

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE



ANNEE 2008

THESE N°..3122 11

**APPORT DE LA PCR DANS LE DIAGNOSTIC DES
INFECTIONS FONGIQUES INVASIVES**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
Obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement

le 5 septembre 2008 à 17h30

par

Thomas ROSSIGNOL

Né le 28 Novembre 1979 à Toulouse (31)

JURY

Madame le Professeur Marie-Laure DARDÉ.....Présidente
Madame le Professeur Dominique BORDESSOULE.....Juge
Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY.....Juge
Monsieur le Professeur Gilles DREYFUS.....Juge
Monsieur le Docteur Daniel AJZENBERG.....Membre invité, directeur de thèse

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Pr VANDROUX Jean-Claude

ASSESEURS : Monsieur le Pr LASKAR Marc
Monsieur le Pr VALLEIX Denis
Monsieur le Pr PREUX Pierre-Marie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS :

* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
BERTIN Philippe FF (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE

COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIELLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DUDOGNON Pierre	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel (C.S)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé (C.S)	REANIMATION MEDICALE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE

MAUBON Antoine (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MERLE Louis (C.S)	PHARMACOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
PARAF François	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
PILLEGAND Bernard	GASTRO ENTEROLOGIE, HEPATHOLOGIE
PIVA Claude	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
RIGAUD Michel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
SAUTEREAU Denis (C.S)	GASTRO ENTEROLOGIE, HEPATHOLOGIE
SAUVAGE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel (C.S)	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE-CHIRURGIE GENERALE
VANDROUX Jean-Claude (C.S)	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
VERGNENEGRE Alain (C.S)	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
VIDAL Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE

VIGNON Philippe	REANIMATION MEDICALE
VIROT Patrice (C.S)	CARDIOLOGIE
WEINBRECK Pierre (C.S)	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine (C.S)	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	Parasitologie et Mycologie
ANTONINI Marie-Thérèse (C.S)	Physiologie
BOUTEILLE Bernard	Parasitologie et Mycologie
CHABLE Hélène	Biochimie et Biologie Moléculaire
DAVIET Jean-Christophe	Médecine Physique et Réadaptation
DRUET-CABANAC Michel	Médecine et Santé au Travail
DURAND-FONTANIER Sylvaine	Anatomie – Chirurgie Digestive
ESCLAIRE Françoise	Biologie Cellulaire
JULIA Annie	Hématologie
LE GUYADER Alexandre	Chirurgie Thoracique et Cardio- Vasculaire
MOUNIER Marcelle	Bactériologie – Virologie – Hygiène Hospitalière
PETIT Barbara	Anatomie et Cytologie Pathologique
PICARD Nicolas	Pharmacologie Fondamentale
QUELVEN-BERTIN Isabelle	Biophysique et Médecine Nucléaire
RONDELAUD Daniel	Cytologie et Histologie
TERRO Faraj	Biologie Cellulaire
VERGNE-SALLE Pascale	Thérapeutique
VINCENT François	Physiologie

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	Anglais
----------------	---------

PROFESSEURS ASSOCIES À MI-TEMPS

BUCHON Daniel	Médecine Générale
BUISSON Jean-Gabriel	Médecine Générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE À MI-TEMPS

DUMOITIER Nathalie	Médecine Générale
PREVOST Martine	Médecine Générale

Remerciements

A Madame le Professeur Marie-Laure DARDÉ, Professeur des Universités de Parasitologie et Mycologie, Chef de Service, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici toute ma gratitude pour votre disponibilité et pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de mon cursus d'interne en biologie médicale.

A Madame le Professeur Dominique BORDESSOULE, Professeur des Universités d'Hématologie Clinique, Chef de Service, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments respectueux.

A Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Praticien hospitalier, d'avoir accepté de juger ce travail. Mon passage dans le service de Bactériologie fut un réel plaisir et restera un excellent souvenir. Trouve en cette thèse l'expression de tout mon respect et de ma profonde sympathie.

A Monsieur le Professeur Gilles DREYFUS, Professeur des Universités de Parasitologie et Mycologie de la faculté de Pharmacie, d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Vos connaissances et votre disponibilité ont contribué à me faire apprécier l'entomologie.

A Monsieur le Docteur Daniel AJZENBERG, Maître de Conférence des Universités de Parasitologie et Mycologie, Praticien hospitalier, de m'avoir encadré dans l'élaboration de ce travail. Ta patience, ton écoute et tes conseils précieux m'auront été d'une grande aide. Travailler à tes côtés m'a apporté beaucoup, c'est un honneur et un réel plaisir. Trouve en cette thèse l'expression de toute ma gratitude et de ma profonde sympathie.

Je remercie les personnes qui ont contribué à ce travail :

A Annabelle et Valérie, techniciennes au sein du laboratoire de Mycologie du CHU de Limoges, pour leur collaboration précieuse au recueil des prélèvements et des souches fongiques. Merci pour votre bonne humeur.

A Mademoiselle Marie-Claire Baclet, Ingénieur responsable de l'Unité de séquençage, pour tes connaissances en biologie moléculaire et ta disponibilité.

A Olivier Barraud, Assistant au laboratoire de Bactériologie pour tes conseils avisés dans ma démarche scientifique et ma rédaction.

A Elsa, Nadia et ma maman pour le travail de relecture.

Au laboratoire Pfizer, pour son aide à l'élaboration de ce travail.

Je tiens également à remercier ceux et celles qui ont contribué à ma formation et avec qui j'ai travaillé durant tout mon internat :

A tous les membres des laboratoires du CHU de Limoges et du GHSR de Saint-Pierre dans lesquels j'ai eu la chance de travailler, pour leur accueil, la formation et leur gentillesse. Soyez assurés de ma sympathie.

A mes co-internes pour tous les bons moments passés ensemble. A David, Delphine, Jean-Baptiste, Julien, Leïla, Lydie, Marie-Laurence, Paul, Rémi, Sébastien et tous les autres, pour leur amitié.

A l'ensemble des enseignants de la Faculté de Médecine de Toulouse qui ont assuré ma formation.

A Christelle et Clément, ce que j'ai de plus cher au monde.

A mes parents et ma grand-mère, avec toute mon affection.

A ma famille et belle-famille, pour leur soutien et leur gentillesse.

A mes amis, pour tous les bons moments passés ensemble et à venir.

Plan

Introduction.....	11
Généralités.....	13
1. Les infections fongiques invasives.....	14
1.1. Epidémiologie.....	14
1.2. Critères diagnostiques.....	28
2. Diagnostic en Mycologie Médicale.....	33
2.1. Méthodes conventionnelles.....	34
2.2. Biologie moléculaire.....	46
Matériels et méthodes.....	57
1. Souches.....	58
2. Prélèvements biologiques.....	60
3. Extraction de l'ADN.....	62
4. Choix des amorces.....	65
5. PCR.....	67
6. Séquençage.....	69
7. Application pratique.....	71
Résultats.....	72
1. Souches.....	73
1.1. Levures.....	73
1.2. <i>Aspergillus</i>	73
1.3. Mucorales.....	74
1.4. Autres filamenteux.....	74
2. Prélèvements biologiques.....	77
2.1. Infection fongique invasive prouvée.....	77
2.2. Infection fongique invasive probable.....	77
2.3. Synthèse.....	80
Discussion.....	82
1. Choix de la technique.....	85
2. Souches.....	86
3. Prélèvements biologiques.....	87
4. Perspectives.....	89
Conclusion.....	91
Annexes.....	93
Bibliographie.....	101

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	ADN ribosomal
AI	Aspergillose Invasive
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	ARN ribosomal
BD	β -D-glucane
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
dNTP	Désoxyribonucléotide
DO	Densité Optique
e.g.	exempli gratia (par exemple)
EIA	Enzyme ImmunoAssay
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FISH	Fluorescence par Hybridation In Situ
GM	GalactoMannane
GVHD	Graft-Versus Host Disease
HLA	Human Leucocyte Antigens
IFI	Infection Fongique Invasive
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ITS	Internal Transcribed Spacer
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LIPA	Reverse-hybridization Line Probe Assay
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIA	RadioImmunoAssay
RLB	Reverse Line Blot hybridization assay
SNC	Système Nerveux Central
SSCP	Single-Stranded Conformation Polymorphism
T_m	Melting Temperature
US FDA	<i>United State Food and Drug Administration</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Acquise

Introduction

Les infections fongiques invasives (IFI) sont une cause importante de morbidité et de mortalité chez les patients immunodéprimés. L'émergence d'infections dues à des espèces de levures autres que *Candida albicans* ou à des champignons filamenteux autres qu'*Aspergillus sp.* impose une identification précise de l'agent responsable d'une infection pour adapter au mieux le traitement antifongique des patients.

Cependant, le diagnostic des IFI et l'identification des microorganismes en cause sont souvent difficiles. Les signes cliniques sont peu spécifiques. Les hémocultures et les cultures des biopsies de tissus infectés sont souvent négatives.

Pour tenter d'améliorer les performances du diagnostic de ces infections, des techniques de détection par amplification génique de séquences d'ADN fongique présentes dans les liquides biologiques ou les tissus infectés ont été proposées. Une des stratégies utilisées est la détection ciblée d'une espèce donnée en utilisant un couple d'amorces spécifiques d'une séquence de l'ADN de l'espèce considérée. Une autre approche est la détection dite « universelle » de séquences d'ADN d'origine fongique. Dans ce cas, les amorces sont choisies pour s'hybrider avec des séquences conservées ou « consensus » du génome des champignons qui encadrent des régions de séquences variables selon les espèces. L'identification de l'espèce est faite alors par hybridation avec une sonde spécifique ou par le séquençage des produits d'amplification. Ces techniques de détection universelle ont été évaluées pour rechercher de l'ADN fongique à partir d'échantillons de liquides biologiques ou de prélèvements tissulaires. Les gènes fongiques ciblés par les techniques d'amplification « universelle » appartiennent au complexe génique codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) 18S, 28S et 5,8S qui sont séparés les uns des autres par les régions ITS 1 et ITS 2 (*Internal Transcribed Spacer 1 et 2*). Chez les champignons, les séquences des gènes codant pour l'ARNr sont relativement conservées parmi les espèces et sont donc moins discriminantes que les séquences des régions ITS qui ont un degré de polymorphisme plus grand. Mais le nombre élevé de copies des gènes codant pour les ARNr 18S, 28S et 5,8S dans le génome des champignons a l'avantage de conférer une grande sensibilité aux techniques d'amplification génique ciblées sur cette région.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'intérêt de l'amplification des séquences d'ADN codant pour les régions ITS 1 et 2 à l'aide d'amorces consensus situées sur l'ADNr pour la détection et l'identification de champignons à l'origine d'IFI.

Généralités

1. Les infections fongiques invasives

1.1.Épidémiologie

Selon une étude réalisée entre 1998 et 1999 en France, l'incidence des IFI a été estimée à 9,2/1000 admissions en Hématologie (1200 IFI par an), à 6,3/1000 en Réanimation (1300 IFI/an) et à 5,2/1000 en Maladies infectieuses (350 IFI/an) [74]. Sur 209 dossiers détaillés, 66% des IFI en Hématologie étaient dues à des aspergilloses, 29% à des candidoses, 3% à des cryptococcoses et 2% à des mycoses plus rares mais considérées comme émergentes (mucormycose, fusariose, scédosporiose, trichosporonose). Il est à noter également que 70% des IFI en Réanimation étaient dues à des candidoses.

1.1.1. Candidoses

Il existe différentes formes de candidoses invasives :

- la candidémie, définie par au moins une hémoculture positive à *Candida*, avec ou sans localisation endocarditique,
- la candidose profonde avec atteinte d'un organe profond,
- la candidose aiguë disséminée, définie par l'atteinte d'au moins deux organes profonds non-contigus avec ou sans formes métastatiques cutanées diffuses.

Une candidose invasive va être fortement suspectée en présence de fièvre isolée résistante aux antibiotiques avec altération de l'état général chez un patient à risque.

1.1.1.1. Facteurs de risque

L'origine de l'infection par des levures du genre *Candida* est le plus souvent endogène. Les levures du genre *Candida*, en particulier *Candida albicans*, sont intégrées dans la microflore des tractus gastro-intestinaux et oropharyngés chez l'Homme. L'altération des

mécanismes de défense en cas d'hospitalisation, de diabète ou d'un déficit immunitaire, est associée à une colonisation grandissante par *Candida*. La suppression de la flore bactérienne habituelle du tube digestif par l'administration d'antibiotiques à large spectre permet la croissance et la prolifération en quantité anormalement importante de levures du genre *Candida*. Une fois colonisées, les muqueuses lésées autorisent la translocation microbienne à travers la barrière intestinale digestive [116]. Cette translocation est facilitée par des conditions telles qu'un iléus intestinal, la radiothérapie, une rupture de la barrière muqueuse résultant d'actes chirurgicaux, des médicaments modifiant le pH intestinal, un drainage ou une ischémie de perfusion [115].

La transmission croisée de levures est cependant possible, comme l'atteste la description de nombreuses épidémies liées la plupart du temps à des transmissions manuportées [121] ou à des contaminations des liquides de perfusion ou de nutrition parentérale [15, 52].

1.1.1.1.1. Facteurs généraux

Les facteurs généraux tels que les âges extrêmes (vieillard, prématuré), une maladie sous-jacente débilite, la présence de comorbidités nombreuses, la convalescence d'une opération chirurgicale majeure, la présence de dysfonction organique ou d'un score de sévérité de la maladie témoignant de perturbations physiologiques importantes, sont considérés et déterminés dans la plupart des études comme des facteurs de risque de l'infection à levure du genre *Candida* (**tableau 1**).

1.1.1.1.2. Facteurs spécifiques

Des facteurs de risque plus spécifiques associés aux infections à *Candida* ont été identifiés chez des patients ayant acquis des candidémies nosocomiales [13, 125]. En particulier, l'hémodialyse ou l'ultrafiltration rénale à des fins de support de fonction, les brûlures étendues ou l'exposition à de multiples antibiotiques à large spectre, ainsi qu'à des manoeuvres invasives et des accès vasculaires multiples, sont des facteurs de risques indépendants en analyse multivariée (**tableau 1**).

La colonisation par des levures du genre *Candida* a été identifiée comme un facteur indépendant de l'acquisition d'une candidémie dans plusieurs études [115]. L'importance du degré de colonisation dans le risque d'acquisition d'infection sévère à *Candida* a été mise en évidence il y a plus de 20 ans chez des patients ayant eu une chirurgie abdominale [141]. Chez des patients victimes de maladies cancéreuses, Martino *et al.* [88] ont relevé que la candidémie se développait chez 32% des patients colonisés au niveau de plusieurs sites corporels, comparativement à 1% seulement chez ceux colonisés au niveau d'un seul site et 0,5 % de ceux qui n'étaient pas colonisés par *Candida*.

Une exposition préalable ou concomitante à une antibiothérapie à large spectre constitue un facteur de risque indéniable d'infection à *Candida*, et en particulier de candidémie. Plus le spectre est élargi et plus la durée d'antibiothérapie est prolongée, plus le risque de complication fongique est important. Dans l'étude de Fraser *et al.* [33], 94% des patients développant une candidémie avaient été exposés au préalable à des antibiotiques et 62% avaient reçu plus de quatre agents différents avant de développer la candidémie. Tout antibiotique à large spectre, par son effet de destruction de la flore intestinale autorisant la croissance de levures du genre *Candida*, peut être associé à une augmentation du risque d'infection secondaire.

Les patients admis en réanimation sont à risque élevé d'infections à levures du genre *Candida*, compte tenu du fait qu'ils cumulent souvent plusieurs facteurs de risque (**tableau 1**). Les anomalies de la fonction immunitaire compliquant les perturbations physiologiques contribuent à accroître le risque infectieux. La transplantation d'organe associant l'intervention chirurgicale majeure et des traitements immunosuppresseurs évitant le rejet, placent le patient à risque infectieux élevé, en particulier en cas d'exposition prolongée à des antibiotiques à large spectre, d'accès intravasculaires et de drainages multiples, de fuites des anastomoses digestives, biliaires ou pancréatiques et de colonisation précoce par *Candida* [151]. Le recours à de multiples accès vasculaires, souvent nécessaire au support des fonctions vitales, constitue un facteur de risque prédominant chez le patient colonisé par des levures du genre *Candida* ; entre 60 et 80% des épisodes de candidémie sont secondaires à des infections d'accès vasculaires [115].

Tableau 1. Facteurs de risques prédisposant aux infections à levures du genre *Candida*, d'après Pittet, *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* [115].

Facteurs généraux

Les facteurs généraux sont associés à un risque augmenté d'infections nosocomiales bactériennes ou fongiques.

Âges extrêmes (vieillard, prématuré)

Maladie débilitante, diabète

Présence de (nombreuses) comorbidité(s)

Séjour prolongé en réanimation

Antécédent récent de chirurgie digestive ou urologique

Cathétérisation vésicale en particulier en cas de chirurgie urologique

Recours à une cathétérisation vasculaire (multiple)

Facteurs spécifiques

Ces facteurs sont plus spécifiquement associés à un risque augmenté d'infections à levures du genre *Candida*.

Colonisation par *Candida sp.*

Exposition à des antibiotiques à large spectre

Neutropénie

Insuffisance rénale et hémodialyse/hémofiltration

Nutrition parentérale totale

Immunosuppression et transplantation d'organe solide

Diminution de l'immunité cellulaire

Traumatisme (multiple) majeur

Brûlures étendues

Fuite digestive après anastomose chirurgicale

Iléus intestinal et diarrhée

1.1.1.2. Agents responsables et incidence

Les levures du genre *Candida* sont des cellules de forme variable (globuleuse, ovoïde, cylindrique à allongée) dont la reproduction se fait par bourgeonnement multilatéral. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou bien développé selon les espèces. Certaines espèces, comme *Candida albicans* possèdent un vrai mycélium. Environ 200 espèces sont connues dont 10% responsables d'infections humaines.

L'incidence des candidémies est en France de 0,22 à 0,29 pour 1000 admissions mais elle est variable selon les établissements (0,52 dans les Centres Anti-Cancéreux, 0,24 dans les CHU, 0,10 dans les hôpitaux généraux) [126, 148].

Avec une prévalence de 8,5%, les candidémies étaient classées au 5^{ème} rang des infections systémiques après les entérobactéries, *Staphylococcus aureus*, les Staphylocoques à coagulase négative et *Pseudomonas aeruginosa* en Réanimation en 2006 [17].

On observe régulièrement une diminution du taux de *Candida albicans* au profit des espèces non *albicans* [112]. *Candida albicans* représente actuellement environ 56% des *Candida* isolés d'hémoculture en Europe, les espèces non-*albicans* étant représentées principalement par *Candida glabrata* (14%), *Candida parapsilosis* (13%), *Candida tropicalis* (7%) et *Candida krusei* (2%) [148]. La proportion d'espèces non-*albicans* est plus importante chez les patients d'Hématologie. Ainsi, d'après l'étude épidémiologique de l'EORTC de 1992 à 1994 réalisée dans 30 services hospitaliers européens, *Candida albicans* serait à l'origine de 70% des candidémies observées chez des patients atteints de tumeurs solides, alors qu'il n'a été retrouvé que dans 36% des candidémies survenues des patients ayant une hémopathie [152].

1.1.1.3. Pronostic

La mortalité reste importante (environ 40% de mortalité globale) et au moins 20 à 30% de mortalité attribuable. Elle est d'autant plus élevée si l'infection est causée par *Candida krusei* (55%) ou *Candida glabrata* (45%). La mortalité à 30 jours est estimée à 38% [148].

La mortalité secondaire aux infections invasives à *Candida albicans* a diminué chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques grâce à l'utilisation étendue du fluconazole en prophylaxie [85, 86].

1.1.2. Aspergilloses

Le tableau clinique typique est une pneumopathie fébrile résistante à une antibiothérapie à large spectre chez un patient à risque mais la dissémination à tous les organes est possible. L'atteinte du système nerveux central est fréquente chez le patient allogreffé très immunodéprimé.

1.1.2.1. Facteurs de risque

Les facteurs de risque de survenue d'une aspergillose invasive (AI) sont liés à l'état d'immunodéficience de l'hôte et à des facteurs exogènes liés à l'environnement. Les moyens de défense anti-aspergillaire sont imparfaitement connus. Quatre ont été clairement identifiés : la barrière muco-ciliaire, les macrophages alvéolaires, les polynucléaires neutrophiles, des cytokines TH1 dépendantes. L'altération d'un ou plusieurs de ces moyens de défense est pratiquement toujours une condition préalable au développement d'une aspergillose invasive.

Les modifications d'environnement majorant le risque aspergillaire sont surtout les travaux portant sur le gros oeuvre des bâtiments. Des facteurs climatiques saisonniers (période hivernale, estivale) pourraient influencer sur l'aérocontamination par *Aspergillus*.

Les modes de contamination sont essentiellement l'inhalation de spores (porte d'entrée pulmonaire ou sinusienne) et plus rarement le dépôt de spores sur des plaies, brûlures, site opératoire [6, 96]. La prévention est donc indispensable avec l'isolement protecteur chez le patient neutropénique ($<500 /\text{mm}^3$) ou immunodéprimé dans une chambre protégée avec filtration de l'air, la surveillance de l'eau et de l'alimentation, le respect des règles rigoureuses de circulation des personnes et des biens, les protocoles de bionettoyage et les prélèvements d'air et de surfaces (surveillance de la biocontamination fongique environnementale).

1.1.2.1.1. Hématologie clinique

En Hématologie clinique, cinq facteurs de risque ressortent de l'analyse de la littérature comme clairement identifiés [5]. Chacun d'entre eux induit une augmentation du risque potentiel, qu'il est difficile d'évaluer avec précision. Le risque aspergillaire augmente encore plus clairement lorsque plusieurs de ces facteurs se cumulent :

- La neutropénie est un facteur de risque majeur. Entrent en ligne de compte son degré et sa durée : le risque aspergillaire augmente si le taux des polynucléaires neutrophiles est inférieur à $500/\text{mm}^3$ pendant une période supérieure ou égale à 2 semaines ou en cas de neutropénie inférieure à $100/\text{mm}^3$ quelle qu'en soit la durée.
- La corticotérapie à posologie élevée et prolongée est un facteur favorisant reconnu malgré des controverses sur la valeur seuil de la dose quotidienne et de la durée : le seuil d'augmentation du risque généralement admis est de $1\text{mg}/\text{kg}/\text{jour}$ de méthyl prednisolone ou de prednisone pendant une à trois semaines.
- La colonisation des voies aériennes supérieures et/ou inférieures par *Aspergillus* est hautement prédictive (60 à 90%) d'une AI lors d'un épisode ultérieur de neutropénie sévère et/ou prolongée.
- Un antécédent d'AI antérieure expose à un risque de rechute supérieur à 50%, en cas de neutropénie ultérieure, malgré une chimioprophylaxie secondaire.
- L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est une situation particulière par le cumul des facteurs de risque, dont rend compte la morbidité aspergillaire majeure chez ces patients. L'AI est dans plus de 50% des cas une infection tardive, survenant de 60 à plus de 100 jours après la greffe chez des patients non neutropéniques. Les facteurs de risque identifiés sont au nombre de 3 : la réaction du greffon contre l'hôte, dont le traitement curatif (corticoïdes) a un rôle aggravant ; le type de greffe, une allogreffe de moelle phéno-identique (donneur et receveur appariés mais non apparentés) ou une greffe partiellement incompatible sont plus à risque qu'une greffe géno-

identique (donneur et receveur appariés et apparentés); l'interruption des mesures de protection (chambre à air traité).

