

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

People's Democratic Republic of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Université Saad Dahleb Blida



Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département B.P.O

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de
Master en Sciences Biologiques
Spécialité : Parasitologie

Thème

Diagnostic des mycoses profondes à l'hôpital de Ain naâdja

Présenté par :

Melle CHOUAKRI yasmine

Devant le jury composé de :

Mme. Boulkour S. (M.C.B)	Université de Bida	Président
Mme. Kara F/Z. (Professeur)	Université de Blida	Encadreur
Mme. Adjmi H. (Professeur)	Hôpital central de l'armée Ain naâdja	Co-Encadreur
Mme. Makhlof C. (M.A.A)	Université de Blida	Examineur

Année universitaire : 2019-2020

Dédicaces

Cher et douce maman, je t'adresse mes plus profonds remerciements pour avoir fait de moi celle que je suis aujourd'hui, pour ta présence, ta bienveillance, ton amour indélébile et tes précieuses prières qui m'ont donné la force et la motivation pour réaliser ce travail dans ces circonstances et cette crise qu'a connu notre pays et le monde.

Cher et tendre papa, je te dédie ce travail afin de t'adresser mes plus sincères remerciements pour ton soutien indéfectible, ton aide incommensurable, tes efforts inestimables durant ce stage pratique et durant tout mon cursus scolaire et universitaire ainsi que ton amour inconditionnel. Tu as été un père plus que parfait et tu as fait des efforts plus que nécessaires et pour cela je t'en serai éternellement reconnaissante.

À mon frère « Sofiane », merci pour ton amour, ta présence, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé à aller de l'avant, je suis très chanceuse de t'avoir à mes côtés.

A ma merveilleuse grand-mère

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que tu n'as cessé de formuler dans tes prières. Que Dieu te préserve santé et longue vie.

A tous les membres de ma famille « tantes, oncles, cousins, et cousines ». Je vous dédie ce travail car vous avez toujours été une source de motivation.

A mes deux copines « Rym et Aya »

Merci pour ces cinq années d'amitié, d'études et de partage.

Remerciements

Je remercie tout d'abord « Allah » le tout puissant, de m'avoir donné le courage d'entamer et de finir ce mémoire dans de bonnes conditions malgré la crise sanitaire que traverse notre cher pays.

Je remercie vivement ma Co-encadreur, Pr Adjmi Hamoudi Hayat, de m'avoir encadré ce travail avec beaucoup de compétences :

Merci pour votre indéfectible disponibilité, votre rigueur scientifique et la confiance que vous m'avez accordée au cours de l'élaboration de ce mémoire ; Merci pour vos conseils éclairés. Veuillez trouver dans ces pages une infime partie de mon infime reconnaissance.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers ma Promotrice Pr Kara F/Z. pour ces précieux conseils, sa grande gentillesse, pour l'intérêt qu'elle m'a porté et pour son implication exemplaire.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail malgré les mauvaises circonstances dues au COVID-19 auxquelles nous faisons face.

Mes remerciements vont également au Directeur du HCA d'Ain Naâdja et au Professeur Adjmi d'avoir accepté ma demande de stage.

Je remercie tous les membres du laboratoire de mycologie et de parasitologie du HCA Ain naâdja, en particulier Melle Racha Boubekour, pour leurs indéfectibles disponibilités et pour les efforts consentis afin de m'assurer de meilleures conditions de travail ainsi que pour leur grande gentillesse et leur patience.

Résumé

Les candidoses sont dues à des levures ubiquitaires et opportuniste appartenant au genre *Candida*. *C. albicans* est l'espèce la plus commune, responsables de candidoses profondes. Cependant, d'autres espèces pathogènes et résistantes aux agents antifongiques habituels commencent à émerger. Ainsi, il est intéressant d'identifier correctement les isolats fongiques. L'objectif est de décrire une surveillance prospective en laboratoire des espèces de *Candida* collectées à partir de différents sites anatomiques de patients.

Notre travail a porté sur l'étude des caractéristiques de 56 patients en fonction de plusieurs paramètres notamment : l'âge, le sexe, la provenance et les principaux signes cliniques. Le diagnostic des mycoses profondes a été établi sur la base de la conclusion des interprétations des différentes méthodes utilisées : le diagnostic mycologique, le diagnostic immunologique et le diagnostic moléculaire.

