat
Lecture du résultat	Visuelle (24 et/ou 48h)	Spectrophotométrique (24h)

Les modalités de lecture de la CMI dépendent de l'antifongique étudié. Ainsi, pour l'amphotéricine B (antifongique fongicide sur les levures), la CMI correspond au premier puits avec une absence de pousse soit 100% d'inhibition pour le CLSI. Avec l'EUCAST, la CMI est lue à 90% d'inhibition.

Pour les azolés (fongistatiques sur les levures), les échinocandines et la 5-FC, la CMI correspond au puits où la pousse est inhibée de 50% par rapport au puits contrôle sans antifongique (CANTON *et al.* 2009).

Dans la pratique d'un laboratoire de mycologie de diagnostic de routine, ces deux techniques de référence sont difficiles à mettre en place du fait du temps technique et du matériel nécessaires, notamment la nécessité de disposer de l'antifongique en poudre. D'autres techniques plus applicables en routine, détaillées ci-dessous, ont donc été développées.

b) La technique E-test[®] (AB bioMérieux)

♦ Principe

Le principe de cette technique par diffusion en gélose repose sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini d'antifongiques.

En pratique, un milieu (RPMI le plus souvent) est ensemencé avec un inoculum standardisé de la levure à étudier puis la bandelette est ensuite déposée sur le milieu. L'antifongique diffuse dans la gélose dès son contact avec celle-ci selon un gradient de concentration. Après 24 à 48 heures d'incubation, la lecture de la CMI se fait à l'intersection entre la bandelette graduée et l'ellipse de la zone d'inhibition résultant de la croissance fongique.

♦ ***Lecture des CMI et difficultés : l'effet de traîne***

La lecture des CMI par cette méthode est plus ou moins aisée. Des exemples de lecture de CMI par technique Etest[®] sont présentés dans la Figure 17, page 46.

Pour l'amphotéricine B, antifongique fongicide, la lecture présente généralement peu de difficulté et s'effectue à 100% d'inhibition.

Comme avec les techniques de référence en microdilution, la lecture de la CMI pour les autres antifongiques ne se fait pas à 100%, mais à 90% pour la 5-FC et à 80% pour les azolés et les échinocandines.

Dans certaines circonstances, on peut donc voir une pousse réduite mais persistante à des concentrations élevées d'antifongiques sous forme de colonies de plus petite taille, qu'il ne faut pas prendre en compte. Pour les azolés, ce phénomène, est appelé effet de traîne et peut amener à surestimer la valeur de la CMI (ARIKAN 2007). Par contre, les colonies de taille identique dans la zone d'inhibition, même en faible nombre, ne doivent pas être ignorées.

Par ailleurs, à hautes concentrations d'échinocandines, à des taux très supérieurs aux CMI de la levure étudiée, on peut observer une croissance fongique. Ce phénomène, appelé « croissance paradoxale » ou « Eagle effect », pourrait être secondaire à des modifications *in vitro* de la composition de la paroi de la levure, avec une diminution de $\beta(1-3)$ glucane et une augmentation de la chitine. La signification clinique de cet effet paradoxal reste à déterminer (ARIKAN 2007; POUND *et al.* 2010).

♦ ***Corrélation avec les techniques de références***

Si le coût des bandelettes reste assez élevé, la technique Etest[®] est plus simple d'utilisation que les méthodes de microdilution en milieu liquide proposée par le CLSI et l'EUCAST. Une bonne corrélation avec ces techniques de référence a été montrée pour les différents antifongiques, dont les azolés (DIEKEMA *et al.* 2007; PFALLER *et al.* 1998b) et les échinocandines (PFALLER *et al.* 2010b).

Concernant l'amphotéricine B, la technique Etest[®] pourrait même être meilleure que les techniques de référence pour détecter la résistance à cet antifongique, mais la corrélation *in vitro* – *in vivo* pour l'amphotéricine B est difficile quelle que soit la technique utilisée (cf. *infra*) (ARIKAN 2007; PFALLER *et al.* 1998a; WANGER *et al.* 1995).

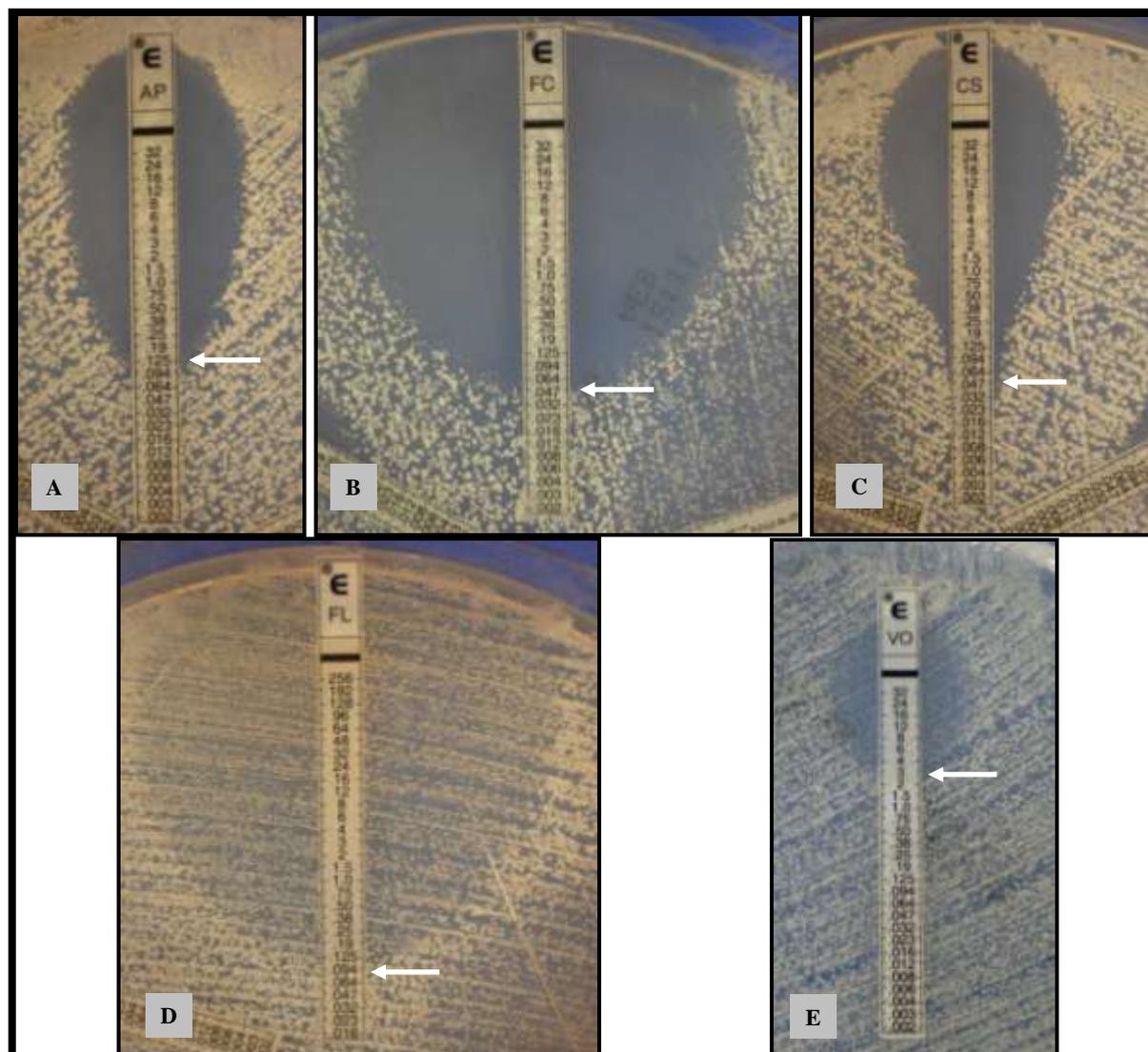


Figure 17 : Exemples d'aspects des ellipses d'inhibition par la technique Etest® (collection personnelle)

- A : Amphotéricine B (AP), lecture à 100% d'inhibition, ici CMI=0.125 µg/ml
- B : 5-fluorocytosine (FC), lecture à 90% d'inhibition, ici CMI=0.047 µg/ml
- C : Caspofungine (CS), lecture à 80% d'inhibition, ici CMI=0.047 µg/ml
- D : Fluconazole (FL), lecture à 80% d'inhibition, ici CMI=0.094 µg/ml (ignorer l'effet de traîne)
- E : Voriconazole (VO), lecture à 80% d'inhibition, ici CMI=3 µg/ml (ignorer l'effet de traîne)

c) Autres méthodes

Il existe d'autres méthodes reposant également sur le principe de dilution en milieu liquide disponibles dans le commerce dont le système ATB Fungus 2[®] (bioMérieux). Ces galeries sont simples d'utilisation, rapides et automatisables et présentent une corrélation satisfaisante avec les techniques de référence (TORRES-RODRIGUEZ and ALVARADO-RAMIREZ 2007). Cependant, des erreurs peuvent se produire avec ces tests du fait d'une mauvaise standardisation de l'inoculum ou d'une homogénéisation imparfaite des milieux.

Un antifongigramme entièrement automatisé (carte Vitek AST-YS[®]) est également disponible sur l'automate Vitek[®] de bioMérieux et permet de tester le fluconazole, le voriconazole, l'amphotéricine B et la 5-fluorocytosine. La corrélation avec les méthodes de référence reste encore à déterminer. Les quelques études récentes montrent une bonne corrélation globale mais avec des exceptions comme pour *C. krusei*, *C. glabrata* et pour *C. parapsilosis* (BORGHI *et al.* 2010; BOURGEOIS *et al.* 2010; PETERSON *et al.* 2011).

2) Interprétation de l'antifongigramme

a) Seuils de sensibilité

Les valeurs critiques des CMI (pour séparer les levures sensibles à un antifongique des levures résistantes) n'ont pas été définies pour tous les antifongiques par les comités de références (CLSI et EUCAST). Ainsi, il n'y a pas de seuil officiellement reconnu pour l'amphotéricine B.

L'EUCAST propose des seuils cliniques de sensibilité uniquement pour le fluconazole et le voriconazole, pour trois espèces : *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Pour le fluconazole, ces espèces sont sensibles si la CMI est inférieure à 2 µg/ml et résistantes si la CMI est supérieure à 4 µg/ml. Pour le voriconazole, le seuil de 0.125 µg/ml permet de séparer les souches sensibles des souches résistantes.

Le CLSI propose des seuils cliniques de sensibilité pour le fluconazole, le voriconazole, l'itraconazole et la 5-fluorocytosine (cf. Tableau 13, page 48).

Tableau 13 : Seuils de sensibilité et de résistance déterminés par le CLSI (M27-A3) pour les *Candida* (ARIKAN 2007).

Antifongiques	CMI (en µg/ml)		
	Sensible	Sensibilité dose-dépendante	Résistant
Fluconazole	≤ 8	16-32	≥ 64
Itraconazole	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1
Voriconazole	≤ 1	2	≥ 4
5-fluorocytosine	≤ 4	8-16	≥ 32

Remarques :

1. *Candida krusei* étant intrinsèquement résistant au fluconazole, les seuils pour cet antifongique ne doivent pas lui être appliqués.
2. Sensibilité dose-dépendante : pour cette zone de CMI, des concentrations sanguines supérieures d'antifongique sont nécessaires pour traiter efficacement l'infection.

Pour les azolés, il a récemment été proposé des seuils de sensibilité adaptés en fonction de l'espèce, pour les espèces les plus fréquentes, dans la mesure où la sensibilité naturelle varie en fonction de l'espèce (cf. Tableau 14). On peut remarquer que pour le fluconazole, *C. glabrata* n'est jamais considéré comme sensible, mais de sensibilité dose-dépendante pour des CMI basses.

Tableau 14 : Seuils critiques pour le fluconazole et le voriconazole adaptés à l'espèce (PFALLER *et al.* 2011a; PFALLER *et al.* 2010a)

	Fluconazole			Voriconazole		
	CMI (en µg/ml) définissant les souches comme :			CMI (en µg/ml) définissant les souches comme :		
	S	SDD	R	S	SDD	R
<i>C. albicans</i>	≤ 2	4	≥ 8	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1
<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	≥ 8	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1
<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	4	≥ 8	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1
<i>C. krusei</i>	Espèce intrinsèquement résistante			≤ 0.5	1	≥ 2
<i>C. glabrata</i>		≤ 32	≥ 64	Pas de corrélation entre les CMI et l'efficacité clinique. Une CMI ≤ 0.5 distingue uniquement les souches sauvages des souches non-sauvages (mécanisme de résistance acquis).		
	S : sensible	SDD : sensibilité dose-dépendante		R : résistante		

Pour les échinocandines, le CLSI (M27-A3) avait initialement retenu un seuil de sensibilité de 2 µg/ml (au delà de 2 µg/ml, les isolats étaient considérés comme non-sensibles) pour l'ensemble des espèces de *Candida* (PFALLER *et al.* 2008b). Mais il a été démontré ultérieurement que certains isolats ayant acquis un mécanisme de résistance pouvaient présenter une CMI inférieure à ce seuil. Ce seuil a donc été très récemment réévalué et doit désormais tenir compte de l'espèce considérée et, comme pour les autres antifongiques, une valeur seuil de sensibilité et de résistance a été proposée (PFALLER *et al.* 2011c). Le seuil de résistance, est ainsi plus élevé pour *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* que pour les autres

espèces de *Candida* (cf. Tableau 15), ces deux espèces présentant naturellement une sensibilité diminuée à cette famille d'antifongiques.

Tableau 15 : Seuils de sensibilité (S) et de résistance (R) pour les échinocandines en fonction de l'espèce de *Candida* (PFALLER *et al.* 2011c).

Espèces	Seuils (en µg/ml)					
	Caspofungine		Anidulafungine		Micafungine	
	S	R	S	R	S	R
<i>C. albicans</i>	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1
<i>C. glabrata</i>	≤0.12	≥0.5	≤0.12	≥0.5	≤0.06	≥0.25
<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1
<i>C. krusei</i>	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1
<i>C. parapsilosis</i>	≤2	≥8	≤2	≥8	≤2	≥8
<i>C. guilliermondii</i>	≤2	≥8	≤2	≥8	≤2	≥8

b) Difficultés de corrélation entre les données *in vitro* et *in vivo*

L'objectif de la détermination des CMI *in vitro* est de prédire la réussite ou l'échec d'une thérapeutique antifongique chez un patient infecté. Les données permettant de corréler les résultats des CMI avec l'issue clinique d'un patient ne sont pas toujours disponibles.

Ainsi, le seuil de 2 µg/ml pour les échinocandines n'étaient pas parfaitement discriminant pour séparer les souches ayant acquis un mécanisme de résistance des autres souches. La corrélation *in vitro* – *in vivo* des seuils adaptés à l'espèce reste à déterminer.

Un autre exemple concerne l'amphotéricine B, pour laquelle établir une corrélation entre un échec thérapeutique et une résistance *in vitro* reste difficile, ce qui explique l'absence de seuil défini par le CLSI ou l'EUCAST (PARK *et al.* 2006).

Pour les azolés, une méta-analyse a démontré une bonne corrélation *in vitro* - *in vivo*, avec en moyenne une réussite thérapeutique dans 91% des patients infectés avec une souche sensible *in vitro*, alors que ce taux chute à 48% pour les patients infectés avec des souches résistantes (REX and PFALLER 2002).

La technique Etest[®] est bien corrélée avec les techniques de référence proposées par le CLSI et l'EUCAST. Mais il faut rester critique dans l'interprétation de la sensibilité d'un antifongique, déterminée *in vitro*, et son activité réelle *in vivo*.

III. Les *Candida* en milieu hospitalier : aspects cliniques et épidémiologiques

Avant d'aborder l'épidémiologie des candidoses, sujet de l'étude EPICANDI et de ce manuscrit, les principales manifestations cliniques et leur impact médico-économique sont présentés.

A - Les candidoses : aspects cliniques et impact en santé publique

Les infections à *Candida* peuvent être schématiquement séparées en deux groupes, de pronostic très différent. D'un côté, les infections superficielles n'engageant pas directement le pronostic vital pour la plupart des formes cliniques et de l'autre, les infections profondes, qui présentent une morbi-mortalité élevée et surviennent sur des terrains particuliers.

1) Les candidoses superficielles

Les candidoses superficielles correspondent aux infections de la peau, des phanères et des muqueuses. Il n'y a pas d'atteintes des organes profonds et de façon générale, le pronostic en termes de morbi-mortalité est sans commune mesure avec celui des infections profondes.

a) Les candidoses cutanées et unguéales

Les *Candida* spp. sont responsables d'intertrigo des grands et petits plis, d'onyxis et de périonyxis, le plus souvent au niveau des mains. Les facteurs favorisants sont nombreux mais essentiellement locaux : transpiration, macération, humidité... (CHABASSE *et al.* 2006).

A côté de ces formes classiques, il existe des formes d'atteintes cutanées plus graves touchant des terrains spécifiques : la candidose cutanéomuqueuse chronique est secondaire à un déficit constitutionnel sélectif de l'immunité cellulaire (GLOCKER and GRIMBACHER 2010), les nouveau-nés en particulier prématurés peuvent présenter une candidose cutanée néonatale suite à une candidose vaginale maternelle méconnue (FLORENS *et al.* 2010).

b) Les candidoses des muqueuses

♦ *Muqueuses digestives*

L'atteinte peut survenir aux différents étages du tractus digestif. Elle traduit le plus souvent le passage de l'état commensal à l'état pathogène d'une levure déjà présente au niveau digestif à l'occasion de facteurs favorisants.

Les candidoses buccales sont les premières formes cliniques d'infections candidosiques décrites par Hippocrate. L'atteinte peut être aiguë, comme le muguet buccal, ou chronique.

Candida albicans et *C. glabrata* sont les espèces les plus fréquemment responsables (CHABASSE *et al.* 2006). C'est à partir de souches isolées de candidose buccale chez les patients VIH+ que *C. dubliniensis* a été décrit (SULLIVAN *et al.* 1995).

La candidose œsophagienne atteint les patients souffrant de pathologie chronique, en particulier les patients infectés par le VIH à un stade avancé (lymphocytes CD4 inférieur à 100/mm³). En dehors de ces deux formes les plus caractéristiques, on peut également voir des candidoses gastriques, intestinales ou anales (CHABASSE *et al.* 2006).

♦ **Muqueuses génito-urinaires**

La vulvo-vaginite à *Candida* est une affection très fréquente chez la femme en âge de procréer. L'espèce la plus fréquente est là encore *C. albicans* mais *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* peuvent également être en cause. Chez l'homme, les balanites ou les urétrites à *Candida* sont plus rares (ACHKAR and FRIES 2010).

Les levures du genre *Candida* sont isolées dans 1 à 5 % des examens cyto bactériologiques des urines (ECBU) en consultation non hospitalière et dans 10 à 29% des ECBU dans un contexte nosocomial, notamment chez les porteurs de sondes urinaires (ETIENNE and CARON 2007; RONALD 2002). Une candidurie peut ne correspondre qu'à une infection locale, résultant d'une colonisation ascendante à partir d'un portage cutané-muqueux ou digestif. Mais chez les patients immunodéprimés comme les sujets neutropéniques et les enfants à bas poids de naissance en néonatalogie, une candidurie peut être la première manifestation d'une candidose disséminée. D'autre part, une candidurie peut être le point de départ d'une candidémie en cas de geste urologique dans les jours suivants l'isolement de la levure (ETIENNE and CARON 2007).

2) Les candidoses profondes et systémiques

Les candidoses invasives regroupent des formes cliniques variées. Toutes les infections à *Candida* autres que les infections cutané-muqueuses sont considérées comme des infections invasives. Cela inclut les candidémies qui sont les formes les plus fréquentes, les candidoses disséminées aiguës qui sont secondaires à l'épisode de candidémie et qui concernent le plus souvent l'œil, la peau, l'endocarde, le SNC mais aussi potentiellement tous les organes, et les candidoses disséminées chroniques (candidose hépato-splénique), formes plus rares.

Il n'y a pas de signes cliniques spécifiques de candidémie. En l'absence de signe de localisation secondaire, la présentation habituelle est donc relativement peu spécifique et repose sur la présence d'une fièvre persistante sous antibiothérapie à large spectre bien

conduite, avec un état général dégradé chez un patient à risque. Une seule hémoculture positive à une levure du genre *Candida* suffit à poser le diagnostic et initier la prise en charge.

a) Portes d'entrée des candidoses invasives

Schématiquement, on distingue deux modes d'entrée principaux de la levure : la voie endogène, à partir d'un foyer digestif, et la voie exogène, à partir d'un cathéter intra-vasculaire le plus souvent.

La majorité des infections disséminées à *Candida* a pour point de départ le tractus gastro-intestinal. Cela implique qu'il y ait une colonisation préalable des muqueuses par la levure et montre l'intérêt de ne pas méconnaître une colonisation digestive à *Candida* spp. chez un patient à risque. Le passage sanguin est favorisé notamment par une chirurgie digestive ou des lésions muqueuses secondaires aux chimiothérapies. Des études ont prouvées par typage en biologie moléculaire que, pour les mêmes patients, les isolats isolés d'hémoculture avaient un profil identique à ceux isolés antérieurement des muqueuses digestives (REAGAN *et al.* 1990; VOSS *et al.* 1994).

La porte d'entrée d'une candidémie peut parfois être cutanée, en particulier via un cathéter intra-vasculaire central. Il peut alors s'agir plus rarement d'infections croisées entre patients, attribuables au portage cutané du personnel soignant, mais également de contaminations de produits intraveineux, comme la nutrition parentérale (CALDERONE 2002).

b) Les terrains à risque de candidoses invasives

Les candidoses invasives surviennent chez des terrains particuliers, en général dans un contexte nosocomial. Les facteurs de risque sont ceux qui entraînent une immunodépression chez le patient, tel qu'une neutropénie profonde, ou ceux favorisant les portes d'entrée de la levure, comme une antibiothérapie prolongée, qui déséquilibre la flore digestive, ou un cathéter vasculaire central (PAPPAS 2006). Certains patients, par leur pathologie sous-jacente ou le type de prise en charge, cumulent les facteurs favorisant et sont donc particulièrement à risque de candidoses invasives.

♦ Les patients neutropéniques

L'importance de la neutropénie profonde et sa durée prolongée sont des facteurs de risques majeurs de candidoses invasives. Ce risque dépend aussi du type de maladie sous-jacente et de la chimiothérapie utilisée, en fonction de la sévérité des lésions des muqueuses digestives qu'elle occasionne. Mais un des facteurs associés le plus déterminant est l'intensité de la colonisation candidosique préalable au niveau cutanéomuqueux (PRENTICE *et al.* 2000).

♦ ***Les patients hospitalisés en soins intensifs***

Dans une étude américaine, les levures du genre *Candida* représentaient de l'ordre de 10% des pathogènes isolés des hémocultures chez les patients des soins intensifs (WISPLINGHOFF *et al.* 2004).

La combinaison de la présence de cathéters intra-vasculaires, de l'usage d'antibiotiques à large spectre, d'une ventilation mécanique et d'une chirurgie abdominale font des patients hospitalisés en soins intensifs, quelqu'en soit le motif, des patients à haut risque de candidémies. Une infection invasive est alors presque toujours précédée d'une colonisation (PITTET *et al.* 1994).

♦ ***Les receveurs d'organes solides***

Ces patients associent des procédures chirurgicales particulières et une immunosuppression lourde et prolongée. Contrairement aux autres infections fongiques, telles que l'aspergillose invasive, les candidoses invasives surviennent précocement, en général dans le premier mois après la chirurgie (PAPPAS *et al.* 2010). Certaines infections peuvent avoir pour origine le greffon, via la colonisation des voies aériennes des transplants pulmonaires ou du segment duodéal dans les transplants pancréatiques.

Le risque de candidose invasive dépend également du type de transplantation. Les transplantations rénales sont ainsi à plus faible risque alors qu'elles surviennent chez 5 à 42 % des patients transplantés hépatiques, avec une mortalité de 25 à 71% (GROSSI 2009).

♦ ***Autres terrains à risque***

Les grands brûlés et les enfants à petit poids de naissance présentent des dysfonctions de leurs polynucléaires et sont également à risque de candidémies. Chez les prématurés, un âge gestationnel inférieur à 32 semaines est un facteur de risque important (CALDERONE 2002).

Les usagers de drogues intraveineuses sont également à risque de candidoses invasives suite à l'injection de drogues souillées par des levures du genre *Candida*. Ces patients présentent une fièvre associée à une éruption cutanée caractéristique, avec des papules au niveau du cuir chevelu ou de la barbe. Sur ce terrain, les atteintes oculaires ou une endocardite du cœur droit sont caractéristiques (CONNELL *et al.* 2010; ELLIS *et al.* 2001).

Les patients neutropéniques, hospitalisés en soins intensifs ou transplantés d'organes solides sont particulièrement à risque de développer une candidémie ou une autre forme de candidoses invasives.

c) Impact médico-économique des candidoses invasives

♦ *Une incidence en augmentation*

L'incidence des candidoses invasives a augmenté significativement depuis plusieurs dizaines d'années. L'augmentation a surtout eu lieu entre les années 1970 et 1990 (LASS-FLORL 2009). Cette évolution de l'incidence est largement attribuée à l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés ou pris en charge en unités de soins intensifs (CALDERONE 2002).

Ainsi, chez les patients hospitalisés aux Etats-Unis, le nombre de candidémies a augmenté de plus de 200% entre 1979 et 2000 (MARTIN *et al.* 2003). *Candida* spp. y est à présent le 4^{ème} germe isolé des hémocultures par ordre de fréquence après les staphylocoques à coagulase négative, *Staphylococcus aureus* et les entérocoques, correspondant à environ 10% des souches responsables de septicémies (WISPLINGHOFF *et al.* 2004). Depuis les années 1990 et la mise en place des stratégies de prévention antifongique, cette augmentation s'est ralentie mais les études récentes montrent que l'incidence des candidémies continue d'augmenter (LASS-FLORL 2009; PFALLER and DIEKEMA 2007).

Cette évolution s'observe également en Europe, bien que l'incidence y soit plus faible qu'outre-Atlantique : elle est de 1.9 à 4.9 cas pour 100 000 personnes par an en Europe contre de l'ordre de 8 cas pour 100 000 par an aux Etats-Unis (PFALLER and DIEKEMA 2007). Il existe des disparités importantes entre les différents pays européens, avec par exemple une incidence de 1.9 pour 100 000 personnes en Finlande contre 11 pour 100 000 au Danemark (LASS-FLORL 2009).

Cette disparité géographique est probablement multifactorielle : des variations dans la démographie des patients, avec des comorbidités ou des pathologies sous-jacentes différentes, ou dans les pratiques médicales avec des choix distincts de stratégies antibiotiques ou antifongiques et d'usage de cathéters intra-vasculaires (LASS-FLORL 2009; PFALLER and DIEKEMA 2007). Cela est notamment visible par les différences d'incidence selon le type d'hôpital : l'incidence augmente avec le nombre de lit de l'hôpital, les plus grands hôpitaux ayant en général plus de services avec des patients à haut risque de candidoses invasives (TORTORANO *et al.* 2006).

◆ *Une mortalité élevée*

Parmi l'ensemble des septicémies, les candidémies sont associées à la plus haute mortalité, de l'ordre de 50% (WISPLINGHOFF *et al.* 2004). La mortalité directement attribuable à la candidémie varie de 5 à 71% selon les études (FALAGAS *et al.* 2006). En Europe, elle est de l'ordre de 28 à 59% (LASS-FLORL 2009).

Depuis le milieu des années 1990, le taux de mortalité a tendance à diminuer notamment grâce à l'amélioration de la prise en charge. Un délai long entre le diagnostic et l'administration d'un antifongique ou un traitement antifongique inadapté augmentent d'ailleurs la mortalité (PFALLER and DIEKEMA 2007).

La mortalité varie significativement en fonction de l'espèce en cause : dans une étude récente, *C. parapsilosis* est lié à un meilleur pronostic, alors que *C. krusei* a le taux de mortalité le plus élevé (cf. Figure 18) (HORN *et al.* 2009).

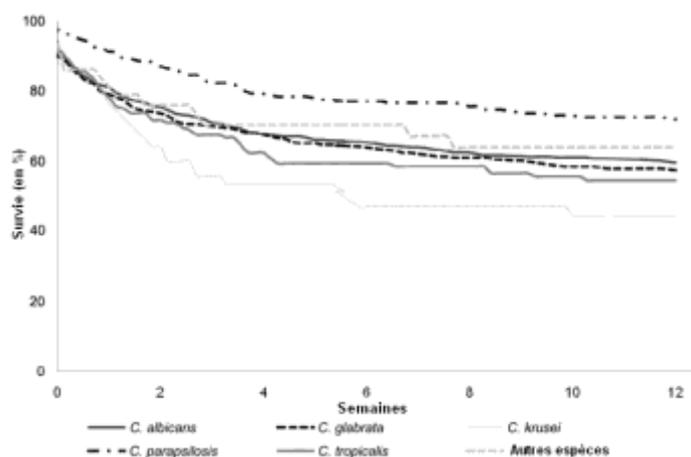


Figure 18 : Courbes de survie des patients dans les 12 semaines suivant le diagnostic de candidémie, en fonction de l'espèce en cause (HORN *et al.* 2009).

◆ *Un coût de prise en charge important*

Les études de coût et d'impact économique sont essentiellement américaines. Les principales données montrent que la survenue d'une candidémie allonge significativement la durée d'hospitalisation des patients de 10 à 30 jours (PFALLER and DIEKEMA 2007). D'autre part, la survenue d'un épisode de candidémie retarde souvent la prise en charge de la maladie sous-jacente.