Interviennent aussi comme facteurs favorisants sans qu'il soit possible de leur donner une valeur formelle, le type de maladie en traitement (maligne ou non), la notion de rechute(s), la situation de deuxième greffe, la séropositivité vis à vis du Cytomégalovirus, l'utilisation d'une irradiation corporelle totale pour le conditionnement [5]. Une porte d'entrée cutanée (cathéter intra cave), des lésions muqueuses induites par la chimiothérapie, un diabète secondaire à la corticothérapie et/ou à l'asparaginase ont peut-être un rôle favorisant mais la place de ces facteurs est difficile à préciser car ils se cumulent généralement aux facteurs de risque précédents.

1.1.2.1.2. Transplantation d'organe

En transplantation d'organe, le risque aspergillaire est lié aux particularités de l'organe transplanté, aux modalités du traitement immunodépresseur et à des facteurs d'environnement [5].

En transplantation hépatique sont reconnus comme facteur de risque : les hépatites fulminantes et sub-fulminantes, des suites opératoires compliquées (dysfonction du greffon, sepsis, insuffisance rénale aiguë traitée par hémodialyse, thrombopénie, transfusions multiples, réinterventions) et les retransplantations. En transplantation pulmonaire, l'infection à CMV et une colonisation post opératoire précoce sont généralement retenus comme facteurs de risque.

Le traitement immunosuppresseur repose sur des molécules dont le mode d'action est encore incomplètement élucidé, et qui induisent un déficit immunitaire fonctionnel, mais pas ou peu de neutropénie. L'intensité de l'immunodépression induite majore le risque aspergillaire. Celui-ci est maximal lors des 3 à 6 premiers mois post-greffe et lors des épisodes ultérieures de rejet. Parmi les médicaments utilisés se détache principalement le rôle favorisant de la corticothérapie. Lorsqu'elle est administrée à une posologie supérieure à 1.25mg/kg/j de prednisone ou méthylprednisolone, elle est reconnue comme facteur favorisant. La durée n'est pas précisée. Les posologies utilisées avant 1980 induisaient donc un risque reconnu. Le meilleur contrôle du rejet de greffe lié à l'introduction de nouvelles

molécules (ciclosporine, tacrolimus) a permis de diminuer les doses quotidiennes de stéroïdes et la fréquence des bolus comme traitement des rejets. La ciclosporine, le tacrolimus n'apparaissent pas constituer un facteur de risque propre. Le risque d'aspergillose invasive a diminué en transplantation rénale et cardiaque depuis l'utilisation de ces molécules.

1.1.2.2. Agents responsables et incidence

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures à filaments septés caractérisées par la présence de conidiophores renflés à l'extrémité en vésicule et de phialides qui se forment directement ou par l'intermédiaire de métules sur cette vésicule. Les phialides produisent des conidies en chaîne. L'ensemble vésicule, phialides et conidies est appelé tête aspergillaire. Une quarantaine d'espèces sont pathogènes pour l'homme [96]. L'espèce *fumigatus* est de loin la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine, les autres espèces, notamment *flavus*, *nidulans*, *niger*, *terreus* et *ustus* sont plus rarement impliquées. Ce sont des champignons ubiquitaires de l'environnement et opportunistes pour l'homme. Certaines espèces, comme *Aspergillus flavus* et *Aspergillus terreus* posent un problème thérapeutique du fait de leur sensibilité diminuée à l'amphotéricine B [145].

Selon une revue de la littérature, l'incidence des AI dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques varie de 5-8% après la réception d'un transplant d'un donneur HLA-identique, à 10%-25% après la réception d'un transplant d'un donneur non apparenté HLA et à 0.5-2% après la réception d'un transplant autologue [22]. Cependant la comparabilité entre les études était difficile notamment à cause d'un manque de consensus sur la définition de l'infection, jusqu'à ce que l'Organisation européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (EORTC) et le Groupe d'Étude des Mycoses (MSG) n'aient publié des définitions standards à un niveau international [7, 25].

En dehors des procédures de greffe, la morbidité est plus élevée dans les hémopathies malignes aiguës (2 à 5%) [5]. Le risque paraît augmenter avec la répétition des aplasies thérapeutiques, notamment en cas de rechute. La morbidité est plus faible dans les hémopathies malignes chroniques et les lymphomes. Parmi les maladies hématologiques non malignes, le risque d'aspergillose est important en cas d'aplasie médullaire sévère (5-10%). Il en est de même dans certains déficits immunitaires congénitaux (déficits combinés sévères), surtout chez les enfants atteints de granulomatose septique.

1.1.2.3. Pronostic

1.1.2.3.1. Hématologie clinique

Les AI sont une cause importante de décès après transplantation de cellules souches [64, 82, 83, 89, 107, 155]. La mortalité des cas déclarés est considérable, de 50 à 90% selon la nature de la maladie associée ou des facteurs iatrogéniques, parfois cumulés [5]. Le plus haut taux de mortalité due à l'Aspergillose est observé chez les greffés allogéniques de cellules souches hématopoïétiques [69], ainsi le taux de survie à 1 an après le début d'une AI chez ces patients est d'environ 20 % [83].

Des facteurs pronostiques de décès en rapport avec une AI après greffe de cellules souches hématopoïétiques ont été évalués. Une première étude conduite sur un nombre réduit de patients [123] a identifié plusieurs facteurs directement corrélés à une sur-mortalité, notamment l'étendue de l'infection, la localisation clinique (par exemple, la localisation cérébrale et les formes disséminées) et l'utilisation de corticostéroïdes. Une étude plus récente menée par Cordonnier *et al.* a impliqué les 64 centres de santé publique affiliés à la Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire pour participer à l'évaluation des facteurs pronostiques de décès suite à une AI prouvée ou probable après la greffe de cellules souches hématopoïétiques en 2002 au moment du diagnostic d'AI. La mortalité attribuée à une AI au cours des 4 mois après le diagnostic était de 0,62 (l'intervalle de confiance à 95%, 0,47–0,76). Sept facteurs évalués au diagnostic étaient fortement rattachés au décès par AI : l'âge de 12-35 ans, la dissémination de l'AI, la présence d'une effusion pleurale, un taux de monocytes inférieur à $120/\text{mm}^3$, l'administration prolongée de corticoïdes au cours des 2 mois précédents, la réception d'une dose 2 mg/kg de corticoïdes au moment du diagnostic, et une réaction du greffon contre l'hôte non contrôlée [22].

1.1.2.3.2. Transplantation d'organe

Dans les transplantations de poumons, malgré une incidence médiane faible (6,2%), la mortalité globale reste élevée (52%) en particulier au cours des AI d'apparition tardive [138]. Dans les autres transplantations d'organes solides, la mortalité est élevée, de 77 à 100% en fonction du type d'organe, avec une incidence moyenne autour de 2% [139].

1.1.3. Mycoses émergentes

De nombreuses publications rapportent l'émergence d'infections provoquées par d'autres filamenteux, comme les *Fusarium*, *Scedosporium*, les Zygomycètes. Ces observations sont surtout inquiétantes étant donné le mauvais pronostic associé à ces IFI [8, 11, 61, 110, 122, 124, 129, 131, 156].

1.1.3.1. Mucormycoses

Les Zygomycètes englobent deux ordres de champignons importants sur le plan médical : les Entomophthorales qui sont retrouvés surtout en zone tropicale et les Mucorales qui sont cosmopolites. Les filaments de type mucorale sont larges, non septés, irréguliers et ramifiés à angle droit. Les spores asexuées sont des endospores car elles se forment à l'intérieur de sacs appelés sporocystes.

Le genre *Rhizopus* est le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine [124], toutefois un certain nombre d'autres mucorales, comme les *Absidia*, *Rhizomucor* ou *Cunninghamella*, sont de plus en plus isolés lors d'infections graves chez les patients immunodéprimés [124]. Les facteurs de risques de développer une mucormycose sont la neutropénie, le diabète déséquilibré, toute acidose métabolique (notamment lors d'un diabète acido-cétosique), la corticothérapie, les traitements par chélateurs de fer comme la déféroxamine, la dénutrition, la prématurité, la toxicomanie intra-veineuse [61]. Dans 9% des cas, aucun facteur de risque n'est retrouvé.

La porte d'entrée se fait habituellement par les voies respiratoires. La mucormycose se présente classiquement sous la forme d'une infection rhino-orbito-cérébrale chez le diabétique. Les patients immunodéprimés avec une neutropénie ou suivant une transplantation peuvent présenter des infections rhinocérébrales ou pulmonaires [61]. Les formes gastro-intestinales sont rares et peuvent se rencontrer chez des enfants ou nouveau-nés dénutris. La porte d'entrée peut-être cutanée chez les patients subissant une intervention chirurgicale, un traumatisme, des brûlures, ou pour le nouveau-né en soins intensifs. Cette dernière situation se produit en raison de la nature précaire du tégument des nouveau-nés. Le développement des mucormycoses dans les zones cutanées a été associé avec une variété de produits adhésifs

contaminés, des bandages élastiques, et des abaisse-langues utilisés dans les hôpitaux [156]. La dissémination, de très mauvais pronostic, peut survenir à partir de n'importe quel site primaire infecté.

Le diagnostic définitif dépend de la démonstration de la morphologie caractéristique des filaments dans les tissus. La culture de ces tissus permet de définir le genre mais elle est souvent négative malgré un examen direct positif.

La mortalité varie avec le site de l'infection : 96% lors d'infection disséminée, 85% dans la forme gastro-intestinale et 76% lors de localisation pulmonaire. La précocité du traitement associant formulation lipidique d'amphotéricine B et exérèse chirurgicale est un élément décisif dans le pronostic des mucormycoses [129].

1.1.3.2. Fusarioses

Les *Fusarium* sont des champignons filamenteux, vivants en saprophytes dans le milieu extérieur, retrouvés dans le sol, l'air, l'eau et sur de nombreux végétaux et céréales. Le genre *Fusarium* contient environ une vingtaine d'espèces. Quatre espèces sont incriminées dans 95 % des infections en pathologie humaine : *Fusarium solani* le plus fréquent, suivi de *Fusarium moniliforme* (syn. *F. verticilloides*), *Fusarium oxysporum* et *Fusarium dimerum* [11, 101].

Les fusarioses sont de plus en plus reconnues comme une cause d'IFI chez les patients neutropéniques et chez les transplantés [83, 98, 132]. Certains centres ont signalé les *Fusarium* comme étant la deuxième cause, après les *Aspergillus*, d'IFI chez les patients transplantés [83]. Les facteurs de risque des fusarioses invasives sont notamment la neutropénie persistante et la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). La population de patients avec une GVHD est particulièrement à risque dans les transplantations de sang de cordon et lors de l'utilisation de fortes doses de corticostéroïdes.

La mortalité liée à la fusariose disséminée chez l'adulte varie selon les études entre 50 et 70 % [11, 39]. Il existe un risque élevé de rechute de la fusariose lors d'un traitement myélosuppresseur ultérieur, après une guérison apparente de l'infection [11]. Les formes cliniques de fusarioses chez l'immunodéprimé sont des formes disséminées. Classiquement, la fusariose se présente comme une fièvre persistante, réfractaire aux traitements antibiotiques

et antifongiques. Elle comporte souvent des lésions cutanées, des signes de pneumopathie ou de sinusite, et est parfois accompagnée de myalgies [11, 39]. Les lésions cutanées surviennent chez au moins 70% des patients. Elles représentent parfois la porte d'entrée. Les lésions primaires sont alors des cellulites autour d'une onychomycose, d'une blessure cutanée, ou d'une piqûre d'insecte. Le plus souvent, cependant, les lésions cutanées sont des localisations métastatiques.

Le *Fusarium* est un germe facilement identifiable en culture, à partir du sang ou des biopsies, notamment cutanées. Les hémocultures sont positives dans 60 % des cas de fusarioses disséminées [11]. La phagocytose est le premier mécanisme immunitaire de défense contre le *Fusarium*. La guérison est fortement liée à la récupération d'un nombre normal de polynucléaires neutrophiles. L'utilisation précoce d'un antifongique est aussi un élément fondamental du traitement, bien que l'efficacité de la plupart des antifongiques sur le *Fusarium* soit limitée. L'amphotéricine B est considérée comme le traitement de référence des fusarioses disséminées.

1.1.3.3. Scédosporioses

Scedosporium apiospermum (*Pseudallescheria boydii*) est un hyalohyphomycète ubiquitaire présent dans le sol, les eaux usées et les eaux polluées. Ce micro-organisme est une cause rare d'infection chez l'homme.

Des infections pulmonaires, cérébrales et disséminées fatales ont été observées chez des victimes (immunocompétentes) de noyade. Cependant les IFI dues à *Scedosporium apiospermum* sont le plus souvent rencontrées chez les patients immunodéprimés, notamment en cas de greffe de cellules souches hématopoïétiques ou en cas de transplantations d'organe solide, avec une mortalité très élevée. La localisation pulmonaire est la plus fréquente et est non différenciable de l'aspergillose invasive pulmonaire sur les plans cliniques, radiologiques et histologiques. De 1985 à 1999, Marr *et al.* [83] ont attribué à *Scedosporium sp.*, 9 infections invasives chez des patients receveurs de cellules souches hématopoïétiques.

Le traitement des scédosporioses invasives est difficile, car *Scedosporium apiospermum* a une résistance naturelle à de nombreux antifongiques, dont le fluconazole et l'amphotéricine B [157].

Scedosporium prolificans est responsable d'infection localisée (à l'os et au tissu mou le plus souvent) chez l'immunocompétent et est responsable d'IFI de mauvais pronostic chez le patient immunodéprimé [122].

1.2. Critères diagnostiques

Depuis plusieurs dizaines d'années, les IFI opportunistes chez les patients immunodéprimés ont vu leur fréquence augmenter sans que les critères diagnostiques de ces IFI n'aient été clairement définis. Ainsi, en 2002, sur la base d'une révision de la littérature et d'un consensus international, les membres de l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative group) et du MSG (National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group) ont élaboré des définitions des IFI applicables en recherche clinique [7]. Trois niveaux de preuve sont proposés : "prouvé", "probable" et "possible".

Ces définitions sont destinées à être utilisées dans un contexte de recherche clinique et/ou épidémiologique, mais pas pour la prise de décision clinique.

Les définitions de 2002 n'ont pas été sans lacunes. Par exemple, la catégorie « possible » (2002) a permis à un trop grand nombre de cas douteux d'être inclus, en particulier ceux impliquant une neutropénie, des infiltrats pulmonaires non spécifiques, une fièvre réfractaire aux antibiotiques à large spectre, mais sans signe évident d'IFI [10]. Ces cas représentent des patients avec un risque plus élevé d'IFI mais sont tout à fait différents des cas, également définis comme des cas possibles, pour lesquels des anomalies pulmonaires plus spécifiques étaient présentes.

En 2008, les définitions ont été modifiées afin d'établir une distinction entre les cas douteux et les cas plus probables sans support mycologique évident [23, 36, 45, 47].

Les définitions originales de 2002 avaient également été restreintes aux patients atteints de cancer et aux receveurs de cellules souches hématopoïétiques sans intégrer d'autres populations comme les transplantés d'organe solide et les patients avec des immunodéficiences primaires [48, 106].

Le groupe de consensus EORTC/MSG s'est réuni à Chicago (Illinois) le 14 Septembre 2003, lors de la 43^{ème} *Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (ICAAC). Tous les membres du groupe ont convenu de la nécessité d'affiner et de réviser les définitions. Il a également été convenu à l'unanimité que la définition devrait rester facilement reproductible et offrir l'opportunité d'une comparaison des futurs ensembles de données avec des données qui ont été recueillies dans les essais cliniques impliquant des

patients avec des infections fongiques invasives prouvées et probables selon les définitions originales (2002). Enfin, le groupe a entrepris de réexaminer la possibilité d'utiliser les définitions à des fins thérapeutiques, de mettre au point un moyen d'étendre leur application à d'autres groupes de patients, de passer en revue la pertinence des résultats obtenus à partir d'études basées sur les définitions pour la pratique clinique, et de tenter d'intégrer tous les tests de laboratoire et techniques d'imagerie dans les définitions.

Les questions qui semblaient difficiles à résoudre ont été abordées en séance publique au cours du 15^{ème} Congrès européen de microbiologie clinique et des maladies infectieuses à Copenhague (Danemark) et à la 45^{ème} ICAAC à Washington, DC. Le projet final a été mis à la disposition de l'ensemble de la communauté sur les sites web *Dr Fungus* (<http://www.doctorfungus.org>) et *The Aspergillus* (<http://www.aspergillus.org.uk>) puis publié dans *Clinical Infectious Disease* [25].

Les définitions révisées en 2008 des IFI sont résumées et traduites de l'anglais dans les **tableaux 2 et 3** (en excluant les mycoses endémiques).

Tableau 2. Critères pour les infections invasives prouvées à l'exception des mycoses endémiques (traduit et adapté de [25]).

Analyse et type de prélèvement	Filamenteux ^a	Levures ^a
Analyse microscopique d'un prélèvement normalement stérile	Examen histopathologique, cytopathologique ou microscopique direct ^b à partir d'une ponction à l'aiguille ou d'une biopsie mettant en évidence des filaments ou éléments lévuriformes mélangés associés à des lésions tissulaires	Examen histopathologique, cytopathologique ou microscopique direct ^b à partir d'une ponction à l'aiguille ou d'une biopsie d'un site normalement stérile (autre que des muqueuses) montrant des levures (par exemple, les <i>Cryptococcus sp.</i> avec des levures encapsulées ou des <i>Candida sp.</i> avec des pseudofilaments ou des vrais filaments ^c)
Culture d'un prélèvement normalement stérile	Obtention d'une moisissure ou d'un dématé produisant des levures par la culture d'un échantillon prélevé selon une procédure stérile sur un site normalement stérile et cliniquement ou radiologiquement anormal compatible avec un processus infectieux avec un processus infectieux avec un processus infectieux, en excluant les LBA, les sinus crâniens et les urines	Obtention d'une levure par la culture d'un échantillon prélevé selon une procédure stérile (incluant un drainage récemment placé [< 24 h]) sur un site normalement stérile et cliniquement ou radiologiquement anormal et compatible avec un processus infectieux
Hémoculture	Hémoculture fongique positive à moisissure ^d (par exemple <i>Fusarium sp.</i>) dans un contexte compatible avec un processus infectieux	Hémoculture positive à levure (par exemple <i>Cryptococcus sp.</i> ou <i>Candida sp.</i>) ou à un apparenté levure (par exemple, <i>Trichosporon sp.</i>)
Analyse sérologique du LCR	Non applicable	La présence d'antigène cryptococcique dans le LCR indique une cryptococose neuro-méningée

^a Ajouter l'identification de genre ou d'espèce de la culture, si disponible.

^b Les tissus et cellules avec à un examen histopathologique ou cytopathologique doivent être colorés par les colorations de Gomori-Grocott ou au PAS, pour faciliter l'observation des structures fongiques. Dans la mesure du possible, les examens directs en milieu liquide devraient être colorés à l'aide d'un colorant fluorescent (par exemple, calcofluor ou blankophor).

^c Les genres *Candida*, *Trichosporon*, *Geotrichum* et *Blastoschizomyces capitatus* peuvent aussi former des pseudofilaments ou de vrais filaments.

^d Des hémocultures positives à *Aspergillus* doivent être toujours interprétées comme une contamination.

Tableau 3. Critères pour les infections fongiques invasives probables à l'exception des mycoses endémiques (traduit et adapté de [25]).

Facteurs liés à l'hôte^a

- Neutropénie récente (<500 neutrophiles/mm³ pendant >10 jours) en relation avec le début de l'infection fongique
- Greffe allogénique de cellules souches
- Utilisation prolongée de corticostéroïdes (à l'exception des patients avec une aspergillose broncho-pulmonaire allergique) à une dose moyenne minimale de 0,3 mg/kg/jour d'équivalent prednisone pendant plus de 3 semaines
- Traitement par d'autres immunosuppresseurs des cellules T, tels que la cyclosporine, les anti TNF α , les anticorps monoclonaux (comme l'alemtuzumab), ou les analogues nucléosidiques pendant les 90 derniers jours
- Immunodéficience héréditaire sévère (comme la maladie granulomateuse chronique ou l'immunodéficience combinée grave)

Critères cliniques^b

- Infection basse du tractus respiratoire^c

Présence d'au moins 1 des 3 signes suivants au scanner :

Des lésions denses, bien délimitées avec ou sans signe du halo
Croissant gazeux
Cavité

- Trachéobronchite

Ulcération trachéobronchique, nodule, pseudomembrane, plaque ou escarre visualisé à la fibroscopie bronchique

- Infection sino-nasale

Imagerie montrant une sinusite associée à au moins 1 des 3 signes suivants :

Douleur aiguë localisée (y compris douleur irradiant à l'œil)
Ulcération nasale avec escarre

Extension à travers la paroi osseuse des sinus paranasaux, y compris dans l'orbite

- Infection du SNC

Au moins 1 des 2 signes suivants :

Lésions focales à l'imagerie
Atteinte méningée à l'IRM ou au scanner

- Candidose disséminée^d

Au moins 1 des 2 entités suivantes après un épisode de candidémie dans les 2 semaines suivantes :

Abcès petits, en forme de cible, dans le foie ou la rate

Exsudats rétinien progressifs à l'examen ophtalmologique

Critères mycologiques

- Techniques directes (cytologie, examen direct microscopique, ou culture)

Moisissure provenant des expectorations, d'un LBA, d'une aspiration bronchique, ou d'une aspiration sinusale découverte par un des éléments suivants :

Présence d'éléments fongiques évoquant une moisissure

Culture positive à moisissure (par exemple, des *Aspergillus*, *Fusarium*, Zygomycètes, *Scedosporium*)

- Techniques indirectes (détection d'antigène ou de composants de la paroi cellulaire)^e

Aspergillose

Détection du galactomannane dans le plasma, le sérum, le LBA, ou le LCR

Infection fongique invasive autre que la cryptococcose et les zygomycoses

Détection du β -D-glucane dans le sérum

NOTE. La classification en infection fongique invasive probable requiert la présence d'un facteur lié à l'hôte, un critère clinique, et un critère mycologique. Les cas avec un facteur lié à l'hôte et un critère clinique mais sans critère mycologique sont classés comme des infections fongiques invasives possibles.