Les résultats obtenus montrent que cette pathologie toucherait plus préférentiellement l'homme d'âge mur avec une moyenne d'âge de 47.07ans. Les services les plus touchés par la candidémie sont les services de pneumologie (33.33%) et d'hématologie (20.37%). Le diagnostic mycologique a donné 75% de patients positifs, et la détection combinée d'Ac et d'Ag dans le sérum a permis d'augmenter de façon considérable la sensibilité du diagnostic immunologique et nous a orientés vers une suspicion de candidose. Une évaluation de la technique moléculaire PCR pour différencier entre *C. albicans* et *C. dubliniensis* (qui ont été sensible aux antifongiques par l'antifongogramme) a montré une prédominance des *C. albicans*. Quant à l'Auxacolor, il a révélé la présence de 5 autres souches non albicans, *C. parapsilosis* (25%), *C. dubliniensis* (25%), *C. krusei* (12.5%) et *C. tropicalis* (12.5%).

La détection d'Ac et d'Ag fournit dans de nombreux cas des résultats que l'on ne saurait négliger. La PCR, encore au stade expérimental, fournit des résultats prometteurs. La variabilité de la distribution des espèces de *Candida* provenant de différents sites anatomiques souligne l'importance de l'épidémiologie locale dans la prise en charge de la maladie et la sélection des agents antifongiques.

Mots clés : mycoses profonde - diagnostic - algorithmes clinicobiologiques - antifongique.

Abstract

Candidiasis are due to ubiquitous and opportunistic yeasts belonging to the genus *Candida*. *C. albicans* is the most common species, responsible for deep candidiasis. However, other species that are pathogenic and resistant to the usual antifungal agents are beginning to emerge. Thus, it is of interest to correctly identify the fungal isolates. The aim is to describe prospective laboratory surveillance of *Candida* species collected from different anatomical sites of patients.

Our work focused on the study of the characteristics of 56 patients according to several parameters including: age, sex, origin and main clinical signs. The diagnosis of deep mycoses was established on the basis of the conclusion of the interpretations of the different methods used: mycological diagnosis, immunological diagnosis and molecular diagnosis.

The results obtained show that this pathology more preferentially affects mature men with an average age of 47.07 years. The departments most affected by candidemia are the Pulmonology (33.33%) and Hematology (20.37%) departments. The mycological diagnosis gave 75% of patients positive, and the combined detection of Ac and Ag in the serum considerably increased the sensitivity of the immunological diagnosis and directed us to a suspicion of candidiasis. An evaluation of the molecular PCR technique to differentiate between *C. albicans* and *C. dubliniensis* (which were susceptible to antifungals by the antifongigram) showed a predominance of *C. albicans*. As for Auxacolor, it revealed the presence of 5 other non-albicans strains, *C. parapsilosis* (25%), *C. dubliniensis* (25%), *C. krusei* (12.5%) and *C. tropicalis* (12.5%).

The detection of anticorp and antigens in many cases provides results that cannot be overlooked. PCR, still at the experimental stage, is providing promising results. The variability in the distribution of *Candida* species from different anatomical sites emphasizes the importance of local epidemiology in disease management and the selection of antifungal agents.

Key words: deep yeast infection - diagnosis - clinicobiological algorithms - antifungal.

ملخص

داء Candidose ناتج عن الخمائر الانتهازية المنتشرة في كل مكان والتي تنتمي إلى جنس *Candida albicans*. هي أكثر الأنواع شيوعاً المسؤولة عن داء المبيضات العميق. ومع ذلك ، بدأت الأنواع الأخرى المسببة للأمراض والمقاومة للعوامل المضادة للفطريات في الظهور. وبالتالي ، من المهم تحديد العزلات الفطرية بشكل صحيح. الهدف هو وصف المراقبة المختبرية المستقبلية لأنواع المبيضات التي تم جمعها من مواقع تشريحية مختلفة للمرضى.