Cet allongement de la durée d'hospitalisation est la cause principale du surcoût des candidémies, suivi par le prix élevé des traitements antifongiques, des moyens diagnostiques et de la prise en charge des effets secondaires des traitements. Aux Etats-Unis, le surcoût attribuable à un épisode de candidémie est estimé entre 6 000 \$ et 44 000 \$ pour les adultes et à plus de 90 000 \$ dans un cadre pédiatrique (ZAOUTIS *et al.* 2005).

Une incidence en augmentation avec une mortalité qui reste élevée et un coût important de prise en charge justifient les stratégies de prévention largement mises en place chez les patients à risque et le suivi de l'épidémiologie des *Candida*, avec l'inquiétude de voir émerger des résistances.

B - Epidémiologie des *Candida* spp. : données actuelles

Les principales données épidémiologiques proviennent d'études réalisées outre-Atlantique. Avant le milieu des années 1990, il existait très peu de publications portant sur l'épidémiologie des candidémies en Europe. Depuis, plusieurs études ont été publiées, notamment dans le cadre l'« European Confederation of Medical Mycology » (ECMM) (TORTORANO *et al.* 2006). Le nombre de souches étudiées y est cependant généralement plus modeste.

Comme pour les études américaines, les études épidémiologiques européennes portent essentiellement sur les candidémies. Quelques études s'intéressent à l'ensemble des prélèvements ou à une localisation particulière, comme la colonisation buccale (COMERT *et al.* 2007; SCHELENZ *et al.* 2011). Ces études ont pour intérêt de connaître l'écologie locale des *Candida* dans laquelle évoluent les patients à risques.

Par ailleurs, dans la majorité des études épidémiologiques, l'identification des levures est réalisée en utilisant des méthodes phénotypiques, qui sont globalement fiables mais présentent des limites en particulier pour les espèces les moins fréquentes. Les données épidémiologiques les concernant peuvent donc être dans une certaine mesure imprécises.

L'espèce la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine est *C. albicans* suivi par *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei* (PFALLER and DIEKEMA 2007). Il s'agit là de leur ordre global de fréquence mais, comme nous le verrons ci-dessous, il existe des variations géographiques parfois significatives rendant nécessaire la connaissance de l'épidémiologie locale.

1) Distribution des espèces

a) *Candida albicans*

Dans les différents réseaux de surveillance épidémiologique à travers le monde, la principale tendance est à la diminution de la prévalence de *C. albicans* par rapport aux autres espèces, tout en restant encore majoritaire, de l'ordre de 50 à 70% des isolats cliniques (ARENDRUP 2010; PFALLER and DIEKEMA 2007). Dans certaines études, *C. albicans* représente même moins de 50% des isolats, l'ensemble des *Candida non-albicans*, dont certaines espèces présentent une sensibilité moindre au fluconazole, devenant alors majoritaire (HORN *et al.* 2009). Cette inversion progressive de l'épidémiologie devra être prise en considération dans l'avenir pour la prise en charge thérapeutique et les stratégies de prévention.

b) Les espèces non-*albicans* : une disparité géographique

Dans la plupart des pays, la prévalence des *Candida non-albicans* a donc augmenté, notamment pour *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* (ARENDRUP 2010).

Cependant, comme nous allons le voir, il existe des grandes disparités géographiques à l'échelle mondiale mais également locale. Une revue récente reprenant les résultats de réseaux de surveillance des candidoses invasives de plusieurs régions à travers le monde le met clairement en évidence (PFALLER and DIEKEMA 2007).

Ainsi, dans cette étude, il est constaté une nette augmentation de la prévalence de *C. glabrata* aux Etats-Unis, 2^{ème} espèce isolée en fréquence après *C. albicans*, qui représente 20 à 24% des espèces isolées. Dans les autres régions, sa prévalence semble moins importante, de l'ordre de 7 à 10%, et ne présente pas d'augmentation significative.

Cette disparité s'observe également pour *C. tropicalis* : aux Etats-Unis, c'est la 4^{ème} espèce isolée par ordre de fréquence, avec une prévalence de l'ordre de 7%, plutôt en diminution, alors qu'en Asie du Sud-est et en Amérique Latine, sa prévalence augmente et *C. tropicalis* est la seconde espèce isolée en terme de fréquence, devant *C. glabrata*.

Concernant *C. parapsilosis*, sa prévalence augmente globalement, mais de façon plus importante en Amérique Latine. Dans cette étude, la prévalence de *C. krusei* est stable et plus faible, de l'ordre de 2 à 4% des candidémies.

Les cartes présentées dans la Figure 19 reprennent la proportion de *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* par rapport à l'ensemble des espèces isolées dans différentes études réalisées à travers le monde et portant sur les candidoses invasives (ARENDRUP 2010). On y retrouve les mêmes tendances épidémiologiques : prévalence plus importante de *C. glabrata* aux Etats-Unis, de *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* en Amérique Latine et en Asie du Sud-est.

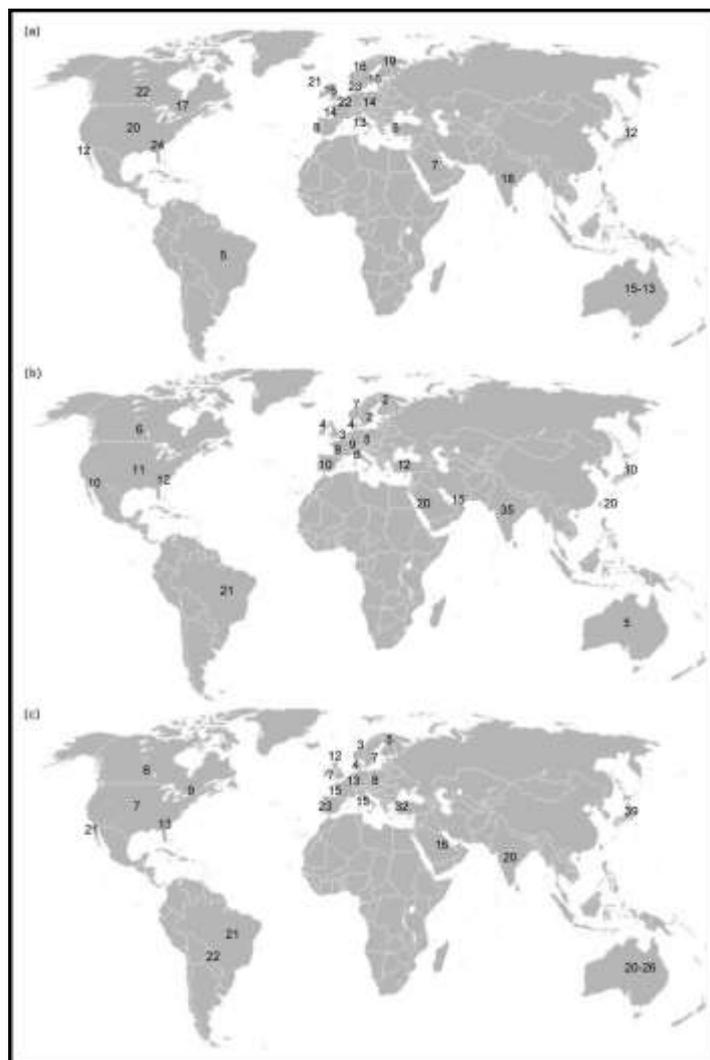


Figure 19 : Disparités géographiques dans la prévalence de *C. glabrata* (a), *C. tropicalis* (b) et *C. parapsilosis* (c) au niveau mondial dans les candidoses invasives (ARENDRUP 2010). Les chiffres correspondent aux pourcentages de chacune des espèces concernées par rapport à l'ensemble des souches isolées dans différentes études épidémiologiques.

On peut également remarquer sur ces cartes qu'il existe des disparités importantes entre les différents pays européens. Cette observation, déjà mise en évidence dans le cadre du réseau de surveillance de l'European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (cf. Figure 20, page 59) a pu être confirmée dans d'autres études plus récentes. Ainsi, il apparaît dans une étude finlandaise réalisée sur une large cohorte de patients (n=603) atteints de candidémies une

prévalence très faible de *C. tropicalis*, représentant 2 %, soit une prévalence inférieure à celle de *C. krusei* (3%) (POIKONEN *et al.* 2010). En Allemagne, cette proportion est de l'ordre de 6% et au Portugal de 13% (BORG-VON ZEPELIN *et al.* 2007; COSTA-DE-OLIVEIRA *et al.* 2008). A l'opposé, deux études successives menées en Tunisie récemment, retrouvait *C. tropicalis* comme l'espèce la plus fréquente, avec 37% des candidémies, devant *C. albicans* (MAKNI *et al.* 2009; SELLAMI *et al.* 2010).

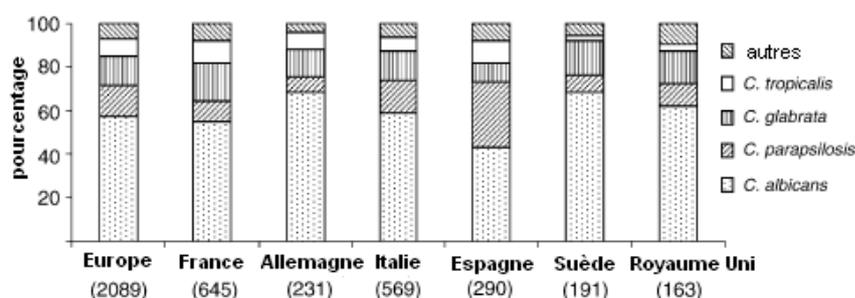


Figure 20 : Variation de la distribution des espèces responsables de candidémies entre plusieurs pays européens, d'après les données du réseau de surveillance de l'ECMM (TORTORANO *et al.* 2006).

A ce jour, peu d'études se sont focalisées sur l'épidémiologie des *Candida* spp. en France. Certaines ne concernent que l'épidémiologie d'un seul centre : par exemple Paris (HONDERLICK *et al.* 2007), Lyon (MARTIN *et al.* 2005), Nantes (THIERRY *et al.* 2011) ou Lille, où les auteurs montrent que l'incidence des candidémies semble être inversement liée à la consommation d'antifongique (SENDID *et al.* 2006a). Comme illustré sur la Figure 21, *C. albicans* reste largement majoritaire. La répartition des autres espèces est plus variable, en fonction des centres considérés.

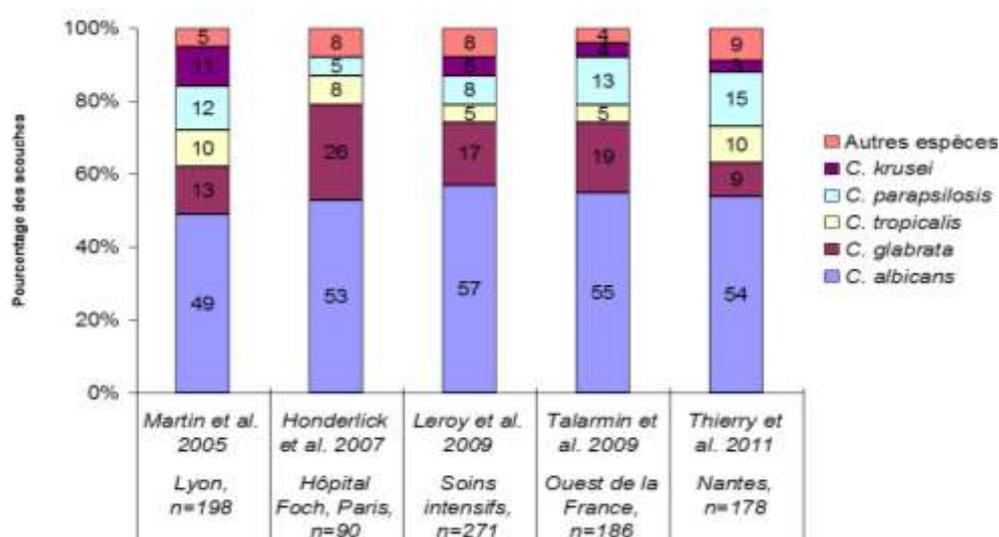


Figure 21 : Distribution des espèces de *Candida* dans les candidoses invasives dans différentes études françaises (HONDERLICK *et al.* 2007; LEROY *et al.* 2009; MARTIN *et al.* 2005; TALARMIN *et al.* 2009; THIERRY *et al.* 2011)

Cette disparité géographique s'explique probablement en partie par des pratiques médicales différentes, notamment en ce qui concerne par exemple la prophylaxie antifongique et l'usage des cathéters centraux, ou par le type de maladie sous-jacente ou l'âge des patients concernés dans les différents pays (PFALLER and DIEKEMA 2007). A titre d'exemple, en Europe, et comme illustré ci-dessous, les pratiques en matière de traitement des candidémies varient d'un pays à l'autre, avec de nettes variations dans l'antifongique utilisé en première intention selon les pays (cf. Figure 22).

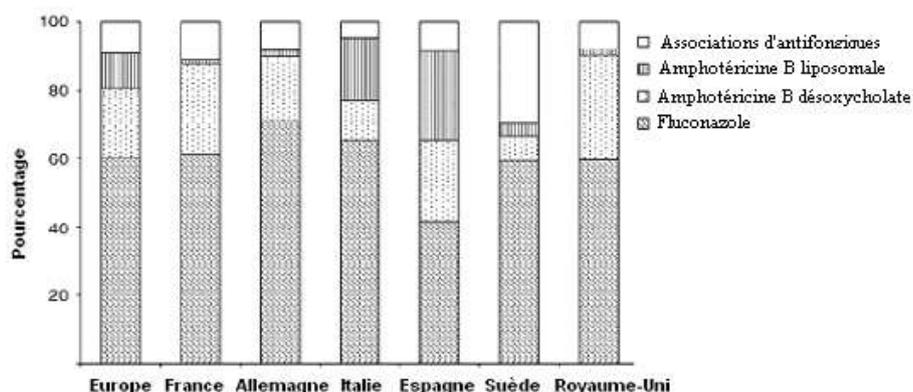


Figure 22 : Antifongiques utilisés en première intention pour le traitement des candidémies dans six pays européens. Données du réseau de surveillance de l'ECMM (TORTORANO *et al.* 2006).

L'importance épidémiologique des *Candida non-albicans* est donc en augmentation à travers le monde, avec des disparités géographiques marquées à l'échelle mondiale mais aussi locale. Si les tendances sont assez faciles à mettre en évidence pour les espèces les plus fréquentes, peu d'études permettent d'évaluer la place exacte des espèces rares et émergentes dont certaines présentent des profils de résistance aux antifongiques préoccupants.

c) Les espèces rares et émergentes

Évaluer l'évolution de la prévalence des espèces les moins fréquentes reste plus difficile car dans la plupart des études épidémiologiques les isolats rares d'une espèce sont généralement regroupés sous l'ensemble « *Candida* sp. » du fait d'un faible effectif ou ne sont pas identifiés au-delà du genre. Il faut également noter une fois de plus que l'identification repose souvent sur les techniques phénotypiques qui ne permettent pas de distinguer les espèces rares ou cryptiques (JOHNSON and ELIZABETH 2009). En dehors des cinq espèces les plus fréquentes, la proportion des autres espèces reste faible, chacune ne dépassant généralement pas 1% de l'ensemble des espèces isolées.

Cependant, dans la revue américaine précédemment citée, la prévalence de certaines de ces espèces dont *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa* et *C. famata* aurait été multipliée de 2 à 10 fois sur la période étudiée (6 ans) (PFALLER and DIEKEMA 2007).

Ainsi, si leur prévalence reste faible, la fréquence des espèces rares semble montrer une tendance à l'augmentation, notamment chez les patients présentant une pathologie hématologique maligne. Parmi ces espèces, certaines posent le problème d'une sensibilité diminuée aux antifongiques.

L'épidémiologie des *Candida* présente donc des grandes variations géographiques. La grande majorité des études est d'origine américaine, cependant l'épidémiologie européenne n'est pas exactement superposable à celle d'outre-Atlantique.

Il est pourtant recommandé de prendre en compte les données locales concernant les espèces prédominantes et leurs sensibilités dans les stratégies de traitements antifongiques (PAPPAS *et al.* 2009).

d) Facteurs influençant l'épidémiologie des *Candida* spp.

♦ *Importance du terrain : âge et pathologie sous-jacente*

A côté des disparités géographiques, l'épidémiologie varie également selon le type de population étudiée. Concernant les candidoses invasives, deux grandes tendances sont ainsi observées en fonction de l'âge des patients (cf. Figure 23, page 62) :

- une plus forte prévalence de *C. parapsilosis* chez les enfants de moins de un an et notamment les prématurés ;
- une augmentation de la prévalence de *C. glabrata* avec l'âge.

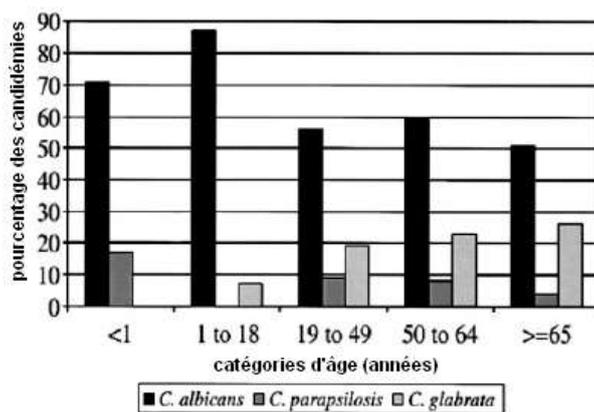


Figure 23 : Prévalences respectives de *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata* en fonction de l'âge des patients (PFALLER and DIEKEMA 2007).

La répartition des espèces isolées dans le cadre des candidoses invasives varie également selon la pathologie sous-jacente des patients, et donc leur service d'hospitalisation.

Une des principales tendances, largement décrite dans la littérature, est la plus grande prévalence des espèces non-*albicans* chez les patients avec une pathologie hématologique maligne et les greffés de moelle osseuse que chez les autres patients (cf. Figure 24). Cela est notamment bien illustré pour *C. tropicalis*, *C. krusei*, mais également des espèces moins fréquentes telles que *C. kefyr* (ANN CHAI *et al.* 2010; PFALLER and DIEKEMA 2007; SENDID *et al.* 2006b). Par exemple, dans une étude américaine dans un service d'hématologie, *C. albicans* ne représentait que près de 35% des candidémies, suivi par *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*, représentant chacune environ 20% des épisodes de candidémies (SIPSAS *et al.* 2009).

De 1997 à 2004, sur 45 épisodes de candidémies survenues dans le service d'hématologie à Nantes, 29% des levures isolées correspondaient à *C. albicans*, 27% à *C. tropicalis*, suivi par *C. krusei* (13%), *C. kefyr* (11%) et *C. glabrata* (7%). Dans cette étude, les espèces non-*albicans*, et en particulier *C. tropicalis*, dominaient donc nettement (VIGOUROUX *et al.* 2006).

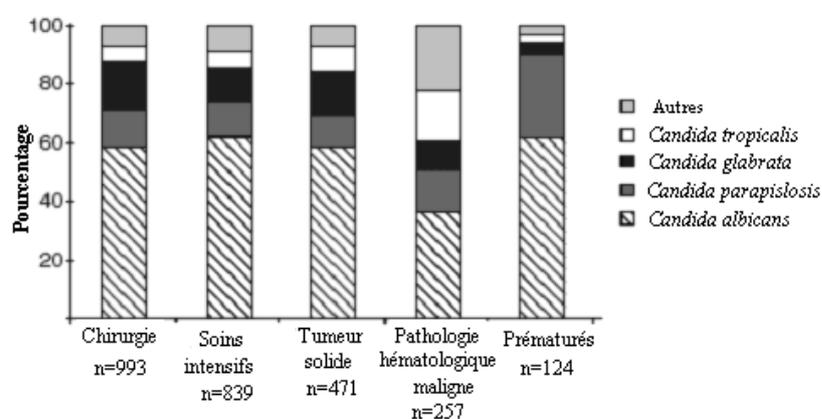


Figure 24 : Fréquence des espèces de *Candida* responsables de candidémies en fonction de la pathologie sous-jacente en Europe (LASS-FLORL 2009).

♦ ***Influence de la pression de sélection des antifongiques***

La prise antérieure d'un traitement antifongique est un facteur susceptible d'influencer l'épidémiologie, du fait des différences dans la sensibilité naturelle aux antifongiques entre les espèces.

Ainsi, dans une étude récente, la prévalence de *C. glabrata* et *C. krusei* était plus importante parmi les patients qui avaient reçu des antifongiques dans le cadre d'un traitement prophylactique ou empirique dans les 30 jours précédant le diagnostic de candidémies (HORN *et al.* 2009).

Une autre étude, conduite en France, confirme également que l'épidémiologie des candidémies peut être potentiellement influencée par la prise antérieure d'un traitement antifongique notamment le fluconazole ou la caspofungine. Comme illustré dans la Figure 25, la proportion des cinq espèces les plus fréquentes varie de façon significative chez les patients ayant reçu un antifongique dans les 30 jours précédant l'épisode de candidémie par rapport aux patients qui n'en ont pas reçu (LORTHOLARY *et al.* 2011).

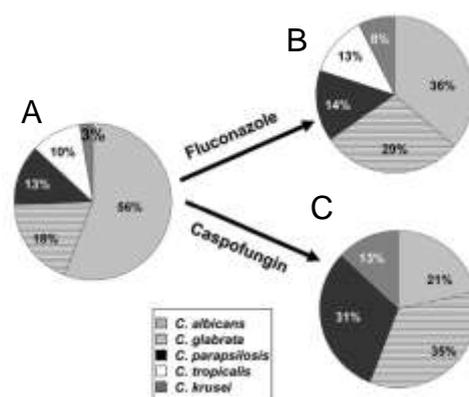


Figure 25 : Influence de la prise d'un traitement antifongique sur la distribution des espèces responsables de candidémies (LORTHOLARY *et al.* 2011).

A : pas de traitement antérieur

B : fluconazole

C : caspofungine.

Ainsi, que ce soit pour la caspofungine ou le fluconazole, la proportion de *C. albicans* diminue significativement chez les patients ayant reçu un traitement antifongique récent. Pour le fluconazole, la proportion de *C. glabrata* et de *C. krusei* augmente, ce qui est à rapprocher de leur moins bonne sensibilité ou de leur résistance intrinsèque à cette molécule. Pour la caspofungine, la proportion de *C. glabrata* augmente également ainsi que celle de *C. parapsilosis*, espèce moins sensible *in vitro* aux échinocandines. D'autre part, dans le groupe « candidémie après traitement par fluconazole », les concentrations minimales inhibitrices au fluconazole sont significativement plus élevées pour les isolats de *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*.

2) Évolution de la sensibilité/résistance aux antifongiques

a) Azolés et *Candida* spp.

Cette classe d'antifongique est largement utilisée dans le traitement et la prévention des candidoses invasives. Les souches résistantes au fluconazole peuvent avoir une résistance croisée aux autres molécules de la classe : environ 60% des *C. albicans* résistants au fluconazole le sont également au voriconazole, reflet de mécanismes de résistance partagés (PFALLER *et al.* 2010c).

Le pourcentage de souches résistantes aux azolés varie selon l'espèce étudiée. Il reste relativement faible pour *C. albicans*, de moins de 2%. Ces taux sont également faibles pour des espèces comme *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ou *C. kefyr*, mais atteignent des niveaux plus élevés pour *C. glabrata* (de l'ordre de 15 à 22%) ou d'autres espèces plus rares comme *C. guilliermondii*, *C. rugosa* ou *C. norvegensis*, ainsi que *C. krusei*, espèce naturellement résistante au fluconazole (PFALLER *et al.* 2010c).

Tableau 16 : CMI 50 et CMI 90 pour 3 azolés en fonction de l'espèce (PFALLER and DIEKEMA 2007).
Les CMI 50 et 90 correspondent à la CMI pour laquelle 50% et 90% respectivement des souches testées sont inhibées. On observe des CMI50 et 90 plus élevées pour *C. glabrata*, *C. krusei* et dans une moindre mesure, *C. guilliermondii*.

Espèces	Antifongiques	Nombre de souches testées	CMI 50	CMI 90
<i>C. albicans</i>	Itraconazole	3,895	0.06	0.12
	Posaconazole	2,359	0.03	0.03
	Voriconazole	2,359	0.007	0.015
<i>C. glabrata</i>	Itraconazole	1,054	1.0	2.0
	Posaconazole	607	1.0	2.0
	Voriconazole	607	0.25	1.0
<i>C. parapsilosis</i>	Itraconazole	1,028	0.25	0.5
	Posaconazole	439	0.12	0.25
	Voriconazole	439	0.015	0.12
<i>C. tropicalis</i>	Itraconazole	839	0.12	0.25
	Posaconazole	319	0.06	0.25
	Voriconazole	319	0.06	0.12
<i>C. krusei</i>	Itraconazole	206	0.5	1.0
	Posaconazole	114	0.5	1.0
	Voriconazole	114	0.25	0.5
<i>C. lusitaniae</i>	Itraconazole	89	0.12	0.25
	Posaconazole	42	0.03	0.12
	Voriconazole	42	0.007	0.06
<i>C. guilliermondii</i>	Itraconazole	90	0.5	1.0
	Posaconazole	45	0.25	0.5
	Voriconazole	45	0.06	0.12

L'évolution du taux de souches résistantes dans le temps varie selon les espèces, avec une tendance à l'augmentation. Dans une étude américaine sur une période de 10 ans (1997 à 2007), les taux de résistances au fluconazole ou au voriconazole restent relativement stables pour *C. albicans* ou *C. glabrata*. Par contre, une diminution de la sensibilité est observée pour *C. parapsilosis* (de 2.5% à 3.6% de souches non-sensibles), *C. guilliermondii* (de 9.9% à 14.2%) et *C. lusitaniae* (de 2.9% à 6.0%) (PFALLER *et al.* 2010c).

Enfin, outre une variation temporelle, une variation spatiale des résistances est observée, à l'échelle des continents, mais aussi à l'échelle locale (cf. Tableau 17).

Tableau 17: Pourcentage de souches de *C. glabrata* résistantes aux azolés en fonction de leur provenance géographique (PFALLER and DIEKEMA 2007).

	Fluconazole	Voriconazole
Europe (n=4900)	16.5%	5.6%
Asie-Région Pacifique (n=1800)	10.6%	4.1%
Amérique latine (n=910)	13.2%	5.4%
Amérique du Nord (n=1200)	18.0%	9.0%

La résistance aux antifongiques azolés est moins importante en Europe qu'en Amérique du Nord : dans le réseau de surveillance de l'ECMM, moins de 2% des *C. albicans* sont résistants au fluconazole (TORTORANO *et al.* 2006). En France, dans une étude portant sur plusieurs centres de l'ouest de la France, près de 85% des souches étaient sensibles au fluconazole, dont plus de 97% des *C. albicans* (TALARMIN *et al.* 2009).

b) Echinocandines et *Candida* spp.

Les échinocandines sont des molécules qui possèdent une forte activité sur les *Candida*. Les trois molécules commercialisées de cette classe thérapeutique présentent généralement une activité équivalente pour une même espèce donnée. Par contre, la sensibilité naturelle varie d'une espèce à l'autre (cf. Tableau 18, page 66).

Le taux de résistance globale est faible dans les études de surveillance des candidémies aux Etats-Unis, de moins de 1% pour des isolats de *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* même si cette dernière espèce présente des CMI beaucoup plus élevées que les autres espèces (PFALLER *et al.* 2011b; PFALLER *et al.* 2011e).

Candida glabrata présente des taux de résistance plus élevés, de l'ordre de 1 à 2.5% des souches testées. On peut aussi noter que le taux de souches de *C. glabrata* résistantes aux échinocandines varie selon son origine géographique (PFALLER *et al.* 2011e). Les souches d'origine sud-américaine et asiatique ne présentaient pas de résistance, alors que 1.5% des souches européennes étaient résistantes à l'anidulafungine. Ce chiffre monte à 3.2% pour les souches nord-américaines, ce qui représente une différence significative.

Tableau 18 : Sensibilité *in vitro* de souches de *Candida* spp. en fonction de l'espèce pour les échinocandines (PFALLER *et al.* 2008a)

La CMI90 (encadrés), qui correspond à la CMI qui inhibe au moins 90% des souches d'une espèce, est plus élevée pour *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii*.

Espèces	nombre d'isolats testés	Molécule antifongique	Pourcentage cumulatif d'isolats sensibles à une CMI (en µg/ml) égale à :										
			0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	≥8
<i>C. albicans</i>	2,869	Anidulafungine	6.2	33.5	69.5	92.4	99.1	99.5	99.5	99.6	100.0		
		Caspofungine	1.7	26.7	74.2	97.1	99.3	99.9	100.0				
		Micafungine	11.9	80.6	96.4	99.3	99.4	99.5	99.6	100.0			
<i>C. parapsilosis</i>	759	Anidulafungine			0.3	0.3	0.3	1.4	4.7	27.9	92.5	100.0	
		Caspofungine		0.1	0.5	3.3	10.7	52.2	89.5	98.6	99.9	100.0	
		Micafungine		0.1	0.3	0.3	0.5	6.1	24.4	79.3	100.0		
<i>C. glabrata</i>	747	Anidulafungine		0.4	7.8	62.4	93.6	99.4	99.7	99.9	99.9	100.0	
		Caspofungine			7.0	65.2	95.3	98.4	99.2	99.7	99.9	99.9	100.0
		Micafungine	13.7	91.4	97.9	98.9	99.5	99.9	99.9	100.0			
<i>C. tropicalis</i>	625	Anidulafungine	3.2	24.2	75.7	95.0	98.4	99.4	99.5	99.5	100.0		
		Caspofungine	1.3	31.0	79.7	97.3	99.0	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	100.0
		Micafungine	4.0	39.5	77.6	96.3	98.6	99.5	99.7	100.0			
<i>C. guilliermondii</i>	61	Anidulafungine					3.3	6.6	13.1	57.4	90.2	100.0	
		Caspofungine			1.6	4.9	11.5	39.3	80.3	95.1	95.1	100.0	
		Micafungine		3.3	3.3	6.6	11.5	21.3	65.6	98.4	100.0		

Ainsi, si cette classe d'antifongique sur le marché depuis seulement une dizaine d'années garde une bonne activité, l'émergence de résistance chez les levures doit être surveillée.