^a Les facteurs liés à l'hôte ne sont pas synonymes de facteurs de risque mais doivent être définis pour que les individus prédisposés aux infections fongiques invasives puissent être reconnus. Ils sont destinés principalement à s'appliquer aux patients traités pour des maladies malignes et aux greffés allogéniques de cellules souches hématopoïétiques et aux greffés d'organes solides. Ces facteurs liés à l'hôte sont aussi applicables aux patients recevant des corticostéroïdes et autres traitements T-suppresseurs ainsi qu'aux patients présentant des immunodéficiences primaires.

^b Doivent être compatibles avec les données mycologiques, le cas échéant, et doivent être contemporains de l'épisode infectieux.

^c Tous les efforts devraient être entrepris pour exclure une autre étiologie.

^d La présence de signes et de symptômes compatibles avec un syndrome septique indique une infection aiguë disséminée, alors que leur absence correspond à une infection disséminée chronique.

^e Ces tests sont applicables aux aspergilloses et aux candidoses mais ne sont pas utilisables dans le diagnostic des infections dues à *Cryptococcus sp.* et aux zygomycètes. La détection des acides nucléiques n'est pas incluse car ces techniques ne sont pas encore validées ou standardisées.

2. Diagnostic en Mycologie Médicale

Bien que les espèces de *Candida*, les espèces d'*Aspergillus* et *Cryptococcus neoformans* représentent plus de 80% de toutes les infections fongiques chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques, les greffés d'organe solide et dans les autres populations de patients immunodéprimés [27], les champignons opportunistes moins communs et "émergents" posent un défi diagnostique et thérapeutique significatif. Dans la plupart des cas, le seul moyen disponible pour diagnostiquer ces mycoses est l'isolement par la culture et l'identification ultérieure par un mycologiste expérimenté. Cependant sur 64 biopsies qui montraient des éléments fongiques à l'examen microscopique, Rossetti *et al.* n'ont obtenu une culture positive que pour 34 (52 %) d'entre-elles [130]. Par ailleurs, l'examen histologique, quand il est positif permet rarement à lui seul d'identifier avec certitude l'espèce responsable du processus infectieux.

Les patients, qui ont le plus haut risque de développer une maladie fongique opportuniste, ont typiquement une réponse inflammatoire diminuée et les signes et symptômes se développent alors que l'infection est souvent dans les stades avancés.

Le défi pour diagnostiquer l'infection fongique est par conséquent double:

- identifier les patients qui ont le plus haut risque de développer une IFI pour une surveillance accrue du risque fongique,
- développer des méthodes de laboratoire performantes pour un diagnostic le plus précoce possible.

La sérologie et les techniques de biologie moléculaire sont prometteuses mais les méthodes microbiologiques et histologiques conventionnelles demeurent la pierre angulaire du diagnostic définitif des mycoses.

La réussite du diagnostic et du traitement des infections fongiques nécessite une approche pluridisciplinaire qui inclut les praticiens soignants, les mycologistes médicaux et les anatomopathologistes.

2.1.Méthodes conventionnelles de diagnostic en Mycologie Médicale

2.1.1. Examen direct

L'examen direct microscopique des prélèvements est une procédure de première ligne cruciale car le fait de découvrir la présence d'éléments fongiques est le moyen le plus rapide et le moins onéreux pour diagnostiquer les infections fongiques [94]. La détection microscopique d'éléments fongiques peut fournir un diagnostic par présomption en moins d'une heure et sert souvent pour guider le laboratoire dans le choix des moyens les plus appropriés pour la culture du prélèvement, aussi bien que dans l'interprétation des résultats de la culture, et également pour guider le clinicien dans son choix thérapeutique.

La microscopie directe, exécutée dans un laboratoire de Mycologie, repose généralement sur l'utilisation de solutions éclaircissantes comme le chloral-lactophénol, ou des colorations panoptiques type May-Grünwald-Giemsa et Gram ou plus spécifiques des champignons comme le Gomori-Grocott et le bleu lactophénol. Le calcofluor, en se liant à la chitine dans la paroi des cellules fongiques qui devient alors fluorescente (blanc-bleu ou vert), fournit également un moyen rapide et sensible de détection des champignons dans les prélèvements [40, 94].

La microscopie directe peut fournir un diagnostic étiologique notamment lors d'infections causées par *Pneumocystis jiroveci* ou par des champignons dits exotiques ou endémiques (*Histoplasma capsulatum* variété *capsulatum* ou *duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* ou *Penicillium marneffeii*). Cependant, dans la plupart des cas, la microscopie directe ne donne que des renseignements préliminaires mais pas l'identification de l'agent responsable [2]. Les caractéristiques morphologiques des champignons vus à l'examen microscopique direct incluent les levures bourgeonnantes, les filaments et les pseudofilaments.

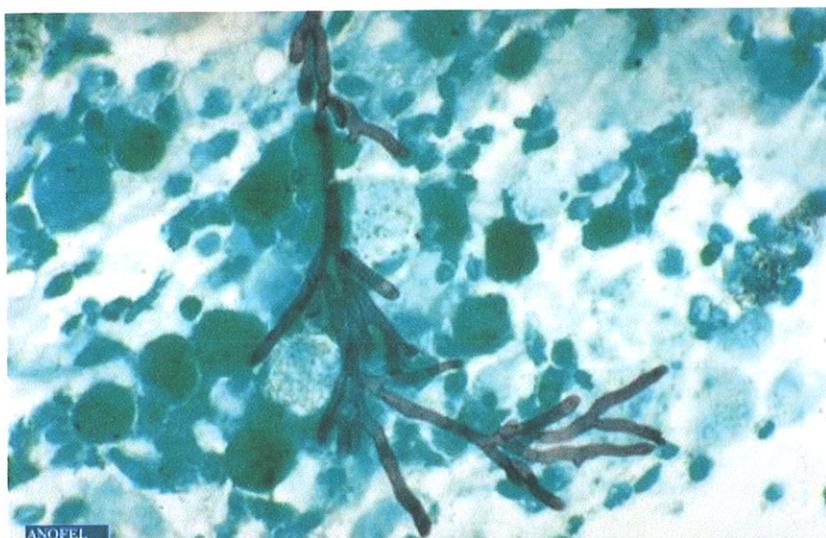
La combinaison de cellules de levure bourgeonnantes et de pseudofilaments est caractéristique des espèces de *Candida* (**figure 1**) mais ces structures peuvent aussi être vues avec les espèces de *Trichosporon* et *Geotrichum* [2] d'où l'importance de la culture pour affirmer l'identification du genre et d'espèce.

Figure 1. Formes levures et pseudofilaments après coloration de Gomori-Grocott (d'après le Cédérom ANOFEL 3).



Les hyphomycètes ont généralement des filaments tubulaires à bord parallèle, de diamètre régulier (2-5 μm) et régulièrement septés, avec des ramifications à angle aigu (**figure 2**). On distingue les hyalohyphomycètes à paroi claire (mucédinés) et les phaeohyphomycètes (dématiés) à paroi mélanisée. Là encore, l'isolement par culture et l'identification de l'organisme infectant sont exigés pour un diagnostic précis. En effet, on ne peut pas différencier par l'examen microscopique direct les filaments des différents Hyphomycètes impliqués dans les IFI (e.g. *Aspergillus*, *Fusarium*, et *Scedosporium*) [2].

Figure 2. Filaments d'hyphomycètes après coloration de Gomori-Grocott dans un LBA (d'après le Cédérom ANOFEL 3).



Les zygomycètes ont des filaments siphonnés larges (6-16 μm), irréguliers, non ou peu cloisonnés, avec des ramifications à angle droit (**figure 3**).

Figure 3. Filaments de type mucorale après coloration de Gomori-Grocott (d'après le Cédérom ANOFEL 3).



Il est important de garder à l'esprit que toutes les méthodes d'examen direct sont moins sensibles que la culture et que les résultats négatifs d'examen direct ne doivent jamais exclure une infection fongique [94].

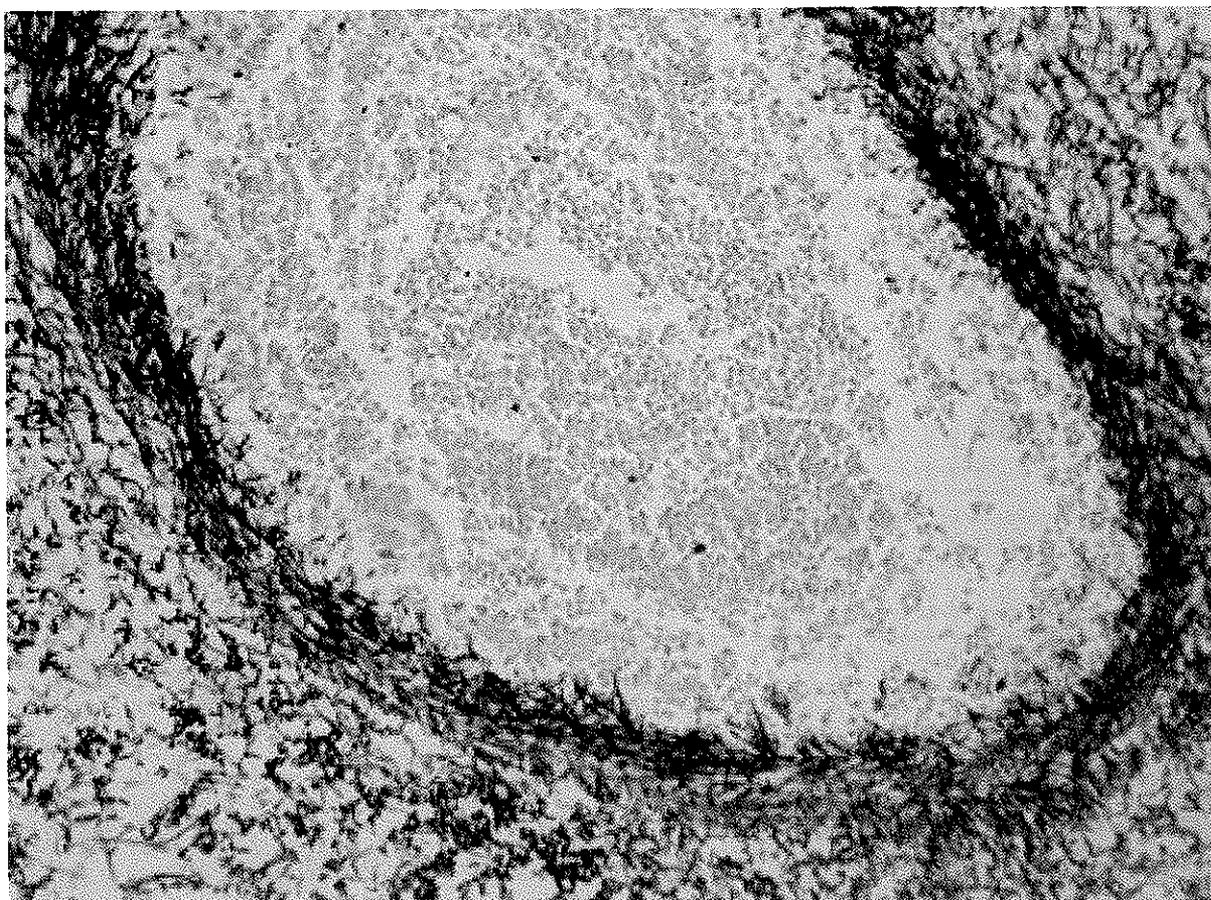
2.1.2. Méthodes histopathologiques

La visualisation d'éléments fongiques dans un tissu par examen anatomopathologique affirme le caractère invasif de la mycose. Les colorations anatomopathologiques à partir de tissus doivent utiliser des colorations spécifiques de champignons, comme le Gomori-Grocott (**figure 4**) et l'acide périodique de Schiff (PAS). La coloration de Fontana-Masson colore la mélanine de la paroi cellulaire et peut accentuer légèrement la pigmentation des champignons dématiés ; elle peut aussi aider dans la différenciation de *Cryptococcus neoformans* (mélanine positive) avec d'autres levures (mélanine négative) dans le tissu. La coloration au mucicarmin est aussi utilisée pour identifier *Cryptococcus neoformans* dans les tissus, en colorant la capsule polysaccharidique en rouge vif.

Les limites des méthodes histopathologiques sont les mêmes que celles de l'examen microscopique direct.

L'immunohistologie pour l'identification des champignons a été essayée et des anticorps monoclonaux et polyclonaux fluorescents ont été développés pour différencier les genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Scedosporium*. Malheureusement, le haut degré de similitude antigénique entre ces champignons et d'autres espèces fongiques comme *Paecilomyces sp*, a favorisé les réactions croisées et a diminué la spécificité de cette méthode [59]. Actuellement, il n'y a aucun anticorps fluorescent commercialement disponible pour l'identification « in situ » des champignons.

Figure 4. Envahissement et destruction de la paroi d'une artère cérébrale par des filaments d'*Arthrographis kalrae* après coloration de Gomori-Grocott d'une coupe de cerveau prélevé en post mortem (Collection personnelle, Dr D. Ajzenberg, service de Mycologie, CHU de Limoges, France).



2.1.3. Culture

Les champignons étant ubiquitaires dans l'environnement, leur isolement d'échantillons cliniques représente souvent une colonisation transitoire plutôt qu'une pathologie invasive. La contamination d'échantillons ou de cultures par les organismes de l'environnement, dont beaucoup sont aussi des agents étiologiques de mycoses opportunistes, peut gêner l'interprétation de résultats de la culture.

L'isolement d'espèces d'*Aspergillus* des cultures de prélèvements du système respiratoire est surtout problématique, car ces organismes sont communs dans l'environnement et qu'ils peuvent coloniser le système respiratoire de n'importe quel individu sans vraiment provoquer de pathologie. Les résultats de la culture doivent être interprétés en fonction du terrain et des facteurs de risque fongique des patients [49, 109, 167]. Ainsi chez les patients de la catégorie à haut risque (par exemple, les receveurs allogéniques de cellules souches hématopoïétiques, les patients avec des pathologies hématologiques malignes ou les patients en neutropénie), une culture positive d'une espèce d'*Aspergillus* est souvent associée à une maladie invasive. La valeur prédictive positive d'une culture positive est diminuée pour les receveurs autogéniques de cellules souches hématopoïétiques, les greffés d'organe solide et les patients infectés par le VIH [49, 109, 167].

2.1.3.1. Isolement

Une recherche fongique spécifique inclut l'ensemencement sur milieux contenant des antibiotiques, classiquement le milieu de Sabouraud additionné de chloramphénicol et de gentamicine. Par ailleurs, la température de croissance optimale de certains champignons n'est pas 37 °C mais plutôt 25 à 30 °C. De même, si pour beaucoup de champignons d'intérêt médical la croissance est obtenue en 2 jours, certains nécessitent des durées supérieures à 5 jours. Ainsi, garder des cultures à 37 °C pendant seulement 48 heures expose au risque de faux négatifs.

Le diagnostic d'infections systémiques à levures repose sur les hémocultures qui peuvent cependant être négatives même lorsque l'infection est disséminée. En effet, la sensibilité des hémocultures dans les lévuroses disséminées n'est pas supérieure à 50% [26].

Parmi les systèmes d'hémocultures automatisés en surveillance continue qui ont été développés, les systèmes Bactec® (Becton-Dickinson) et BacT/Alert® (bioMérieux) sont les plus adaptés pour la détection des levures.

Bien que la plupart des espèces de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* et les espèces de *Fusarium* obtenues des hémocultures soient cliniquement significatives, d'autres, comme les espèces d'*Aspergillus* et les espèces de *Penicillium* (sauf *Penicillium marneffeii*), sont considérées comme des contaminants [28, 80].

2.1.3.2. Identification

2.1.3.2.1. Levures

L'identification des levures s'effectue à l'aide de critères phénotypiques tels que la production de filaments, de chlamydospores, et l'assimilation ou la fermentation de certains sucres à l'aide de galeries (API AUX 20C ou 32C, BioMérieux). Ces techniques obligent à travailler sur colonies isolées et nécessitent généralement 24 heures au minimum après l'isolement pour une identification de l'espèce. Historiquement, le diagnostic d'espèce de *Candida albicans* reposait sur le test de filamentation rapide en sérum à 37 °C et la formation de chlamydospores sur milieu pauvre. Pour les autres espèces, le diagnostic repose toujours, en grande partie, sur les caractères phénotypiques tels que la croissance et la fermentation de certains sucres étudiés à l'aide de galeries (Api ID 32C, BioMérieux ; Auxacolor® 2, Bio-Rad). Des progrès importants ont été réalisés par la mise à disposition de milieux comportant des chromogènes. Les colonies de levures, normalement blanc crème, sont colorées suivant l'espèce. L'identification des levures, en particulier *Candida albicans*, est alors possible dès la visualisation de la colonie sans nécessiter de repiquage (CHROMagar®, Becton Dickinson ; Candida ID®, BioMérieux) [9, 103]. Ainsi l'identification est rendue avec un gain de 24 voire 48 heures. Ces milieux peuvent aussi identifier et quantifier les mélanges de levures, particulièrement utiles pour suivre les colonisations des patients à risque. Il existe également des tests d'identification simples et rapides, soit basés sur l'agglutination de particules de latex pour *Candida albicans* (Bichro-Latex® Albicans Fumouze), *Candida krusei* (Krusei-Color Fumouze®) et *Candida dubliniensis* (Bichro-Dubli Fumouze®), soit sur des activités enzymatiques particulières pour *Candida glabrata* (Glabrata RTT Fumouze®, Fumouze) [35].

2.1.3.2.2. Filamenteux

Schématiquement, l'identification des champignons filamenteux repose sur des critères macroscopiques (aspect général des colonies) et microscopiques (étude des filaments végétatifs, des organes de fructification et des spores). Certaines données (température, vitesse de pousse, sensibilité au cycloheximide) seront des compléments utiles à l'identification.

La vitesse de pousse varie en fonction des espèces et de la richesse de l'inoculum. L'aspect des colonies est également un bon critère d'orientation en fonction de la texture duveteuse, laineuse, cotonneuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse. Parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre en raison de l'absence ou de la pauvreté du mycélium aérien. Le relief des colonies (plates, plissés, cérébriformes), tout comme leur consistance, est aussi à observer. Elles peuvent en effet être molles, friables, élastiques, cartonnées ou dures. Il convient de préciser aussi la taille des colonies, petites, étendues, voire envahissantes comme chez les Mucorales.

La couleur de la colonie est un élément pertinent d'orientation ainsi que la présence d'un pigment dans la gélose. En général, les hyalohyphomycètes restent clairs : colonies blanches, mais aussi crèmes ou colorées (vertes, brunes, orangées, violettes, grises). En revanche, les phaéohyphomycètes deviennent rapidement foncés ou noirs. Enfin l'observation macroscopique des cultures devra rechercher en surface, et surtout au centre de la culture, les structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) ainsi que des amas mycéliens ou mèches (corémies).

Plusieurs fragments de culture seront prélevés à l'oëse pour les cultures glabres, ou au scotch (test du drapeau) pour les cultures filamenteuses et poudreuses, et ensuite déposés dans une goutte de bleu lactophénol entre lame et lamelle. Plusieurs prélèvements au centre et en périphérie de la colonie sont parfois nécessaires. De même, il faut savoir répéter les montages afin de saisir le meilleur moment (cultures ni trop jeune, ni trop âgées) pour observer la conidiogénèse.

On analysera successivement :

- Le thalle végétatif ; tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (ou hyphes), l'ensemble est appelé thalle ou mycélium. On recherche la présence de septa ou de cloisons.
- La couleur des hyphes ; les hyphomycètes dont les filaments restent clairs (hyalins) sont appelés Mucédinés ou hyalohyphomycètes. En revanche, ceux qui ont une paroi pigmentée ou foncée seront appelés Dématiés ou phaeohyphomycètes.
- L'origine endogène ou exogène des spores.
- L'aspect des spores.
- La présence de chlamydospores.
- Les différents modes de formation des conidies ; deux grands modes de conidiogénèse doivent être différenciés : le mode thalique (spores formées à partir d'éléments préexistant du thalle) et le mode blastique (spores formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes).
- Le mode de groupement des conidies : en grappes, en masse, en têtes ou « balles », en chaînes basipètes et en chaînes acropètes.
- Le type d'implantation des cellules conidiogènes ; les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif.
- La présence de structures protectrices compactes, issues de la reproduction asexuée (pycnides et acervules) ou sexuée (gymnothèces, cléistothèces et périthèces).

2.1.4. Sérologie

Les tests pour la détection d'**anticorps**, des composants de la paroi cellulaire et des acides nucléiques spécifiques de champignon sont en plein développement [164]. La plupart des tests sérologiques conçus pour dépister les anticorps spécifiques sont inefficaces, parce que la plupart des patients à risque d'IFI sont profondément immunodéprimés. Les techniques immunologiques ou biochimiques détecteront donc en priorité des **antigènes** cytoplasmiques et de la paroi de la cellule fongique dans le sérum ou les liquides biologiques. Les meilleurs exemples de cette approche sont les tests commerciaux disponibles pour la détection des antigènes polysaccharidiques de *Cryptococcus neoformans* et d'*Histoplasma capsulatum*. Ces tests ont prouvé leur valeur diagnostique dans la méningite cryptococcique [150] et dans l'histoplasmose disséminée [158] et ne seront pas détaillés dans ce travail.

2.1.4.1. Galactomannane

Le Galactomannane (GM) est un polysaccharide de la paroi des espèces d'*Aspergillus*, et qui est détectable dans le sérum et les liquides biologiques dans les aspergilloses invasives. En 2003, le test Platelia *Aspergillus* EIA® (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) a été approuvé par l'*US Food and Drug Administration* (US FDA) pour son utilisation dans le diagnostic des aspergilloses invasives chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques et chez les patients leucémiques. Les données présentées à la US FDA ont rapporté une sensibilité de 80.7 % et une spécificité de 89.2 % d'après une étude multicentrique réalisée sur les sérums de 179 patients avec une leucémie, dont 31 % ont développé une aspergillose invasive prouvée ou probable [113].