ركز عملنا على دراسة خصائص 56 مريضاً وفقاً لعدة معايير منها: العمر والجنس والأصل والأعراض الرئيسية. تم تحديد تشخيص الفطريات العميقة على أساس استنتاج تفسيرات الطرق المختلفة المستخدمة: التشخيص الفطري والتشخيص المناعي والتشخيص الجزيئي.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه الحالة المرضية تؤثر بشكل أكثر على الرجال الناضجين بمتوسط عمر 47.07 سنة. الأقسام الأكثر تضرراً من Candidose هي أقسام أمراض الرئة (33.33%) وأمراض الدم (20.37%). أعطى تشخيص علم الفطريات 75% من مريضاً إيجابياً، وزاد الاكتشاف المشترك للأجسام المضادة والمستضدات في المصل بشكل كبير من حساسية التشخيص المناعي ووجهنا للاشتباه في الإصابة بـ *Candidose* ذلك ثم دمج هذه النتائج مع PCR الجزيئية. أظهر تقييم لتقنية PCR للتمييز بين *C. albicans* و *C. dubliniensis* التي كانت عرضة لمضادات الفطريات بواسطة مضادات الفطريات) غلبة *C. albicans*. أما بالنسبة Auxacolor، كشفت عن وجود 5 سلالات أخرى (*C. parapsilosis* (25%)، *C. dubliniensis* (25%)، *C. krusei* (12.5%)، *C. tropicalis* (12.5%).

يوفر اكتشاف الأجسام المضادة والمستضدات في كثير من الحالات نتائج لا يمكن إغفالها. PCR، لا يزال في المرحلة التجريبية ، يقدم نتائج واعدة. إن التباين في توزيع أنواع المبيضات من مواقع تشريحية مختلفة يؤكد أهمية علم الأوبئة المحلية في دعم الأسعار واختيار العوامل المضادة للفطريات.

الكلمات الدالة: mycoses profonde- التشخيص - الخوارزميات الإكلينيكية الحيوية - مضاد الفطريات.

Sommaire

Sommaire	v
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	vii
Liste des abréviations	viii
Introduction.....	1
Chapitre 01 Rappels bibliographiques.....	3
I. Généralité.....	4
1. Historique.....	4
2. Candida et Candidoses.....	4
2.1. L'Agent pathogène : Le genre <i>Candida</i> -----	4
2.2. Epidémiologie-----	5
2.2.1. Classification	5
2.2.2. Les principales caractéristiques morphologiques	6
2.2.3. Caractères biologiques	7
2.2.4. Caractères écologiques	8
2.2.5. Modes de contamination.....	8
2.2.6. Facteurs prédisposant à l'infection candidosique :	9
2.2. Les candidoses -----	10
2.2.1. Candidoses muqueuses	10
2.2.2. Candidoses invasives.....	11
II. Pathogénicité des Candidoses.....	11
III. Manifestations cliniques	12
Chapitre 02 Matériels et méthodes.....	13
I. Matériel.....	14
1. Matériel biologique.....	14
1.1 Les différentes répartitions des patients de l'HCA -----	14
2. Matériel de laboratoire.....	14
2.1. Verrerie et matériel consommable -----	14
2.2. Appareil de laboratoire-----	14
2.3. Milieux de culture-----	14
2.4. Produits chimiques-----	15
2.5. Colorants-----	15

2.6. Réactifs	15
II. Méthode.....	15
1. Méthodes de prélèvement mycologiques.....	15
2. Méthodes et diagnostic :	16
2.1. Le diagnostic mycologique	16
2.1.1. Examen direct après coloration au bleu Coton :	16
2.1.2. Examen direct sans coloration	19
2.2. Détermination de la sensibilité des levures aux antifongiques par Antifongigramme. 20	
3. Le diagnostic immunologique	22
3.1. Technique d'ELISA	22
3.1.1. Recherche des anticorps circulants (IgA, IgM, IgG)	22
3.1.2. Recherche des antigènes circulants	25
4. Diagnostic par biologie moléculaire	26
4.1. Technique moléculaire PCR (réaction en chaîne par polymérase)	26
Chapitre 03 Résultats et discussion	28
Conclusion	47
Bibliographie.....	49
Annexes	55