Une étude récente reporte 12 cas de candidémies survenues chez des patients pendant un traitement par micafungine (PFEIFFER *et al.* 2010). *Candida glabrata* représentait la majorité de ces levures isolées, chez lesquelles des mutations de FKS1 étaient présentes.

En France ces dernières années, une résistance aux échinocandines a été décrite pour plusieurs souches de *Candida* de différentes espèces chez des patients traités par cette classe d'antifongiques (BAIXENCH *et al.* 2007; DESNOS-OLLIVIER *et al.* 2008a; DESNOS-OLLIVIER *et al.* 2011).

L'apparition de résistance aux échinocandines est d'autant plus préoccupante qu'elle peut être associée à une résistance aux azolés ou à l'amphotéricine B (PFALLER and DIEKEMA 2007).

c) Amphotéricine B et *Candida* spp.

La résistance acquise à l'amphotéricine B a toujours été rare et les études publiées sur ce sujet concernent essentiellement des cas isolés.

La résistance à l'amphotéricine B de *C. albicans* reste à l'heure actuelle extrêmement rare même si une série sud-africaine décrit parmi un clade de *C. albicans* un taux de résistance de 16%, ce clade étant très peu retrouvé en Amérique du Nord et en Europe (BLIGNAUT *et al.* 2005). Si la sensibilité pour l'amphotéricine B ne pose généralement pas de problème en thérapeutique pour *C. albicans*, son activité antifongique peut être moins importante pour un certain nombre d'espèces non-*albicans*.

Des cas de souches résistantes à l'amphotéricine B avec une résistance associée aux échinocandines (*C. glabrata*) ou au fluconazole (*C. albicans*) ont ainsi été décrits, restreignant alors les choix thérapeutiques (KROGH-MADSEN *et al.* 2006; NOLTE *et al.* 1997). Ainsi, parmi les espèces rares, *C. guilliermondii* et *C. rugosa* peuvent présenter une sensibilité diminuée à l'amphotéricine B, parfois associée à une résistance au fluconazole pour *C. rugosa*.

Enfin, à côté d'une résistance primaire, des souches de *C. lusitaniae* peuvent également présenter une résistance acquise à cet antifongique. Un cas de résistance acquise sous traitement intensif par amphotéricine B a été décrit pour cette espèce : les premières souches isolées étaient sensibles *in vitro*, puis sous traitement, un variant ayant acquis un mécanisme de résistance a émergé, aboutissant à un échec thérapeutique (MCCLENNY *et al.* 2002).

d) 5-fluorocytosine et *Candida* spp.

Le problème principal de cet antifongique découvert dans les années 1960 est que les levures acquièrent rapidement des résistances à son égard lors d'une utilisation en monothérapie. Dans les années 1980, des taux de résistances primaires de 10 à 43% étaient publiés pour *C. albicans*, avec des variations géographiques nettes: les taux les plus élevés étaient observés en Amérique du Nord ; en Europe, les pourcentages de résistances étaient de l'ordre de 10% (STILLER *et al.* 1982).

Les études plus récentes présentent une fréquence de la résistance beaucoup plus faible probablement du fait de son utilisation de plus en plus limitée et quasi exclusivement en association avec d'autres antifongiques. En 2002, une étude menée sur plus de 8000 souches de *Candida* spp. objective des pourcentages de résistance primaire pour les différentes

espèces de *Candida* de moins de 1% à 7%, à l'exception de *C. krusei* pour laquelle 28% des souches étudiées étaient résistantes (cf. Tableau 19) (PFALLER *et al.* 2002).

Tableau 19 : Sensibilité *in vitro* de souches de *Candida* spp. en fonction de l'espèce pour la 5-fluorocytosine (PFALLER *et al.* 2002).

Espèces (nombre de souches testées)	Pourcentage cumulatif d'isolats sensibles à une CMI (en µg/ml) égale à :										
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
<i>C. albicans</i> (5,208)	49	69	77	92	96	97 ^b	97	97	98	98	99
<i>C. glabrata</i> (1,267)	95	98	98	99	99	99 ^b	99	99	99	99	99
<i>C. parapsilosis</i> (1,047)	73	96	98	99	99	99 ^b	99	99	99	99	99
<i>C. tropicalis</i> (759)	36	72	87	91	91	92 ^b	92	93	93	95	99
<i>C. krusei</i> (184)	2	2	3	3	4	5 ^b	13	72	98	99	99
<i>C. lusitanae</i> (82)	87	89	90	93	93	93 ^b	94	95	95	95	99
<i>C. dubliniensis</i> (90)	100										
<i>C. guilliermondii</i> (100)	51	89	97	98	99	100 ^b					
<i>C. famata</i> (17)	53	88	93	93	93	93 ^b	94	94	94	100	
<i>C. kefyr</i> (15)	67	67	73	100							
Autres <i>Candida</i> spp. (34)	24	35	38	50	53	56 ^b	62	79	91	97	97
Ensemble des espèces (8,803)	57	76	83	92	94	95 ^b	95	97	98	98	99

b : correspond au pourcentage de souches sensibles à la SFC (seuil du CLSI ≤4 µg/ml)

D'autres études sur un nombre d'isolats moins important confirment cet ordre de grandeur : 4,5% en Allemagne (BORG-VON ZEPELIN *et al.* 2007), 2,7% en Irlande (METWALLY *et al.* 2007). Dans une étude coréenne, le pourcentage de résistance était également du même ordre, mais il est remarquable que la moyenne des CMI observée variait du simple au double selon le type d'hôpital, montrant une diversité de l'épidémiologie au sein d'un même pays (YOO *et al.* 2009).

La tendance de l'évolution des résistances aux antifongiques des levures du genre *Candida* est donc à l'augmentation, avec des variations épidémiologiques selon l'espèce et une répartition spatiale inégale, aussi bien à l'échelle des continents qu'à l'échelle locale.

Étude EPICANDI

L'étude EPICANDI qui fait l'objet de ce travail est une étude multicentrique coordonnée par par le Docteur Marie-Elisabeth Bognoux de l'hôpital Necker Enfants Malades et par le Docteur Claire Lacroix de l'Hôpital Saint-Louis. Cette étude a été réalisée avec le soutien du laboratoire Gilead®.

I. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de l'étude EPICANDI était d'établir l'épidémiologie des levures du genre *Candida* isolées des patients hospitalisés dans les principaux services à risque de candidoses invasives. Huit centres hospitalo-universitaires français ont participé à l'étude.

L'étude s'est d'abord focalisée sur l'identification des espèces isolées, avec un souci d'exactitude de l'identification mycologique. L'identification précise des levures incluses a ainsi été obtenue grâce l'aide de la biologie moléculaire quand cela était nécessaire, afin de s'affranchir des inexacitudes pouvant résulter de l'identification phénotypique.

L'étude EPICANDI a aussi été l'occasion de comparer la précision des techniques d'identification des levures notamment entre les méthodes phénotypiques et l'identification par biologie moléculaire et par spectrométrie de masse MALDI-TOF, dont les résultats ne seront pas abordés ici.

Le deuxième axe de ce travail a été l'étude de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques.

Ce manuscrit présente les résultats épidémiologiques globaux ainsi que ceux de Nantes et l'ensemble des données de l'identification moléculaire des levures du genre *Candida*, réalisée au laboratoire de mycologie du CHU de Nantes, ce qui a fait l'objet de mon travail.

II. Matériels et Méthodes

L'étude EPICANDI est une étude prospective, multicentrique, à visée épidémiologique.

A - Caractéristiques de l'étude

1) Centres participants

Les huit centres hospitalo-universitaires qui ont participé à cette étude sont les suivants :

- Bordeaux (BDX)
- Lille (LIL)
- Nantes (NTS)
- Poitiers (POI)
- Tours (TOU)
- Trois centres parisiens : l'hôpital Necker-Enfants Malades (NCK), l'hôpital Saint-Louis (SLS) et l'hôpital Saint-Antoine (SAT).

2) Services cliniques étudiés

Les services choisis pour cette étude étaient ceux où sont hospitalisés les patients connus comme les plus à risque de candidoses invasives. En effet, comme décrit dans la première partie, les candidoses invasives restent, du fait de leur morbidité et de leur mortalité, un enjeu médical d'actualité. Les patients à haut risque de candidoses invasives sont les patients immunodéprimés, tels que les patients neutropéniques et les patients transplantés d'organe solide, les patients hospitalisés en réanimation du fait, entre autres, des gestes invasifs qu'ils subissent.

Ainsi, dans le cadre de cette étude, les services retenus étaient les suivants :

- les services d'hématologie adulte et pédiatrique
- les services de réanimation médicale et chirurgicale
- les services de transplantation rénale.

Une analyse rétrospective préalable réalisée sur une période équivalente de deux mois de l'année 2008 a permis d'évaluer le nombre attendu de souches. Les services avec un nombre trop faible de souches pour une analyse statistique satisfaisante n'ont pas été retenus pour cette étude.

Ainsi, à Nantes, les services étudiés étaient les services d'hématologie adulte (toutes unités confondues), le service de réanimation médicale (site Hôtel Dieu) et les services de réanimation chirurgicale (sites Hôtel Dieu et Hôpital Nord Laennec). Les services d'hématologie pédiatrique et de néphrologie transplantation n'ont pas été retenus, du fait d'un nombre attendu de souches insuffisant à l'issue de l'étude préliminaire.

3) Durée d'inclusion

La durée d'inclusion a été fixée à deux mois : de janvier à février 2010.

4) Critères d'inclusion des souches

Toute levure isolée d'un prélèvement provenant d'un patient hospitalisé dans un des services sélectionnés, reçu au laboratoire de mycologie pendant la période d'inclusion, a été incluse dans l'étude. Ils correspondaient aux prélèvements reçus habituellement par les laboratoires de mycologie. Les pratiques de prélèvements des services cliniques n'ont pas été modifiées pendant la période de l'étude.

Tous les types de prélèvements ont été considérés dans l'étude, que leur origine soit superficielle ou profonde. Une candidémie étant souvent précédée d'une colonisation cutanéomuqueuse, cette étude s'est intéressée aussi bien aux levures qui colonisent ces patients qu'à celles responsables d'infections.

Pour faciliter l'analyse, les prélèvements reçus ont été classés en neuf rubriques (cf. Tableau 20, page 73). Pour un patient donné, les souches provenant de plusieurs prélèvements appartenant à la même rubrique n'étaient pas incluses si les prélèvements dataient du même jour et s'il s'agissait de la même espèce. Par exemple, si une expectoration et un lavage broncho-alvéolaire prélevés le même jour étaient tous les deux positifs à *C. albicans*, seule une des souches est incluse.

Tableau 20 : Description des différentes rubriques de prélèvements

Rubriques	Nature des prélèvements
BUCCAL	Bouche Langue Gorge Gencives
DIGESTIF	Biopsie œsophagienne Liquide gastrique Biopsie digestive (gastrique, colique, duodénale, jéjunale, rectale) Liquide biliaire Selles Écouvillon anal ou rectal Liquide de stomie digestive
GENITAL	Vagin Vulve Gland
CUTANE	Tout prélèvement de peau y compris périnée, aine... (à l'exception des biopsies cutanées) Ongles Cuir chevelu
RESPIRATOIRE	Sinus Prélèvement nasal Expectoration Prélèvement distal protégé Aspiration trachéale, aspiration bronchique Lavage broncho-alvéolaire
BIOPSIE	Toutes biopsie (à l'exception des biopsies du tube digestif) : bronchique, pulmonaire, cutanée, hépatique, cérébrale, rénale, vésicale, sinusienne.
URINES	Quel que soit le mode de prélèvement : avec ou sans sonde, cathéter vésical, ...
HEMOCULTURE, CATHETER	Hémoculture périphérique ou sur cathéter Chambre implantable Cathéter veineux ou artériel
LIQUIDES, DRAINS, PUS, PONCTIONS	Liquide péritonéal Liquide pleural Liquide péricardique Liquide articulaire Liquide céphalo-rachidien

B - Identification mycologique

1) Identification phénotypique

Les levures incluses dans l'étude ont d'abord été identifiées phénotypiquement dans chacun des huit centres participants selon un schéma d'identification mycologique classique et standardisé pour l'étude (cf. Figure 26, page 74).

Un milieu chromogène permettait de discriminer les cultures mixtes et d'orienter les tests d'identification suivants. Chaque centre utilisait le milieu chromogène habituellement employé dans leur laboratoire. Le milieu utilisé à Nantes est le milieu *Candida* ID2[®] (bioMérieux). Les tests phénotypiques ont été réalisés selon le mode opératoire décrit par le fabricant.

Toutes les souches incluses ont été cryoconservées à -80°C selon la procédure en vigueur dans chacun des centres.

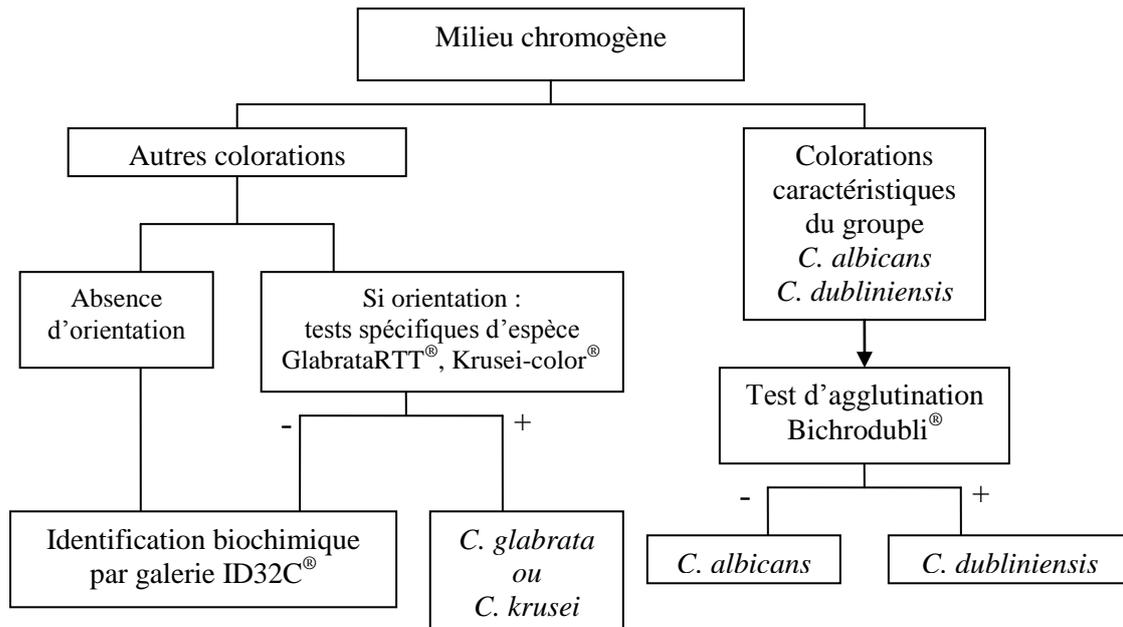


Figure 26 : Schéma utilisé pour l'identification phénotypique.

2) Identification moléculaire

Cette analyse a été réalisée dans un second temps, après le regroupement des données de l'identification dans les différents centres. L'identification moléculaire a été principalement réalisée au CHU de Nantes.

a) Indications de l'identification moléculaire

L'identification par biologie moléculaire n'a pas été réalisée sur tous les isolats inclus dans l'étude mais a été réservée aux situations suivantes :

- Toutes les levures identifiées par galerie ID32C® avec une probabilité d'identification inférieure à 98%.
- Toutes les souches identifiées comme *C. parapsilosis* par les méthodes phénotypiques décrites ci-dessus, afin d'identifier *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis*.
- Toutes les souches identifiées phénotypiquement comme *C. glabrata*, pour identifier *C. bracarensis* et *C. nivariensis*.
- Toutes les souches identifiées phénotypiquement comme *C. kefyi*, *C. guilliermondii* ou *C. famata* quelle que soit la probabilité d'identification de la galerie ID32C®, du fait des difficultés d'identification décrites précédemment.
- Toutes les souches identifiées phénotypiquement à une espèce très rarement isolée en pathologie humaine, et cela quel que soit le résultat de la galerie ID32C®.

b) Mode opératoire

L'identification moléculaire a été obtenue par amplification et séquençage d'une région de l'ADN ribosomal contenant les domaines intergéniques ITS1 et ITS2 et la région codante 5.8S, à l'aide des amorces ITS1 et ITS4 (cf. Tableau 11 page 37). Si l'identification par séquençage de cette région présentait des difficultés, elle a été complétée par l'amplification et le séquençage d'une deuxième région, D1/D2, à l'aide des amorces NL1 et NL4 (cf. Tableau 11, page 37).

Le mode opératoire utilisé dans le cadre de cette étude était le même que celui déjà en place au laboratoire (cf. Annexes n° 3 et 4, pages 117 et 120). Le séquenceur utilisé était un séquenceur 3130XL (Applied Biosystems).

Dans ce protocole, l'étape d'extraction préalable n'est pas réalisée en première intention. En pratique, une colonie isolée est prélevée à l'aide d'un cône stérile à partir d'une culture sur boîte et est déposée directement dans le tube contenant le mix de la réaction de PCR. Cette adaptation du mode opératoire simplifie la procédure et en réduit le coût et la durée.

En cas d'échec d'amplification par cette méthode, une étape d'extraction automatisée a été réalisée grâce à l'automate iPrep[®] (Invitrogen).

Les séquences nucléotidiques sens et anti-sens obtenues pour chacune des souches ont été alignées à l'aide du logiciel Seqscape[®] (Applied Biosystems), un exemple d'alignement est présenté dans la Figure 39 (Annexe n°2 page 116).

L'identification moléculaire a été effectuée par comparaison des séquences obtenues pour les souches à analyser avec les séquences déposées dans les bases de données internationales GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et Mycobank (CBS, <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioLoMICSSequences.aspx>). Pour s'affranchir du risque des séquences inexactes ou mal attribuées possiblement présentes dans les bases de données, les séquences des souches CBS ou ATCC ont été privilégiées pour la comparaison avec la séquence étudiée quand elles étaient disponibles. Ainsi, pour une même espèce, la même séquence de référence de la base de données a été utilisée à chaque identification pour assurer une uniformisation de l'identification (cf. Tableau 21, page 76).

Dans tous les cas l'identification moléculaire a été retenue si la région ITS présentait un pourcentage d'homologie de plus de 98% avec la séquence de référence et s'il n'y avait pas de confusion possible avec une autre espèce.

Si l'homologie était insuffisante ou en cas de difficultés d'identification, le séquençage de la région D1/D2 avec les amorces NL1 et NL4 a été réalisé, selon la même procédure technique et les mêmes conditions.

Tableau 21 : Séquences de référence privilégiées pour la comparaison des séquences ITS.

Espèce	Origine de la souche	Numéro de séquence dans GenBank (région ITS)
<i>C. braccarensis</i>	CBS 10154	GU199440
<i>C. dubliniensis</i>		DQ105856
<i>C. fermentati</i> (<i>Pichia caribbica</i>)	CNRMA 200601194	EU568997
<i>C. glabrata</i>	ATCC 90030	AY939793
<i>C. guilliermondii</i> (<i>Pichia guilliermondii</i>)	ATCC 6260	AY939792
<i>C. inconspicua</i>		AB179767
<i>C. intermedia</i>	ATCC 14439T	AF218968
<i>C. kefyri</i> (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	ATCC 4135	DQ249191
<i>C. lipolytica</i> (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	ATCC 18942	AF335977
<i>C. lusitaniae</i> (<i>Clavispora lusitaniae</i>)	CBS 1944	AY493434
	CBS 10625	EU149777
<i>C. metapsilosis</i>	CBS 10907	FJ872019
<i>C. nivariensis</i>	CBS 9984	GU199445
<i>C. norvegensis</i> (<i>Pichia norvegensis</i>)	CBS 1922	AY497745
<i>C. orthopsilosis</i>	CBS 10906	FJ872018
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	FJ872015
<i>C. sphaerica</i> (<i>Kluyveromyces lactis</i>)	CBS 6170	AY338967
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 66029	EU266571
<i>C. utilis</i> (<i>Pichia jadinii</i>)		DQ249199

ATCC : American Type Culture Collection (USA) CBS : Centraalbureau voor Schimmelcultures (Pays-Bas)
 CNRMA : Centre National de Référence Mycologie et Antifongiques (Institut Pasteur, France)

3) Identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Toutes les souches incluses ont été identifiées par MALDI-TOF à Necker et à Lille avec un appareil de type Bruker®, en respectant les modes opératoires et les procédures utilisées dans ces centres respectifs.

C - Détermination de la sensibilité aux antifongiques

Le deuxième aspect de cette étude a consisté à étudier la sensibilité *in vitro* des levures aux antifongiques. La détermination des CMI a été réalisée par chaque centre au moment de l'isolement de la souche.

1) Indications de la détermination des CMI

Les CMI n'ont pas été réalisées systématiquement. Il a en effet été considéré que du fait la durée courte de l'étude (deux mois), la probabilité de voir apparaître une résistance acquise en cours de traitement était faible. La détermination des CMI n'a donc été effectuée que lors du premier isolement dans un site de prélèvement chez un patient.

Un exemple d'inclusion des souches est présenté dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Exemple d'inclusion des souches et de réalisation des CMI pour un patient donné.

	Prélèvement	Espèces isolées	Inclusion	CMI
J1	LBA	<i>C. albicans</i>	Oui	Oui
	Aspiration bronchique	<i>C. albicans</i>	Non	
J2	Urines	<i>C. albicans</i>	Oui	Oui
J10	Aspiration bronchique	<i>C. albicans</i>	Oui	Non
		<i>C. tropicalis</i>	Oui	Oui

2) Méthodologie et interprétation

L'étude de la sensibilité des levures incluses a été réalisée dans chacun des centres participants au moment de son isolement par diffusion en milieu gélosé par la technique Etest® selon les recommandations du fabricant (cf. Annexe n°5, page n°122). Comme cela a été présenté dans la première partie, cette technique est bien corrélée aux méthodes de référence.

Cinq molécules correspondant aux quatre classes d'antifongiques ont ainsi été testées dans le cadre de l'étude : le fluconazole, le voriconazole, la caspofungine, l'amphotéricine B et la 5-fluorocytosine.

Pour chaque antifongique, la souche a ensuite été classée en sensible ou non-sensible en fonction de la CMI obtenue. Les seuils de résistances choisis pour chaque molécule sont ceux proposés par le fabricant des bandelettes ou issus de la littérature disponible au moment de l'étude (cf. Tableau 23).

Tableau 23 : Seuils de non-sensibilité retenus dans cette étude pour chacun des antifongiques.

Molécules	Seuil de non-sensibilité
Amphotéricine B	> 1 µg/ml
5-fluorocytosine	> 4 µg/ml
Fluconazole	> 8 µg/ml
Voriconazole	> 1 µg/ml
Caspofungine	> 2 µg/ml

D - Collecte des données et analyse statistique

Les résultats de l'identification phénotypique et de la sensibilité *in vitro* ont été reportés au niveau de chaque centre sur une fiche de recueil (cf. Annexe n°6, page n°123) pour chaque isolat. Les informations recueillies sur les patients ne concernaient que leur sexe, leur âge et leur service d'origine. Les données ont été centralisées par les investigateurs (Dr Marie-Elisabeth Bougnoux et Dr Claire Lacroix). L'analyse statistique a été confiée à un biostatisticien (Jérôme Lambert, Hôpital Saint-Louis, Paris).

III. Résultats

1416 souches de levures ont été initialement incluses dans l'étude. 13 ont été exclues *a posteriori* suite à une perte de vitalité après congélation-décongélation ou parce qu'il s'agissait de *Saccharomyces* spp. Ainsi, au total, **1403 isolats de *Candida* spp.** ont finalement été retenus pour l'étude.

Le nombre de souches incluses par centre variait de 77 isolats pour Poitiers à 327 pour Lille. A Nantes, 200 souches ont été incluses au total.

A - Données démographiques

1) Caractéristiques des patients

Les 1403 souches provenaient de 532 patients. Ce chiffre correspondait à ce que l'analyse préalable, réalisée sur une période similaire sur 2008, avait estimé, à savoir environ 1300 souches, provenant de plus de 600 patients.

L'âge médian des patients était de 56,3 ans (minimum : 0,2 an, maximum : 89,2 ans) avec un écart inter-quartile de 44,4 à 66,5 ans.

La majorité des patients était hospitalisée soit en hématologie adulte (38%), soit en réanimation médicale (34%). Comme illustré dans la Figure 27, on remarque une diversité de la répartition des services entre les huit centres participants. Cette disparité est probablement le reflet des différences d'activités de ces services (nombre de lits, etc.) entre les différents centres.

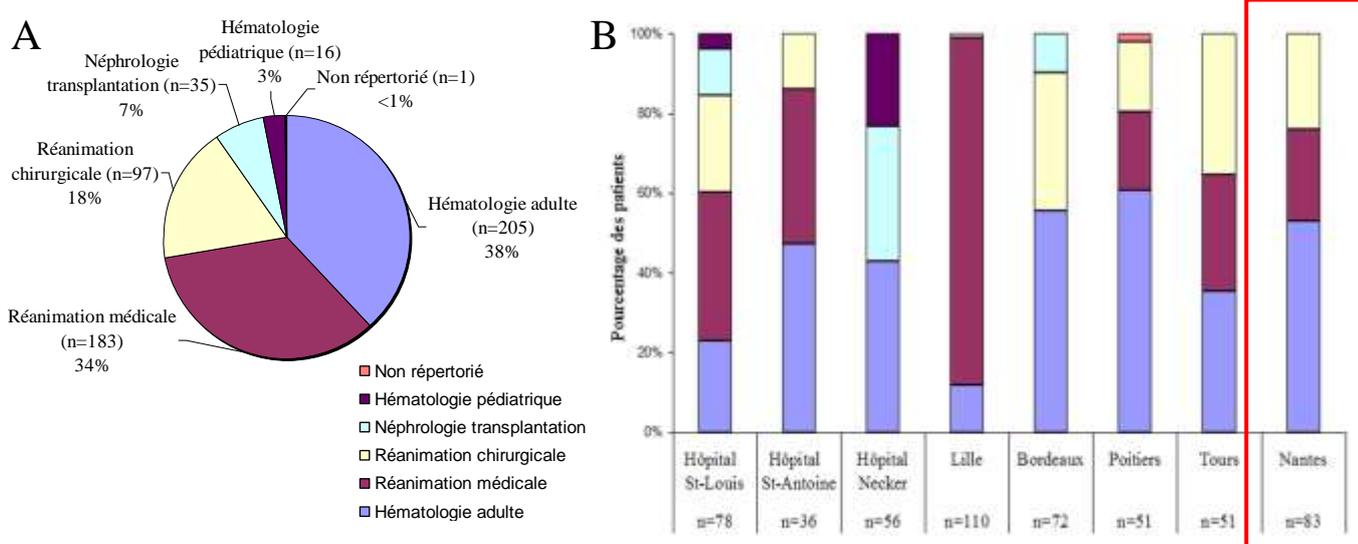


Figure 27 : Répartition par service des patients inclus dans l'étude.

A : répartition globale.

B : répartition par centre.

2) Nature des prélèvements

Les levures incluses provenaient des différents sites de prélèvements selon la répartition présentée dans la Figure 28. Les prélèvements d'origine digestive et respiratoire représentaient plus de la moitié des cas.

Parmi l'ensemble des souches, 75 provenaient de prélèvements profonds, dont 45 d'hémocultures ou de cathéter, 29 de drains, de ponctions ou pus profond et une seule biopsie.

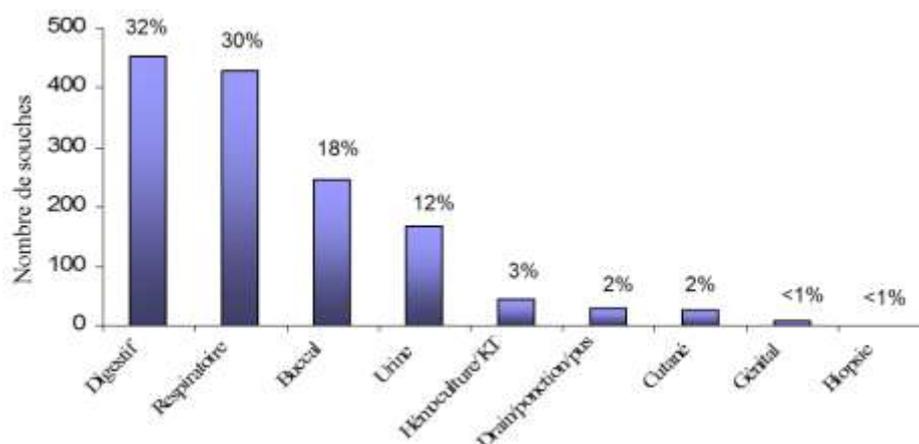


Figure 28 : Répartition des souches incluses en fonction du site de prélèvements (n=1403).

Il est intéressant de souligner une fois de plus que cette répartition variait d'un centre à l'autre (cf. Figure 29), ainsi que d'un service à l'autre. Par exemple, on note une plus grande fréquence des prélèvements d'origine respiratoire à Lille comparativement à Poitiers.

A Nantes, les souches provenaient essentiellement de prélèvements d'origine digestive (dont 80% de selles) et respiratoire (dont 60% de sécrétions bronchiques).