En dépit de nombreuses études cliniques sur l'utilisation du GM pour diagnostiquer et contrôler les patients qui ont un haut risque de développer une aspergillose invasive, il y a beaucoup d'incertitude sur la libération du GM à partir du site d'infection et sur la performance du test dans la pratique clinique [92]. La variabilité dans la performance du test est considérée comme multifactorielle, liée à la libération de l'antigène, à des facteurs liés à l'hôte (e.g. traitement antifongique, âge) et à des facteurs méthodologiques (valeurs limites,

définition d'un test positif et définition d'un patient infecté) [92]. Le seuil actuel de positivité a été défini à 0,5 [81, 84].

Des faux-positifs sont possibles chez les patients traités par pipéracilline-tazobactam [1, 144, 153] et amoxicilline-acide clavulanique [79, 90]. Le GM est un sucre complexe qui est commun à d'autres organismes ainsi que dans beaucoup de produits alimentaires et qui peuvent donc être responsable de faux-positifs [79, 92, 93].

Il y a plusieurs questions non résolues concernant l'utilisation du GM dans le diagnostic de l'aspergillose invasive. Les caractéristiques de performance du test chez les greffés d'organe solide et en pédiatrie doivent être établies. Jusqu'à présent, l'évaluation dans la population de transplantés d'organe solide est peu documentée : une étude chez des greffés hépatiques a été limitée à cause de l'incidence basse de l'aspergillose invasive chez ces patients [63]. Une autre étude chez des greffés pulmonaires a rapporté une spécificité forte (93 %) mais une sensibilité faible (30 %) [81]. Les études, en Pédiatrie, chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques ont documenté un fort taux de faux-positifs [143].

La recherche du GM dans d'autres liquides biologiques, comme le LBA, l'urine et le LCR, a aussi été proposée. Les sensibilités du test dans le LBA ont varié de 61 % à 76 %, selon la valeur limite de DO utilisée [99].

2.1.4.2. β -D-glucane

Le β -D-glucane (BG) est un constituant de la paroi fongique et peut être dosé dans le sérum de patients avec une IFI. Le BG est détectable dans les IFI causées par *Aspergillus* et *Candida* et par des pathogènes fongiques plus rares comme les *Fusarium* et *Trichosporon* [166]. Le test ne dépiste pas les infections causées par *Cryptococcus sp* ou les Zygomycètes en raison de faibles quantités de BG dans les parois de ces champignons [55, 95].

Le test BG® (Fungitell; Associates of Cape Cod) a été approuvé par l'US FDA comme aide diagnostique dans les mycoses profondes et les fongémies pour la détection qualitative du BG dans le sérum des patients avec des symptômes ou des conditions médicales prédisposantes à une IFI. Ce test a été évalué dans une étude multicentrique chez des patients avec une IFI et des sujets sains [104] et pour le diagnostic d'IFI chez des patients ayant une pathologie hématopoïétique maligne [102, 108]. La dernière étude en date a testé les sérums

de 283 patients avec une leucémie myéloïde aiguë ou un syndrome myélodysplasique recevant une prophylaxie antifongique. Elle a révélé qu'au moins un échantillon de sérum était positif dans 100% des cas avec une médiane de 10 jours avant le diagnostic clinique chez les sujets avec une IFI prouvée ou probable (incluant des cas de candidoses, fusarioses, trichosporonoses et d'aspergilloses). Un résultat négatif avait une valeur prédictive négative de 100 %. La spécificité du test était de 90% pour un résultat positif et de 96 % quand 2 résultats positifs consécutifs étaient observés [102].

Bien qu'un résultat positif n'identifie pas le champignon infectant, l'application pratique de ce test inclut son utilisation comme marqueur de présomption d'IFI pour permettre une initiation plus précoce de la thérapie antifongique.

La détection combinée du GM et du BG permet d'obtenir une spécificité et une valeur prédictive positive proche de 100% dans le diagnostic de l'AI, sans affecter la sensibilité et la valeur prédictive négative. La détection du BG serait plus précoce que celle du GM chez ces patients [111].

Le BG est ubiquitaire dans l'environnement (par exemple, dans certains types de compresses), ce qui explique la détection de faux-positifs lors d'une mauvaise manipulation du prélèvement, de l'utilisation de certaines membranes de cellulose en hémodialyse ou de certains types de compresse et de la perfusion récente d'albumine ou d'immunoglobulines [51, 58, 100]. Jusqu'à présent, le test BG® Fungitell n'a pas été évalué en Pédiatrie ou dans les populations transplantées d'organe solide.

2.1.4.3. Mannane

Le mannane est un antigène majeur de la paroi des *Candida*. Un test permettant de détecter l'antigène mannane pariétal est par exemple le Platelia Candida. C'est un test Elisa qui utilise un anticorps monoclonal EB-CA1 qui reconnaît le mannane. Son seuil de détection est de 0,25 ng/ml. Sa sensibilité est de 40 % et sa spécificité est de 98 % [128, 136, 137, 165].

La recherche d'anticorps spécifiques se heurte à une difficulté d'interprétation. En effet, la distinction entre colonisation et invasion est difficile, des taux élevés d'anticorps ont ainsi été retrouvés chez des patients asymptomatiques.

La recherche simultanée d'anticorps antimannane et de mannane a montré qu'avec une antigénémie élevée, le taux d'anticorps diminue et vice-versa. La recherche combinée d'antigènes et d'anticorps augmenterait la sensibilité (80%) et la spécificité (93%) au cours des candidoses systémiques causées par *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* qui représentent 80 % des isolats. La sensibilité n'est que de 40 à 50 % pour *Candida krusei* et *Candida parapsilosis* [137, 165]. L'association de la détection d'anticorps et d'antigènes permet non seulement d'augmenter la sensibilité et la spécificité mais aussi de réduire le délai du diagnostic.

L'association de la détection d'antigènes et d'anticorps est beaucoup plus discriminante chez les malades atteints de candidose hépatosplénique. Dans une étude réalisée par Sendid *et al.*, les antigènes et les anticorps ont été détectés 18 jours avant l'apparition des signes radiologiques [136]. Au cours des candidoses systémiques, les hémocultures et les biopsies sont fréquemment négatives même après l'apparition des images radiologiques. Ainsi la surveillance régulière (tous les trois jours) du mannane et d'anticorps antimannane permettrait un diagnostic rapide et une instauration précoce du traitement [137].

2.2. Biologie moléculaire

2.2.1. Principes

2.2.1.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. Elle est une étape préalable essentielle à la bonne réalisation de la PCR.

Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma :

- Lyse des cellules,
- Elimination des protéines,
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN...),
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

2.2.1.2. PCR classique dite en point final

La réaction de PCR requiert les constituants suivants :

- Une matrice d'ADN, qui contient la région du fragment d'ADN à amplifier ;
- Deux amorces, qui déterminent le début et la fin de la région à amplifier ;
- Une ADN polymérase qui copie la région à amplifier ;
- Des nucléotides, à partir desquels l'ADN polymérase construit le nouvel ADN ;
- Un tampon, qui offre un environnement chimique adéquat à l'enzyme ADN polymérase.

- Conditions natives (**0 sur la figure 5**)

Cette étape se fait généralement à température ambiante. L'ADN bicaténaire adopte sa conformation en double hélice. Dans cet exemple, nous considérerons qu'il n'y a qu'une molécule initiale d'ADN double brin dans la solution, la zone colorée (rose et orange) correspondant à notre amplicon (**figure 5**).

- Dénaturation initiale (**1' sur la figure 5**)

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95°C) est réalisée. Elle permet de déshybrider l'ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start » et de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase).

- Phase de dénaturation (**1 sur les figures 5 et 6**)

Cette étape (généralement 0 à 1 minute à 95°C) permet de déshybrider les ADN, de « décrocher » les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

- Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (**2 sur les figures 5 et 6**)

Cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 56-64°C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrices grâce à une température thermodynamiquement favorable.

- Phase d'élongation ou de polymérisation (**3 sur les figures 5 et 6**)

Cette étape (généralement 4 à 120 secondes à 72°C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel (**figure 7**). La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon.

Le premier cycle terminé, les deux nouveaux brins d'ADN formés seront la matrice ADN pour le cycle suivant, multipliant ainsi la quantité d'ADN pour chaque nouveau cycle.

Figure 5. Evolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des 4 premiers cycles de la PCR (D'après Wikipedia, PCR basic principle).

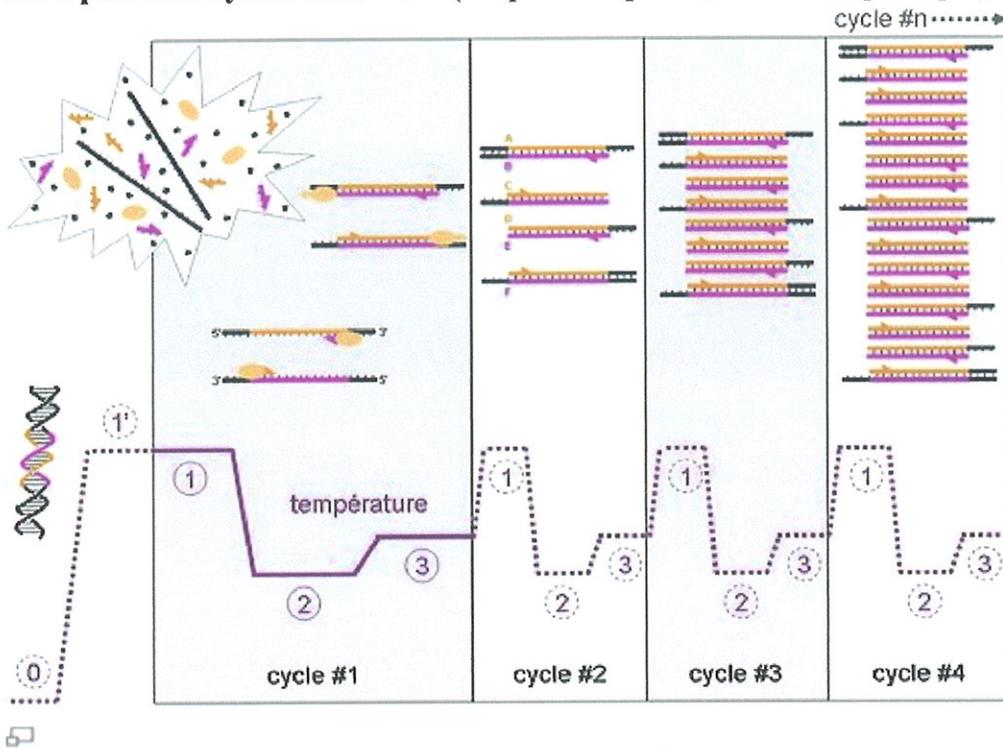


Figure 6. Principe de la PCR. Produits formés au cours d'un cycle (P : ADN polymérase).

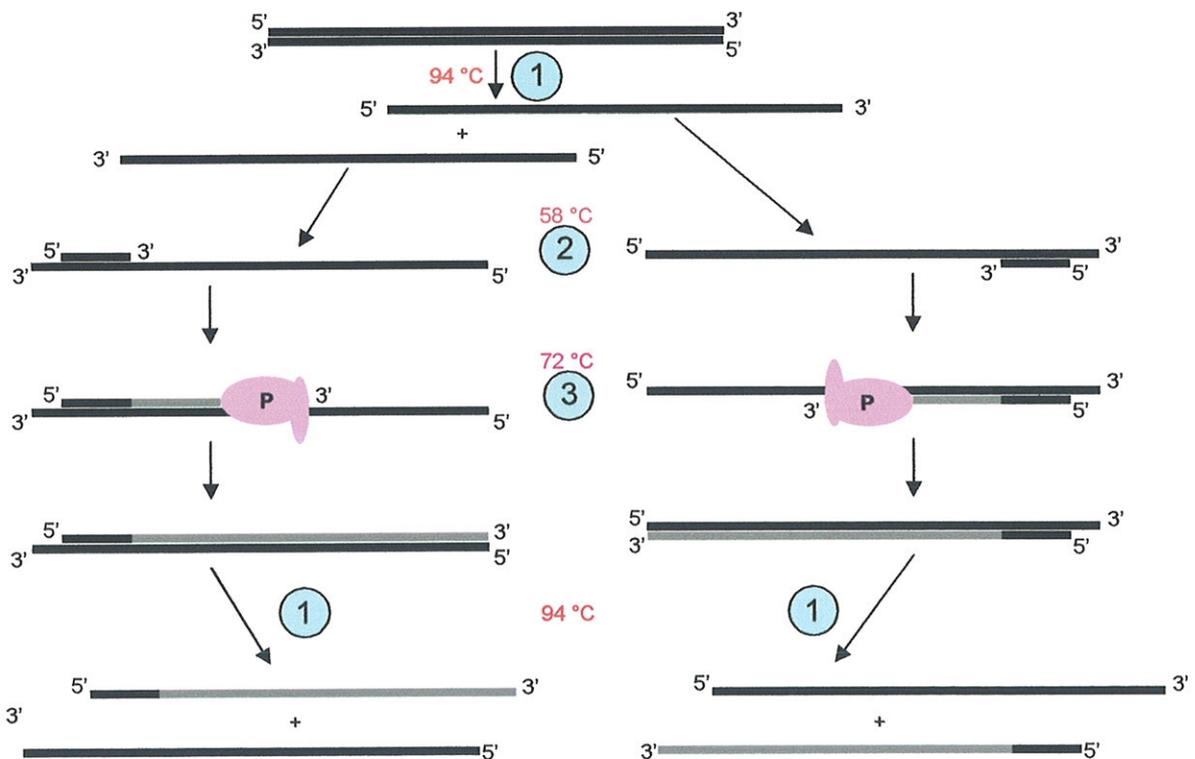
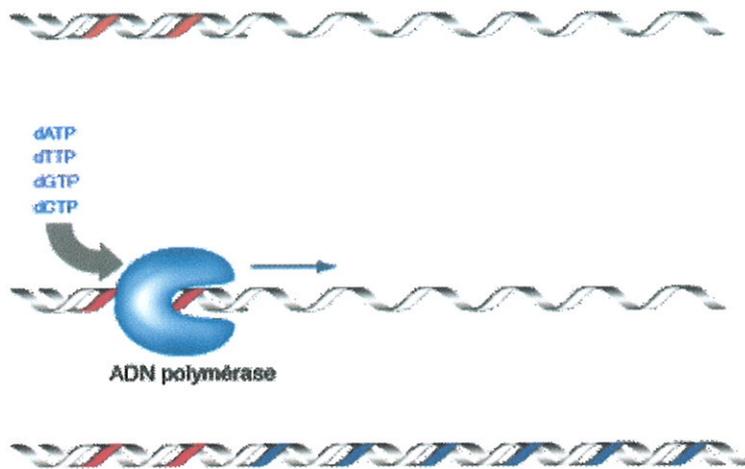


Figure 7. Mécanisme de polymérisation de l'ADN.

La matrice (en blanc) est recopiée par la polymérase qui allonge le brin complémentaire à partir de l'amorce (D'après *Wikipedia*, DNAPol).



2.2.1.3. Séquençage

Cette étape est précédée par une étape de purification des produits de PCR. Elle permet d'éliminer les amorces, nucléotides en excès, enzymes, sel, et autres impuretés des échantillons d'ADN.

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Actuellement, la plupart des séquençages d'ADN sont réalisés par la méthode de Sanger décrite ci-dessous. Cette technique utilise la réaction de polymérisation de l'ADN à l'aide d'une ADN polymérase et des didésoxyribonucléotides (ddNTP) (**figure 8**).

2.2.1.3.1. Historique

Le séquençage de l'ADN a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970. Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert, aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger, en Grande-Bretagne. Ces deux méthodes sont fondées sur des principes diamétralement opposés : l'approche de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique sélective, tandis que celle de Maxam et Gilbert est une

méthode par dégradation chimique sélective. Pour cette découverte, Gilbert et Sanger ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 1980.

Initialement, la méthode de Sanger nécessitait de disposer d'un ADN simple brin qui servait de matrice pour la synthèse enzymatique du brin complémentaire. Pour cette raison, le premier organisme biologique dont le génome a été séquencé en 1977 est le virus bactériophage ϕ X174. Ce virus est constitué d'ADN simple brin qui est encapsulé dans la particule virale.

Au cours des 25 dernières années, la méthode de Sanger a été largement développée grâce à plusieurs avancées technologiques importantes :

- La mise au point de vecteurs de séquençage adaptés, comme le phage M13 développé par Joachim Messing au début des années 1980.
- Le développement de la synthèse chimique automatisée des oligonucléotides qui sont utilisés comme amorces dans la synthèse.
- L'introduction de traceurs fluorescents à la place des marqueurs radioactifs utilisés initialement. Ce progrès a permis de sortir le séquençage des pièces confinées, réservées à l'usage des radioisotopes.
- L'adaptation de la technique de PCR pour le séquençage.
- L'utilisation de séquenceurs automatiques de gènes.
- L'utilisation de l'électrophorèse capillaire pour la séparation et l'analyse.

La méthode de Maxam et Gilbert nécessite des réactifs chimiques toxiques et reste limitée quant à la taille des fragments d'ADN qu'elle permet d'analyser (<250 nucléotides). Moins facile à robotiser, son usage est devenu aujourd'hui confidentiel.

2.2.1.3.2. Méthode de Sanger

Le principe de cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par des ADN polymérases thermostables, celles qui sont utilisées pour la PCR. Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP,

dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'une faible concentration des quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP).

Ces didésoxynucléotides sont des terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau des nucléotides correspondant au didésoxyribonucléotide incorporé dans la réaction.

La détection des fragments ainsi synthétisés se fait en incorporant un traceur dans l'ADN synthétisé. Initialement ce traceur était radioactif (**figure 9**), aujourd'hui, on utilise des traceurs fluorescents attachés au didésoxyribonucléotide.

Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent tous au niveau d'un des nucléotides de la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, ce qui permet ainsi de repérer la position des nucléotides dans la séquence (**figure 10**).

Figure 8. Structure du dATP (haut) et du ddATP (bas).

Dans le ddATP, le groupement 3'-OH (en jaune) est remplacé par un hydrogène. Cette modification empêche la poursuite de la synthèse de l'ADN qui continue normalement sur le 3-OH (D'après *Wikipedia*, DdATP).

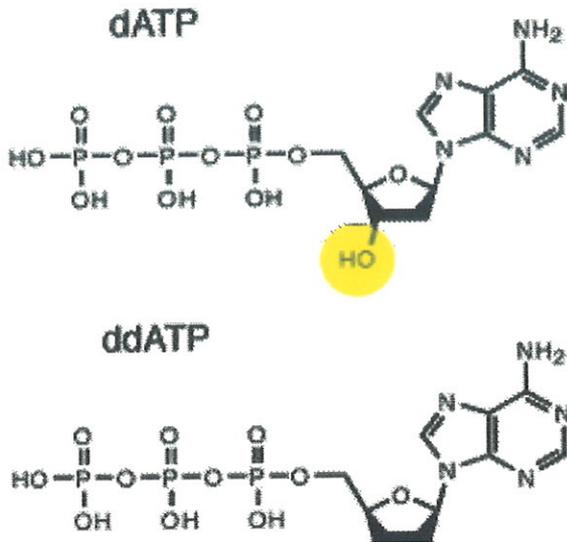


Figure 9. Résultat du séquençage par la méthode de Sanger (traceur radioactif).

L'ordre de chaque bande indique la position d'un nucléotide A, T, C ou G (D'après *Wikipedia*, Sequencing).

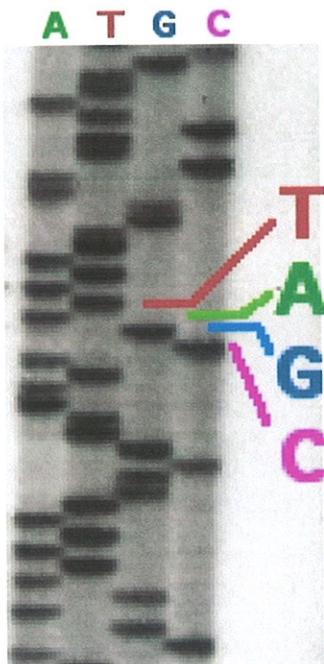


Figure 10. Résultats donnés par un séquenceur automatique (Régions ITS1-5,8S-ITS2 d'*Absidia corymbifera*, données personnelles).



2.2.2. Cibles utilisées dans le diagnostic fongique

White *et al.* [159] ont décrit, dès 1990, les principales amorces créées pour l'amplification de régions situées sur les gènes codant pour les ARN ribosomaux des champignons. Depuis, de nombreuses études ont utilisé ces amorces avec différentes techniques de biologie moléculaire : PCR nichée [54] ou semi-nichée [31], PCR-EIA [24], PCR-RFLP [78], PCR multiplex [75], PCR-LiPA [87], PCR-SSCP [62], PCR-RLB [114], PCR en temps réels [105], PCR et séquençage [19].

Ces amorces ont permis, par le séquençage de ces régions, la création d'amorces et de sondes spécifiques de genre et d'espèce. Spreadbury *et al.* ont par exemple créé des amorces spécifiques situées sur l'ADN ribosomal 26S pour la détection d'*Aspergillus fumigatus* dans les tissus pulmonaires [142]. Sandhu *et al.* ont créé 21 sondes spécifiques d'espèces ou de genres sur l'ADN ribosomal 28S et les ont testées sur des cultures et des prélèvements humains [133].

Les techniques de PCR les plus utilisées actuellement ciblent les régions ITS1 et ITS2 grâce à des amorces universelles situées sur l'ADN ribosomal. Les régions ITS 1 et ITS 2, hautement variable, appartiennent au complexe génique codant pour les ARN ribosomaux qui sont multicopies (supérieure ou égale à 100 copies dans le génome fongique) [20, 44, 46, 50, 62, 65, 66, 67, 75]. Les régions codant pour l'ARN ribosomal (ARN 18S, ARN 5,8S et ARN 28S), moins variable entre les espèces, permettent la création d'amorces universelles.

Les approches moléculaires basées sur la PCR ont été développées pour fournir l'identification plus rapide et plus fiable autant pour les levures que pour les moisissures, par rapport aux méthodes traditionnelles [41, 42, 46, 50]. Plusieurs études récentes ont confirmé l'intérêt de ces approches dans l'identification des levures et moisissures d'intérêt médical [41, 42, 46, 50, 53]. Les séquences d'ADN des principales espèces fongiques sont disponibles dans des bases de données comme GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), cependant, il convient d'être prudent car la qualité des séquences est très variable d'où la nécessité de vérifier l'origine des données à chaque comparaison de séquence [42, 46].

Avec l'amélioration des techniques de séquençage, des bases de données plus larges et plus sûres, et des kits et des logiciels plus disponibles, cette technologie sera une alternative compétitive aux techniques classiques d'identification des IFI.