Liste des figures

Figure 1 Aspect microscopique de levures de <i>Candida albicans</i> au grossissement x40	5
Figure 2 Morphologie de <i>Candida albicans</i>	7
Figure 3 Physiopathologie des candidoses	9
Figure 4 Les étapes à suivre pour l'identification colorimétrique des levures	18
Figure 5 Evaluation du sex ratio des patients ayant servi pour les tests à l'HCA, tous services confondus	30
Figure 6 Répartition des patients selon l'âge (<35ans, >35ans) au laboratoire, à l'HCA, tous services confondus	30
Figure 7 Distribution des patients au cours d'une candidose profonde selon les différents services de l'HCA	31
Figure 8 Examen direct montrant :A) à gauche : Culture sur milieu sabouraud chloramphenicol, B) à droite : Examen à l'état frais (objectif x40)	32
Figure 9 Chlamydospores terminales de <i>C. albicans</i> sur milieu Rice cream.....	33
Figure 10 Plaque de microtitration du kit AuxaColor™ 2 après 24 à 48h d'incubation	33
Figure 11 Pourcentage de chaque espèce obtenue par AUXACOLOR	34
Figure 12 Résultats d'Antifongigramme effectué pour l'espèce <i>Candida albicans/dubliniensis</i>	35
Figure 13 Résistances des souches de <i>Candida albicans/dubliniensis</i> de notre étude aux différents antifongiques testés au laboratoire.....	35
Figure 14 Distribution des résultats Serion ELISA Anticorps (IgA, IgG, IgM).....	36
Figure 15 Distribution des résultats Serion ELISA Antigène.....	37
Figure 16 Performance des sérologies <i>Candida</i> Antigène et Anticorps en incluant ou pas les résultats intermédiaires	37
Figure 17 Visualisation des produits PCR des souches de <i>Candida</i> , montrant : a) <i>Candidaalbicans</i> , b) <i>Candida dubliniensis</i>	38
Figure 18 Répartition par espèce des résultats de PCR	39
Figure 19 Répartition par espèce des souches de <i>Candida</i> responsables de candidémie (toute techniques confondues) diagnostiqués dans le laboratoire de parasitologie-mycologie de 2020 à l'HCA	40

Liste des tableaux

Tableau 1 Les facteurs intrinsèques/extrinsèques favorisant le développement de la forme invasif des candida.	10
---	----

Liste des abréviations

C° : Degré Celsius

PCR : Réaction en chaîne polymérase

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

HCA : Hôpital central de l'armée

pH : Potentiel d'hydrogène

C : *Candida*

LCR : Liquide céphalorachidien

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

ORL : Otorhinolaryngologie

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

ADN : Acide désoxyribonucléique

dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate

BET : Bromure d'éthidium

UV : Ultraviolet

ATF : Antifongique

Introduction

Les candidoses sont des affections dues à des champignons saprophytes du genre *Candida* vivant en commensal sur les muqueuses du tube digestif ainsi que sur les muqueuses du vagin chez le sujet sain. Ces champignons sont des levures produisant un pseudo ou un vrai mycélium (Grillot, 1996).

Jusqu'aux années 80, les candidoses étaient surtout connues dans les localisations superficielles bénignes, connues des dermatologues.

La décennie qui a suivi s'est démarquée par la gravité des gastro-œsophagiennes qui ont entraîné les décès de patients, notamment ceux atteints de SIDA. Les candidoses profondes, en particulier les septicémies, sont devenues depuis, le problème majeur en terme de fréquence, de morbidité et de mortalité chez les patients immunodéprimés, les sujets neutropéniques, greffés de moelle osseuse, greffés d'organes (foie, poumons...), sidéens, atteints d'une granulomatose septique chronique... D'autres formes de candidoses invasives peuvent survenir chez des patients moins immunodéprimés, sous corticothérapie et les patients diabétiques, par exemple. Depuis 1996, le genre *Candida* dans son ensemble est assimilé à un agent émergent des infections nosocomiales hospitalières (Fridkin *et al*, 1996) à l'origine d'une mortalité classée au 4^{ème} rang des maladies infectieuses. Ce problème touche essentiellement les Unités de Soins Intensifs de tous types (pédiatrique, médicale, chirurgicale et cardiovasculaire) (Trick *et al*, 2002).