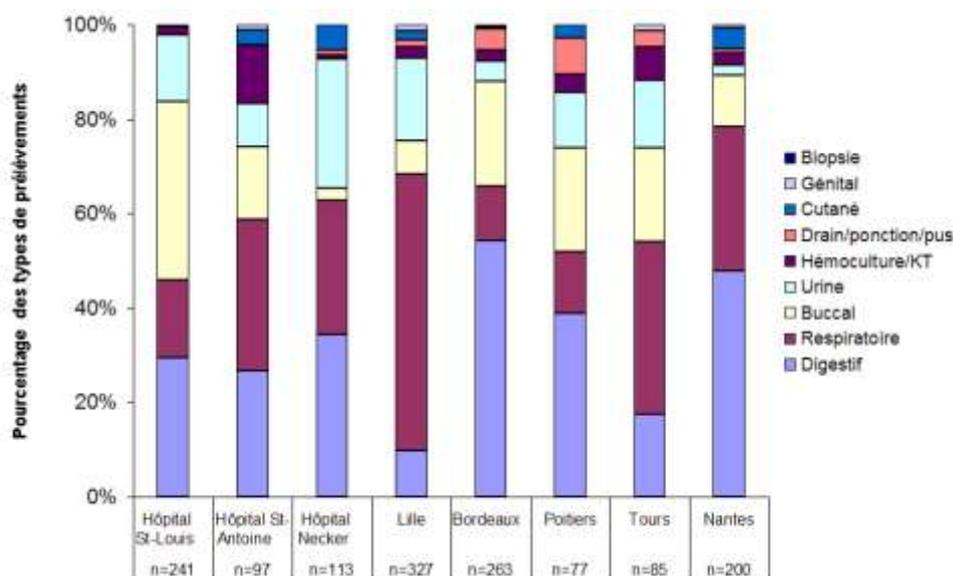


Figure 29 : Répartition des différents types de prélèvements dans les 8 centres.

B - Résultats de l'identification mycologique et apport de la biologie moléculaire

Au total, 446 des 1403 souches de *Candida* spp. incluses dans cette étude ont été identifiées par biologie moléculaire (7 souches exclues *a posteriori* avaient également été identifiées). 403 de ces identifications moléculaires ont été effectuées dans le laboratoire de Parasitologie du CHU de Nantes.

1) Performances de la méthode

Il est intéressant de souligner que 395 des 403 souches analysées à Nantes en biologie moléculaire ont pu être parfaitement identifiées à partir d'une colonie isolée, en s'affranchissant de l'étape d'extraction (« PCR colony ») ce qui illustre la bonne performance de cette méthode. En effet, seules 8 souches ont nécessité une étape d'extraction (réalisée sur automate iPrep[®], Invitrogen) préalable suite à une absence d'amplification de la région ITS par la technique habituelle. A noter que ces huit souches, correspondaient toutes à des isolats de l'espèce *C. kefyr*. Les 52 autres souches de cette même espèce ont pu être identifiées par le protocole habituel sans difficulté.

Pour la plupart des espèces, comme *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ou *C. guilliermondii*, l'identification par biologie moléculaire n'a pas présenté de problème particulier, que ce soit pour l'amplification ou l'analyse des séquences.

Comme illustré en annexe, la taille de la séquence amplifiée varie significativement en fonction des espèces de 217 pb pour *C. lipolytica* à 842 pb pour *C. glabrata* (cf. Annexe n°7, page 124). Pour certaines espèces, la séquence complète peut varier d'une paire de base du fait d'une insertion ou d'une délétion ponctuelle survenant au niveau des régions intergéniques ITS1 et ITS2. La séquence complète était logiquement plus difficile à obtenir pour les espèces avec la séquence ITS la plus longue, comme *C. glabrata*, ce qui la plupart du temps n'empêchait pas l'identification moléculaire de la levure, du fait d'une séquence suffisamment longue pour être analysée sans risque d'erreur.

L'amplification et l'analyse d'une seconde région de l'ADN ribosomal, la région D1/D2, ont été nécessaires pour un certain nombre d'isolats en particulier du fait de l'obtention de profil multibandes lors de l'amplification des régions ITS (plusieurs amplicons de taille différente avec en général un amplicon majoritaire) rendant délicate l'interprétation des séquences nucléotidiques. L'analyse de la région D1/D2 a alors toujours permis de confirmer

l'identification. Il s'agissait dans la plupart des cas d'isolats de *C. glabrata* ou de *C. inconspicua*.

Le séquençage de la région D1/D2 a également été nécessaire pour confirmer l'identification des quelques espèces rares identifiées lors de l'analyse des régions ITS. Ainsi, les identifications de *C. magnoliae*, *C. lipolytica* ou bien encore *C. ethanolica*, ont également été confirmées par amplification et séquençage de la région D1/D2. Concernant cette dernière espèce, les séquences de la région ITS et de la région D1/D2 sont très proches des séquences d'une autre espèce, *Pichia deserticola*, très proche taxonomiquement de *C. ethanolica*, les séquences de la région D1/D2 de ces deux espèces ne différant que de deux bases.

La comparaison des séquences obtenues avec la base de données de GenBank a généralement permis d'identifier sans ambiguïté les levures du genre *Candida* (cf. Annexe n°8, page 125). Pour les espèces rarement décrites, peu de séquences nucléotidiques sont disponibles dans les bases de données nécessitant souvent le recours à l'analyse d'une deuxième région.

Au final, toutes les souches étudiées ont pu être identifiées grâce à la biologie moléculaire.

2) Résultats globaux et comparaison avec l'identification phénotypique

Les identifications moléculaires des 446 souches sont présentées dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Ensemble des identifications obtenues en biologie moléculaire (n=446).

Espèce	Nombre de souches
<i>C. albicans</i>	9
<i>C. bracarensis</i>	1
<i>C. dubliniensis</i>	4
<i>C. ethanolica</i>	1
<i>C. fabianii</i>	17
<i>C. fermentati</i>	3
<i>C. glabrata</i>	174
<i>C. guilliermondii</i>	9
<i>C. inconspicua</i>	12
<i>C. intermedia</i>	2
<i>C. kefir</i>	61
<i>C. lipolytica</i>	1
<i>C. lusitaniae</i>	20
<i>C. magnoliae</i>	1
<i>C. orthopsilosis</i>	3
<i>C. parapsilosis</i>	81
<i>C. sphaerica</i>	1
<i>C. tropicalis</i>	45
<i>C. utilis</i>	1

Le Tableau 25 présente les erreurs de l'identification phénotypique mises en évidence par l'identification moléculaire.

Pour les espèces les plus fréquentes, l'identification phénotypique est correcte à plus de 95%, avec cependant quelques erreurs. La précision de l'identification phénotypique diminue pour les espèces moins fréquentes avec pour certaines identifications phénotypiques, comme *C. norvegensis*, une erreur systématique.

Tableau 25 : Exactitude de l'identification phénotypique selon l'espèce

Identification phénotypique présumée*	n =	Exactitude de l'identification**	Identification moléculaire définitive si différente
<i>C. glabrata</i>	176	98.8% (174/176)	1 <i>C. parapsilosis</i> 1 <i>C. lusitaniae</i>
<i>C. parapsilosis</i>	78	96.1% (75/78)	3 <i>C. orthopsilosis</i>
<i>C. kefyri</i>	65	95.3% (61/65)	1 <i>C. sphaerica</i> 2 <i>C. lusitaniae</i> 1 <i>C. parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	43	97,6% (42/43)	1 <i>C. intermedia</i>
<i>C. lusitaniae</i>	18	100% (18/18)	
<i>C. guilliermondii</i>	12	75% (9/12)	3 <i>C. fermentati</i>
<i>C. pelliculosa</i>	12	0% (0/12)	10 <i>C. fabianii</i> 2 <i>C. parapsilosis</i>
<i>C. norvegensis</i>	9	0% (0/9)	8 <i>C. inconspicua</i> 1 <i>C. ethanolica</i>
<i>C. utilis</i>	9	11% (1/9)	7 <i>C. fabianii</i> 1 <i>C. parapsilosis</i>
<i>C. inconspicua</i>	5	80% (4/5)	1 <i>C. intermedia</i>
<i>C. pulcherima</i>	2	0% (0/2)	2 <i>C. tropicalis</i>
<i>C. famata</i>	1	0% (0/1)	1 <i>C. lusitaniae</i>
<i>C. lipolytica</i>	1	100% (1/1)	
<i>C. magnoliae</i>	1	100% (1/1)	
<i>C. holmii</i>	1	0% (0/1)	1 <i>Kazachstania unispora</i> ***
Non identifiable	1		<i>C. bracarensis</i>

* par galerie ID32C® ou RTT Glabrata®

**en prenant pour référence l'identification moléculaire

*** anciennement *Saccharomyces unisporus*, exclu *a posteriori* de l'étude..

3) Identification moléculaire des complexes d'espèces

♦ Complexe « *parapsilosis* »

Comme expliqué précédemment, la variabilité génétique présentée au sein de la région ITS amplifiée (présence de substitutions et d'insertions-délétions) avec les amorces ITS1 et ITS4 est suffisante pour permettre de différencier les trois espèces de ce complexe (cf. Figure 4 page 22).

Les résultats de l'identification moléculaire des 84 souches identifiées comme appartenant à ce complexe par les méthodes phénotypiques sont présentés dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Résultat de l'identification moléculaire pour le complexe « *parapsilosis* » (n=84)

	Effectif	%
<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	81	96,4 %
<i>C. orthopsilosis</i>	3	3.6 %
<i>C. metapsilosis</i>	0	0 %

A noter que les trois souches de *C. orthopsilosis* mises en évidence à l'issue de l'analyse moléculaire avaient été identifiées comme *C. parapsilosis* avec une probabilité de 99,9% (excellente identification) par les méthodes phénotypiques.

Enfin, il faut souligner que 5 souches présentées dans le Tableau 27, identifiées comme *C. parapsilosis* par biologie moléculaire, avaient été attribuées à tort à d'autres espèces (*C. kefyra* notamment) par les méthodes phénotypiques. On remarque que pour trois d'entre elles, le score de la galerie ID32C[®] était faible.

Tableau 27 : Discordance entre identification phénotypique et identification moléculaire dans le complexe « *parapsilosis* »

Identification phénotypique	Score (ID32C [®])	Identification moléculaire
<i>C. kefyra</i>	99,9 %	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. pelliculosa</i>	74,5 %	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. utilis</i>	72,9 %	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. pelliculosa</i>	71,6 %	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. parapsilosis</i>

*identification par le test RTT *Glabrata*

♦ **Complexe « *glabrata* »**

Comme expliqué précédemment, contrairement aux techniques phénotypiques, la variabilité présentée au sein de la région ITS permet de différencier facilement les trois espèces de ce complexe avec les amorces ITS1 et ITS4 (cf. Figure 5, page 22).

Les résultats de l'identification moléculaire effectuée sur les 175 souches appartenant à ce complexe sont présentés dans le Tableau 28. On observe ainsi la faible fréquence dans notre étude, de *C. braccarensis* et de *C. nivariensis*.

Tableau 28 : Résultat de l'identification moléculaire pour le complexe « *glabrata* » (n=175)

	Effectif	%
<i>C. glabrata</i>	174	99.4 %
<i>C. braccarensis</i>	1	0.6 %
<i>C. nivariensis</i>	0	0 %

Il est intéressant de noter que la souche de *C. braccarensis* n'avait pas été identifiée par le test RTT *Glabrata*[®] ni par la galerie ID32C[®].

A noter que l'ensemble des souches de *C. glabrata* ont été parfaitement identifiées par le test RTT *Glabrata*[®]. En revanche, une souche de *C. parapsilosis* et une de *C. lusitaniae* ont été identifiées à tort comme *C. glabrata* par ce test.

♦ ***C. guilliermondii* et espèces apparentées.**

Comme cela a été présenté précédemment, *C. guilliermondii* et *C. famata* sont des espèces difficilement différenciables par les techniques phénotypiques et des confusions avec d'autres espèces proches taxonomiquement sont fréquentes comme par exemple avec *C. fermentati* (*Pichia caribbica*), *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) ou bien encore *C. utilis* (*Pichia jadinii*).

Les résultats de l'identification moléculaire pour chacune des souches identifiées phénotypiquement comme *C. guilliermondii* ou *C. famata* sont présentés dans le Tableau 29, page 85.

On peut observer que trois des 12 souches identifiées initialement comme *C. guilliermondii* correspondaient en fait à *C. fermentati*. Toutes les identifications avec des scores de plus de 98% avec la galerie ID32C[®] étaient concordantes avec les résultats de l'identification moléculaire.

Par ailleurs, aucun *C. famata* (*Debaryomyces hansenii*) n'a été finalement isolé dans cette étude, l'identification phénotypique n'étant pas confirmée par l'analyse moléculaire.

Tableau 29 : Résultats de l'identification moléculaire pour *C. guilliermondii* (n= 12) et *C. famata* (n=1)

Identification phénotypique	Score (galerie ID32C®)	Identification moléculaire
<i>C. guilliermondii</i>	98,8 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	98,8 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	98,3 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	98,3 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	92,1 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	92,1 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	92,1 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	92,1 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	89,6 %	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	92,1 %	<i>C. fermentati (Pichia caribbica)</i>
<i>C. guilliermondii</i>	92,1 %	<i>C. fermentati</i>
<i>C. guilliermondii</i>	89,7 %	<i>C. fermentati</i>
<i>C. famata</i>	46.3%	<i>C. lusitaniae</i>

Les résultats de l'identification moléculaire des espèces proches de *C. guilliermondii* et *C. famata*, en particulier *C. utilis* (*P. jadinii*), sont présentées dans le Tableau 30. Une seule souche était identifiée correctement par les techniques phénotypiques, avec un score supérieur à 98%, les autres isolats étant identifiés comme *C. utilis* ou *C. pelliculosa* mais avec des scores nettement inférieurs (généralement moins de 80%) montrant les limites de l'identification pour ce groupe d'espèces. A l'issue de l'analyse moléculaire, à l'exception d'une souche de *C. parapsilosis*, les autres isolats correspondaient en fait à *C. fabianii* (*Pichia fabianii*), levure rarement rapportée chez l'homme.

Tableau 30 : Résultats de l'identification moléculaire pour les souches identifiées phénotypiquement comme *C. utilis* ou *C. pelliculosa*.

Identification phénotypique	Score (galerie ID32C®)	Identification moléculaire
<i>C. utilis (Pichia jadinii)</i>	96,6 %	<i>C. utilis</i>
<i>C. utilis</i>	72,9 %	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. utilis</i>	74,5 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. utilis</i>	77,9 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. utilis</i>	77,9 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. utilis</i>	77,9 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. utilis</i>	77,9 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. utilis</i>	77,9 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. utilis</i>	90,1 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	74,5 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	71,6 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	71,6 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	71,6 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	71,6 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	71,5 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	57,3 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	57,3 %	<i>C. fabianii</i>
<i>C. pelliculosa</i>	57,3 %	<i>C. fabianii</i>

♦ ***C. inconspicua* et *C. norvegensis***

Certaines souches de *C. inconspicua* présentaient un profil multibande après amplification avec les amorces ITS1 et ITS4. L'identification des souches de cette espèce a donc été systématiquement complétée par le séquençage de la région D1/D2.

Par méthode phénotypique, 8 souches de l'étude ont été identifiées comme *C. norvegensis* et 4 souches comme *C. inconspicua*. Les scores de probabilités de la galerie ID32C[®] n'étaient jamais supérieurs à 98%. Les résultats de l'identification moléculaire pour ces souches sont présentés dans le Tableau 31.

Tableau 31 : Identification moléculaire de *C. inconspicua* et de *C. norvegensis*.

Identification phénotypique	Score (galerie ID32C [®])	Identification moléculaire
<i>C. norvegensis</i>	96,6 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. norvegensis</i>	96,6 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. norvegensis</i>	96,6 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. norvegensis</i>	96,5 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. norvegensis</i>	96,5 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. norvegensis</i>	96,5 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. norvegensis</i>	85,4 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. norvegensis</i>	Non disponible	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. inconspicua</i>	96,6 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. inconspicua</i>	96,5 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. inconspicua</i>	96,5 %	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. inconspicua</i>	96,5 %	<i>C. inconspicua</i>

Comme illustré dans le tableau, il apparaît que toutes ces souches correspondaient en fait à *C. inconspicua*, si bien qu'aucun isolat de *C. norvegiensis* n'a finalement pu être mis en évidence dans notre étude.

♦ ***C. lusitaniae***

18 des 20 souches de cette espèce incluses dans notre étude et identifiées par biologie moléculaire, avaient été identifiées correctement par la galerie ID32C[®], malgré des scores plutôt faibles, toujours inférieur à 98% (de 64,9% à 95,8%). A noter qu'un isolat avait été initialement identifié comme *C. glabrata* et un autre comme *C. famata* avec un score très faible.

L'analyse des séquences nucléotidiques des isolats de *C. lusitaniae*, révèle que si la majorité de la région ITS est bien conservée entre les souches, un polymorphisme important existe au niveau de la région ITS1 (cf. Figure 30).

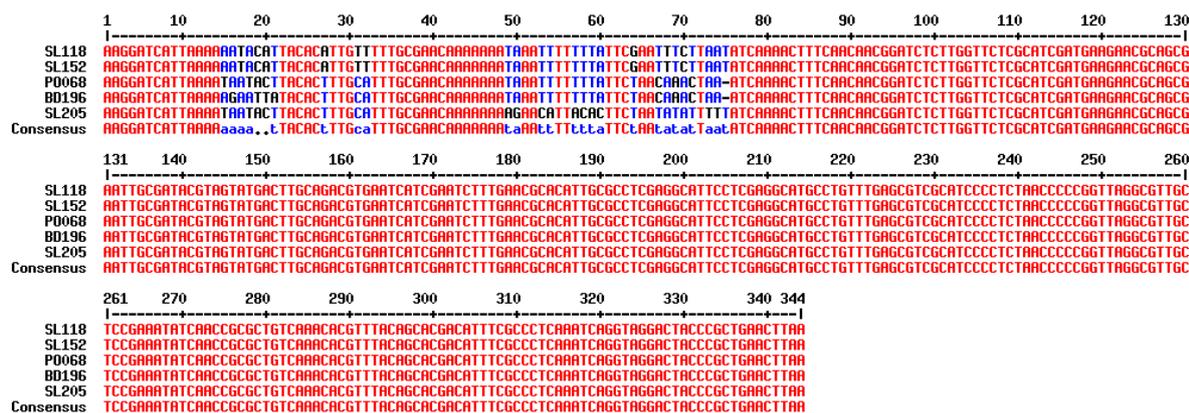


Figure 30 : Alignement de la séquence nucléotidique de la région ITS de cinq des souches de *C. lusitaniae*. Document personnel réalisé avec le logiciel Multalin : <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

Malgré ce polymorphisme, pour chacune des séquences obtenues, la comparaison avec la base de données de GenBank nous a permis d’identifier de manière fiable *C. lusitaniae*, ce polymorphisme génétique étant également bien représenté dans la base de données, avec par exemple des correspondances pour des séquences non-identiques entre elles de deux isolats de *C. lusitaniae* de la collection CBS (CBS 1944 et CBS 10625).

Toutefois et afin de conforter l’identification, le séquençage de la région D1/D2 a été systématiquement réalisé et a conforté à chaque reprise, sans ambiguïté, l’identification de *C. lusitaniae*.

◆ *C. kefyri* et *C. sphaerica*

Le séquençage de la région ITS a confirmé l’identification de 61 *C. kefyri*, identifiés comme tels par méthode phénotypique (probabilités de la galerie ID32C® : de 80,6% à 99,9%).

Un isolat de *C. sphaerica*, espèce proche de *C. kefyri* a également été identifié après séquençage de la région ITS. Cette souche était identifiée phénotypiquement comme un *C. kefyri*, avec une probabilité de 98%.

◆ *Autres espèces*

Les résultats de l’identification moléculaire pour d’autres espèces plus rares sont présentés dans le Tableau 32.

Tableau 32 : Résultats de l’identification moléculaire pour les espèces rares.

Identification phénotypique	Score (galerie ID32C®)	Identification moléculaire
<i>C. inconspicua</i>	96,7 %	<i>C. intermedia</i>
<i>C. intermedia</i>	99,6 %	<i>C. intermedia</i>
<i>C. tropicalis</i>	99,3 %	<i>C. intermedia</i>
<i>C. magnoliae</i>	Non disponible	<i>C. magnoliae</i>
<i>C. holmii</i>	52,9 %	<i>Kazachstania unispora</i> *
<i>C. norvegensis</i>	96,5 %	<i>C. ethanolica</i>
<i>C. lipolytica</i>	98,2%	<i>C. lipolytica</i> (<i>Yarrowia lipolytica</i>)

* anciennement *Saccharomyces unisporus*, exclu a posteriori de l’étude.

C - Étude EPICANDI : distribution des espèces

La répartition des différentes espèces identifiées dans l'étude EPICANDI est présentée ci-dessous, dans un premier temps de façon globale, puis comparée entre les différents centres.

1) Épidémiologie globale

Les identifications retenues des 1403 souches incluses, après identification phénotypique parfois complétées par biologie moléculaire, sont présentées dans la Figure 31. 20 espèces distinctes de *Candida* ont finalement été isolées au cours de cette étude.

Afin d'éviter un biais de sélection du fait de patients qui auraient été prélevés de nombreuses fois dans de multiples sites et pour analyser l'écologie des espèces de *Candida*, il n'a été considéré qu'un isolat d'une espèce par patient quel que soit le site de prélèvement. Ainsi, si un *C. albicans* a été isolé à plusieurs jours d'intervalle dans des sites différents chez un même patient, il n'a été pris en compte qu'une seule fois.

Dans ce cadre, l'analyse est restreinte à 669 isolats. On remarque que l'ordre de fréquence des principales espèces est sensiblement identique.

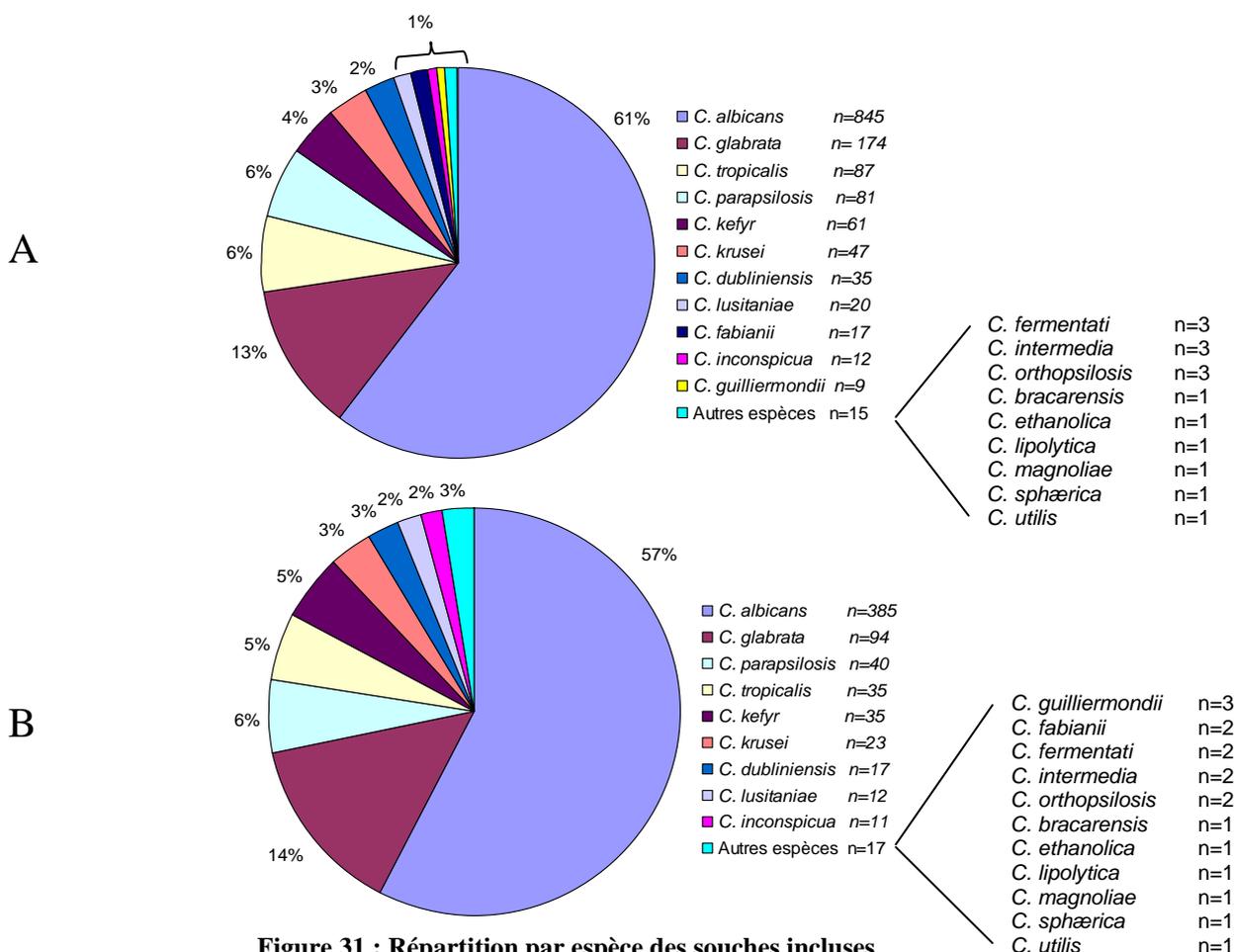


Figure 31 : Répartition par espèce des souches incluses

A : Toutes les souches (n=1403)

B : Après suppression des prélèvements multiples chez un même patient (n=669)

Il apparaît ainsi dans cette étude que *C. albicans* est la première espèce en terme de fréquence (57%), suivi par *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. kefyr*. La prévalence des autres espèces est plus faible, de l'ordre ou inférieur à 3%.

La Figure 32 présente la répartition des espèces isolées de prélèvements profonds (hémocultures, ponctions, biopsies). On peut souligner que la distribution des espèces reste globalement inchangée si l'on considère uniquement ces prélèvements. On remarque également parmi ces isolats la présence d'espèces rares, comme *C. fabianii*.

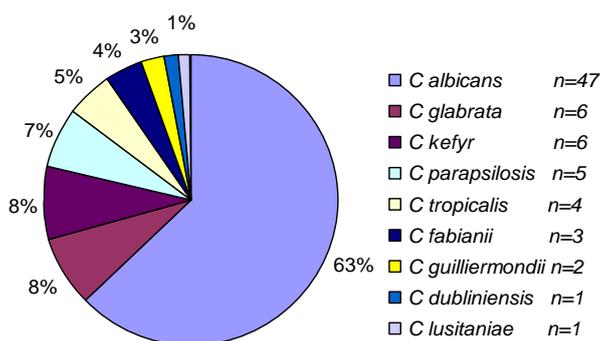


Figure 32 : Répartition des espèces isolées de prélèvements profonds (n=75)

La Figure 33 présente la répartition des espèces en fonction du service.

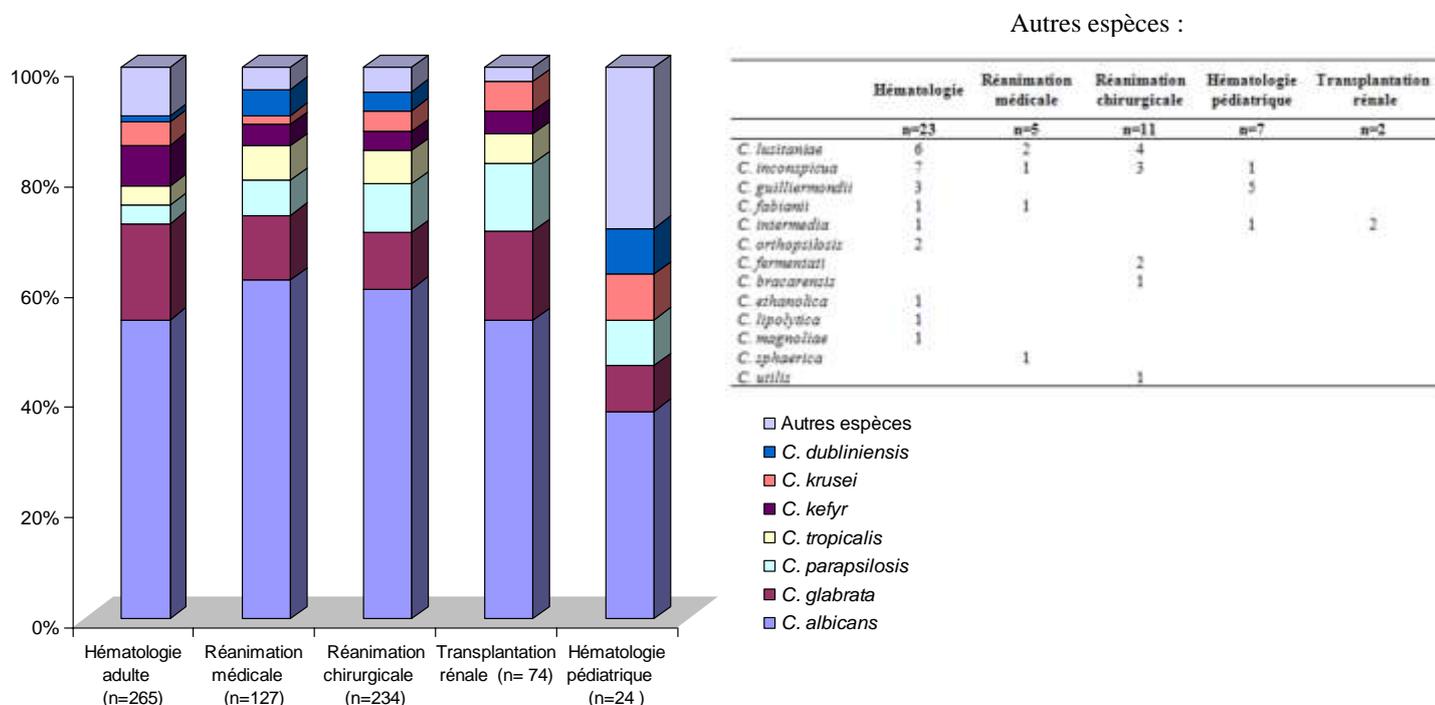


Figure 33 : Répartition des espèces en fonction des services (les prélèvements multiples ne sont pas considérés)

Plusieurs tendances apparaissent :

- En hématologie, par rapport au service de réanimation, on trouve un pourcentage de *C. albicans* plus bas et un pourcentage de *C. glabrata*, mais aussi de *C. krusei* et *C. kefyr*, plus élevé. L'ensemble des « espèces rares » y est également plus prévalent.
- *C. parapsilosis* est plus prévalent dans les services de réanimation qu'en hématologie.