Ces techniques de PCR ont été expérimentées à partir de souches fongiques issues de culture et/ou de prélèvements de tissus ou de liquides biologiques animaux ou humains [19, 20, 46, 68, 119].

2.2.3. Identification des souches

L'identification des souches fongiques par la biologie moléculaire peut avoir plusieurs intérêts.

Les méthodes conventionnelles ne permettent pas dans certains cas l'identification d'espèce. Dans d'autres cas, l'absence de sporulation rend impossible l'identification d'un champignon par ces méthodes conventionnelles (filamenteux non identifiable). Le séquençage des régions ITS 1 et 2 a ainsi permis à Pounder *et al.* d'identifier 16 pathogènes potentiels sur 50 cultures de filamenteux non identifiables [117]. Pour les mucorales, l'identification d'espèce est difficile par les méthodes conventionnelles alors que l'intérêt de la biologie moléculaire pour l'identification d'espèce est avéré [78, 134].

En Dermatologie, les méthodes conventionnelles pour identifier les dermatophytes sont souvent longues et ne peuvent pas conclure dans les cas où la microscopie et/ou la morphologie sont atypiques. Le séquençage des régions ITS 1 et 2 permet l'identification sans attendre le vieillissement des cultures [68].

Ciardo *et al.* ont proposé un algorithme décisionnel pour l'identification des levures par les méthodes conventionnelles, la biologie moléculaire ayant un intérêt lorsque les caractères biochimiques ne sont pas discriminants (17/1648 cas) [21].

2.2.4. Prélèvements biologiques

Le nombre de maladies infectieuses diagnostiquées via la biologie moléculaire augmente rapidement. Cependant, la majorité des tests moléculaires validés pour l'utilisation dans les laboratoires de microbiologie sont dédiés actuellement au diagnostic des maladies virales. Étant donné les limites actuelles dans le diagnostic fongique, l'utilisation de la PCR comme aide diagnostique est prometteuse.

La PCR a été étudiée surtout dans le diagnostic des candidémies et des aspergilloses invasives, à partir de divers prélèvements dont le sérum ou le sang pour les *Candida* et *Aspergillus* et les prélèvements respiratoires (par exemple, les expectorations ou le LBA), pour les filamenteux en général [60, 99, 164]. Les fragments amplifiés varient selon les études, mais incluent souvent des gènes ribosomiaux (ARNr 18S) ou les régions ITS [53, 65, 164]. Les sensibilités varient de 78 % à 100 % pour les candidoses et de 33 % à 100 % chez les patients avec une aspergillose invasive prouvée [164]. Les spécificités sont variables avec les PCR amplifiant les *Aspergillus* car la présence transitoire de conidies dans le système respiratoire peut entraîner un résultat faussement positif. L'utilisation du sérum ou du plasma est préférable à l'utilisation des prélèvements respiratoires, car la contamination par les conidies est beaucoup moins probable. La combinaison d'une PCR quantitative et d'un test détectant le GM dans le LBA a amélioré la sensibilité et la spécificité dans le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire invasive [99]. L'utilisation des tests antigéniques et de la PCR en temps réel à partir du sérum s'est avérée utile dans le dépistage hebdomadaire des aspergilloses invasives des patients en Hématologie [60].

Comme en Bactériologie, l'utilisation de PCR universelle est une stratégie potentiellement intéressante [164]. L'amplification suivie d'une analyse par restriction avec une endonucléase, ou par séquençage, ou par hybridation de sondes spécifiques de genre ou d'espèces sont des possibilités d'aide au diagnostic des infections fongiques [18, 44, 50, 53, 65]. En revanche, contrairement à la Bactériologie, l'intérêt de la PCR panfongique en pratique courante demande à être confirmé [2].

Nous avons mis au point une technique de PCR avec séquençage, ciblant les régions ITS 1 et 2, et une PCR spécifique *Aspergillus fumigatus*, pour la détection et l'identification des champignons dans les prélèvements biologiques issus de patients avec des IFI prouvées ou probables.

Matériels et Méthodes

1. Souches

Les souches fongiques utilisées pour la mise au point des techniques de PCR appartiennent à différents genres et espèces de levures, mucorales, hyphomycètes et dermatophytes (**tableau 4**). Ces souches proviennent de la collection de référence du laboratoire de Mycologie du CHU Dupuytren (Limoges) et ont été identifiées par des méthodes conventionnelles macro et microscopiques.

Tableau 4. Souches fongiques utilisées pour la mise au point des techniques de PCR.

Anamorphes	Téléomorphes
Levures	
<i>Candida albicans</i>	
<i>Candida glabrata</i>	
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	
Mucorales	
<i>Absidia corymbifera</i>	
<i>Mucor circinelloïdes</i>	
<i>Rhizopus microsporus</i>	
<i>Rhizomucor pusillus</i>	
Hyphomycètes	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	
<i>Aspergillus terreus</i>	
<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Eurotium herbariorum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Aspergillus versicolor</i>	
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Emericella nidulans</i>
<i>Aspergillus candidus</i>	
<i>Fusarium oxysporum</i>	
<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Trichotecium roseum</i>	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	
<i>Beauveria sp.</i>	
<i>Penicillium sp.</i>	
<i>Phoma sp.</i>	
<i>Chaetonium sp.</i>	
<i>Alternaria alternata</i>	
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>Microascus brevicaulis</i>
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	
<i>Trichophyton rubrum</i>	
<i>Trichophyton tonsurans</i>	
<i>Microsporum canis</i>	

2. Prélèvements biologiques

Tous nos prélèvements ont été manipulés sous hotte aspirante à flux laminaire et stockés à -80°C. Ils proviennent de 17 patients correspondant à 12 liquides biologiques et 23 biopsies tissulaires. Parmi ces 17 patients, 7 patients avaient une IFI prouvée et 10 une IFI probable selon les critères EORTC 2008 (**tableau 5**).

Tableau 5. Prélèvements biologiques.

Patient	IFI	Echantillon	Prélèvements	ED	Culture
MR	Prouvée	1	Biopsie pleurale	FH	<i>Aspergillus fumigatus</i>
HF	Prouvée	2	HP	FH	-
		3	HP	FM	<i>Rhizopus sp.</i>
MP	Prouvée	4	Biopsie pulmonaire	FH, TA	<i>A. fumigatus</i>
RF	Prouvée	5	Biopsie pulmonaire	FH, TA	-
		6	Biopsie pulmonaire	-	-
SP	Prouvée	7	Biopsie pulmonaire	-	<i>A. fumigatus</i>
CJM	Prouvée	8	Biopsie pulmonaire	-	<i>Scedosporium apiospermum</i>
LK	Prouvée	9	PRR	-	<i>Candida albicans</i>
		10	CFE	Levures	<i>C. albicans</i>
		11	Liquide articulaire	-	<i>C. albicans</i>
		12	CFE	-	<i>Mucor sp.</i>
LA	Probable	13	Aspiration	FH	<i>A. fumigatus</i>
			Bronchique		
GJF	Probable	14	LBA	-	<i>A. fumigatus</i>
BD	Probable	15	Aspiration	FH	<i>A. fumigatus</i>
			Bronchique		
PA	Probable	16	LBA	FH	<i>A. fumigatus</i>
		17	Sinus	-	<i>Aspergillus sp.</i>
		18	Sinus	-	<i>Aspergillus sp.</i>
		19	Sinus	FH	-
		20	Sinus	FH	-
		21	Sinus	FH, TA	<i>Aspergillus sp.</i>
		22	Sinus	-	-
		23	Sinus	FH	-
WMP	Probable	24	Sinus	FH	<i>Aspergillus sp.</i>
		25	LBA	FH	<i>A. fumigatus</i>
		26	LBA	FH	<i>A. fumigatus</i>
		27	Aspiration	FH	<i>A. fumigatus</i>
CM	Probable	28	Bronchique		
			Biopsie nasale	FM	<i>Absidia sp.</i>
GX	Probable	29	Biopsie nasale	FM	<i>Absidia sp.</i>
			LBA	-	<i>A. fumigatus</i> + <i>C. albicans</i>
PA	Probable	30	Crachats	Levures, FH	<i>A. fumigatus</i> + <i>C. albicans</i>
			Sinus	FM	-
PSA	Probable	31	Sinus	FM	<i>Aspergillus sp.</i>
			LBA	-	<i>A. fumigatus</i>
RR	Probable	32	Crachats	-	<i>Absidia sp.</i> + <i>Candida kefyr</i>

NOTE.

(-) : Négatif, négative ; ED : Examen direct microscopique ; HP : Hématome péritonéal ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; PRR : plaie région rotulienne ; CFE : condyle fémoral externe ; FH : Filaments mycéliens type Hyphomycète, FM : Filaments mycéliens type Mucorale, TA : Têtes aspergillaires.

3. Extraction de l'ADN

Trois techniques différentes ont été utilisées en fonction de la nature du matériel à extraire (cultures, liquides biologiques ou biopsies).

3.1.Cultures

L'extraction de l'ADN fongique a été réalisée à l'aide des tubes de 2 ml Lysing Matrix C[®] (MP Biomedicals, Illkirch, France) (**figure 11**). Une colonie (levures) ou une petite partie de la culture (moisissures) est mise en suspension dans 500 µl d'eau stérile directement dans les tubes Lysing Matrix C[®]. Les tubes sont traités dans l'appareil Fast Prep[®] FP120A (MP Biomedicals, Illkirch, France) (**figure 12**) à la vitesse de 6.0 m/sec pendant 2 cycles de 40 secondes. Les tubes sont ensuite centrifugés 1 minute à 6000 g.

Le surnageant est prêt à l'emploi pour la PCR.

Le dosage de l'ADN a été réalisé par spectrophotométrie grâce au NanoDrop[®] ND-1000 (Labtech, Palaiseau, France) disponible à l'unité d'oncologie moléculaire du CHU de Limoges.

3.2.Liquides biologiques

L'ADN fongique situé dans les liquides biologiques (LBA, liquide articulaire, crachat,...) est extrait dans les tubes Lysing Matrix C[®] avec la procédure suivante :

- 500 µl à 1000 µl de liquide sont traités dans l'appareil Fast Prep[®] FP 120A dans les mêmes conditions que pour les cultures,
- 200 µl de surnageant sont utilisés avec le protocole « Blood and Body Fluid Spin Protocol » du kit QIAamp[®] DNA Mini Kit (Quiagen, Courtaboeuf, France).

3.3. Biopsies tissulaires

Les tissus solides (biopsies) sont traités après une découpe de 10 à 25 mg de tissu. Ce morceau est recoupé en petits morceaux à l'aide d'un scalpel stérile à usage unique et placé dans 500 µl de tampon ATL (kit QIAamp[®] DNA Mini Kit) préalablement introduit dans les tubes Lysing Matrix C[®].

Les tubes sont placés dans l'appareil Fast Prep[®] 120A et traités dans les mêmes conditions que pour les cultures. Les tubes sont ensuite incubés pendant 3 heures à 56°C avec la protéinase K (20 µl) du kit QIAamp[®] DNA Mini Kit. Les tubes sont retraités dans l'appareil Fast Prep[®] 120A à la vitesse de 6,0 m/sec pendant 2 cycles de 40 secondes.

Le protocole « Tissue Protocol » du kit QIAamp[®] DNA Mini Kit (Quiagen, Courtaboeuf, France) est ensuite suivi dans son intégralité.

Figure 11. Tube de 2 ml Lysing Matrix C[®] (MP Biomedicals, Illkirch, France).



Figure 12. Fast Prep[®] FP120A (MP Biomedicals, Illkirch, France).



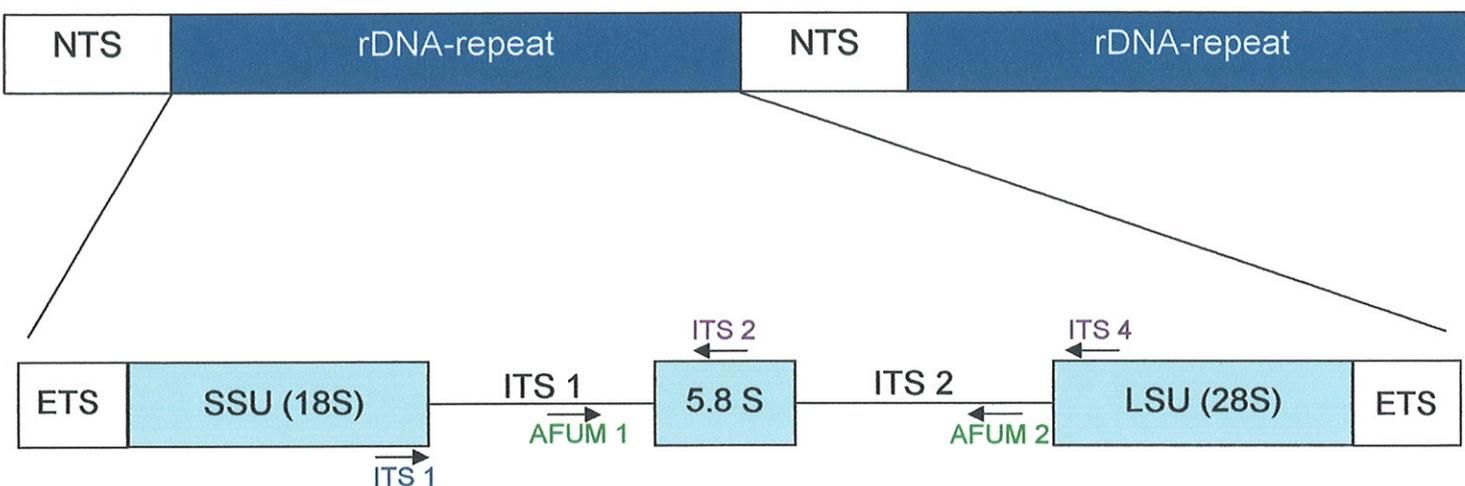
4. Choix des amorces

Nous avons utilisé 3 couples d'amorces correspondant à 3 PCR différentes (**figure 13**) :

- PCR ITS1+2 qui utilise le couple d'amorces ITS1/ITS4 encadrant la région ITS1-5,8S-ITS2,
- PCR ITS1 qui utilise le couple d'amorces ITS1/ITS2 encadrant la région ITS1,
- PCR *fumigatus* qui utilise le couple d'amorces AFUM1/AFUM2 qui cible spécifiquement les régions variables ITS1 et ITS2 d'*Aspergillus fumigatus*, champignon le plus fréquemment isolé d'IFI [75].

Les séquences des amorces utilisées sont reportées dans le **tableau 6**.

Figure 13. Localisation des régions ITS1 et ITS2 et des couples d'amorces utilisées dans les 3 techniques de PCR.



NOTE.

NTS : nontranscribed spacer, ETS : external transcribed spacer, ITS : internal transcribed spacer, SSU : small subunit, LSU : large subunit.

Tableau 6. Amorces utilisées dans les 3 techniques de PCR.

Amorces	Séquence (5'→3')	Position	Références
ITS 1 (F)	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	SSU 1768-1787	White <i>et al.</i> [159]
ITS 2 (R)	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	5.8S 50-31	White <i>et al.</i> [159]
ITS 4 (R)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	LSU 69-50	White <i>et al.</i> [159]
AFUM1 (F)	CGC CGA AGA CCC CAA CAT GAA CGC	ITS1 117-140	Luo <i>et al.</i> [75] Hinrikson <i>et al.</i> [46]
AFUM2 (R)	TAA AGT TGG GTG TCG GCT GGC	ITS2 137-157	Luo <i>et al.</i> [75] Hinrikson <i>et al.</i> [46]

NOTE.

SSU : small subunit (petite sous unité ribosomale), LSU : large subunit (grosse sous unité ribosomale), ITS : internal transcribed spacer, (F) : Amorce sens, (R) : Amorce anti sens.

5. PCR

Le mélange pour la réaction de PCR ITS1 ou ITS1+2 contient 25 µl comprenant :

- 12,5 µl de QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix (contenant la HotStarTaq DNA Polymérase) du kit QIAGEN® Multiplex PCR (Quiagen, Courtaboeuf, France),
- 1 µl d'amorce sens ITS1 à 10 pmol/µl,
- 1 µl d'amorce anti-sens ITS2 ou ITS4 à 10 pmol/µl,
- 5,5 µl d'eau distillée du kit QIAGEN® multiplex PCR,
- 5 µl d'échantillon.

Le mélange pour la PCR *fumigatus* est légèrement différent puisqu'il contient :

- 12,5 µl de QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix (contenant la HotStarTaq DNA Polymérase) du kit QIAGEN® Multiplex PCR (Quiagen, Courtaboeuf, France),
- 0,25 µl d'amorce sens AFUM1 à 40 pmol/ µl,
- 0,25 µl d'amorce antisens AFUM2 40 pmol/ µl,
- 7 µl d'eau distillée,
- 5 µl d'échantillon.

Après optimisation de la température d'hybridation des amorces et du nombre de cycles nécessaires, le programme de PCR retenu a été le suivant : une étape de dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C suivie de 35 cycles avec les étapes suivantes : dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 58°C pendant 30 secondes et extension à 72°C pendant 30 secondes et elle s'achève par une étape d'élongation finale de 30 minutes à 60°C.

Dans le but de vérifier que l'amplification de notre ADN s'est bien déroulée, nous avons procédé à une migration de nos produits d'amplification sur gel d'agarose de haute résolution, qualité biologie moléculaire RESOPHOR (Eurobio, Les Ullis, France).

L'électrophorèse a été effectuée en gel d'agarose 2% en tampon Tris-Borate-EDTA ou TBE (Tris-base 45mM, acide borique 45mM, EDTA 1,25 mM ; pH 8,6) 1X (solution mère TBE 10X Biorad, Ivry sur Seine), après avoir incorporé dans le gel 2 µl de bromure

d'éthidium ou BET à 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) qui est un agent intercalant et fluorescent, ce qui permet de visualiser l'ADN dans le gel sous un éclairage d'ultraviolets.

Le gel a ensuite été coulé dans une cuve d'électrophorèse MINICELL[®] EC 370M (Electrophoretic Gel System, St Petersburg, Floride, USA) avec un maximum de 13 puits par gel :

- 12 puits sont réservés aux échantillons (dont un contient un témoin négatif) : 5 µl d'ADN amplifié + 5 µl de bleu de bromophénol dilué (100 µl de bromophénol 0,25%, xylène-cyanol 0,25%, glycérol 30% et 500 µl de TBE 1X).
- 1 puits est réservé au marqueur de poids moléculaire : 1 µl de marqueur de poids moléculaire XIV (Roche Diagnostics, Meylan, France) + 5 µl de TBE 1X + 1 µl de bleu de bromophénol.

L'ADN amplifié a migré 20 minutes à 160 volts à l'aide d'un générateur de champ électrique modèle PS 250/2,5 AMP (Hoefer Scientific instruments, San Francisco, Californie, USA). Puis nous avons photographié le gel avec un film Seikosha VP-15052S 110mm / 21mm (Seiko precision Inc, Japon) sous éclairage par ultraviolets avec l'appareil FluoLink (Céra.Labo, Aubervilliers, France). La présence d'ADN est visualisée par une bande fluorescente d'intensité variable sur le gel, dont la taille peut être estimée par comparaison à la migration de marqueur de poids moléculaire (distance de migration des fragments d'ADN inversement proportionnelle au Log10 de leur taille).

Une seule bande est attendue ; en présence de plusieurs bandes fluorescentes, le séquençage est impossible. Il est possible de séparer les populations fongiques par migration de l'amplifiât sur un gel d'agarose à 1% (100 Volts pendant 1H30). Chaque bande est découpée et pesée. Nous purifions chaque bande grâce au kit QIAquick[®] gel extraction Kit (Quiagen, Courtaboeuf, France). Nous vérifions la pureté et la quantité d'ADN par migration sur gel d'agarose à 1% (160 Volts pendant 20 minutes).

6. Séquençage

Seules les régions ITS1 ou ITS1-5,8S-ITS2 sont séquencées dans notre étude. La région spécifique « *fumigatus* » a été séquencée une fois afin de vérifier la spécificité de l'amplification de la PCR *fumigatus*.

6.1. Purification des produits de PCR

La purification du produit de PCR est réalisée à l'aide du kit Rapid PCR Purification Systems® (Marligen, Bioscience, Ijamsville, USA).

Le produit de purification (50 µl) est conservé à -20°C.

4 µl d'échantillon sont utilisés pour le séquençage.

6.2. Réaction de séquençage

Les produits de PCR ont été séquencés dans les 2 directions grâce aux amorces sens ITS1, et antisens ITS2 ou ITS4 avec le kit Big Dye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

Chaque réaction de séquençage contient 10 µl de mélange comprenant :

- 4 µl d'échantillon purifié,
- 2,7 µl du kit Big Dye® Terminator v1.1,
- 0,5 µl d'amorce sens ou antisens à 10 µM,
- 2,15 µl d'eau distillée,
- 0,65 µl de tampon de séquençage du kit Big Dye® Terminator v1.1.

Le programme de la réaction comprend 30 cycles avec une étape de dénaturation, 10 secondes à 96°C, une étape d'hybridation, 5 secondes à 50°C et une étape d'élongation, 4 minutes à 60°C. La totalité du produit de séquençage est purifiée par précipitation à l'isopropanol.

6.3. Précipitation à l'isopropanol

Un mélange comprenant 30 µl d'eau distillée, 60 µl d'isopropanol et 10 µl du produit de séquençage est vortexé puis centrifugé 4 secondes « short spin » et laissé à l'obscurité et à température ambiante toute la nuit. Le lendemain, le tube est centrifugé 20 minutes à 20 000 g, puis le surnageant est enlevé par retournement. 250 µl d'éthanol à 70 % sont rajoutés et le tube est centrifugé 5 minutes à 20 000g. Le surnageant est enlevé par retournement et évaporation passive. Quinze µl de formamide (stocké à +4°C) sont ajoutés et le tube est vortexé doucement puis centrifugé 4 secondes « short spin ».

L'ADN est dénaturé 3 minutes à 95°C et mis immédiatement dans la glace.

6.4. Électrophorèse capillaire

Les 15 µl du mélange sont mis dans le puits d'une plaque 96 puits qui est déposée à l'unité de séquençage du CHU. L'échantillon est soumis à une électrophorèse capillaire dans un ABI prism 3130xl (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

6.5. Analyse des séquences

Les données de l'électrophorégramme sont vérifiées à l'aide du logiciel d'alignement de séquence « Finch TV » (<http://www.geospiza.com>) et les séquences sens et antisens sont comparées grâce au logiciel d'alignement en ligne ClustalW [146, 147] disponible sur le site EMBL EBI (<http://www.ebi.ac.uk>).