Le diagnostic clinique est restreint, dominé par une fièvre imputée, souvent à tort, à une bactérie que l'on traite par une antibiothérapie de plus en plus lourde faisant le lit du *Candida* qui pullule.

Le diagnostic de certitude des Candidoses invasives nécessite souvent des prélèvements profonds et invasifs (Pihet *et al*, 2013), tels que les biopsies, qui ne sont pas toujours possibles chez les patients fragilisés. Les hémocultures constituent le « gold standard ». Même si une seule hémoculture positive suffit à poser le diagnostic, cet examen manque encore de sensibilité pour ce type d'infection (seulement 50 à 75 %) (Cuenca-Estrella *et al*, 2012), en dépit des améliorations techniques (utilisation d'automate, milieu spécifique de culture fongique), les hémocultures demeurent négatives dans plus de 50% des candidoses invasives, dans les pays développés. De plus, toutes les Candidoses invasives ne se traduisent pas

toujours par une candidémie (péritonites, candidoses hépatospléniques) et cet épisode se manifeste souvent trop tardivement.

Par ailleurs, le délai de positivité de cet examen reste important, les hémocultures mettent en moyenne deux à trois jours avant de se positiver (Yera *et al*, 2001 ; Fernandez *et al*, 2009). Ceci a pour conséquence de retarder l'initiation du traitement, ce qui est associé à une mortalité hospitalière élevée (Garey *et al*, 2006).

Ces difficultés diagnostiques expliquent l'intérêt porté aux examens qui ne sont pas basés sur l'isolement du champignon. Ainsi l'objectif de notre travail consiste à décrire une surveillance prospective en laboratoire des espèces de *Candida* qui ont été collectées à partir de différents sites anatomiques de patients admis à l'HCA. Pour tenter d'améliorer le diagnostic des candidoses systémiques, plusieurs approches ont été proposées ces dernières années dans un but de diagnostic précoce afin de débiter rapidement un traitement antifongique :

- La détection combinée de l'Ag (Sendid *et al*, 1999) et des Ac (IgG IgM ou IgA) (Aubert *et al*, 1996).

- Plus récemment la détection d'ADN de *Candida* par amplification génique (Bougnoux *et al*, 2003), cette dernière n'est toutefois pas encore adaptée à l'activité de routine.

Notre travail s'articulera autour de trois axes principaux : dans un premier temps nous définirons clairement les objectifs de notre mémoire, puis nous procéderons à une analyse des données de notre étude, et enfin nous tenterons de discuter nos résultats.

Chapitre 01 :
Rappels bibliographiques

I. Généralité

1. Historique

Les infections à *Candida* existent probablement depuis très longtemps, puisque l'on retrouve la trace d'écrits d'Hippocrate décrivant le muguet buccal au IV^{ème} siècle avant Jésus-Christ (Chabasse *et al*, 2006). Cependant il faut attendre le début du XIX^{ème} siècle pour voir apparaître la mycologie médicale et plus précisément 1839 pour que Langenbeck décrive pour la première fois le champignon responsable du muguet chez l'Homme. Quelques années plus tard, ce champignon est nommé *Oidium albicans*, puis *Monilia albicans* à cause de son rôle dans les monilioses (Chabasse *et al*, 2006).

En 1923, Berkhout propose le nom de genre *Candida* en remplacement de celui de *Monilia*. (Odds, 1988)

En 1967 Satge et Coll interpellent quant à la gravité des septicémies à *Candida* désignant l'espèce la plus fréquemment rencontrée, *Candida albicans*.

2. *Candida* et Candidoses

2.1. L'Agent pathogène : Le genre *Candida*

Les *Candida* sont des levures saprophytes dont la forme fongique unicellulaire (Figure1) se multiplie par bourgeonnement. Une dizaine d'espèces de *Candida* est le plus fréquemment impliquée en pathologie humaine. L'espèce *C. albicans*, est incriminée dans la majorité des mycoses mais nous assistons ces dernières années à l'émergence croissante d'autres espèces opportunistes, les espèces «nonalbicans» (Pramayon, 2001) et (Belkaid *et al*, 1992).