2) Epidémiologie locale et comparative

La distribution des espèces dans les huit centres participants est présentée dans la Figure 34. L'analyse est faite après suppression des prélèvements multiples chez un même patient (soit 669 souches au total).

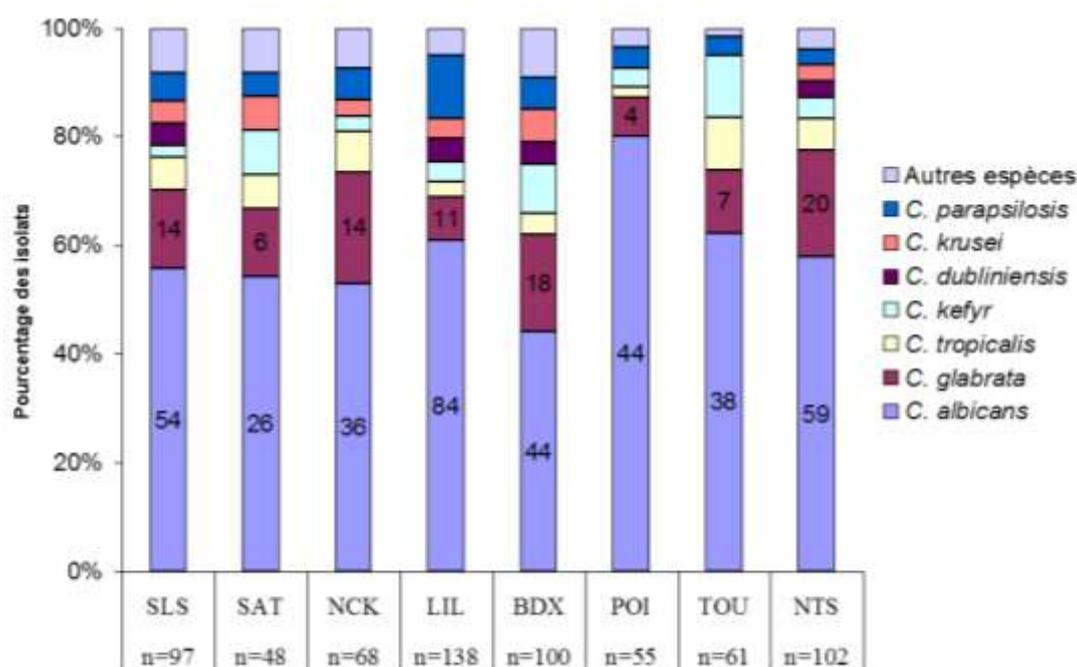


Figure 34 : Distribution des espèces dans les huit centres participants à l'étude.
 SLS : Saint-Louis, SAT : Saint-Antoine, NCK : Necker, LIL : Lille,
 BDX : Bordeaux, POI : Poitiers, TOU : Tours, NTS : Nantes
 Les chiffres présentés sur le graphe correspondent au nombre absolu de souches.

On observe une certaine disparité entre les centres, notamment sur le pourcentage de *C. albicans*, qui varie de 44% pour Bordeaux à 80% pour Poitiers. Nantes si situe plutôt dans la moyenne, avec 58% de *C. albicans*.

L'ordre des espèces non-*albicans* varie entre les centres. Ainsi, *C. glabrata* est la deuxième espèce par ordre de fréquence dans tous les centres à l'exception de Lille, où *C. parapsilosis* est au deuxième rang. A Nantes cette dernière espèce est au 5^{ème} rang. On peut également noter la forte proportion de *Candida* non-*albicans* à Bordeaux et la forte prévalence de *C. kefyr* dans ce centre, qui est au 3^{ème} rang dans l'ordre de fréquence des espèces isolées.

Au CHU de Nantes, dans les trois services étudiés, *C. albicans* reste l'espèce la plus fréquemment isolée. Parmi les *Candida* non-*albicans*, *C. glabrata* est majoritaire. *C. albicans* et *C. glabrata* représentent à elles deux plus de 75% des isolats.

◆ ***Epidémiologie comparative par service***

La répartition par service des souches isolées à Nantes, comparée à l'ensemble des autres centres, est présentée dans la Figure 35. Les services d'hématologie pédiatrique et de transplantation rénale, services non-inclus à Nantes, n'y sont pas présentés. Ces résultats doivent être interprétés avec précaution du fait des faibles nombres d'isolats dans chaque service pris séparément.

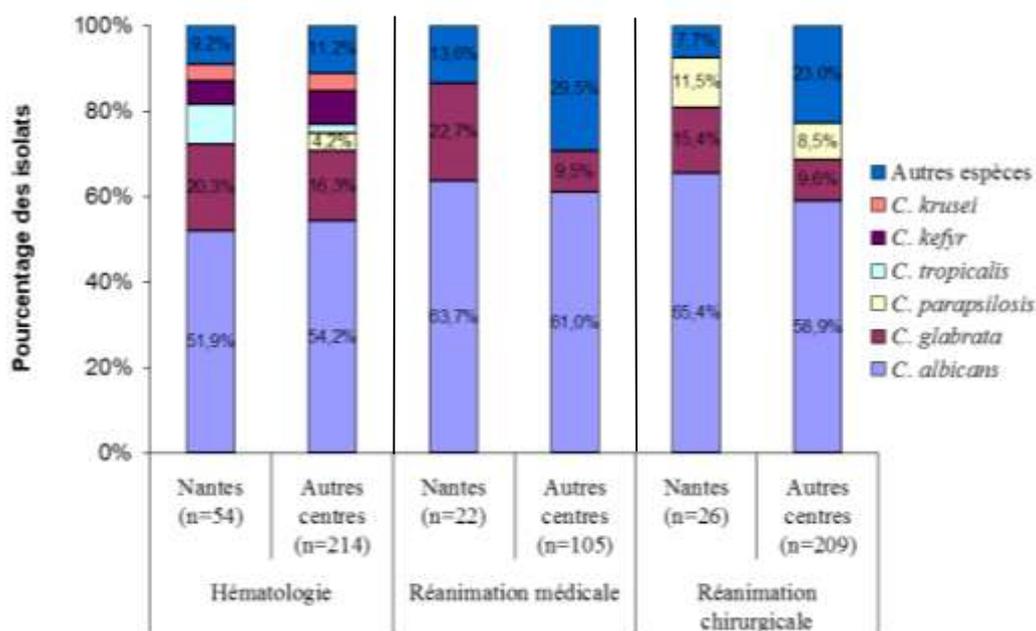


Figure 35 : Répartition des espèces dans les trois services étudiés à Nantes et comparaisons aux autres centres pris dans leur ensemble.

Pour l'hématologie, les pourcentages de *C. albicans* sont similaires entre Nantes et l'ensemble des autres centres. On remarque l'absence de *C. parapsilosis* à Nantes ainsi qu'une plus forte prévalence de *C. tropicalis*. *Candida kefyr*, *C. krusei* et les autres espèces moins fréquentes sont présentes dans le même ordre de grandeur.

En réanimation médicale et chirurgicale à Nantes, la quasi absence d'espèces autres que *C. albicans* et *C. glabrata* (respectivement 3 et 5 isolats d'autres espèces) est remarquable.

Les seuls isolats de *C. parapsilosis* sur la période étudiée proviennent de la réanimation chirurgicale.

D - Étude EPICANDI : sensibilités *in vitro* aux antifongiques

Comme expliqué dans les matériels et méthodes, la sensibilité *in vitro* vis-à-vis des antifongiques a été évaluée par diffusion en milieu gélosé dans chacun des centres selon la méthode Etest[®]. Au total, l'étude de la sensibilité aux antifongiques a ainsi été réalisée sur 881 isolats de *Candida*. A Nantes, elle a été effectuée sur 155 souches. Les données sont présentées en catégorisation sensible/non-sensible.

1) Données globales

Les résultats de la catégorisation en sensible ou non-sensible (comprenant les souches de sensibilité diminuée et les souches résistantes) pour l'ensemble des souches, toutes espèces confondues, sont présentés dans le Tableau 33.

Tableau 33 : Sensibilité aux antifongiques pour l'ensemble des souches testées (n=881)

	Sensible		Non-sensible		Données non disponibles
	Valeur absolue	%	Valeur absolue	%	
Fluconazole	753	85.5	125	14.2	3
Voriconazole	854	96.9	26	2.95	1
Caspofungine	876	99.4	4	0.45	1
Amphotéricine B	875	99.3	4	0.45	2
5-fluorocytosine	789	89.6	90	10.20	2

14% des souches sont ainsi résistantes au fluconazole, mais ce chiffre doit être interprété en fonction de l'espèce étudiée du fait des variations de la sensibilité naturelle à cet antifongique. Le voriconazole présente une bonne activité avec près de 97% des souches présentant une CMI inférieure à 1µg/ml. On observe que les résistances à la caspofungine et à l'amphotéricine B restent exceptionnelles.

a) Sensibilités aux antifongiques en fonction des services

La sensibilité au fluconazole est plus variable selon les services, avec moins de souches sensibles dans les services d'hématologie, adulte et pédiatrique. Il y a peu de différences pour le voriconazole (cf. Figure 36).

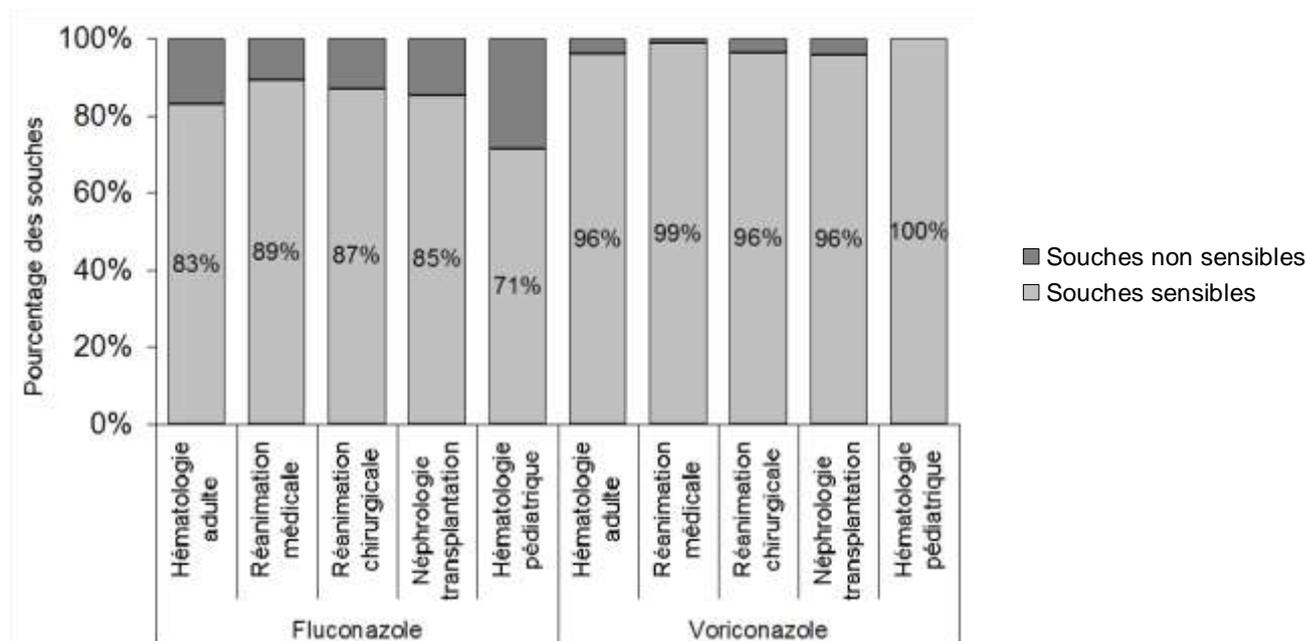


Figure 36 : Sensibilités des isolats au fluconazole et au voriconazole en fonction des différents services.

Concernant la caspofungine, les souches non-sensibles provenaient de l'hématologie adulte, de la réanimation chirurgicale et de l'hématologie pédiatrique.

Les 4 souches non-sensibles à l'amphotéricine B provenaient de l'hématologie adulte et de la réanimation médicale.

Les pourcentages de souches non-sensibles à la 5-fluorocytosine sont comparables dans les trois principaux services, aux alentours de 90% (cf. Tableau 34).

Tableau 34 : Sensibilité à la 5-fluorocytosine en fonction des services

	Hématologie adulte	Réanimation médicale	Réanimation chirurgicale	Néphrologie transplantation	Hématologie pédiatrique
Nombre de souches testées	310	259	241	48	21
Nombre de souches sensibles à la 5-fluorocytosine	273	231	222	46	17
Pourcentage	88.1%	89.2%	92, »%	95.8%	81.0%

b) Sensibilités aux antifongiques en fonction de l'espèce

Le nombre d'isolats testés pour chacune des espèces est listé dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Souches pour lesquelles la sensibilité aux antifongiques a été évaluée.

Nom usuel	Effectif	Pourcentage
<i>C. albicans</i>	518	58.8%
<i>C. glabrata</i>	120	13.6%
<i>C. tropicalis</i>	53	6.0%
<i>C. parapsilosis</i>	49	5.6%
<i>C. kefyr</i>	39	4.4%
<i>C. krusei</i>	30	3.4%
<i>C. dubliniensis</i>	22	2.5%
<i>C. lusitaniae</i>	16	1.8%
<i>C. inconspicua</i>	12	1.4%
<i>C. guilliermondii</i>	5	0.6%
<i>C. fabianii</i>	4	0.5%
<i>C. orthopsilosis</i>	3	0.3%
<i>C. fermentati</i>	3	0.3%
<i>C. intermedia</i>	2	0.2%
<i>C. bracarensis</i>	1	0.1%
<i>C. lipolytica</i>	1	0.1%
<i>C. magnoliae</i>	1	0.1%
<i>C. sphaerica</i>	1	0.1%
<i>C. utilis</i>	1	0.1%
TOTAL	881	

◆ Sensibilité aux azolés

Le pourcentage de souches sensibles en fonction de l'espèce pour le fluconazole et le voriconazole est présenté dans le Tableau 36.

Tableau 36 : Sensibilité au fluconazole et au voriconazole en fonction de l'espèce de *Candida*.
Les espèces avec un ou deux isolats testés ne sont pas représentées.
Les espèces présentant une sensibilité diminuée aux azolés plus marquée apparaissent en gras.

Espèce	n=	Nombre et pourcentage de souches sensibles			
		fluconazole		voriconazole	
<i>C. albicans</i>	518	513	99.4%	518	100.0%
<i>C. glabrata</i>	120	48	40.3%	97	80.8%
<i>C. tropicalis</i>	53	51	96.2%	53	100.0%
<i>C. parapsilosis</i>	49	47	95.9%	48	100.0%
<i>C. kefyr</i>	39	39	100.0%	39	100.0%
<i>C. krusei</i>	30	0	0.0%	30	100.0%
<i>C. dubliniensis</i>	22	21	95.5%	21	95.5%
<i>C. lusitaniae</i>	16	15	93.8%	16	100.0%
<i>C. inconspicua</i>	12	0	0.0%	12	100.0%
<i>C. guilliermondii</i>	5	4	80.0%	4	80.0%
<i>C. fabianii</i>	4	4	100.0%	4	100.0%
<i>C. fermentati</i>	3	3	100.0%	3	100.0%
<i>C. orthopsilosis</i>	3	2	66.7%	2	66.7%

On remarque ainsi :

- La bonne sensibilité de *C. albicans* au fluconazole, avec plus de 99% des isolats présentant une CMI inférieure ou égal à 8 µg/ml.
- *C. glabrata* est moins sensible aux azolés que les autres espèces (cf. Annexe n°8, page 125). Il représente d'ailleurs près de 58% (72/125) des souches résistantes au fluconazole de l'étude.
- La résistance de l'ensemble des souches de *C. krusei* au fluconazole est une des caractéristiques de cette espèce. L'ensemble des souches de cette espèce était par ailleurs sensibles au voriconazole.
- La faible activité du fluconazole sur l'ensemble des souches de *C. inconspicua*.

Le nombre de *C. orthopsilosis* isolé dans cette étude est insuffisant pour pouvoir comparer la sensibilité de cette espèce avec *C. parapsilosis*. Néanmoins il faut souligner que nous avons pu isoler une souche de *C. orthopsilosis* résistante au fluconazole et au voriconazole chez un patient d'hématologie pris en charge à Nantes pour une aspergillose pulmonaire invasive et traité par voriconazole depuis plusieurs semaines.

Concernant les espèces rares, non présentées dans le tableau précédent du fait du faible nombre d'isolats, (*C. intermedia*, *C. bracarensis*, *C. lipolytica*, *C. magnoliae*, *C. sphaerica* et *C. utilis*), toutes les souches étaient sensibles à ces deux antifongiques, à l'exception d'une souche identifiée comme *C. magnoliae*, présentant une CMI supérieure à 256 µg/ml vis-à-vis du fluconazole.

♦ **Sensibilité à la caspofungine**

La très grande majorité des espèces présentait des CMI basses pour cet antifongique, confirmant que les échinocandines ont une bonne activité sur les espèces les plus fréquentes.

Quatre souches présentaient des CMI supérieures ou égales à 2 µg/ml. Il s'agissait de :

- 2 souches de *C. parapsilosis* sur les 49 souches testées de cette espèce (95.9% de *C. parapsilosis* avaient donc une CMI inférieure à 2 µg/ml).
- 2 souches de *C. guilliermondii* sur les 5 souches testées de cette espèce (60% de *C. guilliermondii* avaient une CMI inférieure à 2 µg/ml).

Ces deux espèces sont connues pour avoir des CMI plus élevées aux échinocandines. Cela s'observe d'ailleurs sur la distribution de l'ensemble des CMI (cf. Annexe n°9, page 126), qui est décalée vers des CMI plus élevées pour *C. parapsilosis* par rapport à d'autres espèces, comme *C. albicans* ou *C. glabrata*. Le nombre de *C. guilliermondii* testés dans l'étude est insuffisant pour mettre en évidence une tendance équivalente pour cette espèce.

♦ **Sensibilité à l'amphotéricine B**

Toutes les souches testées étaient sensibles à cet antifongique, à l'exception d'une souche de *C. glabrata*, une souche de *C. tropicalis* et deux *C. krusei*, qui avaient toutes des CMI légèrement supérieures au seuil, à 1,5 µg/ml.

♦ **Sensibilité *in vitro* à la 5-fluorocytosine en fonction de l'espèce considérée**

Le pourcentage de souches sensibles en fonction de l'espèce pour cet antifongique est présenté dans le Tableau 37. Il existe une grande disparité de sensibilité pour la 5-fluorocytosine. Toutes les souches de *C. krusei* étaient résistantes à la 5-fluorocytosine, cette résistance intrinsèque fait partie des caractéristiques de cette espèce.

**Tableau 37 : Sensibilité à la 5-fluorocytosine en fonction de l'espèce.
Les espèces avec un ou deux isolats testés ne sont pas représentées.**

Espèce	Total	Nombre et pourcentage de souches sensibles à la 5-fluorocytosine	
<i>C. albicans</i>	518	501	97.1%
<i>C. glabrata</i>	120	118	98.3%
<i>C. tropicalis</i>	53	37	69.8%
<i>C. parapsilosis</i>	49	48	98.0%
<i>C. kefyr</i>	39	31	79.5%
<i>C. krusei</i>	30	0	0.0%
<i>C. dubliniensis</i>	22	19	86.4%
<i>C. lusitaniae</i>	16	6	37.5%
<i>C. inconspicua</i>	12	11	91.7%
<i>C. guilliermondii</i>	5	5	100.0%
<i>C. fabianii</i>	4	4	100.0%
<i>C. fermentati</i>	3	3	100.0%
<i>C. orthopsilosis</i>	3	1	33.3%

Concernant les espèces rares, avec peu d'isolats, non présentées dans le tableau précédent, (*C. intermedia*, *C. bracarensis*, *C. lipolytica*, *C. magnoliae*, *C. sphaerica* et *C. utilis*), seules les souches de *C. lipolytica* et de *C. magnoliae* étaient résistantes à cet antifongique, cette dernière étant également résistante au fluconazole, comme vu précédemment.

2) Épidémiologie locale et comparative

A Nantes, les CMI ont été réalisées pour 155 souches de *Candida*. Les résultats obtenus sont comparés ici avec les résultats de l'ensemble des autres centres (soit 726 souches).

Sur l'ensemble des souches toutes espèces confondues, les pourcentages de résistance aux azolés (fluconazole et voriconazole) sont parfaitement comparables entre Nantes et l'ensemble des autres centres.

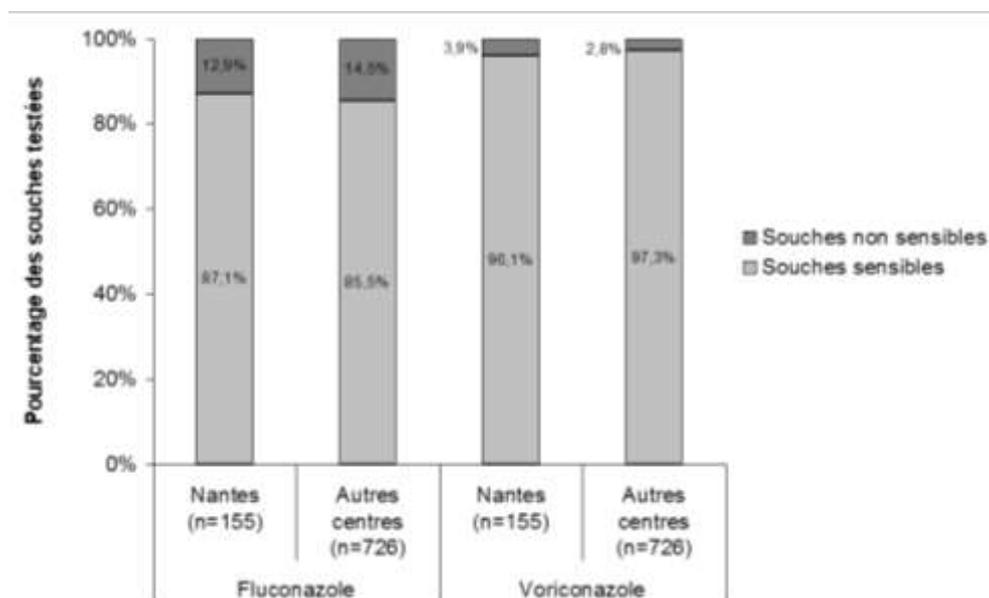


Figure 37 : Comparaison des résistances aux azolés entre Nantes et l'ensemble des autres centres.

Par ailleurs, il semble qu'il y ait en moyenne moins de souches de sensibilité diminuée à la 5-fluorocytosine à Nantes que dans l'ensemble des autres centres (4,5% vs 11,4%).

Aucune des souches testées de Nantes n'était résistante à l'amphotéricine B ou à la caspofungine.

a) Sensibilité aux antifongiques en fonction des services

La répartition de la sensibilité à la 5-fluorocytosine, au fluconazole et au voriconazole dans les trois services inclus dans l'étude à Nantes est présentée dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Sensibilité au fluconazole et au voriconazole dans les trois services du CHU de Nantes.

Service	Nombre de souches analysées	Nombre de souches sensibles			
		Fluconazole		Voriconazole	
Hématologie adulte	68	56	82.4%	65	95.6%
Réanimation médicale	29	28	96.5%	29	100%
Réanimation chirurgicale	58	51	87.9%	55	94.8%

Un point notable est le pourcentage plus faible de souches sensibles au fluconazole en hématologie par rapport aux services de réanimation médicale et chirurgicale.

Par ailleurs, les pourcentages de sensibilités à la 5-fluorocytosine sont comparables entre ces trois services, de l'ordre de 95% des souches sont sensibles.

b) En fonction des espèces

Si l'ensemble des souches incluses à Nantes sont sensibles à la caspofungine et à l'amphotéricine B, il est intéressant de détailler quelles espèces correspondaient aux souches résistantes aux azolés puis à la 5-fluorocytosine.

♦ *Fluconazole et voriconazole*

Au total, 20 souches sur les 155 de Nantes étaient résistantes au fluconazole.

Sont essentiellement concernées des espèces connues avec une moindre sensibilité naturelle.

Ainsi, parmi ces 20 souches, il a été retrouvé comme non-sensibles :

- 13 souches de *C. glabrata* sur les 27 testées ; ainsi près de 50% des isolats de cette espèce sont résistants au fluconazole, avec des CMI allant de 8 µg/ml à plus de 256 µg/ml.
- une souche de *C. guilliermondii* sur les 2 testées (CMI à 16 µg/ml).
- la totalité des 4 souches de *C. krusei* testées, cette espèce étant résistante intrinsèquement à cet antifongique.

Deux autres souches présentaient des CMI élevées, et cela de façon inhabituelle pour l'espèce :

- la souche de *C. orthopsilosis* (CMI à 48 µg/ml) ; comme évoqué précédemment, elle provenait d'une patiente traitée depuis plusieurs semaines par voriconazole pour une aspergillose pulmonaire.
- une souche de *C. dubliniensis* sur les 4 testées (CMI>256 µg/ml).

Concernant le voriconazole, six souches étaient résistantes. L'ensemble de ces souches étaient également résistantes au fluconazole, avec des CMI élevées, de 48 µg/ml ou supérieures à 256 µg/ml. Cela comprenait quatre souches de *C. glabrata* sur les 27 testées (CMI entre 3 et 4 µg/ml), ce qui est concordant avec la moindre sensibilité naturelle de cette espèce.

Il est intéressant de remarquer que les deux souches résistantes au fluconazole de façon non attendue étaient également résistantes au voriconazole : la souche de *C. orthopsilosis* avait une CMI à 3 µg/ml et la souche de *C. dubliniensis* une CMI supérieure 32 µg/ml.

♦ **5-fluorocytosine**

A Nantes, sept souches étaient résistantes à la 5-fluorocytosine. Il s'agissait des espèces suivantes :

- la totalité des 4 souches de *C. krusei* testées, espèce intrinsèquement résistante à cet antifongique (CMI entre 6 et 12 µg/ml)
- une souche de *C. albicans* sur les 97 testées pour cette espèce (CMI >32 µg/ml)
- une souche de *C. parapsilosis* sur les 5 testées pour cette espèce (CMI>32 µg/ml)
- une souche de *C. tropicalis* sur les 9 testées pour cette espèce (CMI>32 µg/ml).

La résistance à la 5-fluorocytosine est donc au final assez inhabituelle à Nantes.

Discussion

L'étude EPICANDI, dont les principaux résultats font l'objet de ce manuscrit, est une étude épidémiologique prospective et multi-centrique. Son objectif était de connaître et de comparer les écologies locales des levures du genre *Candida* dans les services hébergeant des patients à haut risque d'infection invasive, en particulier dans les services d'hématologie et de réanimation.

♦ **Méthodologie de l'étude**

La stratégie retenue pour cette étude épidémiologique a été de ne pas la limiter aux seuls isolats provenant de prélèvements profonds et correspondant donc aux candidoses invasives mais au contraire d'élargir l'analyse à l'ensemble des souches de *Candida* isolées des patients à risque, qu'elles proviennent de prélèvements profonds ou superficiels.

Ce choix peut être discuté : les levures présentes dans les sites superficiels, hors contexte d'infection évident, peuvent appartenir à la flore commensale normale et n'ont pas, dans l'absolu, fait la preuve de leur pouvoir pathogène. Cependant, comme nous l'avons vu, il existe un réel continuum entre l'état commensal des levures et l'infection, les levures isolées de sites profonds et responsables de candidoses invasives ayant généralement d'abord colonisé les muqueuses, le plus souvent d'ailleurs au niveau digestif. D'autre part, certaines espèces, qui auparavant ne semblaient pouvoir chez l'homme que coloniser occasionnellement les muqueuses sans avoir de réel pouvoir pathogène, ont finalement été isolées de sites profonds. Ainsi certaines espèces isolées dans notre étude, n'ont jamais été décrites comme à l'origine d'infections invasives (aucun cas d'infection n'a ainsi été décrit pour *C. ethanolica*). Pour d'autres espèces, le caractère pathogène est exceptionnel, comme illustré pour *C. magnoliae*, un seul cas de candidémie à *C. magnoliae* et un cas de ténosynovite ayant été publié (LANE *et al.* 2001; LO CASCIO *et al.* 2007). Toutefois, du fait du caractère opportuniste de ces levures, il n'est pas exclu que dans l'avenir d'autres cas ne soient décrits, en particulier chez des patients fortement immunodéprimés. L'étude EPICANDI a donc eu pour objectif d'évaluer de manière ponctuelle, l'environnement fongique dans lequel évoluent les patients à risque de candidoses invasives.

Inclure les isolats provenant de tous types de prélèvements présentait également l'avantage de permettre la collection d'un plus grand nombre de souches. Les candidoses invasives sont des événements qui restent peu fréquents. Ainsi, sur la période étudiée, relativement courte (deux mois), sur l'ensemble des huit centres, seules 75 souches provenant de prélèvements d'origine

profonde ont été incluses, ce qui est clairement insuffisant pour dégager des tendances épidémiologiques statistiquement significatives.