Les séquences vérifiées sont ensuite comparées avec la base de données disponible sur GenBank grâce au logiciel en ligne BLAST [4] disponible sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Une identification d'espèce est valable lorsqu'un pourcentage d'homologie entre les séquences est $\geq 99\%$. Nos séquences sont aussi comparées à notre base de données établie avec les souches isolées de culture, identifiées macroscopiquement et microscopiquement au laboratoire de Mycologie du CHU de Limoges.

Les séquences des souches de référence ont été alignées entre elles avec le logiciel AliBee-Multiple alignment Release 2.0 disponible sur le site GenBee (<http://www.genebee.msu.su/>) et mises en **annexe 1, 2 et 3**.

7. Application pratique

La collection de souches nous a permis de mettre au point les techniques d'extraction, de PCR et de séquençage.

Nous avons ensuite appliqué ces techniques à partir des prélèvements biologiques avec la méthodologie suivante :

- Le PCR ITS1, ITS 1+2 et *fumigatus* ont été réalisées systématiquement ;
- Le séquençage des régions ITS1-5,8S-ITS2 a été réalisé lorsque la PCR ITS 1+2 était positive. Lorsque cette dernière était négative, le séquençage de la région ITS1 a été réalisé sous réserve que la PCR ITS1 était positive.

Résultats

1. Souches

Les résultats du séquençage des régions ITS1 par la PCR ITS1 et des régions ITS1-5,8S-ITS2 par la PCR ITS1+2 et de la PCR *fumigatus* à partir des souches étudiées sont reportés dans le **tableau 7**.

La sensibilité des 3 techniques d'amplification a été testée avec de l'ADN extrait de culture de *Candida albicans*, *Absidia corymbifera* et *Aspergillus fumigatus*. Des dilutions à partir d'une solution contenant une concentration d'ADN de 10 µg/µl ont été réalisées. Cette stratégie a été choisie pour tenir compte à la fois de l'étape d'extraction et de l'étape d'amplification qui peuvent interférer sur le seuil final de détection de la technique.

1.1. Levures

L'amplification et le séquençage des régions ITS1-5,8S-ITS2 par la PCR ITS1+2 a été possible pour toutes les souches de levures étudiées. Les séquences complètes de la région ITS1-5,8S-ITS2 de chaque levure ont été alignées (**annexe 1**).

La sensibilité des PCR ITS1 et ITS1+2 à partir d'une souche de *Candida albicans* est de 1 pg/µl, soit 5 pg d'ADN.

La PCR *fumigatus* a été négative dans tous les cas.

1.2. *Aspergillus*

Les séquences des régions ITS1-5,8S-ITS2 des *Aspergillus flavus*, *glaucus*, *nidulans* et *versicolor* ont été alignées en **annexe 2**. L'amplification des régions ITS1-5,8S-ITS2 a été négative pour les *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* et *A. candidus*. Seule la région ITS1 de l'*Aspergillus candidus* a pu être amplifiée et séquencée.

Le couple d'amorces « spécifique *fumigatus* », PCR *fumigatus*, nous a permis d'amplifier les *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus terreus* uniquement, ceux-ci ne présentant pas le même profil de migration sur gel d'agarose et pouvant donc être distingués aisément (le

séquençage du produit de PCR a bien montré que nous étions en présence soit de l'*Aspergillus fumigatus* soit de l'*Aspergillus terreus*). Nous avons donc décidé de faire migrer sur gel d'agarose toutes les PCR *fumigatus* avec un témoin positif d'*Aspergillus fumigatus* (contrôlé par séquençage).

La limite de détection de la PCR *fumigatus* était de 100 pg/μl avec *Aspergillus fumigatus*, soit une sensibilité de la PCR *fumigatus* de 500 pg d'ADN.

1.3.Mucorales

Comme pour les levures, la région ITS1-5,8S-ITS2 a pu être amplifiée et séquencée pour toutes les mucorales étudiées (**annexe 3**).

La limite de détection des PCR ITS 1 et ITS 1+2, était de 1 pg/μl avec l'*Absidia corymbifera*, soit une sensibilité des PCR ITS 1 et ITS 1+2 de 5 pg d'ADN.

La PCR *fumigatus* a été négative dans tous les cas.

1.4.Autres filamenteux

Toutes les moisissures autres qu'*Aspergillus* et Mucorales ont été amplifiées et séquencées à partir de la PCR ITS1 ou de la PCR ITS1+2, à l'exception de *Chaetonium sp* (**tableau 7**). Les séquences du *Fusarium oxysporum* et du *Scedoporium apiospermum* ont été alignées avec celle des *Aspergillus* (**annexe 2**). La PCR *fumigatus* a été négative dans tous les cas.

Parmi les 4 dermatophytes étudiés, les séquences des régions ITS1-5,8S-ITS2 ont pu être obtenues pour *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis* tandis que pour *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton tonsurans* seule la région ITS1 a pu être séquencée (**tableau 7**). La PCR *fumigatus* a été négative dans tous les cas.

Tableau 7. Résultats d'identification des champignons à partir de la PCR *fumigatus* et du séquençage de la PCR ITS1 et ITS1+2 sur des cultures identifiées macroscopiquement et microscopiquement au laboratoire de Mycologie du CHU Limoges.

Microorganismes	PCR <i>fumigatus</i> ^a	Séquençage ITS 1	Séquençage ITS 1 + 2
Levures			
<i>Cryptococcus neoformans</i> *	Négative	NR	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Candida albicans</i> *	Négative	NR	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida glabrata</i> *	Négative	NR	<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida kefyr</i> *	Négative	NR	<i>Candida kefyr</i>
<i>Candida krusei</i> *	Négative	NR	<i>Candida krusei</i>
<i>Candida parapsilosis</i> *	Négative	NR	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida tropicalis</i> *	Négative	NR	<i>Candida tropicalis</i>
Aspergillus			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Positive	NA	NA
<i>Aspergillus flavus</i> *	Négative	NR	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus glaucus</i> *	Négative	NR	<i>Aspergillus glaucus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	Négative	NA	NA
<i>Aspergillus terreus</i>	Positive	NA	NA
<i>Aspergillus nidulans</i> *	Négative	NR	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Aspergillus versicolor</i> *	Négative	NR	<i>Aspergillus versicolor</i>
<i>Aspergillus candidus</i>	Négative	<i>Aspergillus candidus</i>	NA
Mucorales			
<i>Mucor circinelloïdes</i> *	Négative	NR	<i>Mucor circinelloïdes</i>
<i>Rhizopus microsporus</i> *	Négative	NR	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>Absidia corymbifera</i> *	Négative	NR	<i>Absidia corymbifera</i>
<i>Rhizomucor sp.</i>	Négative	NR	<i>Rhizomucor pusillus</i> *
Autres moisissures			
<i>Fusarium oxysporum</i> *	Négative	NR	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Scedoporium apiospermum</i> *	Négative	NR	<i>Scedoporium apiospermum</i>
<i>Trichotecium roseum</i>	Négative	<i>Trichotecium roseum</i>	NR
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Négative	NR	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
<i>Beauveria sp.</i>	Négative	NR	NR
<i>Penicillium sp.</i>	Négative	NR	NR
<i>Phoma sp.</i>	Négative	NR	<i>Phoma cava</i>
<i>Chaetonium sp.</i>	Négative	NA	NA
<i>Alternaria alternata</i>	Négative	<i>Alternaria alternata</i>	NR
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Négative	NR	NR
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Négative	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	NR

Dermatophytes

<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Négative	NR	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	Négative	<i>Trichophyton rubrum</i>	NR
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Négative	<i>Trichophyton tonsurans</i>	NR
<i>Microsporum canis</i>	Négative	NR	<i>Microsporum canis</i>

NOTE.

Les séquences des champignons marqués d'un astérisque* sont reportées en annexes.

NR : non réalisé, NA : non amplifié.

^a Une PCR *fumigatus* négative indique l'absence de bandes sur le gel d'agarose ; une PCR *fumigatus* positive indique la présence d'une bande sur gel : l'une à 382 bp pour *Aspergillus fumigatus* et l'autre à 525 bp pour *Aspergillus terreus*. Le séquençage des 2 produits de PCR a permis de montrer que les 2 bandes étaient spécifiques de chaque espèce.

2. Prélèvements biologiques

Les résultats du séquençage des régions ITS1 par la PCR ITS1 et des régions ITS1-5,8S-ITS2 par la PCR ITS1+2 et de la PCR *fumigatus* à partir des prélèvements biologiques de 17 patients sont reportés dans le **tableau 8**.

2.1. Infection fongique invasive prouvée

Un total de 12 prélèvements correspondant à 7 patients avec une IFI prouvée ont été étudiés.

Seulement 5 examens directs microscopiques étaient positifs et dans 9 cas, la culture a permis d'identifier un pathogène fongique (sans identification d'espèce dans 2 prélèvements). La biologie moléculaire, quant à elle, retrouve une identification précise d'espèce dans 10 prélèvements.

2.2. Infection fongique invasive probable

Un total de 23 prélèvements correspondant à 10 patients avec une IFI probable ont été étudiés. L'examen direct microscopique était positif dans 17 prélèvements et la culture était positive dans 18 prélèvements (dont 4 prélèvements avec 2 champignons différents). Cependant l'identification d'espèce a été limitée au genre pour 8 champignons car ils correspondaient soit à une mucorale soit à un *Aspergillus* dont l'aspect macroscopique et microscopique ne permettait pas de donner un nom d'espèce.

La biologie moléculaire nous a permis d'identifier 1 ou 2 champignons dans 17 prélèvements sur 23. L'identification d'espèce est obtenue pour chaque champignon (le pourcentage d'identité par rapport à GenBank est supérieur ou égal à 99%). Nos séquences sont également comparées à notre base de référence obtenue avec les souches de référence et reportée en annexe.

Les résultats du séquençage sont corrélés dans tous les cas avec l'identification par la culture (lorsqu'elle est positive).

Tableau 8. Résultats de l'examen direct, de la culture et de la biologie moléculaire sur les prélèvements biologiques.

Patient	IFI	Source	Prélèvements	ED	Culture	PCR <i>fumigatus</i> ^a	Séquençage ITS1	Séquençage ITS 1+2
MR	Prouvée	1	Biopsie pleurale	FH	<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	NA	NA
HF	Prouvée	2	HP	FH	-	+	NA	NA
MP	Prouvée	3	HP	FM	<i>Rhizopus sp.</i>	+	NR	<i>Rhizopus oryzae</i>
		4	Biopsie pulmonaire	FH, TA	<i>A. fumigatus</i>	+	NA	NA
RF	Prouvée	5	Biopsie pulmonaire	FH, TA	-	+	NA	NA
SP	Prouvée	6	Biopsie pulmonaire	-	-	+	NA	NA
		7	Biopsie pulmonaire	-	<i>A. fumigatus</i>	+	NA	NA
		8	Biopsie pulmonaire	-	<i>Scedosporium apiospermum</i>	-	NA	NA
LK	Prouvée	9	PRR	-	<i>Candida albicans</i>	-	NR	<i>C. albicans</i>
GJF	Probable	10	CFE	Levures	<i>C. albicans</i>	-	NR	<i>C. albicans</i>
		11	Liquide articulaire	-	<i>C. albicans</i>	-	NA	NA
BD	Probable	12	CFE	-	<i>Mucor sp</i>	-	NR	<i>Mucor circinelloides</i>
		13	Aspiration Bronchique	FH	<i>A. fumigatus</i>	+	NA	NA
PA	Probable	14	LBA	-	<i>A. fumigatus</i>	-	NA	NA
		15	Aspiration Bronchique	FH	<i>A. fumigatus</i>	+	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	NA
PA	Probable	16	LBA	FH	<i>A. fumigatus</i>	-	NA	NA
		17	Sinus	-	<i>Aspergillus sp.</i>	-	NR	<i>A. flavus</i>
		18	Sinus	-	<i>Aspergillus sp.</i>	-	NR	<i>A. flavus</i>
		19	Sinus	FH	-	-	-	<i>Aspergillus flavus</i>
		20	Sinus	FH	-	-	-	NR

2.3.Synthèse

Une synthèse de nos résultats est reportée dans le **tableau 9**.

L'examen direct microscopique permet de détecter la présence d'éléments fongiques mais ne permet pas d'identifier un champignon.

Une culture positive signifie qu'un ou plusieurs champignons ont pu être détectés mais ne signifie pas que l'identification est réalisée. En effet, la culture n'a pas pu identifier l'espèce fongique dans 10 cas parmi les 32 isollements de notre étude.

Une biologie moléculaire positive implique systématiquement que l'identification d'espèce est obtenue.

Pour l'ensemble de nos prélèvements, nous avons d'abord comparé les résultats de chaque technique obtenus séparément. La culture et la biologie moléculaire ont des résultats supérieurs à l'examen direct ; cependant, malgré sa faible sensibilité, l'examen direct reste un examen indispensable afin de rendre un résultat précoce au moindre coût. Avec une sensibilité égale (77%), la culture et la biologie moléculaire ne détectent cependant pas des champignons dans les mêmes prélèvements d'où l'intérêt d'associer les 2 techniques.

Nous avons ensuite comparé les résultats en associant les techniques. Les critères de positivité sont les mêmes que pour chaque technique prise individuellement. Un résultat positif signifie qu'au moins une des deux techniques est positive.

Le gold standard actuel, c'est-à-dire l'examen direct microscopique associé à la culture, permet de détecter 33 prélèvements positifs sur 35, mais sans identification d'espèce dans 17 cas. L'association examen direct, culture et biologie moléculaire détecte un prélèvement positif supplémentaire par rapport à l'association examen direct et culture mais la biologie moléculaire permet d'identifier 14 espèces de champignons sur les 17 non identifiées par les 2 autres techniques.

L'association de la culture et de la biologie moléculaire nous permet de constater que ce ne sont pas les mêmes prélèvements qui sont détectés par chacune des techniques prises individuellement (**tableau 9**).

Tableau 9. Résultats de chaque technique prise isolément et associée.

	ED n(%)	Culture n(%)	BM n(%)	ED + culture n(%)	ED + BM n(%)	Culture + BM n(%)	ED + culture + BM n(%)
Négatif	13(37%)	8(23%)	8(23%)	2(6%)	4(11%)	2(6%)	1(3%)
Positif	22(63%)	27(77%)	27(77%)	33(94%)	31(89%)	33(94%)	34(97%)
Total	35	35	35	35	35	35	35

NOTE.

ED : Examen direct microscopique, BM = Biologie moléculaire.

Un examen direct microscopique est considéré comme positif lorsque des levures, des filaments et/ou des têtes aspergillaires sont visualisés.

Une culture positive ne permet pas d'identifier une espèce dans tous les cas.

Discussion

Notre objectif était de développer une méthode de diagnostic moléculaire permettant de détecter les champignons dans les prélèvements biologiques pour pallier au manque de spécificité et de sensibilité des techniques histologiques ou culturales habituellement utilisées. La région des gènes codant pour l'ARN ribosomal est une cible de choix pour la mise au point d'une technique permettant la détection d'un large éventail d'espèces potentiellement pathogènes. Elle est en effet présente chez tous les champignons et contient des séquences conservées permettant de dessiner des amorces encadrant des séquences variables spécifiques d'espèce ou de groupes d'espèce. De plus, le nombre important de copies des gènes codant pour l'ARNr permet d'obtenir une bonne sensibilité de la technique d'amplification.

La mise en œuvre des techniques d'amplification par PCR peut avoir un intérêt dans le cas où une IFI est fortement suspectée afin d'accélérer le processus d'identification du champignon responsable et de mettre en place un traitement antifongique probabiliste adapté.

L'examen direct est un examen simple et rapide mais peut être négatif lors d'authentiques IFI pour les raisons suivantes :

- La partie de tissu ou de liquide analysée ne contient pas de matériel fongique,
- Le champignon est présent mais en trop faible quantité pour être détecté microscopiquement,
- Le tissu analysé est difficilement analysable microscopiquement (par exemple, un liquide biologique très visqueux).

La culture peut éventuellement permettre d'isoler et d'identifier le champignon responsable. Cependant elle peut être négative lorsque le champignon ne pousse pas (faux négatifs) ou lorsque son identification est impossible par l'examen macroscopique et microscopique de la culture (exemple, filamenteux non identifiable). Elle peut être également positive lorsque le prélèvement est colonisé ou contaminé avant la culture (cas des prélèvements issus de site non stérile ou manipulés non stérilement).

La biologie moléculaire peut, comme la culture, être faussement positive si le prélèvement est souillé par des spores ou en cas de contamination lors des différentes étapes de la PCR [70]. Le risque inhérent aux techniques d'amplification avec des amorces consensus est l'obtention de résultats faussement positifs dus à la contamination des réactions d'amplification par de l'ADN fongique provenant d'une autre source que l'échantillon testé. Loeffler *et al.* [70] dans une étude destinée à évaluer ce risque ont trouvé un taux de 8% de

réactions positives pour les témoins négatifs placés dans les séries d'amplification. Les sources de contamination peuvent être les produits d'amplification générés dans le laboratoire mais également les moisissures présentes dans l'environnement [70]. Les réactifs commercialisés pour la réalisation des étapes d'extraction ou d'amplification peuvent eux même être à l'origine de résultats faussement positifs en raison de leur contamination par de l'ADN fongique. C'est ainsi que la présence d'ADN fongique a été détectée dans certains lots de zymolyase et de lyticase [70]. Ces deux enzymes produites par une bactérie, *Arthrobacter luteus* [70] sont utilisées pour la lyse de la paroi fongique dans les protocoles d'extraction d'ADN.

Pour être en mesure de détecter la survenue d'une éventuelle contamination lors des manipulations, nous avons inséré des contrôles négatifs aux différentes étapes de réalisation de la PCR (contrôle négatif d'extraction et contrôle du mélange réactionnel d'amplification). Nous nous sommes par ailleurs conformés aux recommandations en vigueur concernant la séparation des locaux pour la prévention des risques de contaminations croisées au cours des techniques d'amplification. Les manipulations ont été réalisées sous hotte à flux d'air laminaire avec du matériel à usage unique.

Aucune contamination n'a été détectée au cours de nos manipulations de PCR.

1. Choix de la technique

La première étape de notre technique fût la mise au point de l'extraction, étape fondamentale préalable à la PCR. La paroi des champignons se caractérise par la présence d'une paroi cellulaire complexe solide qui résiste à la lyse par les méthodes classiques d'extraction d'ADN employées pour les bactéries.

Plusieurs protocoles d'extraction de l'ADN fongique ont été décrits dans la littérature [3, 29, 37, 97, 149, 160]. La congélation-décongélation, en utilisant l'azote liquide ou la neige carbonique, a démontré son efficacité [37, 56, 71]. L'homogénéisation a également été utilisée pour extraire l'ADN fongique en utilisant des billes de verre [97, 140]. L'extraction enzymatique est une autre méthode utilisant la lyticase qui décompose la paroi cellulaire fongique, libérant l'ADN fongique [160]. Bien que ces protocoles donnent de bons résultats, ils sont complexes et longs à réaliser, difficilement utilisables en routine.

Nous avons dans un premier temps testé un protocole d'extraction chimique décrit par Hendolin *et al.* [44] mais sa complexité et l'absence de résultats probants nous a amené à l'abandonner rapidement. Les protocoles tissu et liquide biologique du kit QIAamp[®] DNA Mini Kit (Quiagen, Courtaboeuf, France) ont été également testés mais sans résultat avec les moisissures. Nous avons finalement opté pour la technique HSCD « High Speed Cell Disruption » qui utilise la l'action mécanique des billes de verres sur les parois des cellules [97]. L'utilisation des tubes de 2 ml Lysing Matrix C[®] avec l'appareil FastPrep[®] 120A ont permis d'obtenir facilement et rapidement de bons résultats sur les cultures comme l'ont montré Fredricks *et al.* [34] et Griffiths *et al.* [38].

Nous avons essayé d'optimiser cette technique d'extraction en ajoutant des étapes de congélation-décongélation dans l'azote liquide et/ou « boiling » (utilisé pour les bactéries), mais sans que cela améliore le rendement d'extraction de l'ADN.

2. Souches

La plupart des souches de collection identifiées morphologiquement ont été également identifiées au niveau moléculaire avec une concordance de 100%. Certains champignons, comme l'*Aspergillus niger*, n'ont pas pu être amplifiés par PCR. Ces problèmes d'amplification ne sont pas notifiés dans la littérature avec les mêmes amorces et cette discordance nous interpelle. Luo *et al.* avaient en revanche noté une absence d'amplification pour certaines moisissures en particulier avec colonies âgées [75]. Une inhibition de la PCR due aux pigments a cependant été rapportée pour *Scytalidium dimidiatum* et *Aspergillus niger* [77].

Aspergillus fumigatus n'a pas pu être amplifié avec les PCR panfongiques ITS1 et ITS 1+2. Cette absence d'amplification est suppléée par la PCR *fumigatus* qui permet de s'affranchir du séquençage puisque *Aspergillus fumigatus* représente 47% des infections fongiques dues aux filamenteux chez les greffés de moëlle osseuse [8]. Cependant un témoin de migration sur gel est nécessaire car nous avons montré que l'*Aspergillus terreus* est également amplifié par la PCR *fumigatus*.

3. Prélèvements biologiques

La détection et l'identification des agents pathogènes fongiques par la biologie moléculaire peuvent donner des résultats plus précoces que la culture [30, 43, 118]. En outre, chez les animaux infectés expérimentalement et chez les patients, la sensibilité de la PCR semble plus élevée que la culture et les tests sérologiques pour le diagnostic des infections fongiques invasives [29, 57, 118]. Ces résultats ont été corrélés avec l'amélioration clinique et l'effet du traitement, en particulier chez les patients avec une aspergillose invasive [29, 72, 163], une candidose invasive [29], et une cryptococcose méningée [120].

Dans notre étude, les différentes techniques conventionnelles et de biologie moléculaire n'ont pas été réalisées en même temps dans la plupart des prélèvements, mais lorsque cela a été possible, la biologie moléculaire a donné des résultats plus précoces que la culture. Malgré le faible nombre de prélèvements, la biologie moléculaire a une sensibilité égale à la culture (77%) dans les IFI prouvées et probables.

Dans un cas (patient « RF ») pour lequel deux biopsies pulmonaires ont été analysées, le diagnostic d'IFI prouvée a été basé uniquement sur la présence de filaments mycéliens de type hyphomycète et de têtes aspergillaires à l'examen direct microscopique du prélèvement « RF 5 ». La PCR *fumigatus* a été positive pour les deux prélèvements alors que la culture est restée négative. Les résultats de la PCR auraient permis de confirmer et de diagnostiquer une Aspergillose Invasive à *Aspergillus fumigatus*.