Parmi le genre *Candida*, 54,3% des infections sont dues à l'espèce *albicans*, 16,4% à l'espèce *glabrata*, 14,9% à l'espèce *parapsilosis*, 8,2% à l'espèce *tropicalis*, et 1,6% l'espèce *krusei* (Pfalleret *al*, 1997-1998). Il faut toutefois noter que la zone géographique considérée peut fortement influencer la nature de l'espèce retrouvée. (Lagane, 2007).

Ces levures peuvent entraîner différentes pathologies superficielles et profondes. Ces dernières, de loin les plus graves, évoluent selon une fréquence constante (Dupont, 1995) malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez les patients immunodéprimés (Benedict *et al*, 1994).

2.2. Epidémiologie

C. albicans est une levure commensale des cavités naturelles, en particulier du tube digestif et des muqueuses humaines. Sa présence sur la peau est significative de son pouvoir pathogène. Cette espèce n'est normalement jamais retrouvée dans l'environnement à moins fécale d'une contamination par l'homme ou l'animal. La transmission chez le nourrisson se fait par contact maternel. *Candida albicans* est une levure principalement impliquée en pathologie humaines pour lesquelles, elle représente 70 % des levures isolées. (Coulibaly, 2003) et (Anonyme, 2014).

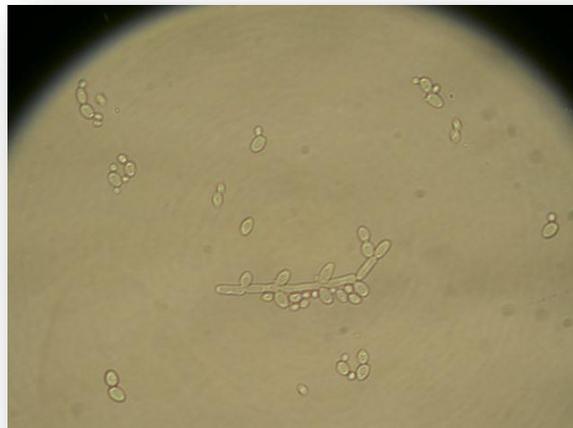


Figure 1 Aspect microscopique de levures de *Candida albicans* au grossissement x40 (Kaouech, 2003)

2.2.1. Classification

La candidose est le nom générique donné aux maladies provoquées par des levures du genre *Candida*. (Garnier *et al*, 2002)

La classification des champignons a beaucoup évolué. Celle présentée ici date de 2000 (Barnett, 2000):

Règne : Champignon

Phylum : Ascomycota

Classe : Hemiascomycètes

Ordre : Saccharomycétales

Famille : Candidaceae

Genre : *Candida*

2.2.2. Les principales caractéristiques morphologiques

Morphologiquement, elle se présente toujours comme des petites levures rondes, capable de former des mycéliums ou des pseudo-mycéliums (Pramayon, 2001) *Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Elle se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements (Graser *et al*, 1996), formant ainsi des colonies blanches crémeuses.

La taille de cette levure peut mesurer de 3 à 15 μm la caractérisant par un polymorphisme typique que l'on peut retrouver in vitro et in vivo et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* (Buffo *et al*, 1984).

Candida albicans peut ainsi se présenter sous quatre stades morphologiques différents (Figure2):

Les blastospores ou blastoconidies : C'est la forme la plus courante de multiplication de *Candida albicans* saprophyte. Les levures sous forme de conidies sont des petites cellules rondes ou ovoïdes, chacune de ces cellules peut émettre un bourgeon qui donnera une cellule fille identique à la cellule mère. Au terme des divisions, il se forme un amas de levures qui restent réunies, les blastospores.

Le pseudo – mycélium : Il se forme par croissance tubulaire à partir du bourgeon de la blastospore. Le pseudo - mycélium restera attaché à la cellule mère et les deux cellules seront individualisées par une zone d'étranglement sans cloison vraie.

Le mycélium : On peut en rencontrer dans les tissus infectés. Il s'agit de la blastospore qui a donné naissance à un tube germinatif pour former un vrai mycélium, dont chaque élément sera individualisé par de vraies cloisons.