La plupart des études épidémiologiques sur les candidémies menées à ce jour sont d'ailleurs le résultat d'une analyse rétrospective ce qui permet d'avoir un recrutement plus important. En revanche, l'inclusion n'est alors pas réalisée de façon standardisée comme dans une étude prospective, avec par exemple une même stratégie d'identification. Un des avantages de l'étude EPICANDI est d'avoir été conduite de manière prospective, les isolats ayant tous été identifiés et conservés selon un protocole commun, établi à l'avance.

Un des points forts de cette étude est son caractère multi-centrique. En effet, huit centres hospitalo-universitaires y ont participé, permettant ainsi à la fois d'avoir une vision globale d'une partie de l'épidémiologie des *Candida* en France mais également de permettre la comparaison des écologies locales. Une bonne connaissance de l'épidémiologie locale est d'ailleurs indispensable comme souligné dans les dernières recommandations de la Société Américaine de Maladies Infectieuses (« Infectious Diseases Society of America ») (PAPPAS *et al.* 2009).

A notre connaissance, il n'y eu a ce jour que peu d'études portant sur l'épidémiologie des levures du genre *Candida* en France alors qu'il existe de nombreuses études épidémiologiques menées par des équipes nord-américaines et incluant généralement un grand nombre de souches. Or, comme nous l'avons développé dans la première partie de ce travail, l'épidémiologie nord-américaine n'est pas parfaitement superposable à l'épidémiologie française ou même européenne, tant sur le plan de la distribution des espèces que sur la résistance aux antifongiques. Si des études européennes commencent à être de plus en plus publiées depuis la fin des années 1990, on y observe une diversité entre les différents pays, plus ou moins marquée selon l'espèce ou l'antifongique étudiés (TORTORANO *et al.* 2006). Certaines de ces études objectivent généralement également des variations à plus petite échelle, soit entre les différents types d'hôpitaux (général, universitaires) soit entre les villes (POIKONEN *et al.* 2010; YOO *et al.* 2009).

La plupart des études sur l'épidémiologie française des levures du genre *Candida* ont été réalisées sur un seul centre (HONDERLICK *et al.* 2007; MARTIN *et al.* 2005; SENDID *et al.* 2006a; THIERRY *et al.* 2011). Cette approche présente l'avantage de connaître l'épidémiologie locale des centres concernés, mais elle reste également difficilement extrapolable aux autres centres hospitaliers, même proches. La comparaison des résultats obtenus dans ces diverses études, même si leurs conditions de réalisation ne sont pas identiques, montre qu'il existe

effectivement des variations épidémiologiques significatives entre les centres. Par ailleurs, la plupart de ces études françaises n'avait pas pour objectif d'aborder la sensibilité *in vitro* des levures isolées, contrairement à l'étude EPICANDI. Ainsi, une des premières études sur l'épidémiologie française des levures du genre *Candida*, qui extrapole les données de 25 centres pour estimer l'épidémiologie française (RICHEL *et al.* 2002), fournit des données sur l'incidence des candidémies et la distribution des différentes espèces responsables, mais aucune sur la sensibilité des levures vis-à-vis des antifongiques.

Les huit centres participants de notre étude correspondent à huit centres hospitalo-universitaires de France métropolitaine. Ces centres, au statut administratif comparable, présentent des différences structurelles sur plusieurs points : i) leur nombre de lits, ce qui se reflète sur le nombre total de souches incluses entre les centres, ii) leurs bassins de population, iii) l'organisation entre les différents services qui ont des importances relatives variables d'un centre à l'autre. Dans l'étude EPICANDI, cette disparité d'organisation a influé sur la provenance des patients concernés par l'étude. Si plus des deux-tiers de l'ensemble des patients étaient hospitalisés en hématologie adulte et en réanimation médicale, cette répartition n'était pas homogène d'un centre hospitalier à l'autre. Ainsi, à l'hôpital Necker Enfants Malades, l'importance de l'hématologie pédiatrique est plus grande alors qu'à Lille, la réanimation médicale occupe une place prépondérante par rapport aux autres centres. A Nantes, la répartition des patients se situe plutôt dans la moyenne, la majorité de la cohorte étant constituée de patients d'hématologie adulte. Cette disparité doit être prise en compte car elle est susceptible d'introduire un biais dans la comparaison des épidémiologies locales entre les huit centres. Le type de service est en effet un des facteurs influençant notablement l'épidémiologie des levures du genre *Candida*. Cependant, les résultats obtenus restent bien le reflet de la réalité locale.

Nous avons pu également observer des différences entre les types de prélèvements à partir desquels ont été isolées les souches de *Candida*. Ainsi, les prélèvements de type buccaux sont sur-représentés à l'hôpital Saint-Louis en comparaison des autres centres. Il en est de même pour les prélèvements d'origine respiratoire à Lille alors qu'à Nantes, les prélèvements sont majoritairement d'origine digestive et les prélèvements urinaires sont rares par rapport aux autres centres hospitaliers. Cette disparité est probablement en partie une conséquence de la variation des importances relatives du type de services entre les centres mais est également le reflet des disparités des pratiques médicales en matière de prélèvements d'un centre à l'autre.

♦ **Intérêt de la biologie moléculaire pour l'identification des levures**

L'ensemble des levures incluses dans l'étude EPICANDI a été identifié selon une démarche d'identification phénotypique standardisée entre les centres, similaire à celle utilisée habituellement dans les laboratoires de mycologie. Dans un souci d'exactitude de l'identification de chacune des souches incluses, cette identification a été vérifiée par biologie moléculaire à chaque fois que cela était nécessaire. En effet, la plupart des études épidémiologiques réalisées jusqu'alors repose le plus souvent sur les données d'identifications phénotypiques. Comme nous l'avons vu, si cette identification est performante pour les espèces les plus fréquentes, elle peut parfois être prise en défaut, notamment pour les espèces appartenant à des complexes d'espèces proches avec aucune ou peu de différences phénotypiques ou pour certaines espèces rares, dont les caractéristiques phénotypiques ne sont pas rapportées dans les bases de données des galeries d'identification. Certaines erreurs apparaissent ainsi de façon récurrente dans la littérature, comme *C. inconspicua* identifiées phénotypiquement comme *C. norvegensis* ou *C. famata* qui semble être souvent une identification par excès (DESNOS-OLLIVIER *et al.* 2008b; MAJOROS *et al.* 2003).

Dans notre étude, il a donc été choisi de vérifier systématiquement l'identification de certaines souches par le séquençage des régions ITS, parfois complété par l'analyse de la région D1/D2 de l'ADNr. L'identification moléculaire est une technique souvent prise en référence pour l'identification des levures. La technique que nous avons utilisée dans l'étude EPICANDI est de type « PCR colony ». En pratique, l'identification est réalisée à partir d'une colonie isolée en culture, en s'affranchissant de l'étape d'extraction. Cette méthode, relativement peu rapportée dans la littérature, présente un avantage certain en terme de coût et de simplicité de réalisation (ALSHAHNI *et al.* 2009; MIRHENDI *et al.* 2007). A l'occasion de l'étude EPICANDI, la bonne performance de cette méthode a pu être constatée, l'ensemble des souches ayant pu être analysées à l'exception notable de quelques isolats de *C. kefyri* qui ont nécessité une étape d'extraction sans que l'on puisse pour le moment trouver une explication à cette exception.

L'utilisation de la biologie moléculaire pour l'identification des levures nécessite un équipement adapté et un personnel entraîné à ces techniques mais également une certaine expérience pour l'interprétation des séquences obtenues. Il faut notamment connaître les limites des bases de données publiques, comme GenBank. Cette base de données, probablement la plus utilisée et la plus exhaustive, présente l'avantage d'être disponible gratuitement mais présente quelques limites. Ainsi, un certain nombre des séquences qui y

sont déposées est erroné. Ces erreurs d'enregistrement des séquences présentes dans la base peuvent survenir dans la mesure où elles sont sous la seule responsabilité de celui qui les soumet. Si elles ne semblent pas exceptionnelles pour certains champignons filamenteux (DE HOOG and HORRE 2002), au cours de notre étude, aucune erreur majeure n'a été notée et n'a interféré avec l'identification retenue.

La distinction entre deux espèces distinctes de *Candida* sur la base de la séquence obtenue peut être faite aisément sur quelques nucléotides de différences, comme pour *C. guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*) et *C. fermentati* (*Pichia caribbica*), deux espèces proches phénotypiquement mais dont les séquences des régions ITS diffèrent d'une dizaine de nucléotides. A l'opposé, différents isolats d'une même espèce peuvent présenter un polymorphisme important au sein de la région ITS comme observé dans notre étude avec *C. lusitaniae*. On remarque également que cette espèce présente des variations dans son profil phénotypique, ce qui se voit à travers les scores variables obtenues par la galerie ID32C[®]. A noter que cette diversité génétique de *C. lusitaniae* a déjà été rapportée par d'autres auteurs, sans que ces différences entre les souches ne soient à ce jour suffisantes pour distinguer plusieurs espèces (KOLLIA *et al.* 2003; PFALLER *et al.* 1994).

Comme attendu, l'identification par biologie moléculaire a permis de rectifier dans un certain nombre de cas l'identification phénotypique. Ainsi, une des erreurs les plus fréquemment observées dans notre étude et rapportée par d'autres auteurs a concerné *C. inconspicua* qui a été identifié comme *C. norvegensis* à plusieurs reprises dans notre étude, aucune de souches de *C. norvegensis* n'ayant finalement été confirmée à l'issue de l'analyse moléculaire (CENDEJAS-BUENO *et al.* 2010; MAJOROS *et al.* 2003; NHO *et al.* 1997).

Parmi les espèces du complexe « *C. guilliermondii* », nos résultats sont en parfaite adéquation avec ceux récemment publiés par Desnos-Ollivier *et al.* qui rapportaient la fréquente confusion entre *C. fermentati* (*Pichia caribbica*) et *C. guilliermondii* (DESNOS-OLLIVIER *et al.* 2008b). Il faut également souligner dans notre étude, l'absence d'isolement de *C. famata*, confirmant que cette espèce est probablement moins souvent isolée en pathologie humaine que ce que les identifications phénotypiques ne le laissent présager.

Dans notre étude, plusieurs souches de *C. fabianii* (*Pichia fabianii*) ont été isolées de plusieurs sites de prélèvement (dont les hémocultures) chez un même patient (CHU de Bordeaux). Rarement décrite à l'origine d'infection invasive, cette espèce ne faisant pas partie de la base de données de la galerie ID32C[®] n'a pu être identifiée de manière correcte dans

notre étude, elle était confondue avec deux autres espèces *C. utilis* et *C. pelliculosa* comme décrit dans la littérature (HAMAL *et al.* 2008; VALENZA *et al.* 2006).

On retrouve également parmi les souches de l'étude un isolat de *C. sphaerica* identifié phénotypiquement comme *C. kefyra*, ce qui concorde avec les publications disponibles (CENDEJAS-BUENO *et al.* 2010; GOMEZ-LOPEZ *et al.* 2010).

Il est intéressant de souligner que la plupart des souches mal identifiées par la galerie ID32C[®] avait des scores de probabilité inférieurs à 98% (et même parfois beaucoup plus bas), comme par exemple pour les souches initialement identifiées à tort comme *C. famata*, *C. utilis*, *C. pelliculosa*. Des scores supérieurs à 98% correspondaient en général à des identifications correctes, en accord avec les données de l'identification moléculaire.

Un autre apport de l'identification moléculaire est de permettre l'identification sans ambiguïté des espèces nouvellement décrites dans les complexes d'espèces « *C. parapsilosis* » et « *C. glabrata* ». Trois isolats de *C. orthopsilosis* et un isolat de *C. bracarensis* ont ainsi été mis en évidence dans notre étude.

Les souches de *C. orthopsilosis* étaient identifiées en tant que *C. parapsilosis* avec des excellents scores de probabilité de la galerie ID32C[®], ces trois espèces ont en effet le même profil phénotypique (TAVANTI *et al.* 2005). L'isolat de *C. bracarensis* n'avait pas pu être identifié phénotypiquement par le test RTT *Glabrata*[®], ce qui correspond à ce qui a déjà été décrit (WAHYUNINGSIH *et al.* 2008)

Au final, le nombre de souches isolées de ces complexes dans l'étude EPICANDI est en accord avec les données de la littérature. Dans le complexe « *C. parapsilosis* », nous rapportons ainsi une prévalence de 3,6% de *C. orthopsilosis* mais aucun *C. metapsilosis*. Dans une étude conduite en 2008, en Europe, *C. orthopsilosis* représentait 3,5% des souches du complexe et *C. metapsilosis* 2,9% (LOCKHART *et al.* 2008). Un seul isolat du complexe « *glabrata* » ne correspondait pas à *C. glabrata stricto sensu*, ce qui est concordant avec la très faible prévalence de *C. bracarensis* et *C. nivariensis* décrite dans les études disponibles (CUENCA-ESTRELLA *et al.* 2011; LOCKHART *et al.* 2009a). Le nombre limité de souches isolées des différents membres de ces complexes ne permet par contre pas de conclure à la présence ou non de différences significatives dans leur profil de résistance aux antifongiques dans cette étude. Les données disponibles à ce jour sont d'ailleurs insuffisantes pour savoir si une telle précision dans l'identification précise d'espèce au sein de ces complexes est ou non justifiée dans une pratique de routine d'un laboratoire de mycologie.

Concernant *C. dubliniensis*, on remarque également dans notre étude que sa prévalence dans l'ensemble *C. albicans/C. dubliniensis* (4,0%) est concordante avec les données publiées (de 1 à 5%) sur l'épidémiologie des patients non infectés par le VIH, ce qui correspond aux patients inclus dans l'étude (SULLIVAN *et al.* 2004). Dans l'étude EPICANDI, la sensibilité aux antifongiques de ces deux espèces, notamment aux azolés, ne semble pas significativement différente.

♦ **Données actuelles sur l'épidémiologie des *Candida* en France**

Les résultats de l'étude EPICANDI concernant l'épidémiologie des *Candida* du point de vue de la distribution des espèces est au moins en partie superposable aux données décrites dans la littérature.

Au cours de notre étude, l'identification exacte des levures a pu être obtenue, ce qui a permis d'évaluer correctement la prévalence des différentes espèces peu fréquentes. Au total, des isolats appartenant à 20 espèces différentes de *Candida* ont été isolées. L'ensemble « *Candida non-albicans* » couvre un éventail varié d'espèces, dont certaines ont rarement été isolées chez l'homme (*C. ethanolica*, *C. magnoliae*, *C. fabianii*...). Il y a également des « grands » absents dans cette étude : aucune souche de *C. famata* ou de *C. norvegensis* n'a été isolée.

Nos résultats montrent que *C. albicans* est encore l'espèce majoritaire représentant plus de la moitié des souches isolées. Cela correspond aux résultats des différentes études françaises présentées dans la première partie de ce travail, dans lesquelles *C. albicans* représentent 49 à 57% des isolats (HONDERLICK *et al.* 2007; LEROY *et al.* 2009; MARTIN *et al.* 2005; TALARMIN *et al.* 2009; THIERRY *et al.* 2011). *Candida glabrata* est la deuxième espèce par ordre de fréquence, suivi par *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* deux espèces présentant des prévalences globales équivalentes. Là encore, cela correspond aux données épidémiologiques françaises disponibles, qui ne sont pas superposables à celles décrites dans d'autres pays européens.

L'analyse globale de l'étude EPICANDI concernant la prévalence des espèces les plus fréquentes est donc concordante avec les données de la littérature à l'exception notable de *C. kefyr*, qui est ici plus fréquent que *C. krusei* et devient donc la 5^{ème} espèce de *Candida* par ordre de fréquence. Dans les études nord-américaines, l'émergence de cette espèce n'est pas spécifiquement remarquée, elle semble en effet rester rare et être moins fréquente que *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae* (PFALLER and DIEKEMA 2007). Par contre, au niveau européen, une publication française faisait état d'une forte prévalence (4,8%) de cette espèce

parmi les patients d'hématologie colonisée à *Candida* par rapport aux patients d'autres services (SENDID *et al.* 2006b). L'association entre *C. kefyr* et les services d'hématologie était également suggéré dans une étude plus ancienne rapportant plusieurs cas de candidémies à *C. kefyr* chez des patients neutropéniques en Allemagne (REUTER *et al.* 2005). Dans l'étude EPICANDI, on observe effectivement sur les données globales que dans le service d'hématologie, *C. kefyr* est la troisième espèce isolée, après *C. albicans* et *C. glabrata* mais surtout devant *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*. Dans les autres services, son importance est moins grande. D'un centre hospitalier à l'autre, la place de cette espèce émergente semble varier, avec une prévalence qui semble plus importante à Tours et Bordeaux.

On remarque que les espèces dites rares sont plus prévalentes dans les services d'hématologie adulte (8,8%) ou pédiatrique que dans les services de réanimation médicale et chirurgicale ou de transplantation rénale (de l'ordre de 4%). Cette spécificité des services d'hématologie correspond à ce qui est décrit dans la littérature. A l'inverse, les services de réanimation médicale et chirurgicale ainsi que les services de transplantation rénale présentent une prévalence plus importante de *C. parapsilosis* que les services d'hématologie.

La distribution des espèces isolées de prélèvements profonds montre comme pour l'ensemble des isolats, la prédominance nette de *C. albicans*, de plus de 60%. On remarque que *C. kefyr* est là aussi plus fréquent qu'attendu puisqu'il est la troisième espèce par ordre de fréquence, à des niveaux certes équivalents à *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*. On note en outre, parmi ces isolats issus de prélèvements profonds, la présence non négligeable d'espèces rares, notamment *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae* mais également *C. fabianii*.

Comme nous avons pu le montrer, la distribution des espèces varie également significativement d'un centre à l'autre. Ces variations peuvent en partie s'expliquer par l'importance relative de chacun des services dans chaque centre. Ainsi, on note la plus forte proportion de *C. parapsilosis* à Lille, où une majorité de patients provient de réanimation médicale. *Candida albicans* est moins fréquent à Bordeaux par rapport aux autres villes alors que beaucoup de patients provenaient d'hématologie adulte. A l'opposé, à Poitiers, la majorité des patients provient également d'hématologie adulte et c'est dans cette ville que l'on retrouve la plus forte prévalence de *C. albicans* (près de 80%). Les variations de distribution des espèces ne peuvent donc pas uniquement s'expliquer par un biais de sélection et révèlent donc bien que les épidémiologies locales ne sont pas exactement superposables d'un centre à l'autre.

A Nantes, on note les mêmes tendances globales dans la comparaison des services : très peu d'espèces non-*albicans* dans les services de réanimation, moins de *C. albicans* et plus d'espèces rares en hématologie. On peut également remarquer que *C. tropicalis* est plus prévalent en hématologie à Nantes que dans les autres centres, allant dans le sens de ce qui a déjà été publié il y a quelques années (VIGOUROUX *et al.* 2006). A noter que cette tendance semble encore se confirmer ces dernières années (MORIO and TADEC Données non publiées). L'épidémiologie des *Candida* à Nantes, en ce qui concerne la distribution des espèces, est plutôt concordante avec les données de la littérature. Par contre, si *C. albicans* est l'espèce majoritaire, parmi les espèces non-*albicans*, on note la nette prédominance de *C. glabrata*, espèce de moindre sensibilité au fluconazole.

♦ **Données actuelles sur la sensibilité aux antifongiques**

La sensibilité aux antifongiques des souches incluses dans l'étude EPICANDI a été étudiée par technique Etest[®]. Il ne s'agit pas d'une technique de référence comme celles proposées par l'EUCAST ou le CLSI, cependant plusieurs études montrent que la technique Etest[®] est bien corrélée à ces méthodes pour les différents antifongiques testés dans cette étude et est de réalisation technique plus aisée (DIEKEMA *et al.* 2007; PFALLER *et al.* 2010b; PFALLER *et al.* 1998a). De plus, il s'agit de la technique la plus utilisée dans les laboratoires de routine de mycologie, les résultats obtenus dans l'étude EPICANDI présentent donc l'intérêt d'être facilement extrapolables aux résultats rendus habituellement.

La lecture des CMI peut présenter des difficultés, notamment avec l'effet de traîne pour les azolés, et nécessite un lecteur entraîné. Le risque d'erreur à ce niveau n'a pas été particulièrement pris en compte dans l'étude EPICANDI, la lecture des CMI étant réalisée au sein de laboratoires qui utilisent de manière courante cette technique. A Nantes, les CMI de chaque isolat testé ont été systématiquement lues par au moins deux personnes différentes, en aveugle. Nous avons pu constater une bonne reproductibilité des lectures, l'écart entre de CMI obtenues ne dépassait généralement pas une dilution, ce qui, en termes de CMI, n'est pas significativement différent.

Pour permettre l'analyse des résultats des CMI obtenues et faciliter la comparaison des données, chaque souche a été classée en sensibles ou non-sensibles. Les seuils retenus pour la catégorisation étaient ceux universellement reconnus dans la littérature au moment du lancement et de la réalisation de l'étude (soit fin 2009 – début 2010). Depuis, ces valeurs

critiques de sensibilité/résistance ont été largement revues pour les azolés et les échinocandines aboutissant à proposer des seuils critiques adaptés à l'espèce (PFALLER *et al.* 2011a; PFALLER *et al.* 2010a; PFALLER *et al.* 2011c). Cependant, ces seuils adaptés à l'espèce ne sont disponibles que pour les espèces les plus fréquentes. Le seuil de sensibilité vis-à-vis du fluconazole a ainsi été abaissé à 2 µg/ml pour *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*. Parmi les souches étudiées dans notre étude, à l'exception d'un isolat de *C. parapsilosis* devenant non-sensible, l'ensemble des isolats des espèces *C. albicans*, *C. parapsilosis* ou de *C. tropicalis* restent sensibles si l'on considère ce nouveau seuil critique d'interprétation. L'interprétation globale n'est donc pas modifiée pour ces espèces. Concernant *C. glabrata*, espèce dorénavant considérée systématiquement comme de sensibilité diminuée au fluconazole mais résistante pour des CMI supérieures ou égales à 64 µg/ml, la majorité des souches de l'étude EPICANDI apparaissent de sensibilité diminuée et relativement peu apparaissent résistantes.

L'étude de la sensibilité aux antifongiques des souches conduite dans le cadre de l'étude EPICANDI a permis de mettre en évidence plusieurs tendances.

Tout d'abord, les résultats de la sensibilité aux azolés pour l'ensemble des souches donnent des résultats concordant avec les données de la littérature : dans la zone Europe, des chiffres de 16,5% de souches résistantes au fluconazole et de 5,6% pour le voriconazole sont ainsi publiés (PFALLER and DIEKEMA 2007). Le taux de non-sensibilité au voriconazole est même légèrement inférieur (2,95%) dans notre étude. Parmi les 14,2% de souches non-sensibles au fluconazole, la majorité correspond à des résistances « attendues », *C. glabrata* représentant plus de 50% de ces souches. Ainsi, relativement peu de résistances acquises aux azolés (espèces naturellement sensibles) ont été finalement mis en évidence. Concernant *C. albicans*, seuls 5 isolats apparaissent non sensible au fluconazole ce qui correspond aux données récentes de la littérature internationale rapportant une prévalence de la résistance de moins de 2% chez cette espèce (PFALLER *et al.* 2010c). L'exploration des mécanismes intimes de la résistance aux azolés mis en jeu chez ces isolats pourra faire l'objet d'une étude ultérieure.

On note également que les services d'hématologie ont un taux de souches non-sensibles au fluconazole plus important que les services de réanimation, ce qui est à rapprocher de la plus large utilisation de la prophylaxie dans ce service ainsi que la plus grande prévalence des espèces non-*albicans* (LORTHOLARY *et al.* 2011).

Un autre point intéressant de ce travail concerne la confirmation de l'absence d'émergence de résistance à l'amphotéricine B et aux échinocandines. L'acquisition de résistance à ces deux antifongiques restent en effet rares d'après les dernières données publiées (PFALLER *et al.* 2011b; PFALLER *et al.* 2011e). Dans notre étude, la résistance aux échinocandines ou à l'amphotéricine B s'est avérée exceptionnelle. De surcroît, pour l'amphotéricine B, les CMI des souches non-sensibles restaient peu élevées, le plus souvent supérieures d'une dilution par rapport au seuil choisi. Pour les échinocandines, les souches dont les CMI étaient supérieures au seuil de non-sensibilité correspondaient aux espèces dont les CMI sont naturellement plus élevées (*C. parapsilosis* et *C. guilliermondii*). Ainsi, au cours de notre étude, aucun isolat suspect de résistance aux échinocandines n'a pu être mis en évidence.

Concernant la 5-fluorocytosine, le pourcentage de souches non-sensibles correspond aux résultats de la littérature. A Nantes, peu de souches sont résistantes à cet antifongique, qui est cependant peu utilisé dans un contexte de candidose car ne faisant pas partie des schémas thérapeutiques usuels de prise en charge.

De façon rassurante, les souches isolées des services à risque du CHU Nantes présentaient des niveaux de sensibilité aux azolés élevés et comparables aux données issues des autres centres. L'importance de la place de *C. glabrata* influence donc peu la sensibilité globale à ces antifongiques. Le service d'hématologie présente également un taux plus important de souches non-sensibles au fluconazole. Un point intéressant qui mérite d'être souligné concerne l'isolement d'une souche de *C. orthopsilosis* résistante à la fois au fluconazole et au voriconazole, isolée d'un patient d'hématologie traité par voriconazole depuis plusieurs semaines dans le cadre d'une aspergillose pulmonaire invasive. A notre connaissance il s'agit du premier cas d'acquisition de résistance acquise décrit chez cette espèce dont les mécanismes exacts de la résistance restent à explorer. Cet exemple souligne l'importance de la pression de sélection à laquelle sont soumises les levures du genre *Candida* et l'intérêt particulier de l'étude de la sensibilité aux antifongiques chez les patients hospitalisés dans les services à haut risque d'infections invasives.

Au total, l'étude EPICANDI a permis d'évaluer l'épidémiologie des levures du genre *Candida* dans les services à risques. Les résultats sont globalement concordants avec les données récentes de la littérature. On note que *C. albicans* reste l'espèce majoritaire et que la résistance acquise aux antifongiques est un événement rare.

Un autre apport de cette étude est de mettre en évidence la fréquence des erreurs d'identification par les techniques traditionnelles, raison pour laquelle l'identification moléculaire garde toute sa place dans la stratégie d'identification des levures dans les laboratoires de mycologie.

Annexes

ANNEXE n°2 : Principe du séquençage par la méthode de Sanger

La technique de séquençage désormais classique est la technique développée par Sanger dans les années 1970 (SANGER *et al.* 1977). Elle demande une amplification préalable de la zone à séquencer, avec un temps technique total de plusieurs heures.

La première étape de cette technique consiste à obtenir des copies multiples de la séquence d'ADN à séquencer. On réalise pour cela une PCR classique en point final.

Les amplicons ainsi obtenus sont séquencés par la méthode de Sanger (cf. figure suivante).

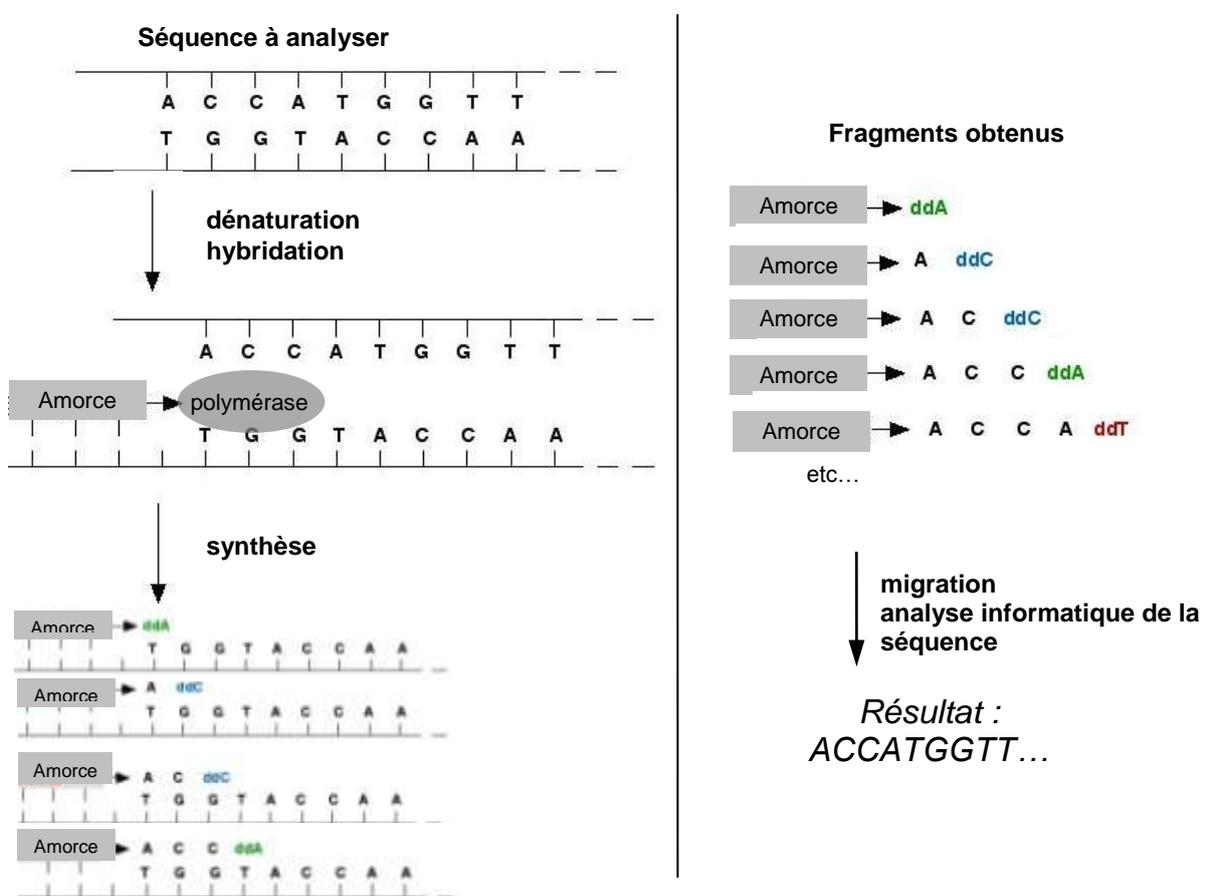


Figure 38 : La méthode de séquençage de Sanger

Le mélange réactionnel contient une ADN polymérase, une amorce, des désoxyribonucléotides (dNTP) et des didésoxyribonucléotides (ddNTP). Les ddNTP peuvent être incorporés par la polymérase dans un brin d'ADN en cours de synthèse, mais ne permettent pas qu'un autre nucléotide soit incorporé à leur suite. La polymérase incorpore aléatoirement le dNTP ou le ddNTP complémentaire à la séquence de l'amplicon étudié. Quand un ddNTP est incorporé, l'allongement du brin d'ADN s'arrête. Au final, on obtient un

mélange de brins d'ADN de taille différente en fonction du ddNTP terminal, qui sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse.