Dans un autre cas (patient « HF »), l'ensemble des analyses effectuées sont concordantes, l'examen direct microscopique mettait en évidence des filaments type mucorale, la culture un *Rhizopus sp.* et le séquençage de la région ITS1-5,8S-ITS2 un *Rhizopus oryzae*. Cependant pour ce patient, seule la biologie moléculaire a détecté un *Aspergillus fumigatus* dans les deux prélèvements d'hématome péritonéal. Ce diagnostic est conforté par la présence de filaments mycéliens de type hyphomycète dans un des deux prélèvements à l'examen direct microscopique et par un taux très élevé d'antigène Galactomannane dans le liquide péritonéal.

Les méthodes de diagnostic moléculaire, comme la culture, ne permettent pas de distinguer les individus qui sont colonisés de ceux qui sont infectés [12, 91]. Par exemple, 8 à

38% de faux-positifs (moyenne 31%) ont été signalés dans le diagnostic de candidose et l'aspergillose [12, 91, 142]. Les explications les plus probables sont la colonisation des voies aériennes par des conidies et/ou des hyphes et la contamination de l'échantillon et/ou des tampons de réaction par des champignons de l'environnement [70]. Des méthodes de travail rigoureuses et des procédures de décontamination aident à contrôler le risque de contamination. La présence de ces faux positifs dans notre étude est impossible à évaluer car notre technique n'a été testée que sur des prélèvements issus de patients avec une IFI prouvée ou probable selon les critères EORTC 2008.

De plus la biologie moléculaire est la seule à donner une identification d'espèce dans 100% des cas où un champignon est détecté alors que la culture donne une identification d'espèce dans 16 cas sur 27 soit 59%. C'est par exemple le cas du patient « PA », pour lequel la culture ne permettait pas de donner l'identification d'espèce d'un *Aspergillus sp.* alors que la biologie moléculaire nous a permis d'identifier un *Aspergillus flavus* dans plusieurs prélèvements. Cette identification a été confirmée par le séquençage de la souche obtenue en culture.

Le *Pneumocystis jiroveci* obtenu par séquençage de la région ITS1 de l'aspiration bronchique du patient « BD » a été confirmé par la PCR spécifique *Pneumocystis jiroveci* réalisée au laboratoire de Mycologie. Le *Pneumocystis jiroveci* n'étant pas cultivable sur les milieux de culture utilisés en Mycologie, la PCR ITS1 peut donc éventuellement le détecter dans les cas où la PCR spécifique n'est pas demandée.

4. Perspectives

Notre travail a évalué l'intérêt de la biologie moléculaire chez des patients atteints d'IFI. Cette technique peut également avoir un intérêt en Mycologie médicale de routine lorsque l'identification par la culture est impossible comme c'est le cas assez souvent dans les prélèvements de Dermatologie. Nous avons pu ainsi identifier par exemple 2 dermatophytes : *Microsporum canis* (responsable d'une teigne) et *Trichophyton rubrum* (responsable d'une dermatophytose de la peau glabre) qui n'étaient pas identifiables microscopiquement à partir de la culture.

Le développement des techniques d'extraction automatisée peut permettre de faciliter cette étape primordiale préalable à toute PCR. Des centres français (comme le laboratoire de Mycologie du CHU de Nancy) utilisent déjà l'automate MagNAPure LC® avec le kit MagNAPure LC DNA isolation kit II® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) pour extraire l'ADN à partir de souches. Lau *et al.* utilisent également cette technique d'extraction à partir de prélèvements biologiques [65]. Loeffler *et al.* ont montré l'intérêt de cet automate pour l'extraction des levures et des filamenteux à partir des cultures [73]. Les méthodes d'extraction automatisées semblent intéressantes en cas de grande série d'échantillons à extraire, mais en présence d'un nombre peu important d'extraction à réaliser, les méthodes d'extraction manuelles sont plus rentables avec des sensibilités comparables [32].

Les automates de PCR en temps réel offrent une perspective intéressante pour améliorer la rapidité de la technique mais présentent une limite quant à la taille du fragment à amplifier (700 paires de base). Vollmer *et al.* ont utilisé la PCR en temps réel (à partir de l'ADN ribosomal 28S) pour la détection et l'identification de champignons dans les prélèvements biologiques avec une limite de détection de 95% à partir de 15 copies par PCR et une identification par séquençage [154]. La PCR en temps réel peut avoir un intérêt dans la détection des principales espèces de *Candida* et l'*Aspergillus fumigatus* dans les hémocultures [76, 105, 127, 135, 162].

Actuellement la durée de notre technique diagnostique par biologie moléculaire varie en fonction de la réalisation du séquençage. En cas de PCR *fumigatus* positive seule, les

résultats sont obtenus dans la journée mais si une des PCR universelles est positive, le séquençage du produit de PCR va augmenter le temps de diagnostic (d'autant plus si plusieurs bandes sont observées lors de l'étape de migration en gel d'agarose) à 2 ou 3 jours. La méthode de purification que nous utilisons lors du séquençage est peu coûteuse. Des kits de purification en colonne existent avec l'avantage d'être plus rapides mais sont aussi plus onéreux. L'utilisation d'un kit de purification, qui permettrait de diminuer encore le temps du diagnostic d'au moins 12 heures, est à envisager.

Le développement de nos techniques sur des tissus paraffinés semble être une prochaine étape afin d'élargir le champ d'action des techniques de biologie moléculaire sur les prélèvements où seule la preuve histopathologique est présente comme l'ont fait Lau *et al.* mais avec une sensibilité plus faible que celle observée avec les tissus frais congelés [65]. Willinger *et al.* ont ainsi identifiés 90% des espèces fongiques sur les tissus frais congelés et seulement 50% sur les tissus paraffinés [161]. Lau *et al.* ont utilisé une « PCR ITS1 » pour détecter l'ADN fongique dans les tissus frais et les tissus paraffinés de patients atteints d'IFI prouvées par la culture ou histologiquement. Ces auteurs ont pu ainsi détecter et identifier les agents pathogènes fongiques dans 93,6% des cas lorsque la culture était positive et dans 64,3% des cas lorsque la preuve de l'infection fongique était uniquement histologique [65]. En comparaison, dans notre étude en cas de culture positive, soit 27 prélèvements, notre technique a permis de détecter et identifier 21 prélèvements contenant 1 ou 2 champignons soit 78% des cas. En cas de preuve à l'examen direct microscopique seul, la biologie moléculaire était positive dans 5 cas sur 6.

Le développement de la biologie moléculaire a permis une augmentation du nombre d'études sur la phylogénie des champignons, entraînant une révision des classifications dites morphologiques [14, 16].

Conclusion

Les techniques conventionnelles de diagnostic des infections fongiques se heurtent souvent à un manque de sensibilité quant à la détection mais surtout à l'identification des espèces fongiques. Nos travaux ont permis de développer 2 techniques de PCR panfongique avec séquençage de la région ITS1-5,8S-ITS2 et une technique de PCR spécifique *Aspergillus fumigatus*, capables d'identifier des champignons en culture mais également à partir de prélèvements biologiques.

Les PCR utilisées n'ont jamais amplifié de l'ADN non fongique, prouvant la spécificité de ces techniques vis-à-vis des champignons. La sensibilité de la PCR (77%) était égale à celle de la culture avec l'avantage de rendre un résultat plus précoce et d'identifier précisément une espèce fongique.

La biologie moléculaire semble pouvoir prendre sa place en cas d'examen direct positif pour les patients suspects d'Infection Fongique Invasive (IFI) en complément de la culture, afin d'obtenir un résultat plus rapide mais également en cas de culture négative pour identifier un agent fongique pathogène, et ainsi orienter le clinicien dans son choix thérapeutique. En cas de forte suspicion d'Infection Fongique Invasive, l'association de la culture et de la biologie moléculaire permettrait d'améliorer la faible sensibilité de l'examen direct microscopique lorsque celui-ci est négatif.

Annexes


```

..++++++++.+          .++ .+.+  ..... .+.++..+++...+.
A. flavus (390) GTGTGTTGGGTC-----GTCGTCCCTCTCCGGGGGGgACGGGCCCAAAGGCAG
A. glaucus (350) GTGTGTTGGG-C-----TTCCGTCCCTGGCAACGGGG-ACGGGCCCAAAGGCAG
A. nidulans (361) GTGTGTTGGGTC-----GTC-GTCCCC--CCCAGGGG-ACGGGCCCAAAGGCAG
A. versicolor (364) GTGTGTTGGGTC-----GTC-GTCCCC--CCCAGGGG-ACGGGCCCAAAGGCAG
F. oxysporum (355) G-GTGTGGGAC-----TC-----GCG-TTAATTCGC---GTTCTCAAATTGAT
S. apiospermum (394) CGGTGTTGGGGcgctacggcgaGTC-TTCGCGACCCCGTAG----GCCCTGAAATACAG

```

```

.+++++.++.....+ + + .+...+++++ +.+.+...+.....++++. .+..
A. flavus (440) CGGCGGCACCGCTC-CGAT-CCTCGAGCGTA-TGGGGCTTTGTCACCCGCT-C-TGTAG
A. glaucus (398) TGGCGGCACCATGTC-TGGT-CCTCGAGCGTA-TGGGGCTTTGTCACCCGCTCC-CGTAG
A. nidulans (407) CGGCGGCACCGTGTTC-CGGT-CCTCGAGCGTA-TGGGGCTTTGTCACCCGCTCG-ATTAG
A. versicolor (410) CGGCGGCACCGTGTTC-CGGT-CCTCGAGCGTA-TGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTAG
F. oxysporum (395) TGGCGGT--CACGTCgAGCT-TCCATAGCGTA-----GTAGTAAAACCTCG--TTAC
S. apiospermum (449) TGGCGGTCCC GCCG-CGGTgCCTTCTGCGTAgTAAGTCTCTTTTGAAGCTCGCATTTGG

```

```

.....+. .++...+ .. ... . .+++.+ .....+... .....+++++++
A. flavus (495) GCCC GGCCGG-CGCTTGC-C---GAaCGCAAATCAATCTTTTT--CCAGGTTGACCTCGG
A. glaucus (454) GTCCAGCTGGCAGCTAGC-----CT--CGCAACCAATCTTTTTTAACAGGTTGACCTCGG
A. nidulans (463) GGCCGGCCGGGCGCCAGC-CGGCGT-CTCCAACC-TTATTTTT-CTCAGGTTGACCTCGG
A. versicolor (467) GGCCGGCCGGGCGCCAGC-CGACGT---CCAACC-ATTTTTCT--TCAGGTTGACCTCGG
F. oxysporum (443) TGGTAATCGT-CGCGGCCaCGCCGT---TAAACCCCACTTCT--GAATGTTGACCTCGG
S. apiospermum (508) GTCCC GGCCGGAGGCTGC-----CGT---CAAACCTATAACTTCAGATGGTTTACCTCGG

```

```

+++++++...+++++++
A. flavus (548) ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
A. glaucus (507) ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
A. nidulans (519) ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
A. versicolor (520) ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
F. oxysporum (497) ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
S. apiospermum (561) ATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

```


M. circinelloides(446) ..+. ...+ +..+ + ++. + .+. +. . . +. . .
 GAT--CTATTCTGAT-----CTCGA-----ACCTCTT-GAAATGT-----ACA--A
R. microsporus (497) -ATACCGATTGTC-T-----AAAATA----CAGCCTCTTTGTAATTTTCATTAAA---
A. corymbifera (514) --TAGTTGCTGTCATgGCCTTAAATCAAtgTCCTAGGTGTTAG-AACATCTAACACCgga
Rh. pusillus (417) GAT--GGATTTTCAT-CCGTTCAAGCTA--CCCGAACAAATTTG-TATGTTGTTGACC---

M. circinelloides(482)++.+. . . + +++. . . .+.+.
 AGG---CCTGAT-CTTGTGTTGAATG---CCTGAACTTTTTTTTAA-----TATAAAGAGA
R. microsporus (541) -----TTACGAACTACCT-AGCC-ATCGTGCTTTTTTGGTCCA-----ACCA-A
A. corymbifera (571) TGGaaaCTTTAGAGCGCTTTAAGAGcAGCTTGGTTAGTGAGTTCAataATTCCAAGCATT
Rh. pusillus (468) -----CTTGATATTTCTTGAGGG---CTTGCATTGGTATCTAA---TTTTTTACCAGT

M. circinelloides(530)+.+.+.+.+.+. . . .+.+.
 AGCTCTTGCGGTAAACT----GTGCTG-----GGCCTCC-----CAAAT---AATAC
R. microsporus (582) AAAACAT---ATAATCTAGGGGTCTG-CTA---GCCAGC-----AGATATTTAATGA
A. corymbifera (631) AAGTCTTTAATGAACTAGCTTTTCTAtCTATGGGACACTacttggAGAAATCCAAGTAA
Rh. pusillus (516) GTGCTTCGAGATGATCAAG-----TA--TAAAGGTCAAT-----CAACCACAAATAA

M. circinelloides(571) ..+++ ...+ ++++++++ +.+ .+.+.+++++
 TCTTT----TTA-AATTTGATCTGAAATCAGGCGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATAT
R. microsporus (629) TCTTT-AACT-----ATGATCTGAAGTCAAGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAT
A. corymbifera (691) CCTTTAAACTCAcATTTAGATCTGAAATCAACTGAGACCACCCGCTGAACTTAAGCATAT
Rh. pusillus (561) -ATTTCAACT-----ATGGATCTGAACTTAGATGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATAT

++++++
M. circinelloides (626) CAATAAGCGGAGGA
R. microsporus (682) CAATAAGCGGAGGA
A. corymbifera (751) CAATAAGCGGAGGA
Rh. pusillus (615) CAATAAGCGGAGGA

Bibliographie

Bibliographie

1. Adam O, Auperin A, Wilquin F, et al.

Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results for patients with haematological malignancies.
Clinical Infectious Diseases, 2004, 38, 917–20.

2. Alexander BD, Pfaller MA.

Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses.
Clinical Infectious Diseases, 2006, 43, S15–27.

3. Al-Samarrai TH, Schmid J.

A simple method for extraction of fungal genomic DNA.
Letters in Applied Microbiology, 2000, 30, 53–56.

4. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al.

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Research, 1997, 25(17), 3389–3402.

5. ANAES.

Prévention du risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés (Hématologie, Transplantation).
Conférence de consensus, 2000.

6. ANOFEL (Association française des enseignants de parasitologie et mycologie médicales).

Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales.
ABREGES connaissances et pratique, Editions Masson, 2007, 230–240.

7. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, et al.

Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus.
Clinical Infectious Diseases, 2002, 34, 7–14.

8. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, et al.

Invasive Mold Infections in Allogeneic Bone Marrow Transplant Recipients.
Clinical Infectious Diseases, 2001, 32, 1319–24.

9. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y.

Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates.
Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34, 454–6.

10. Borlenghi E, Cattaneo C, Capucci MA, et al.

Usefulness of the MSG/IFICG/EORTC diagnostic criteria of invasive pulmonary aspergillosis in the clinical management of patients with acute leukaemia developing pulmonary infiltrates.
Annals of Hematology, 2007, 86, 205–10.

11. Boutati E, Anaissie E.

Fusarium, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management.
Blood, 1997, 90, 999–1008.

12. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, et al.

Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33, 1164–1168.

13. Bross J, Talbot GH, Maislin G, et al.

Risk factors for nosocomial candidemia : a case-control study in adults without leukemia.
American Journal of Medicine, 1989, 87, 614–620.

14. Bruns TD, Shefferson RP.

Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions.
Canadian Journal of Botany, 2004, 82(8), 1122–1132.

15. Burnie JP, Odds FC, Lee W, et al.

Outbreak of systemic *Candida albicans* in intensive care unit caused by cross infection.
British Medical Journal, 1985, 290, 746–748.

16. Caligiorne RB, Licinio P, Dupont J, et al.

Internal Transcribed Spacer rRNA Gene-Based Phylogenetic Reconstruction Using Algorithms with Local and Global Sequence Alignment for Black Yeasts and Their Relatives.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(6), 2816–2823.

17. CCLIN Sud-Ouest.

Surveillance des infections en Réanimation. Site disponible sur :
http://www.cclin-sudouest.com/pages/surv_rea.html. (Page consultée le 04/08/2008)

18. Chemaly RF, Procop GW.

Molecular detection and characterization of fungal pathogens.
In: Persing DH, Tenover FC, Vesolovic J, Molecular microbiology. American Society for Microbiology, 2004, 551–60, Washington, DC.

19. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, et al.

Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes.
Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38, 2302–10.

20. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, et al.

Polymorphic Internal Transcribed Spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts.
Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39, 4042–4051.

-
- 21. Ciardo DE, Schär G, Böttger EC, et al.**
Internal Transcribed Spacer Sequencing versus Biochemical Profiling for Identification of Medically Important Yeasts.
Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44, 77–84.
- 22. Cordonnier C, Ribaud P, Herbrecht R, et al.**
Prognostic Factors for Death Due to Invasive Aspergillosis after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A 1-Year Retrospective Study of Consecutive Patients at French Transplantation Centers.
Clinical Infectious Diseases, 2006, 42, 955–63.
- 23. Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, et al.**
Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial).
Clinical Infectious Diseases, 2007, 44, 1289–97.
- 24. De Aguirre L, Hurst SF, Choi JS, et al.**
Rapid Differentiation of *Aspergillus* Species from Other Medically Important Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay.
Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42, 3495–3504.
- 25. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al.**
Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group.
Clinical Infectious Diseases, 2008, 46, 1813–21.
- 26. Develoux M, Bretagne S.**
Candidoses et levures diverses.
EMC-Maladies infectieuses, 2005, 26, 1–21.
- 27. Dictar MO, Maiolo E, Alexander B, et al.**
Mycoses in the transplanted patient.
Medical Mycology, 2000, 38(S1), 251–8.
- 28. Duthie R, Denning DW.**
Aspergillus fungemia: report of 2 cases and review.
Clinical Infectious Diseases, 1995, 20, 598–605.
- 29. Einsele H, Hebart H, Roller G et al.**
Detection and Identification of Fungal Pathogens in Blood by Using Molecular Probes.
Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35, 1353–60.
- 30. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, et al.**
Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes.
Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36, 3260–3265.

-
- 31. Ferrer C, Colom F, Frasés S, et al.**
Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections.
Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39, 2873–79.
- 32. Francesconi A, Kasai M, Harrington SM, et al.**
Automated and Manual Methods of DNA Extraction for *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* Analyzed by Quantitative Real-Time PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46, 1978–1984.
- 33. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, et al.**
Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality.
Clinical Infectious Diseases, 1992, 15, 414–421.
- 34. Fredricks DN, Smith C, Meier A.**
Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(10), 5122–5128.
- 35. Freydiere AM, Perry JD, Daure O.**
Routine use of a commercial test, GLABRATA RTT, for rapid identification of *Candida glabrata* in six laboratories.
Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42, 4870–2.
- 36. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, et al.**
Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign.
Clinical Infectious Diseases, 2007, 44, 373–9.
- 37. Griffin DW, Kellogg CA, Peak KK. et al.**
A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi.
Letters in Applied Microbiology, 2002, 34, 210–214.
- 38. Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, et al.**
Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR
Journal of Medical Microbiology, 2006, 55, 1187–1191.
- 39. Guarro J, Gene J.**
Opportunistic fusarial infections in humans.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1995, 14, 741–54.
- 40. Hageage GJ, Harrington BJ.**
Use of calcofluor white in clinical mycology.
Laboratory Medicine, 1984, 5, 109–11.
- 41. Hall L, Wohlfiel S, Roberts GD.**
Experience with the Micro Seq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41, 5099–102.

42. Hall L, Wohlfiel S, Roberts GD.

Experience with the Micro Seq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory.
Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42, 622–6.

43. Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, et al.

Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA.
Journal of Medical and Veterinary Mycology, 1995, 33, 319–325.

44. Hendolin PH, Lars P, Koukila-Kahkola P, et al.

Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens.
Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38, 4186–4192.

45. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al.

Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis.
New England Journal of Medicine, 2002, 347, 408–15.

46. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, et al.

Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43, 2092–2103.

47. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW.

Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis.
Lancet Infectious Diseases, 2005, 5, 609–22.

48. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW.

The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp.
Medical Mycology, 2005, 43(Suppl 1), S207–38.

49. Horvath JA, Dummer S.

The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis.
American Journals of Medicine, 1996, 100, 171–8.

50. Hsiao CR, Huang L, Bouchara JP, et al.

Identification of medically important molds by an oligonucleotide array.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43, 3760–3768.

51. Ikemura K, Ikegami K, Shimazu T, et al.

Falsepositive result in *Limulus* test caused by *Limulus* amoebocyte lysate-reactive material in immunoglobulin products.
Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27, 1965–8.

52. Isenberg DD, Tucci V, Cintron F, et al.

Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary bypass surgery.
Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27, 2426–2428.

53. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME.

Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens.

Medical Mycology, 2002, 40, 87–109.

54. Jaeger EEM, Carrol NM, Choudhury S, et al.

Rapid Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* Species in Ocular Samples Using Nested PCR.

Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38, 2902–8.

55. Jojima H.

Early diagnosis and treatment of pulmonary opportunistic infection by using polymerase chain reaction and beta-glucan in patients with hematological neoplasms.

Kurume Medical Journal, 2001, 48, 117–27.

56. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, et al.

Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples.

Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61, 3849–3855.

57. Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ, et al.

PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary *Aspergillus* infection in neutropenic patients.

Journal of Clinical Pathology, 1998, 51, 652–656.

58. Kato A, Takita T, Furuhashi M.

Elevation of blood (1→3)-beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients.

Nephron, 2001, 89, 15–9.

59. Kaufman L.

Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses.

Clinical Infectious Diseases, 1992, 14(S1), S23–9.

60. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y.

Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzymelinked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-β-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders.

Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42, 2733–41.

61. Kontoyiannis DP, Wessel VC, Bodey GP, et al.

Zygomycosis in the 1990s in a Tertiary-Care Cancer Center.

Clinical Infectious Diseases, 2000, 30, 851–6.

62. Kumar M, Shukla PK.

Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis.

Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43, 662–668.

-
- 63. Kwak EJ, Husain S, Obman A.**
Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients.
Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42, 435–8.
- 64. Latge JP.**
Aspergillus fumigatus and aspergillosis.
Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12, 310–50.
- 65. Lau A, Chen S, Sorrell T, et al.**
Development and Clinical Application of a Panfungal PCR Assay To Detect and Identify Fungal DNA in Tissue Specimens.
Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(2), 380–385.
- 66. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, et al.**
Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions.
Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44, 693–699.
- 67. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, et al.**
Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43, 4943–4953.
- 68. Li HS, Bouchara JP, Hsu MML, et al.**
Identification of Dermatophytes by an Oligonucleotide Array.
Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45, 3160–66.
- 69. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM.**
Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature.
Clinical Infectious Diseases, 2001, 32, 358–66.
- 70. Loeffler J, Hebart H, Bialek R, et al.**
Contaminations Occurring in Fungal PCR Assays.
Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(4), 1200–1202.
- 71. Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, et al.**
Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood.
Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35, 3311–3312.
- 72. Loeffler J, Hebart H, Sepe S, et al.**
Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system.
Medical Mycology, 1998, 36, 275–279.
- 73. Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, et al.**
Automated Extraction of Genomic DNA from Medically Important Yeast Species and Filamentous Fungi by Using the MagNA Pure LC System.
Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(6), 2240–2243.