Chlamydospores (Euzeby *et al*, 1994) : Ce sont de volumineuses cellules, sphériques, à double paroi, réfringentes, le plus souvent terminales, mais pouvant être latérales. Les chlamydospores ont la particularité d'être acidophiles et acido-résistantes. (Guignard *et al*, 1989). Les chlamydospores sont la forme de résistance de *Candida albicans* et participent à l'identification du champignon en laboratoire. Elles sont rarement mises en évidence in vivo (Cole *et al*, 1991).

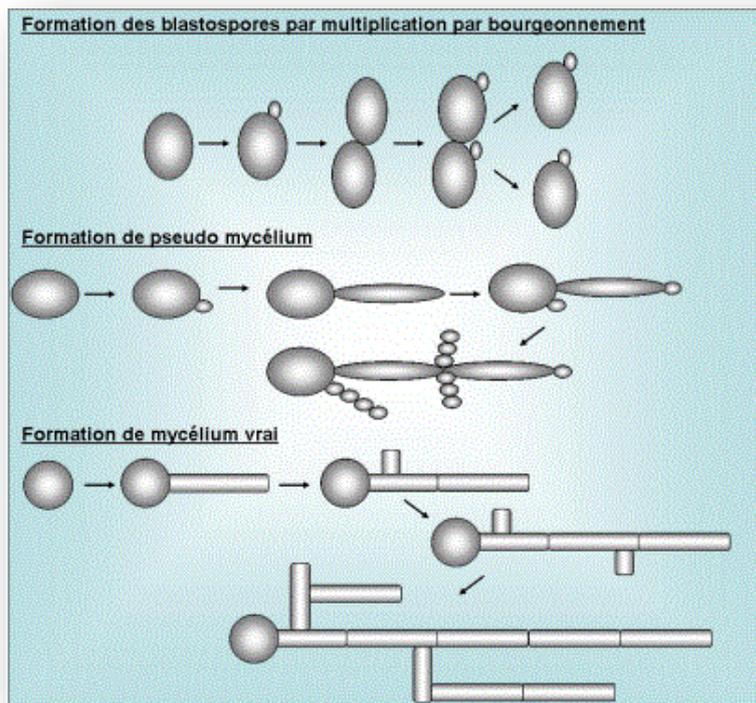


Figure 2 Morphologie de *Candida albicans*. (Odds, 1998)

2.2.3. Caractères biologiques

➤ Milieu de vie

Toutes les espèces du genre *Candida* sont aérobies. Elles vivent exclusivement sur les muqueuses, mais elles peuvent cependant survivre dans le milieu extérieur : 7 à 8 semaines sur le sable des plages, même arrosé d'eau de mer. Mais elles sont détruites par le lavage du linge, la stérilisation du matériel médical et des cathéters. (Koenig, 1995).

➤ Le pH

In vivo, l'acidité gastrique ou vaginale n'altère pas sa vitalité. En effet, la croissance est possible pour des pH allant de 3 à 7. En revanche, en milieu alcalin, l'assimilation des nutriments par les *Candida* est inhibée. (Chabasse *et al*, 2009).

➤ Température

Croissance entre 20°C et 30° C pour la majorité des levures. Les espèces pathogènes sont capables de croître à 37 ° C. (Euzeby, 1994).

➤ Nutrition

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, ils sont incapables de synthétiser leurs molécules carbonées à partir du dioxyde de carbone atmosphérique. Ils vivent donc aux dépens de la matière organique préformée. Le passage des substances se fait par absorption (Koenig, 1995).

2.2.4. Caractères écologiques

Candida albicans est considéré chez l'Homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne (Odds, 1988 ; Mavor *et al*, 2005).

Chez l'homme, *Candida* colonise de nombreux sites anatomiques. Durant leur adaptation au commensalisme, certaines espèces se sont spécialisées pour certaines localisations. Ainsi, *C. albicans* et *C. glabrata* vivent en commensaux en équilibre avec la flore bactérienne sur les muqueuses digestives et génito-urinaires de l'homme et de la femme, alors que *C. parapsilosis* et *C. famata* sont des levures commensales de la peau. Ce sont des levures opportunistes, elles profitent d'un dysfonctionnement du système immunitaire ou d'autres facteurs favorisant pour se comporter comme pathogène et provoquer des candidoses (Chabasse, 1999 ; Bouchara, 2010).