Initialement, la technique utilisait un marquage radioactif pour la révélation. Dans la technique actuelle, les quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) sont marqués avec quatre fluorophores différents. Cela en simplifie la réalisation et permet son automatisation. A Nantes, l'automate utilisé est un séquenceur 3130XL (Applied Biosystem) qui permet l'analyse simultanée de 96 séquences. L'analyse de la séquence obtenue est aidée par des logiciels spécialisés tel que SeqScape® (cf. Figure 39)

Pour obtenir la séquence d'un amplicon, on réalise généralement deux réactions, une avec l'amorce sens et l'autre avec l'amorce anti-sens, ce qui permet d'obtenir deux séquences complémentaires et d'améliorer la qualité et la longueur de la séquence.

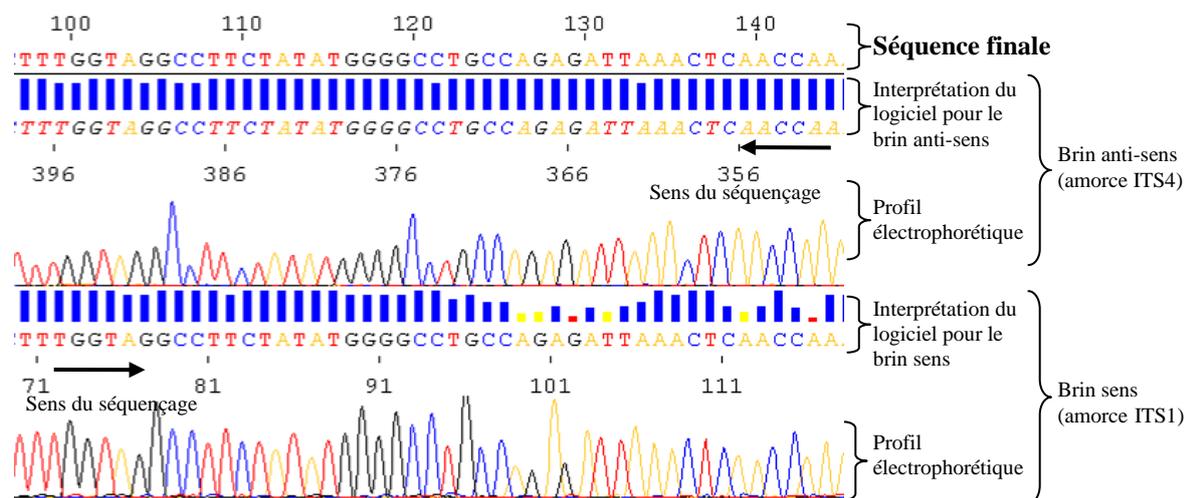


Figure 39 : Résultat du séquençage par la méthode de Sanger : analyse par le logiciel SeqScape® du séquençage de la région ITS (amorces ITS1 et ITS4) d'un *C. parapsilosis* (seule une partie de la séquence est présentée)

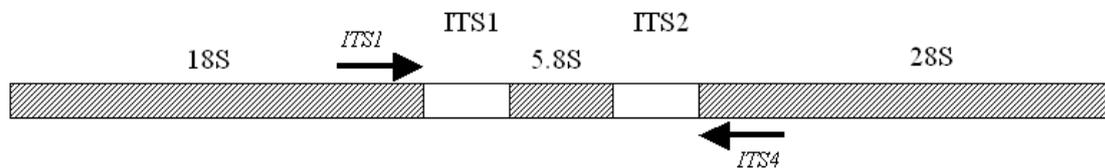
ANNEXE n°3 : Mode opératoire : identification moléculaire des champignons

I. OBJET

Identification des champignons à partir de milieux de culture, par amplification et séquençage d'une région de l'ADN ribosomal contenant les domaines intergéniques ITS1 et ITS2 et la région codante 5.8S.

II. PRINCIPE

Schéma de l'organisation du complexe génique codant pour les ARNs ribosomaux 18S, 5.8S et 28S.



La technique se décompose en deux étapes :

- **Amplification** d'un fragment contenant les régions ITS1, 5.8S et ITS2 à l'aide des amorces universelles ITS1 et ITS4.
- **Séquençage** du produit d'amplification et recherche de séquences homologues dans les bases de données internationales. Le séquençage est effectué par la Plateforme de Séquençage.

III. DOCUMENTS DE REFERENCE

O. Adam, M. Merad, S. Antoun, J.-H. Bourhis, B. Gachot, O. Casiraghi, and E. Chachaty. Intérêt de l'amplification génique à l'aide d'amorces universelles dans le diagnostic des infections fongiques chez le patient immunodéprimé. *Pathol Biol* ; 52 (2004) :544-549.

IV. DOMAINE D'APPLICATION

S'adresse aux techniciens de laboratoire ayant une formation en biologie moléculaire.

V. MODE OPERATOIRE

A. Réactifs

- ⊗ Amorces panfongiques

ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

A réception, les amorces sont reconstituées à 100 μ M (solutions mères, stockage –20°C) puis dilués à 10 μ M pour utilisation (stockage –20°C).

- ⊗ Go Taq Flexi DNA polymerase (Promega). Stockage –20°C.
- ⊗ dNTP reconstitués à 5 μ M (SIGMA). Stockage –20°C.
- ⊗ Eau pour préparation injectable (EPPI) en dosette de 10 mL.

B. Préparation du mix d'amplification

Le mix d'amplification est réalisé de la manière suivante, dans la pièce pré-PCR du laboratoire de Parasitologie-Mycologie :

	Concentration initiale		Concentration finale		Volume pour 1 tube en μ L
Tampon	5	X	1	X	10
MgCl ₂	25	mM	2	mM	4
Amorce ITS 1	10	μ M	0.5	μ M	2.5
Amorce ITS 4	10	μ M	0.5	μ M	2.5
DNTP ATCG	5	mM	0.2	mM	2
Taq polymérase	5	U/ μ L	0.03	U/ μ L	0.3
Eau PPI					23.7
ADN/tube					5
Volume final/tube					50

Dans chaque série de PCR, prévoir deux tubes supplémentaires, en plus des échantillons à tester :

- Un témoin négatif (5 μ l d'eau PPI)
- Un témoin positif (5 μ l d'extrait d'ADN d'une culture de *Candida* ou équivalent)

C. Dépôts de l'ADN

- ⊗ Si la souche est un champignon filamenteux : une extraction préalable est nécessaire
- ⊗ S'il s'agit d'une levure: Pas d'extraction d'ADN préalable.

Le dépôt de l'échantillon peut s'effectuer dans la pièce pré-PCR. Il s'effectue à l'aide d'un cône stérile à partir d'une culture sur boîte. Prélever une colonie isolée et déposer directement dans le tube contenant le mix.

D. Etape d'amplification et révélation

L'étape d'amplification s'effectue par PCR traditionnelle sur le Thermocycleur Applied Biosystem 9700 ou équivalent.

⊗ Déposer les tubes et sélectionner le **programme MYCO ITS**.

Description du programme MYCO-ITS

Dénaturation initiale : 94°C pendant 7 minutes

40 cycles comprenant :

Dénaturation : 94°C pendant 30 secondes

Hybridation : 55°C pendant 45 secondes

Elongation : 72°C pendant 1 minute

Elongation finale à 72°C pendant 7 minutes

⊗ Vérifier l'amplification par migration en gel (cf. ANNEXE n°4 : *Protocole de réalisation de gel pour électrophorèse des produits de PCR*, page n°120)

E. Séquençage des produits d'amplification

L'étape de purification des produits d'amplification présentant la bande attendue est réalisée par le laboratoire de Virologie.

Le séquençage est par la méthode de Sanger, automatisée sur séquenceur 3130XL (Applied Biosystem)

VI. ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

⊗ L'analyse des séquences s'effectue avec le logiciel Seqscape (Applied Biosystems).

L'identification moléculaire s'effectue par comparaison des séquences obtenues pour la souche à analyser avec les séquences déposées dans les bases de données internationales GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et/ou Mycobank (<http://www.cbs.knaw.nl/Medical/Defaultpage.aspx>).

ANNEXE n°4 : Protocole de réalisation de gel pour électrophorèse des produits de PCR

La visualisation des produits d'amplification obtenus par PCR s'effectue grâce à :

- L'électrophorèse des produits d'amplification dans un gel de polyacrylamide à 9% (150 à 170 volts pendant 50 minutes),
- La visualisation sous lampe UV après avoir laissé tremper les gels dans une solution de BET pendant 5 à 10 minutes.

1) Tampon utilisé pour l'électrophorèse et la fabrication du gel = TBE 10X :

TBE 10 X	Tris base	54g
	Acide borique	27,5g
	EDTA	4,65g
	H ₂ O distillée	QSP 1L

2) Solution pour le gel de polyacrylamide à 9% :

Solution Acrylamide Bisacrylamide 37,5/1 (9%)	Acrylamide 37,5/1 40%	112mL
	TBE 10X	50mL
	H ₂ O distillée	QSP 500 mL

3) Gel de polyacrylamide à 9% :

Pour 1 gel (1 plaque)	Acrylamide 37,7/1	10 mL
	Ammonium persulfate	100 µL
	TEMED	10 µL
	Laisser polymériser au moins 15 minutes	

Procédure

Préparer deux plaques en verre avec les espaceurs et placer deux pinces à ce niveau.

Dans un tube Falcon[®] de 15 mL mélanger 10 mL d'acrylamide + 100 µL de persulfate d'ammonium + 10 µL de TEMED.

Agiter par retournement.

Couler le gel entre les deux plaques de verre en veillant à ne pas faire de bulles et placer un peigne afin de créer les puits pour les dépôts. Garder un peu de mélange au fond du tube Falcon[®] comme témoin de polymérisation. Attendre la polymérisation du gel.

Placer le gel avec les plaques d'un côté de la cuve de migration et le fixer avec deux pinces.

Mettre en face une plaque seule, maintenue également par des pinces.

Remplir la cuve centrale ainsi que les cuves extérieures par du tampon TBE 1X.

Retirer délicatement le peigne pour ne pas casser les puits.

Sur un film de Parafilm[®], faire autant de dépôts nécessaires de 2 μ L de tampon de chargement.

Déposer dans le premier puits le marqueur de taille 100 pb (Roche[®]).

Déposer les échantillons dans les puits selon le plan de plaque : 3 μ L de produit PCR mélangé par aspiration-refoulement aux 2 μ L de tampon de chargement.

Faire migrer à 150-170 Volts pendant 50 minutes environ.

Placer le gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pendant 5 à 10 minutes (étape de révélation).

Visualisation sous lumière UV (exemple ci-dessous).

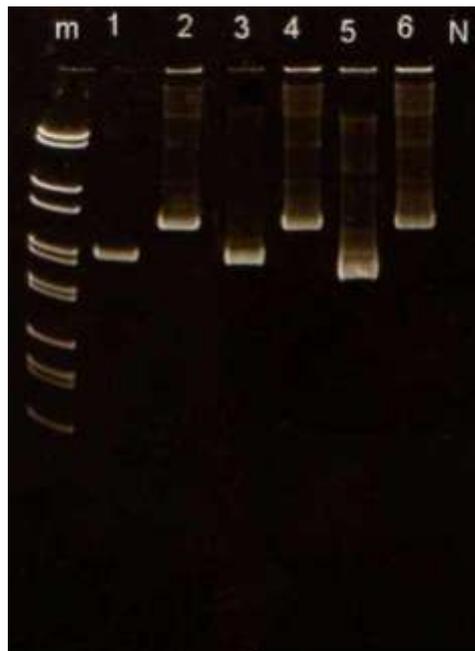


Figure 40 : Révélation sur un gel d'acrylamide d'une série d'amplification par PCR de la région ITS. Les amplicons obtenus migrent en fonction de leur taille qui varie selon l'espèce.

m = marqueur de taille

N = témoin négatif

souches n°1 et 3 : *Pichia guilliermondii*

souche n°5 : *Candida tropicalis*

souches n°2, 4 et 6 : *Candida glabrata*

ANNEXE n°5 : Protocole de réalisation de l'antifongigramme par technique Etest®

- Tester les *Candida* sur des colonies de 48h à 4j
- Inoculum : 0.5 McFarland en solution de NaCl 0.85%
- Ensemencer la boîte de RPMI par écouvillonnage :
 - . Plonger un écouvillon stérile dans la suspension, le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois.
 - . Frotter l'écouvillon sur la surface de la gélose :
 - en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
 - Ou
 - Avec l'aide d'un « tourne disque » si vous disposez de ce matériel, en réalisant un lent aller-retour (15-20 sec)
 - . Laisser sécher les boîtes 10 à 15 minutes à 35-37°C
- Déposer les bandelettes à l'aide de l'applicateur ou d'une pince
- Incubation 24 à 48h à 35°C. *C. glabrata* et *C. tropicalis* doivent toujours être confirmées à 48h
- Lecture :
 - . Amphotéricine B = 100% inhibition
 - . Flucytosine = 90% inhibition
 - . Azolés = 80% inhibition
 - . Caspofungine = 80% inhibition

ANNEXE n°6 : Étude EPICANDI : feuille de recueil des données

Etude EPICANDI

CHU de Nantes, Dr Françoise Gay-Andrieu

Prélèvement		Service
Date de prélèvement	____/____/____	<input type="checkbox"/> Hématologie adulte
Patient	Nom _____ Prénom _____	<input type="checkbox"/> Réanimation médicale
	Date de naissance _____	<input type="checkbox"/> Réanimation chirurgicale
Site de prélèvement		
<input type="checkbox"/> Buccal	<input type="checkbox"/> Liquide drain, ponction, pus (préciser):.....	
<input type="checkbox"/> Digestif	<input type="checkbox"/> Cutané	
<input type="checkbox"/> Respiratoire	<input type="checkbox"/> Génital	
<input type="checkbox"/> Urine	<input type="checkbox"/> Biopsie (préciser) :	
<input type="checkbox"/> Hémodulture, KT		

Identification						
N° identification	C. albicans	C. glabrata	C. parapsilosis	C. tropicalis	C. krusei	Autre (préciser)
NA ____	Espèce 1 : <input type="checkbox"/> ID32 ____ ____ ____ %				
<i>Si plusieurs espèces identifiées sur le prélèvement :</i>						
NA ____	Espèce 2 : <input type="checkbox"/> ID32 ____ ____ ____ %				
NA ____	Espèce 3 : <input type="checkbox"/> ID32 ____ ____ ____ %				
NA ____	Espèce 4 : <input type="checkbox"/> ID32 ____ ____ ____ %				

Sensibilité <i>in vitro</i> Si premier isolement de l'espèce pour un site donné					
		<i>Si plusieurs espèces identifiées sur le prélèvement : repréciser l(es) espèce(s) dont on teste la CMI</i>			
Antifongique	CMI ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) <small>(si CMI max, inscrire 999,9999)</small>	Espèce 2 = NA ____	Espèce 3 = NA ____	Espèce 4 = NA ____	
amphotéricine B	____,____	____,____	____,____	____,____	____,____
flucytosine	____,____	____,____	____,____	____,____	____,____
fluconazole	____,____	____,____	____,____	____,____	____,____
voriconazole	____,____	____,____	____,____	____,____	____,____
casprofungine	____,____	____,____	____,____	____,____	____,____

ANNEXE n°7 : Taille des séquences ITS en fonction de l'espèce

<i>Espèce</i>	<i>Forme téléomorphe</i>	<i>Taille de la séquence ITS obtenue (amorces ITS1 et ITS4) en paire de base</i>
<i>C. albicans</i>		497 ou 498
<i>C. dubliniensis</i>		501 ou 502
<i>C. parapsilosis</i>		481
<i>C. orthopsilosis</i>		471
<i>C. glabrata</i>		842
<i>C. tropicalis</i>		481
<i>C. kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	682
<i>C. sphaerica</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	692
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	568
<i>C. fermentati</i>	<i>Pichia caribbica</i>	568
<i>C. utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>	526
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>	343 ou 344
<i>C. ethanolica</i>		403
<i>C. intermedia</i>		350
<i>C. magnoliae</i>		375
<i>C. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	217

ANNEXE n°8 : Exemples de résultats d'identification de levure.

Résultat de l'alignement de la séquence étudiée avec les séquences de la base de données GenBank par le logiciel BLAST.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ014734.1	Candida tropicalis strain WM10.114 18S ribosomal RNA gene, partial	900	900	100%	0.0	100%
HM222942.1	Candida tropicalis isolate NBAIL-DBT-Ct1 18S ribosomal RNA gene, p	900	900	100%	0.0	100%
HM231275.1	Candida tropicalis strain AN1 18S ribosomal RNA gene, partial sequer	900	900	100%	0.0	100%
GQ376071.1	Candida tropicalis isolate UOA/HCPF 85BL 18S ribosomal RNA gene, p	900	900	100%	0.0	100%
FJ662410.1	Candida tropicalis isolate ZA038 18S ribosomal RNA gene, partial seq	900	900	100%	0.0	100%
FJ662409.1	Candida tropicalis isolate ZA029 18S ribosomal RNA gene, partial seq	900	900	100%	0.0	100%
EU924133.1	Candida tropicalis strain CBL Cd-3 18S ribosomal RNA gene, partial s	900	900	100%	0.0	100%
EF568042.2	Candida tropicalis strain WM 233 18S ribosomal RNA gene, partial se	900	900	100%	0.0	100%
EU266571.1	Candida tropicalis ATCC:66029 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	900	900	100%	0.0	100%
EF216862.1	Candida tropicalis isolate 16 internal transcribed spacer 1, partial se	900	900	100%	0.0	100%
EF190223.1	Candida tropicalis strain WC65-1 18S ribosomal RNA gene, partial se	900	900	100%	0.0	100%
EF192229.1	Candida tropicalis strain zhuan4 18S ribosomal RNA gene, partial seq	900	900	100%	0.0	100%
EF197999.1	Candida tropicalis voucher MCCC2E00295 18S ribosomal RNA gene, p	900	900	100%	0.0	100%
EF200068.1	Candida tropicalis strain HK14c/MCCC2E00211 18S ribosomal RNA qe	900	900	100%	0.0	100%
EF198020.1	Candida tropicalis strain w-14-1 18S ribosomal RNA gene, partial sec	900	900	100%	0.0	100%
EF198007.1	Candida tropicalis strain WC57 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	900	900	100%	0.0	100%
AY939810.1	Candida tropicalis strain ATCC 750 18S ribosomal RNA gene, partial s	900	900	100%	0.0	100%
AM117838.1	Candida tropicalis 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, IT	900	900	100%	0.0	100%

Figure 41 : Identification moléculaire d'une souche de *C. tropicalis*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ183442.1	Clavispora lusitaniae strain VAL-05-019 18S ribosomal RNA gene, par	636	636	100%	3e-179	100%
EU149777.1	Clavispora lusitaniae strain CBS 10625 18S ribosomal RNA gene, part	636	636	100%	3e-179	100%
EF568048.1	Clavispora lusitaniae strain WM 02.479 18S ribosomal RNA gene, parl	630	630	99%	1e-177	100%
DQ249208.2	Clavispora lusitaniae strain WM 02.92 18S ribosomal RNA gene, parti.	630	630	99%	1e-177	100%
AY174089.1	Clavispora lusitaniae UWO(PS)92-308.1 internal transcribed spacer 1	630	630	100%	1e-177	99%
AY383555.1	Clavispora lusitaniae strain CAS00-361 18S ribosomal RNA gene, parl	628	628	100%	5e-177	99%
GU133334.1	Clavispora sp. ZMS6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inte	597	597	93%	1e-167	100%
EF568025.2	Clavispora lusitaniae strain WM 1036 internal transcribed spacer 1, p	588	588	94%	9e-165	99%
EU409795.1	Clavispora lusitaniae isolate Band1 internal transcribed spacer 1, par	568	568	100%	1e-158	96%
EF175898.1	Clavispora lusitaniae clone bandF2 internal transcribed spacer 1, par	568	568	100%	1e-158	96%
EF151449.1	Clavispora lusitaniae isolate F24 internal transcribed spacer 1, partia	568	568	100%	1e-158	96%
AY939811.1	Clavispora lusitaniae isolate VA 13910-03 18S ribosomal RNA gene, p	568	568	100%	1e-158	96%
AM180951.1	Clavispora sp. YS60 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene,	551	551	100%	1e-153	95%
FJ838779.1	Clavispora lusitaniae strain T11 internal transcribed spacer 1, partial	547	547	94%	1e-152	96%
EU568923.1	Clavispora lusitaniae isolate CNRMA 200501223 18S ribosomal RNA qe	545	545	100%	5e-152	95%

Figure 42 : Identification moléculaire d'une souche de *C. lusitaniae*.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
DQ249191.1	Kluyveromyces marxianus strain ATCC 4135 internal transcribed spac	1249	1249	100%	0.0	100%	
HQ396523.1	Kluyveromyces marxianus strain CHY1612 18S ribosomal RNA gene, p	1243	1243	100%	0.0	99%	
HQ014731.1	Kluyveromyces marxianus strain WM10.112 18S ribosomal RNA gene,	1238	1238	100%	0.0	99%	
AF543841.1	Kluyveromyces marxianus 26S ribosomal RNA, 18S ribosomal RNA qer	1236	1236	100%	0.0	99%	
FM177658.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN	1232	1232	99%	0.0	99%	
FM173070.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN	1232	1232	99%	0.0	99%	
AM711389.1	Uncultured compost fungus partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA	1232	1232	99%	0.0	99%	
AY939806.1	Kluyveromyces marxianus isolate VA 116042-03 18S ribosomal RNA c	1232	1232	100%	0.0	99%	
AB365315.1	Kluyveromyces marxianus genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRN	1230	1230	98%	0.0	99%	
DQ249190.1	Kluyveromyces marxianus strain 00-81-1864 internal transcribed spa	1223	1223	99%	0.0	99%	
EF568057.1	Kluyveromyces marxianus strain WM 39 internal transcribed spacer 1	1221	1221	98%	0.0	99%	
EU019227.1	Kluyveromyces marxianus isolate AS2.1549 internal transcribed spac	1221	1221	100%	0.0	99%	
FM173088.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN	1218	1218	99%	0.0	99%	
EU019224.1	Kluyveromyces marxianus isolate F4-3 18S ribosomal RNA gene, part	1201	1201	100%	0.0	98%	

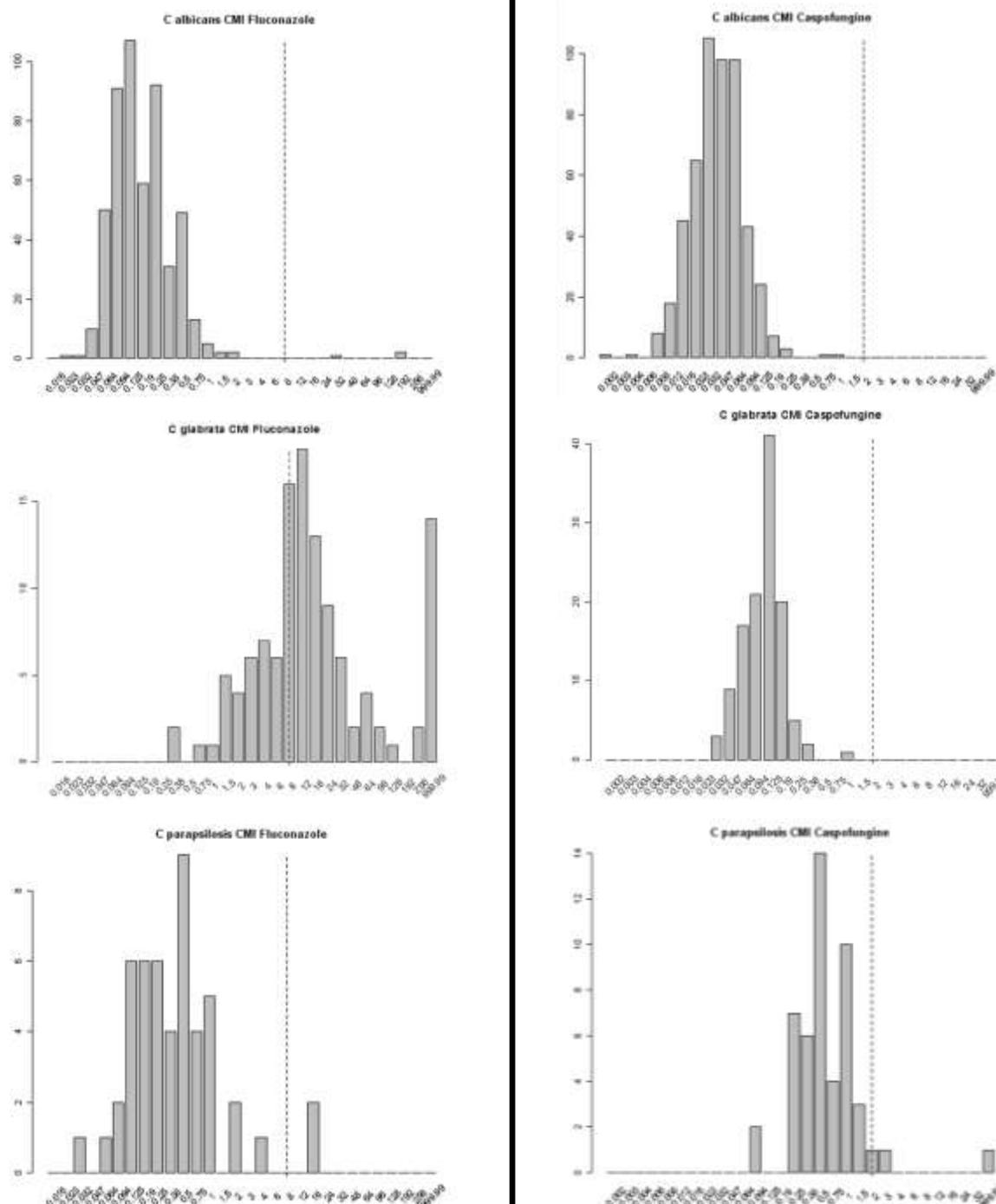
Figure 43 : Identification moléculaire d'une souche de *C. kefyri*.

ANNEXE n°9 : Distribution des souches en fonction de la valeur de leur CMI pour le fluconazole et la caspofungine.

Les données sont présentées pour trois espèces avec un grand nombre d'isolats (*C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*).

Pour le fluconazole (gauche), on remarque que la courbe est décalée à droite pour *C. glabrata*.

Pour la caspofungine (droite), la courbe est décalée à droite pour *C. parapsilosis*



Références bibliographiques

- ACHKAR, J. M., and B. C. FRIES, 2010 Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev* **23**: 253-273.
- ALCOBA-FLOREZ, J., S. MENDEZ-ALVAREZ, J. CANO, J. GUARRO, E. PEREZ-ROTH *et al.*, 2005 Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol* **43**: 4107-4111.
- ALSHAHNI, M. M., K. MAKIMURA, T. YAMADA, K. SATOH, Y. ISHIHARA *et al.*, 2009 Direct colony PCR of several medically important fungi using Ampdirect plus. *Jpn J Infect Dis* **62**: 164-167.
- ANN CHAI, L. Y., D. W. DENNING and P. WARN, 2010 *Candida tropicalis* in human disease. *Crit Rev Microbiol* **36**: 282-298.
- ARENDRUP, M. C., 2010 Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* **16**: 445-452.
- ARIKAN, S., 2007 Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* **45**: 569-587.
- BAIXENCH, M. T., N. AOUN, M. DESNOS-OLLIVIER, D. GARCIA-HERMOSO, S. BRETAGNE *et al.*, 2007 Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chemother* **59**: 1076-1083.
- BISHOP, J. A., N. CHASE, S. S. MAGILL, C. P. KURTZMAN, M. J. FIANDACA *et al.*, 2008 *Candida bracarensis* detected among isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. *J Clin Microbiol* **46**: 443-446.
- BLIGNAUT, E., J. MOLEPO, C. PUJOL, D. R. SOLL and M. A. PFALLER, 2005 Clade-related amphotericin B resistance among South African *Candida albicans* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **53**: 29-31.
- BORG-VON ZEPELIN, M., L. KUNZ, R. RUCHEL, U. REICHARD, M. WEIG *et al.*, 2007 Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* **60**: 424-428.
- BORGHI, E., R. IATTA, R. SCIOTA, C. BIASSONI, T. CUNA *et al.*, 2010 Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: the GISIA3 study. *J Clin Microbiol* **48**: 3153-3157.
- BORMAN, A. M., R. PETCH, C. J. LINTON, M. D. PALMER, P. D. BRIDGE *et al.*, 2008 *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J Clin Microbiol* **46**: 933-938.
- BOUGNOUX, M., and F. ESPINASSE, 2003 Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *RFL*: 67-71.
- BOURGEOIS, N., L. DEHANDSCHOEWERCKER, S. BERTOUT, P. J. BOUSQUET, P. RISPAIL *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**: 154-161.
- BROWN, D. M., M. A. JABRA-RIZK, W. A. FALKLER, JR., A. A. BAQUI and T. F. MEILLER, 2000 Identification of *Candida dubliniensis* in a study of HIV-seropositive pediatric dental patients. *Pediatr Dent* **22**: 234-238.
- BURGAUD, G., D. ARZUR, J. P. SAMPAIO and G. BARBIER, 2011 *Candida oceani* sp. nov., a novel yeast isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent (-2300 meters). *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- CALDERONE, R. A., 2002 *Candida and Candidiasis*, Washington DC.