74. Lortholary O, Charlemagne A, Bastides F, et al.

A multicentre pharmacoepidemiological study of therapeutic practices in invasive fungal infections in France during 1998–1999.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 54, 456–464.

75. Luo G, Mitchell TG.

Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR.

Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40, 2860–2865.

76. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, et al.

Rapid Detection of *Candida albicans* in Clinical Blood Samples by Using a TaqMan-Based PCR Assay.

Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41, 3293–98.

77. Machouard M.

Apport de la PCR-RFLP à l'identification des principaux dermatophytes.

Mémoire de DEA, Paris, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, UFR Lariboisière Saint-Louis-Université Paris 7, 1999, 48 p.

78. Machouard M, Larché J, Burton K, et al.

Genetic Identification of the Main Opportunistic Mucorales by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism.

Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44, 805–10.

79. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, et al.

False-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results.

Clinical Infectious Diseases, 2004, 39, 289–90.

80. Magadia R, Weinstein MP.

Laboratory diagnosis of bacteremia and fungemia.

Infectious Disease Clinics of North America, 2001, 15, 1009–24.

81. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L.

Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance.

Journal of Infectious Diseases, 2004, 190, 641–9.

82. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, et al.

Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors.

Blood, 2002, 100, 4358–66.

83. Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al.

Epidemiology and Outcome of Mould Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients.

Clinical Infectious Diseases, 2002, 34, 909–17.

84. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A.

Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay.

Clinical Infectious Diseases, 2005, 40, 1762–9.

85. Marr K, Seidel K, Slavin M, et al.

Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial.

Blood, 2000, 96, 2055–61.

86. Marr KA, Seidel K, White TC, et al.

Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole.

Journal of Infectious Diseases, 2000, 181, 309–16.

87. Martin C, Roberts D, Van Der Weide M, et al.

Development of a PCR-Based Line Probe Assay for Identification of Fungal Pathogens.

Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38, 3735–42.

88. Martino P, Girmenia C, Venditti M, et al.

Candida colonization and systemic infection in neutropenic patients. A retrospective study.

Cancer, 1989, 64, 2030–2034.

89. Martino R, Subira M, Rovira M, et al.

Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients.

British Journal of Haematology, 2002, 116, 475–82.

90. Mattei D, Rapezzi D, Mordini N.

False-positive *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment.

Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42, 5362–3.

91. Melchers WJ, Verweij PE, van den Hurk P, et al.

General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species.

Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32, 1710–1717.

92. Mennink-Kersten MASH, Donnelly JP, et al.

Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis.

Lancet Infectious Diseases, 2004, 4, 349–57.

93. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, et al.

Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection.

Lancet, 2004, 363, 325–7.

94. Merz WG, Roberts GD.

Algorithms for detection and identification of fungi.

In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, *Manual of clinical microbiology*, 2003, 1668–85, Washington DC: American Society for Microbiology.

95. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K.

Plasma (1→3)- β -D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis.

Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33, 3115–8.

96. Moreau P.

Diagnostic et traitement précoce de l'aspergillose invasive.

Collections Infections fongiques, Paris : Alinéa + Ed. 2006, 28.

97. Müller FMC, Werner KE, Kasai M, et al.

Rapid Extraction of Genomic DNA from Medically Important Yeasts and Filamentous Fungi by High-Speed Cell Disruption.

Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(6), 1625–1629.

98. Musa MO, Al Eisa A, Halim M et al.

The spectrum of *Fusarium* infection in immunocompromised patients with hematological malignancies and in non-immunocompromised patients. A single institution experience over 10 years.

British Journal of Haematology, 2000, 108, 544–8.

99. Musher B, Fredricks D, Leisenring W.

Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid.

Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42, 5517–22.

100. Nakao A, Yasui M, Kawagoe T, et al.

Falsepositive endotoxemia derives from gauze glucan after hepatectomy for hepatocellular carcinoma with cirrhosis.

Hepatology, 1997, 44, 1413–8.

101. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ.

Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species.

Clinical Microbiology Reviews, 1994, 7, 479–504.

102. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E.

β -D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome.

Clinical Infectious Diseases, 2004, 39, 199–205.

103. Odds FC, Bernaerts R.

CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species.

Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32, 1923–9.

-
- 104. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH.**
Multicenter clinical evaluation of the (1→3) β-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans.
Clinical Infectious Diseases, 2005, 41, 654–9.
- 105. O’Sullivan CE, Kasai M, Francesconi A, et al.**
Development and Validation of a Quantitative Real-Time PCR Assay Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology for Detection of *Aspergillus fumigatus* in Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41, 5676–82.
- 106. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, et al.**
Invasive aspergillosis : disease spectrum, treatment practices, and outcomes.
I3 Aspergillus Study Group. Medicine (Baltimore), 2000, 79, 250–60.
- 107. Patterson DL, Singh N.**
Invasive aspergillosis in transplant recipients.
Medicine, 1999, 78, 123–38.
- 108. Pazos C, Ponton J, del Palacio A.**
Contribution of (1→3)-β-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43, 299–305.
- 109. Perfect JR, Cox GM, Lee JY.**
The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis.
Clinical Infectious Diseases, 2001, 33, 1824–33.
- 110. Perfect J, Schell W.**
The new fungal opportunists are coming.
Clinical Infectious Diseases, 1996, 22, S112–8.
- 111. Persat F, Ranque S, Derouin F, et al.**
Contribution of the (1→3)-β-D-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections.
Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46, 1009–1013.
- 112. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi M.**
Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of the worldwide susceptibility of yeasts to fluconazole and voriconazole using standardized disk diffusion testing.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43, 5848–59.
- 113. Platelia aspergillus EIA [package insert].**
Bio-Rad Laboratories, 2003, Redmond, WA.

-
- 114. Playford EG, Kong F, Sun Y, et al.**
Simultaneous Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* Species by Reverse Line Blot Hybridization.
Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44, 876–80.
- 115. Pittet D.**
Candidémie et candidose généralisée.
Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Anesthésie-Réanimation, 36-983-D-10, 2000, 13 p.
- 116. Poulain D.**
Physiopathologie et diagnostic des candidoses. De la colonisation à l'infection.
In : les candidoses systémiques. Paris, Optimed Ed. 2001, 29–40.
- 117. Pounder JI, Simmon KE, Barton CA, et al.**
Discovering Potential Pathogens among Fungi Identified as Nonsporulating Molds.
Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45, 568–571.
- 118. Prariyachatigul C, Chaiprasert A, Meevootisom V, et al.**
Assessment of a PCR technique for the detection and identification of *Cryptococcus neoformans*.
Journal of Medical and Veterinary Mycology, 1996, 34, 251–258.
- 119. Rakeman JL, Bui U, LaFe K, et al.**
Multilocus DNA Sequence Comparisons Rapidly Identify Pathogenic Molds.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43, 3324–3333.
- 120. Rappelli P, Are R, Casu G, et al.**
Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid.
Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36, 3438–3440.
- 121. Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, et al.**
Evidence of nosocomial spread of *Candida albicans* causing bloodstream infection in a neonatal intensive care unit.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1995, 21, 191–194.
- 122. Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, et al.**
Disseminated Phaeohyphomycosis: Review of an Emerging Mycosis.
Clinical Infectious Diseases, 2002, 34, 467–76.
- 123. Ribaud P, Chastang C, Latge JP, et al.**
Survival and Prognostic Factors of Invasive Aspergillosis After Allogeneic Bone Marrow Transplantation.
Clinical Infectious Diseases, 1999, 28, 322–30.
- 124. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ.**
Zygomycetes in Human Disease.
Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13(2), 236–301.

-
- 125. Richet HM, Andreumont A, Tancrede C, et al.**
Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocytic leukemia.
Reviews of Infectious Diseases, 1991, 13, 211-215.
- 126. Richet H, Roux P, Des Champs C, et al.**
Candidemia in French hospitals : incidence rates and characteristics.
Clinical Microbiology and Infection, 2002, 8, 405-12.
- 127. Rigby S, Procop GW, Haase G.**
Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles.
Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40, 2182-6.
- 128. Rimek D, Singh J, Kappe R.**
Cross-reactivity of the Platelia Candida antigen detection enzyme immunoassay with fungal antigen extracts.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41, 3395-8.
- 129. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, et al.**
Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases.
Clinical Infectious Diseases, 2005, 41, 634-53.
- 130. Rosetti F, Brawner DL, Bowden R, et al.**
Fungal liver infection in marrow transplant recipients : prevalence at autopsy, predisposing factors, and clinical features.
Clinical Infectious Diseases, 1995, 20, 801-11.
- 131. Rossmann S, Cernoch P, Davis J.**
Dematiaceous fungi are an increasing cause of human disease.
Clinical Infectious Diseases, 1996, 22, 73-80.
- 132. Sampathkumar P, Paya CV.**
Fusarium infection after solid organ transplantation.
Clinical Infectious Diseases, 2001, 15, 1237-40.
- 133. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, et al.**
Molecular Probes for Diagnosis of Fungal Infections.
Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33, 2913-19.
- 134. Schwarz P, Bretagne S, Gantier JC, et al.**
Molecular Identification of Zygomycetes from Culture and Experimentally Infected Tissues.
Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44, 340-9.
- 135. Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, et al.**
Rapid Identification of Commonly Encountered *Candida* Species Directly from Blood Culture Bottles.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41, 5660-64.

136. Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B, et al.

Contribution of the Platelia Candida-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults.

Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41, 4551–8.

137. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, et al.

New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis.

Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37, 1510–7.

138. Singh N, Husain S.

Aspergillus infections after lungs transplantation: clinical differences in type of transplant and implications for management.

Journal of Heart and Lung Transplantation, 2003, 22, 258–66.

139. Singh N, Paterson DL.

Aspergillus infections in transplant recipients.

Clinical Microbiology Reviews, 2005, 18, 44–69.

140. Smit E, Leeflang P, Glandorf B, et al.

Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis.

Applied Environmental Microbiology, 1999, 65, 2614–2621.

141. Solomkin JS, Flohr AB, Quie PG, et al.

The role of *Candida* in intraperitoneal infections.

Surgery, 1980, 88, 524–530.

142. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, et al.

Detection of *Aspergillus fumigatus* by Polymerase Chain Reaction.

Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31, 615–21.

143. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P.

Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study.

Cancer, 2001, 91, 311–8.

144. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P.

False-positive test for *Aspergillus* antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam.

New England Journal of Medicine, 2003, 349, 2366–7.

145. Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, et al.

In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole.

Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37, 2343–5.

146. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al.

The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.

Nucleic Acids Research, 1997, 25(24), 4876–4882.

147. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.

CLUSTAL W: improving the sensitivity of multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.

Nucleic Acids Research, 1994, 22(22), 4673–4680.

148. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, et al.

Epidemiology of candidaemia in Europe : results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study.

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2004, 23, 317–22.

149. Velegraki A, Kambouris M, Kostourou A, et al.

Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification.

Medical Mycology, 1999, 37, 69–73.

150. Vilchez RA, Fung J, Kusne S.

Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview.

American Journal of Transplantation, 2002, 2, 575–80.

151. Vincent JL, Anaissie E, Bruining H, et al.

Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care.

Intensive Care Medicine, 1998, 24, 206–216.

152. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, et al.

Candidemia in Cancer Patients: A Prospective, Multicenter Surveillance Study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).

Clinical Infectious Diseases, 1999, 28, 1071–9.

153. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P.

False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam.

Clinical Infectious Diseases, 2004, 38, 913–6.

154. Vollmer T, Störmer M, Kleesiek K, et al.

Evaluation of Novel Broad-Range Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Human Pathogenic Fungi in Various Clinical Specimens.

Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46, 1919–26.

155. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, et al.

Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation.

Journal of Infectious Diseases, 1997, 175, 1459–66.

156. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, et al.

Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens.
Clinical Microbiology and Infection, 2004, 10(S1), 48–66.

157. Walsh TJ, Peter J, McGough DA, et al.

Activities of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudoallescheria boydii*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 39, 1361–64.

158. Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, et al.

Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2002, 43, 29–37.

159. White TJ, Burns T, Lee S, et al.

Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.
In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications*, 1990, 315–322, Academic Press Inc., San Diego, CA.

160. Williamson EC, Leeming JP, Palmer HM, et al.

Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction.
British Journal of Haematology, 2000, 108, 132–139.

161. Willinger B, Obradovic A, Selitsch B, et al.

Detection and Identification of Fungi from Fungus Balls of the Maxillary Sinus by Molecular Techniques.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41, 581–85.

162. Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS.

Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43, 2909–12.

163. Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E, et al.

Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis.
Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36, 3619–3623.

164. Yeo SF, Wong B.

Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections.
Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15, 465–484.

165. Yera H, Sendid B, François N, et al.

Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2001, 20, 864–70.

166. Yoshida M, Obayashi T, Iwama A.

Detection of plasma (1→3)-β-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias.

Journal of Medical and Veterinary Mycology, 1997, 35, 371–4.

167. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A.

Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: results from a three-year prospective study.

American Journal of Medicine, 1986, 81, 249–54.

Liste des tableaux

<u>Tableau 1.</u> Facteurs de risques prédisposant aux infections à levures du genre <i>Candida</i> , d'après Pittet, <i>Encyclopédie Médico-Chirurgicale</i> [115].....	page 17
<u>Tableau 2.</u> Critères pour les infections invasives prouvées à l'exception des mycoses endémiques (traduit et adapté de [25]).....	page 30
<u>Tableau 3.</u> Critères pour les infections fongiques invasives probables à l'exception des mycoses endémiques (traduit et adapté de [25]).....	pages 31 et 32
<u>Tableau 4.</u> Souches fongiques utilisées pour la mise au point des techniques de PCR...	page 59
<u>Tableau 5.</u> Prélèvements biologiques.....	page 61
<u>Tableau 6.</u> Amorces utilisées dans les 3 techniques de PCR.....	page 66
<u>Tableau 7.</u> Résultats d'identification des champignons à partir de la PCR <i>fumigatus</i> et du séquençage de la PCR ITS1 et ITS1+2 sur des cultures identifiées macroscopiquement et microscopiquement au laboratoire de mycologie du CHU Limoges.....	pages 75 et 76
<u>Tableau 8.</u> Résultats de l'examen direct, de la culture et de la biologie moléculaire sur les prélèvements biologiques.....	pages 78 et 79
<u>Tableau 9.</u> Résultats de chaque technique prise isolément et associée.....	page 81

Liste des figures

- Figure 1. Formes levures et pseudofilaments après coloration de Gomori-Grocott (d'après le Cédérom ANOFEL 3).....**page 35**
- Figure 2. Filaments d'hyphomycètes après coloration de Gomori-Grocott dans un LBA (d'après le Cédérom ANOFEL 3).....**page 35**
- Figure 3. Filaments de type mucorale après coloration de Gomori-Grocott (d'après le Cédérom ANOFEL 3).....**page 36**
- Figure 4. Envahissement et destruction de la paroi d'une artère cérébrale par des filaments d'*Arthrographis kalrae* après coloration de Gomori-Grocott d'une coupe de cerveau prélevé en post mortem (Collection personnelle, Dr D. Ajzenberg, service de Mycologie, CHU de Limoges, France).....**page 37**
- Figure 5. Evolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des 4 premiers cycles de la PCR (D'après *Wikipedia*, PCR basic principe).....**page 48**
- Figure 6. Principe de la PCR. Produits formés au cours d'un cycle.....**page 48**
- Figure 7. Mécanisme de polymérisation de l'ADN. (D'après *Wikipedia*, DNAPol).....**page 49**
- Figure 8. Structure du dATP (haut) et du ddATP (bas). (D'après *Wikipedia*, DdATP)..**page 52**
- Figure 9. Résultat du séquençage par la méthode de Sanger (traceur radioactif, D'après *Wikipedia*, Sequencing).....**page 52**
- Figure 10. Résultats donnés par un séquenceur automatique (Régions ITS1-5,8S-ITS2 d'*Absidia corymbifera*, données personnelles).....**page 53**
- Figure 11. Tube de 2 ml Lysing Matrix C[®] (MP Biomedicals, Illkirch, France).....**page 63**
- Figure 12. Fast Prep[®] FP120A (MP Biomedicals, Illkirch, France).....**page 64**
- Figure 13. Localisation des régions ITS1 et ITS2 et des couples d'amorces utilisées dans les 3 techniques de PCR.....**page 66**

Table des matières

Plan	9
Abréviations	10
Introduction	11
Généralités	13
1. Les infections fongiques invasives.....	14
1.1. Epidémiologie.....	14
1.1.1. Candidoses.....	14
1.1.1.1. Facteurs de risque.....	14
1.1.1.1.1. Facteurs généraux.....	15
1.1.1.1.2. Facteurs spécifiques.....	15
1.1.1.2. Agents responsables et incidence.....	18
1.1.1.3. Pronostic.....	18
1.1.2. Aspergilloses.....	19
1.1.2.1. Facteurs de risque.....	19
1.1.2.1.1. Hématologie clinique.....	19
1.1.2.1.2. Transplantation d'organe.....	21
1.1.2.2. Agents responsables et incidence.....	22
1.1.2.3. Pronostic.....	23
1.1.2.3.1. Hématologie clinique.....	23
1.1.2.3.2. Transplantation d'organe.....	23
1.1.3. Mycoses émergentes.....	24
1.1.3.1. Mucormycoses.....	24
1.1.3.2. Fusarioses.....	25
1.1.3.3. Scédosporioses.....	27
1.2. Critères diagnostiques.....	28
2. Diagnostic en Mycologie Médicale.....	33
2.1. Méthodes conventionnelles.....	34
2.1.1. Examen direct.....	34
2.1.2. Méthodes histopathologiques.....	36
2.1.3. Culture.....	38
2.1.3.1. Isolement.....	38
2.1.3.2. Identification.....	39
2.1.3.2.1. Levures.....	39
2.1.3.2.2. Filamenteux.....	40
2.1.4. Sérologie.....	42
2.1.4.1. Galactomannane.....	42
2.1.4.2. β -D-glucane.....	43
2.1.4.3. Mannane.....	44
2.2. Biologie moléculaire.....	46
2.2.1. Principes.....	46
2.2.1.1. Extraction d'ADN.....	46
2.2.1.2. PCR classique dite en point final.....	46
2.2.1.3. Séquençage.....	49
2.2.1.3.1. Historique.....	49

2.2.1.3.2. Méthode de Sanger.....	50
2.2.2. Cibles utilisées dans le diagnostic fongique.....	54
2.2.3. Identification de souches.....	55
2.2.4. Prélèvements biologiques.....	55
Matériels et méthodes.....	57
1. Souches.....	58
2. Prélèvements biologiques.....	60
3. Extraction de l'ADN.....	62
3.1. Cultures.....	62
3.2. Liquides biologiques.....	62
3.3. Biopsies tissulaires.....	63
4. Choix des amorces.....	65
5. PCR.....	67
6. Séquençage.....	69
6.1. Purification des produits de PCR.....	69
6.2. Réaction de séquençage.....	69
6.3. Précipitation à l'isopropanol.....	70
6.4. Electrophorèse capillaire.....	70
6.5. Analyse des séquences.....	70
7. Application pratique.....	71
Résultats.....	72
1. Souches.....	73
1.1. Levures.....	73
1.2. <i>Aspergillus</i>	73
1.3. Mucorales.....	74
1.4. Autres filamenteux.....	74
2. Prélèvements biologiques.....	77
2.1. Infection fongique invasive prouvée.....	77
2.2. Infection fongique invasive probable.....	77
2.3. Synthèse.....	80
Discussion.....	82
1. Choix de la technique.....	85
2. Souches.....	86
3. Prélèvements biologiques.....	87
4. Perspectives.....	89
Conclusion.....	91
Annexes.....	93
Bibliographie.....	101
Liste des tableaux.....	119
Liste des figures.....	120

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me perjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 3122

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Résumé

L'incidence des infections fongiques invasives est en constante augmentation avec l'émergence d'espèces de plus en plus variées. Une identification rapide et précise de l'agent pathogène est essentielle pour la mise en place d'une thérapeutique adaptée. Nous avons développé deux techniques de PCR panfongique avec séquençage des régions ITS1 ou ITS1-5,8S-ITS2 et une technique de PCR spécifique *Aspergillus fumigatus*. Ces techniques ont été réalisées sur 34 souches fongiques issues de notre laboratoire et sur 35 prélèvements biologiques congelés issus de 12 patients avec une infection fongique invasive prouvée ou probable. Les séquences ont été comparées à la base de données Genbank. Les techniques de biologie moléculaire ont pu identifier un pathogène fongique dans 77% des prélèvements biologiques en corrélation avec l'examen direct microscopique et/ou la culture. De plus, l'identification précise de genre et d'espèce a été possible dans 14 cas avec identification incomplète ou impossible par les méthodes conventionnelles de diagnostic. Ces résultats corroborent l'intérêt de la biologie moléculaire en combinaison avec l'examen direct microscopique et la culture dans le diagnostic des infections fongiques invasives.

Summary

PCR in the diagnosis of invasive fungal infections.

The incidence of invasive fungal infections is increasing in immunocompromised patients. A quick and accurate identification of the pathogen is essential to initiate specific therapy as soon as possible. We have developed two panfungal PCR assays followed by sequencing of the ITS1 or ITS1-5,8S-ITS2 regions and one specific PCR assay for *Aspergillus fumigatus*. These techniques were tested in 34 fungal strains cultured in our laboratory and in 35 frozen biological samples from 12 patients with a proven or probable invasive fungal infection. The obtained sequences were compared to the Genbank database. The molecular biology assays identified a fungal pathogen in 77% of biological samples and were correlated to direct microscopic examination and/or culture. Moreover, these techniques allowed an accurate identification of the genus and the species in 14 cases in which identification was impossible or incomplete by conventional methods of diagnosis. These results corroborate the interest of molecular biology in combination with direct examination and culture in the diagnosis of invasive fungal infections.

DISCIPLINE : Médecine.

SPECIALITE : Biologie médicale.

MOTS-CLES : Infection fongique invasive, diagnostic, biologie moléculaire, *Internal Transcribed Spacer*, PCR panfongique, PCR *Aspergillus fumigatus*.

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

CHRU Dupuytren / Faculté de Médecine

2 avenue Martin Luther King

87 042 Limoges cedex