- CANTON, E., A. ESPINEL-INGROFF and J. PEMAN, 2009 Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**: 107-119.
- CARDENES-PERERA, C. D., A. TORRES-LANA, R. ALONSO-VARGAS, M. D. MORAGUES-TOSANTAS, J. PONTON-SAN EMETERIO *et al.*, 2004 Evaluation of API ID 32C and VITEK-2 to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**: 219-221.
- CENDEJAS-BUENO, E., A. GOMEZ-LOPEZ, E. MELLADO, J. L. RODRIGUEZ-TUDELA and M. CUENCA-ESTRELLA, 2010 Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. *J Clin Microbiol* **48**: 1895-1899.
- CHABASSE, D., R. ROBERT, A. MAROT and M. PIHET, 2006 *Candida pathogènes*, Paris.
- CHEN, Y. C., Y. H. LIN, K. W. CHEN, J. LIU, H. J. TENG *et al.*, 2010 Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* **68**: 284-292.
- CIARDO, D. E., G. SCHAR, E. C. BOTTGER, M. ALTWEGG and P. P. BOSSHARD, 2006 Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* **44**: 77-84.
- COMERT, F., C. KULAH, E. AKTAS, O. EROGLU and N. OZLU, 2007 Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. *Mycoses* **50**: 52-57.
- CONNELL, P. P., E. C. O'NEILL, F. M. AMIRUL ISLAM, R. BUTTERY, M. MCCOMBE *et al.*, 2010 Endogenous endophthalmitis associated with intravenous drug abuse: seven-year experience at a tertiary referral center. *Retina* **30**: 1721-1725.
- CORREIA, A., P. SAMPAIO, S. JAMES and C. PAIS, 2006 *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 313-317.
- COSTA-DE-OLIVEIRA, S., C. PINA-VAZ, D. MENDONCA and A. GONCALVES RODRIGUES, 2008 A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**: 365-374.
- COSTE, A., A. SELMECKI, A. FORCHE, D. DIOGO, M. E. BOUGNOUX *et al.*, 2007 Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* **6**: 1889-1904.
- CUENCA-ESTRELLA, M., A. GOMEZ-LOPEZ, G. ISLA, D. RODRIGUEZ, B. ALMIRANTE *et al.*, 2011 Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia. *Med Mycol*.
- DE HOOG, G. S., and R. HORRE, 2002 Molecular taxonomy of the alternaria and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses* **45**: 259-276.
- DESNOS-OLLIVIER, M., S. BRETAGNE, D. RAOUX, D. HOINARD, F. DROMER *et al.*, 2008a Mutations in the *fkp1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 3092-3098.
- DESNOS-OLLIVIER, M., O. MOQUET, T. CHOUAKI, A. M. GUERIN and F. DROMER, 2011 Development of echinocandins resistance in *Clavispora lusitaniae* during caspofungin treatment. *J Clin Microbiol*.
- DESNOS-OLLIVIER, M., M. RAGON, V. ROBERT, D. RAOUX, J. C. GANTIER *et al.*, 2008b *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often

- misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *J Clin Microbiol* **46**: 3237-3242.
- DEVELOUX, M., and S. BRETAGNE, 2005 Candidoses et levures diverses. EMC-Maladies infectieuses: 119-139.
- DHIMAN, N., L. HALL, S. L. WOHLFIEL, S. P. BUCKWALTER and N. L. WENGENACK, 2011 Performance and Cost Analysis of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. *J Clin Microbiol*.
- DIEKEMA, D. J., S. A. MESSER, L. B. BOYKEN, R. J. HOLLIS, J. KROEGER *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**: 3170-3177.
- DIEKEMA, D. J., S. A. MESSER, R. J. HOLLIS, L. B. BOYKEN, S. TENDOLKAR *et al.*, 2007 Evaluation of Etest and disk diffusion methods compared with broth microdilution antifungal susceptibility testing of clinical isolates of *Candida* spp. against posaconazole. *J Clin Microbiol* **45**: 1974-1977.
- DROMER, F., O. LORTHOLARY, M. DESNOS-OLLIVIER, D. GARCIA-HERMOSO, D. HOINARD *et al.*, 2010 Rapport d'activité 2009 du centre national de référence mycologie et antifongiques (Institut Pasteur), pp.
- ELLIS, M. E., H. AL-ABDELY, A. SANDRIDGE, W. GREER and W. VENTURA, 2001 Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. *Clin Infect Dis* **32**: 50-62.
- ERASO, E., M. D. MORAGUES, M. VILLAR-VIDAL, I. H. SAHAND, N. GONZALEZ-GOMEZ *et al.*, 2006a Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* **44**: 3340-3345.
- ERASO, E., I. H. SAHAND, M. VILLAR-VIDAL, C. MARCOS, M. DOLORES MORAGUES *et al.*, 2006b Usefulness of *Candida* ID2 agar for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. *Med Mycol* **44**: 611-615.
- ETIENNE, M., and F. CARON, 2007 [Management of fungal urinary tract infections]. *Presse Med* **36**: 1899-1906.
- FAGGI, E., G. PINI, E. CAMPISI, C. MARTINELLI and E. DIFONZO, 2005 Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection. *Mycoses* **48**: 211-215.
- FALAGAS, M. E., K. E. APOSTOLOU and V. D. PAPPAS, 2006 Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**: 419-425.
- FAVEL, A., A. MICHEL-NGUYEN, F. PEYRON, C. MARTIN, L. THOMACHOT *et al.*, 2003 Colony morphology switching of *Candida lusitanae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* **47**: 331-339.
- FERRONI, A., S. SUAREZ, J. L. BERETTI, B. DAUPHIN, E. BILLE *et al.*, 2010 Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **48**: 1542-1548.
- FLORENS, A., G. MAGGIOLINO, M. KAMAT, T. JOSEPH, W. PIETTE *et al.*, 2010 A full-term infant with rash at birth. Congenital cutaneous candidiasis. *Pediatr Ann* **39**: 551-554.
- FREYDIERE, A. M., L. BUCHAILLE, R. GUINET and Y. GILLE, 1997 Evaluation of latex reagents for rapid identification of *Candida albicans* and *C. krusei* colonies. *J Clin Microbiol* **35**: 877-880.
- FREYDIERE, A. M., R. GUINET and P. BOIRON, 2001 Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol* **39**: 9-33.

- FREYDIERE, A. M., R. ROBERT, C. PLOTON, A. MAROT-LEBLOND, F. MONERAU *et al.*, 2003 Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test, GLABRATA RTT. *J Clin Microbiol* **41**: 3861-3863.
- FURMAN, R. M., and D. G. AHEARN, 1983 *Candida ciferrii* and *Candida chiropterorum* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **18**: 1252-1255.
- GARCIA-MARTOS, P., J. RUIZ-ARAGON, L. GARCIA-AGUDO, A. SALDARREAGA, M. C. LOZANO *et al.*, 2004 [*Candida ciferrii* in an immunocompromised patient]. *Rev Iberoam Micol* **21**: 85-86.
- GIEBEL, R., C. WORDEN, S. M. RUST, G. T. KLEINHEINZ, M. ROBBINS *et al.*, 2010 Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol* **71**: 149-184.
- GLOCKER, E., and B. GRIMBACHER, 2010 Chronic mucocutaneous candidiasis and congenital susceptibility to *Candida*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **10**: 542-550.
- GOMEZ-LOPEZ, A., D. PAN, I. CUESTA, A. ALASTRUEY-IZQUIERDO, J. L. RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2010 Molecular identification and susceptibility profile in vitro of the emerging pathogen *Candida kefyr*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **66**: 116-119.
- GROSSI, P. A., 2009 Clinical aspects of invasive candidiasis in solid organ transplant recipients. *Drugs* **69 Suppl 1**: 15-20.
- GUNSILIUS, E., C. LASS-FLORL, C. M. KAHLER, G. GASTL and A. L. PETZER, 2001 *Candida ciferrii*, a new fluconazole-resistant yeast causing systemic mycosis in immunocompromised patients. *Ann Hematol* **80**: 178-179.
- GUO, X., H. ZHU and F. Y. BAI, 2011 *Candida cellulocola* sp. nov., a novel xylose utilizing anamorphic yeast species from rotten wood. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- HAMAL, P., J. OSTRANSKY, M. DENDIS, R. HORVATH, F. RUZICKA *et al.*, 2008 A case of endocarditis caused by the yeast *Pichia fabianii* with biofilm production and developed in vitro resistance to azoles in the course of antifungal treatment. *Med Mycol* **46**: 601-605.
- HIBBETT, D. S., M. BINDER, J. F. BISCHOFF, M. BLACKWELL, P. F. CANNON *et al.*, 2007 A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111**: 509-547.
- HONDERLICK, P., J. GRAVISSSE, P. CAHEN and D. VIGNON, 2007 [Is there a change in ecology of *Candida* species incriminated in fungemia? A 7 years study at Foch Hospital]. *Pathol Biol (Paris)* **55**: 531-533.
- HORN, D. L., D. NEOFYTOS, E. J. ANAISSIE, J. A. FISHMAN, W. J. STEINBACH *et al.*, 2009 Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* **48**: 1695-1703.
- HOSPENTHAL, D. R., M. L. BECKIUS, K. L. FLOYD, L. L. HORVATH and C. K. MURRAY, 2006 Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **5**: 1.
- JENSEN, R. H., and M. C. ARENDRUP, 2011 *Candida palmioleophila*: characterization of a previously overlooked pathogen and its unique susceptibility profile in comparison with five related species. *J Clin Microbiol* **49**: 549-556.
- JOHNSON, and M. ELIZABETH, 2009 *Rare and emerging Candida species*. Springer, Heidelberg, ALLEMAGNE.
- KARAS, M., D. BACHMANN, U. BAHR and F. HILLENKAMPA, 1987 Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **78**: 53-68
- KHAN, Z. U., N. A. AL-SWEIH, S. AHMAD, N. AL-KAZEMI, S. KHAN *et al.*, 2007 Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *J Clin Microbiol* **45**: 2025-2027.

- KOLLIA, K., M. ARABATZIS, O. KOSTOULA, A. KOSTOUROU, A. VELEGRAKI *et al.*, 2003 Clavispora (Candida) lusitaniae susceptibility profiles and genetic diversity in three tertiary hospitals (1998-2001). *Int J Antimicrob Agents* **22**: 458-460.
- KROGH-MADSEN, M., M. C. ARENDRUP, L. HESLET and J. D. KNUDSEN, 2006 Amphotericin B and caspofungin resistance in Candida glabrata isolates recovered from a critically ill patient. *Clin Infect Dis* **42**: 938-944.
- LANE, J. E., M. A. LEE and J. L. STEPHENS, 2001 Tenosynovitis Secondary To Candida Magnoliae In An Immunocompetent Host: Candida Magnoliae Tenosynovitis. *Internet J. Infect. Dis.* **1**.
- LASS-FLORL, C., 2009 The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* **52**: 197-205.
- LEROY, O., J. P. GANGNEUX, P. MONTRAVERS, J. P. MIRA, F. GOUIN *et al.*, 2009 Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* **37**: 1612-1618.
- LIMTONG, S., S. JINDAMORAKOT, S. AM-IN, R. KAEWWICHIAN, S. NITIYON *et al.*, 2011 Candida uthaithanina sp. nov., an anamorphic yeast species in Nakaseomyces clade isolated in Thailand. *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- LIN, D., L. C. WU, M. G. RINALDI and P. F. LEHMANN, 1995 Three distinct genotypes within Candida parapsilosis from clinical sources. *J Clin Microbiol* **33**: 1815-1821.
- LINTON, C. J., A. M. BORMAN, G. CHEUNG, A. D. HOLMES, A. SZEKELY *et al.*, 2007 Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United kingdom mycology reference laboratory. *J Clin Microbiol* **45**: 1152-1158.
- LO CASCIO, G., L. DALLE CARBONARE, L. MACCACARO, F. CALIARI, M. LIGOZZI *et al.*, 2007 First case of bloodstream infection due to Candida magnoliae in a Chinese oncological patient. *J Clin Microbiol* **45**: 3470-3473.
- LOCKHART, S. R., S. A. MESSER, M. GHERNA, J. A. BISHOP, W. G. MERZ *et al.*, 2009a Identification of Candida nivariensis and Candida bracarensis in a large global collection of Candida glabrata isolates: comparison to the literature. *J Clin Microbiol* **47**: 1216-1217.
- LOCKHART, S. R., S. A. MESSER, M. A. PFALLER and D. J. DIEKEMA, 2008 Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis in comparison to the closely related species Candida parapsilosis. *J Clin Microbiol* **46**: 2659-2664.
- LOCKHART, S. R., S. A. MESSER, M. A. PFALLER and D. J. DIEKEMA, 2009b Identification and Susceptibility Profile of Candida fermentati from a worldwide collection of Candida guilliermondii clinical isolates. *J Clin Microbiol* **47**: 242-244.
- LORETO, E. S., L. A. SCHEID, C. W. NOGUEIRA, G. ZENI, J. M. SANTURIO *et al.*, 2010 Candida dubliniensis: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia* **169**: 431-443.
- LORTHOLARY, O., M. DESNOS-OLLIVIER, K. SITBON, A. FONTANET, S. BRETAGNE *et al.*, 2011 Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 532-538.
- MACKENZIE, D. W., 1962 Serum tube identification of Candida albicans. *J Clin Pathol* **15**: 563-565.
- MAJOROS, L., G. KARDOS, A. BELAK, A. MARAZ, L. ASZTALOS *et al.*, 2003 Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that Candida inconspicua clinical isolates can

- be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnostic procedures. *J Clin Microbiol* **41**: 5250-5253.
- MAKNI, F., A. SELLAMI, H. TRABELSI, H. SELLAMI, F. CHEIKHROUHOU *et al.*, 2009 *Évolution de la flore des levures isolées au CHU de Sfax, Tunisie*. Masson, Paris, FRANCE.
- MARINACH-PATRICE, C., A. FEKKAR, R. ATANASOVA, J. GOMES, L. DJAMDJIAN *et al.*, 2010 Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One* **5**: e8862.
- MARKLEIN, G., M. JOSTEN, U. KLANKE, E. MULLER, R. HORRE *et al.*, 2009 Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* **47**: 2912-2917.
- MARTIN, D., F. PERSAT, M. A. PIENS and S. PICOT, 2005 *Candida* species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998-2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 329-333.
- MARTIN, G. S., D. M. MANNINO, S. EATON and M. MOSS, 2003 The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* **348**: 1546-1554.
- MARTINEZ, M., J. L. LOPEZ-RIBOT, W. R. KIRKPATRICK, B. J. COCO, S. P. BACHMANN *et al.*, 2002 Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol* **40**: 3135-3139.
- MCCLENNY, N. B., H. FEI, E. J. BARON, A. C. GALES, A. HOUSTON *et al.*, 2002 Change in colony morphology of *Candida lusitanae* in association with development of amphotericin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1325-1328.
- MEIS, J. F., M. RUHNKE, B. E. DE PAUW, F. C. ODDS, W. SIEGERT *et al.*, 1999 *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis* **5**: 150-153.
- METWALLY, L., M. J. WALKER, P. V. COYLE, R. J. HAY, S. HEDDERWICK *et al.*, 2007 Trends in candidemia and antifungal susceptibility in a university hospital in Northern Ireland 2001-2006. *J Infect* **55**: 174-178.
- MIRHENDI, H., K. DIBA, A. REZAEI, N. JALALIZAND, L. HOSSEINPUR *et al.*, 2007 Colony-PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian J Publ Health* **36**: 40-44.
- MORAN, G. P., D. J. SULLIVAN, M. C. HENMAN, C. E. MCCREARY, B. J. HARRINGTON *et al.*, 1997 Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 617-623.
- MORRELL, M., V. J. FRASER and M. H. KOLLEF, 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**: 3640-3645.
- NHO, S., M. J. ANDERSON, C. B. MOORE and D. W. DENNING, 1997 Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and *HhaI* digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J Clin Microbiol* **35**: 1036-1039.
- NOLTE, F. S., T. PARKINSON, D. J. FALCONER, S. DIX, J. WILLIAMS *et al.*, 1997 Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 196-199.
- ODDS, F. C., 1988 *Candida and Candidosis*, London.
- PAPPAS, P. G., 2006 Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* **20**: 485-506.
- PAPPAS, P. G., B. D. ALEXANDER, D. R. ANDES, S. HADLEY, C. A. KAUFFMAN *et al.*, 2010 Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-

- Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis* **50**: 1101-1111.
- PAPPAS, P. G., C. A. KAUFFMAN, D. ANDES, D. K. BENJAMIN, JR., T. F. CALANDRA *et al.*, 2009 Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**: 503-535.
- PARK, B. J., B. A. ARTHINGTON-SKAGGS, R. A. HAJEH, N. IQBAL, M. A. CIBLAK *et al.*, 2006 Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1287-1292.
- PASLIGH, J., C. RADECKE, M. FLEISCHHACKER and M. RUHNKE, 2010 Comparison of phenotypic methods for the identification of *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect* **43**: 147-154.
- PAUGAM, A., M. T. BAIXENCH and C. VIGUIE, 2008 [An update on *Candida dubliniensis*]. *Med Mal Infect* **38**: 1-7.
- PEREA, S., and T. F. PATTERSON, 2002 Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* **35**: 1073-1080.
- PETERSON, J. F., M. A. PFALLER, D. J. DIEKEMA, M. G. RINALDI, K. M. RIEBE *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*.
- PFALLER, M. A., D. ANDES, M. C. ARENDRUP, D. J. DIEKEMA, A. ESPINEL-INGROFF *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*.
- PFALLER, M. A., D. ANDES, D. J. DIEKEMA, A. ESPINEL-INGROFF and D. SHEEHAN, 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**: 180-195.
- PFALLER, M. A., L. BOYKEN, R. J. HOLLIS, J. KROEGER, S. A. MESSER *et al.*, 2008a In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* **46**: 150-156.
- PFALLER, M. A., M. CASTANHEIRA, D. J. DIEKEMA, S. A. MESSER, G. J. MOET *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**: 1592-1599.
- PFALLER, M. A., M. CASTANHEIRA, S. A. MESSER, G. J. MOET and R. N. JONES, 2011b Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* **69**: 45-50.
- PFALLER, M. A., and D. J. DIEKEMA, 2007 Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- PFALLER, M. A., D. J. DIEKEMA, D. ANDES, M. C. ARENDRUP, S. D. BROWN *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*.
- PFALLER, M. A., D. J. DIEKEMA, D. L. GIBBS, V. A. NEWELL, D. ELLIS *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**: 1366-1377.

- PFALLER, M. A., D. J. DIEKEMA, M. MENDEZ, C. KIBBLER, P. ERZSEBET *et al.*, 2006 *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* **44**: 3551-3556.
- PFALLER, M. A., D. J. DIEKEMA, L. OSTROSKY-ZEICHNER, J. H. REX, B. D. ALEXANDER *et al.*, 2008b Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* **46**: 2620-2629.
- PFALLER, M. A., A. ESPINEL-INGROFF, L. BOYKEN, R. J. HOLLIS, J. KROEGER *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**: 845-850.
- PFALLER, M. A., S. A. MESSER and A. BOLMSTROM, 1998a Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* **32**: 223-227.
- PFALLER, M. A., S. A. MESSER, L. BOYKEN, H. HUYNH, R. J. HOLLIS *et al.*, 2002 In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3518-3521.
- PFALLER, M. A., S. A. MESSER and R. J. HOLLIS, 1994 Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **20**: 127-133.
- PFALLER, M. A., S. A. MESSER, A. KARLSSON and A. BOLMSTROM, 1998b Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J Clin Microbiol* **36**: 2586-2589.
- PFALLER, M. A., G. J. MOET, S. A. MESSER, R. N. JONES and M. CASTANHEIRA, 2011e Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol* **49**: 396-399.
- PFEIFFER, C. D., G. GARCIA-EFFRON, A. K. ZAAS, J. R. PERFECT, D. S. PERLIN *et al.*, 2010 Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol* **48**: 2373-2380.
- PINCUS, D. H., S. ORENGA and S. CHATELLIER, 2007 Yeast identification--past, present, and future methods. *Med Mycol* **45**: 97-121.
- PITTET, D., M. MONOD, P. M. SUTER, E. FRENK and R. AUCKENTHALER, 1994 *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* **220**: 751-758.
- POIKONEN, E., O. LYYTIKAINEN, V. J. ANTTILA, I. KOIVULA, J. LUMIO *et al.*, 2010 Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. *BMC Infect Dis* **10**: 312.
- POUND, M. W., M. L. TOWNSEND and R. H. DREW, 2010 Echinocandin pharmacodynamics: review and clinical implications. *J Antimicrob Chemother* **65**: 1108-1118.
- PRENTICE, H. G., C. C. KIBBLER and A. G. PRENTICE, 2000 Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol* **110**: 273-284.
- RAMANI, R., S. GROMADZKI, D. H. PINCUS, I. F. SALKIN and V. CHATURVEDI, 1998 Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* **36**: 3396-3398.

- REAGAN, D. R., M. A. PFALLER, R. J. HOLLIS and R. P. WENZEL, 1990 Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J Clin Microbiol* **28**: 2733-2738.
- REUTER, C. W., M. A. MORGAN, F. C. BANGE, F. GUNZER, M. EDER *et al.*, 2005 *Candida kefyr* as an emerging pathogen causing nosocomial bloodstream infections in neutropenic leukemia patients. *Clin Infect Dis* **41**: 1365-1366.
- REX, J. H., and M. A. PFALLER, 2002 Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis* **35**: 982-989.
- RICHEL, H., P. ROUX, C. DES CHAMPS, Y. ESNAULT and A. ANDREMONT, 2002 Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect* **8**: 405-412.
- RONALD, A., 2002 The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* **113 Suppl 1A**: 14S-19S.
- RUHNKE, M., A. SCHMIDT-WESTHAUSEN and J. MORSCHHAUSER, 2000 Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J Antimicrob Chemother* **46**: 291-295.
- SAHAND, I. H., M. D. MORAGUES, R. ROBERT, G. QUINDOS and J. PONTON, 2006 Evaluation of Bichro-Dubli Fumouze to distinguish *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **55**: 165-167.
- SANGER, F., S. NICKLEN and A. R. COULSON, 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- SANGLARD, D., and F. C. ODDS, 2002 Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**: 73-85.
- SCHELENZ, S., S. ABDALLAH, G. GRAY, H. STUBBINGS, I. GOW *et al.*, 2011 Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *J Oral Pathol Med* **40**: 83-89.
- SCHULZE, J., and U. SONNENBORN, 2009 Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int* **106**: 837-842.
- SELLAMI, A., H. SELLAMI, S. NEJI, F. MAKNI, S. ABBES *et al.*, 2010 Antifungal Susceptibility of Bloodstream *Candida* Isolates in Sfax Hospital: Tunisia. *Mycopathologia*.
- SELMECKI, A., A. FORCHE and J. BERMAN, 2006 Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* **313**: 367-370.
- SENDID, B., A. COTTEAU, N. FRANCOIS, A. D'HAVELOOSE, A. STANDAERT *et al.*, 2006a Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* **6**: 80.
- SENDID, B., N. FRANCOIS, A. STANDAERT, E. DEHECQ, F. ZERIMECH *et al.*, 2007 Prospective evaluation of the new chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol* **56**: 495-499.
- SENDID, B., C. LACROIX and M. E. BOUGNOUX, 2006b Is *Candida kefyr* an emerging pathogen in patients with oncohematological diseases? *Clin Infect Dis* **43**: 666-667.
- SILVA, A. P., I. M. MIRANDA, C. LISBOA, C. PINA-VAZ and A. G. RODRIGUES, 2009 Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* **47**: 2392-2397.
- SIPSAS, N. V., R. E. LEWIS, J. TARRAND, R. HACHEM, K. V. ROLSTON *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**: 4745-4752.

- STILLER, R. L., J. E. BENNETT, H. J. SCHOLER, M. WALL, A. POLAK *et al.*, 1982 Susceptibility to 5-fluorocytosine and prevalence of serotype in 402 *Candida albicans* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **22**: 482-487.
- SUDBERY, P., N. GOW and J. BERMAN, 2004 The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317-324.
- SULLIVAN, D. J., G. P. MORAN, E. PINJON, A. AL-MOSAID, C. STOKES *et al.*, 2004 Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **4**: 369-376.
- SULLIVAN, D. J., T. J. WESTERNENG, K. A. HAYNES, D. E. BENNETT and D. C. COLEMAN, 1995 *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141** (Pt 7): 1507-1521.
- TALARMIN, J. P., D. BOUTOILLE, P. TATTEVIN, S. DARGERÉ, P. WEINBRECK *et al.*, 2009 [Epidemiology of candidemia: a one-year prospective observational study in the west of France]. *Med Mal Infect* **39**: 877-885.
- TAVANTI, A., A. D. DAVIDSON, N. A. GOW, M. C. MAIDEN and F. C. ODDS, 2005 *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* **43**: 284-292.
- THIERRY, G., F. MORIO, P. LE PAPE, F. GAY-ANDRIEU, O. BARRE *et al.*, 2011 [Prevalence of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in candidemia over a 5-year period at Nantes hospital and in vitro susceptibility to three echinocandins by E-test(R)]. *Pathol Biol (Paris)* **59**: 52-56.
- TORRES-RODRIGUEZ, J. M., and E. ALVARADO-RAMIREZ, 2007 In vitro susceptibilities to yeasts using the ATB FUNGUS 2 method, compared with Sensititre Yeast One and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *J Antimicrob Chemother* **60**: 658-661.
- TORTORANO, A. M., C. KIBBLER, J. PEMAN, H. BERNHARDT, L. KLINGSPOR *et al.*, 2006 Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 359-366.
- VALENZA, G., R. VALENZA, J. BREDELAU, M. FROSCHE and O. KURZAI, 2006 Identification of *Candida fabianii* as a cause of lethal septicaemia. *Mycoses* **49**: 331-334.
- VAUGHAN-MARTINI, A., C. P. KURTZMAN, S. A. MEYER and E. B. O'NEILL, 2005 Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *FEMS Yeast Res* **5**: 463-469.
- VIGOUROUX, S., O. MORIN, P. MOREAU, J. L. HAROUSSEAU and N. MILPIED, 2006 Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. *Haematologica* **91**: 717-718.
- VIJGEN, S., S. NYS, R. NAESENS, K. MAGERMAN, A. BOEL *et al.*, 2010 Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre YeastOne antifungal testing. *Med Mycol* **49**: 107-110.
- VOSS, A., R. J. HOLLIS, M. A. PFALLER, R. P. WENZEL and B. N. DOEBBELING, 1994 Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol* **32**: 975-980.
- WAHYUNINGSIH, R., I. N. SAHBANDAR, B. THEELEN, F. HAGEN, G. POOT *et al.*, 2008 *Candida nivariensis* isolated from an Indonesian human immunodeficiency virus-infected patient suffering from oropharyngeal candidiasis. *J Clin Microbiol* **46**: 388-391.
- WANGER, A., K. MILLS, P. W. NELSON and J. H. REX, 1995 Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2520-2522.

- WARREN, T. A., L. MCTAGGART, S. E. RICHARDSON and S. X. ZHANG, 2010 *Candida bracarensis* bloodstream infection in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol* **48**: 4677-4679.
- WILLINGER, B., S. WEIN, A. M. HIRSCHL, M. L. ROTTER and M. MANAFI, 2005 Comparison of a new commercial test, GLABRATA RTT, with a dipstick test for rapid identification of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* **43**: 499-501.
- WISPLINGHOFF, H., T. BISCHOFF, S. M. TALLENT, H. SEIFERT, R. P. WENZEL *et al.*, 2004 Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**: 309-317.
- YOO, J. I., C. W. CHOI, K. M. LEE, Y. K. KIM, T. U. KIM *et al.*, 2009 National surveillance of antifungal susceptibility of *Candida* species in South Korean hospitals. *Med Mycol* **47**: 554-558.
- ZAOUTIS, T. E., J. ARGON, J. CHU, J. A. BERLIN, T. J. WALSH *et al.*, 2005 The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis* **41**: 1232-1239.

SERMENT MEDICAL

Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

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

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

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

NOM : GICQUEL PRENOM : Aurélie

Titre de Thèse :

Epidémiologie des *Candida* dans les services à haut risque d'infections invasives :
Résultats de l'étude nationale prospective et multi-centrique EPICANDI

RESUME

Les levures du genre *Candida* sont responsables, chez les patients à risques, d'infections invasives de pronostic sévère. En quelques décennies, l'épidémiologie de ces levures a évolué, avec l'émergence d'espèces rares ou de moindre sensibilité aux antifongiques.

L'étude épidémiologique EPICANDI, étude multicentrique et prospective, dont les principaux résultats sont présentés ici s'est intéressé à la distribution des espèces isolées chez les patients à risque (hospitalisés dans les services d'hématologie, de réanimation et de transplantation rénale) ainsi qu'à leur sensibilité *in vitro* aux antifongiques.

Ce travail illustre, notamment à travers les erreurs d'identifications phénotypiques, l'apport important de l'identification moléculaire pour l'identification des levures du genre *Candida*.

MOTS-CLES

Etude prospective multicentrique ; épidémiologie ; *Candida* spp ; services cliniques à risque ; identification moléculaire ; identification phénotypique, sensibilité aux antifongiques.