C. albicans est observé partout dans le monde quelques heures après la naissance, et il peut être retrouvé chez l'animal, sur les objets inanimés et dans le sol, les aliments et les hôpitaux (Ruhnke, 2006 ; Edwards, 2009).

2.2.5. Modes de contamination

Le *Candida* peut atteindre les tissus profonds selon deux modes d'entrée: par voie endogène ou exogène.

- La contamination endogène

Les espèces *Candida albicans* et *C. glabrata*, saprophytes du tube digestif et de la sphère oropharyngée, sont responsables, le plus souvent, d'une infection par voie endogène. La transmission du *Candida albicans* est plus rarement, croisée. Des épidémies ont été décrites, principalement dans les services de réanimation, et sont liées à des contaminations des liquides de perfusion ou de nutrition parentérale ou bien par manuportage (Eggimann, 2000).

-La contamination d'origine exogène

Les espèces non albicans proviennent de différents substrats alimentaires et environnementaux et leur contamination est de fait exogène.

- Physiopathologie des candidoses

Quel que soit le mode de contamination, la pathogénie des candidoses systémiques suit des étapes : colonisation, prolifération, invasion puis dissémination (figure3):

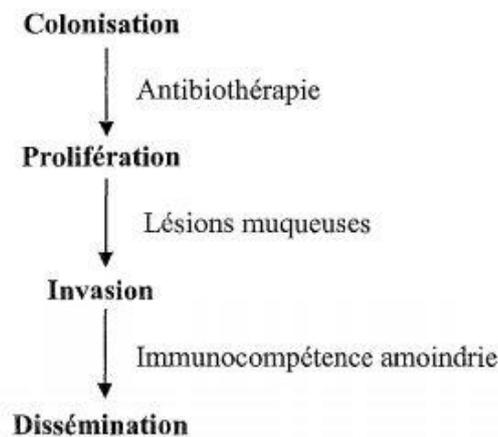


Figure 3 Physiopathologie des candidoses. (Lepape, 1999 ; Mimoz, 2000)

- La prolifération des *Candida* en quantité anormalement importante dans la lumière digestive sous l'effet de facteurs favorisants telle qu'une antibiothérapie à large spectre.

- L'invasion par translocation à l'occasion d'une lésion muqueuse qui va finalement aboutir, en cas de troubles de l'immunité, à la dissémination dans tout l'organisme (Mimoz, 2000 ; Lepape, 1999).

Le même processus peut se faire à partir de la peau ou des muqueuses lorsque des sites normalement stériles sont colonisés par les *Candida*.

2.2.6. Facteurs prédisposant à l'infection candidosique :

Les candidoses sont des maladies opportunistes profitant de la déstabilisation du fragile équilibre de commensalisme installé entre le parasite et l'hôte pour se disséminer. En cela, certains facteurs, propres ou étrangers à l'hôte, favorisent le développement de la forme invasive (tableau1). (Lagane, 2007)

Tableau 1 Les facteurs intrinsèques/extrinsèques favorisant le développement de la forme invasif des *Candida* (Lagane, 2007).

Les facteurs intrinsèques liés à l'hôte	Les facteurs extrinsèques et / ou iatrogènes
<u>Les facteurs physiologiques</u> - Age - Hormones	<u>Les facteurs alimentaires et la dénutrition</u> - consommation de glucides en grande quantité - carences nutritionnelles
<u>Les facteurs locaux</u> - La macération - l'humidité - l'occlusion - la modification de la trophicité	<u>Les traitements médicamenteux</u> - Antibiotiques - Traitements médicamenteux : immunosuppresseurs et anti-cancéreux - Traitements chirurgicaux et accès vasculaire Les cathéters, sondes et matériaux étrangers - Le traitement chirurgical
<u>Le terrain ou la maladie sous-jacente</u> - Les cancers - Le SIDA - Le diabète et les maladies endocriniennes - Pathologie cardiaque - La xérostomie :	

2.2. Les candidoses

Parmi les candidoses, les localisations profondes dont la fréquence a doublé entre les années 80 et 90 et plus de 80% représentent l'infection due à *Candida albicans*, commensal du tractus digestif humain, est la plus commune. Les mycoses à *Candida* se situent au premier rang des infections fongiques par leur fréquence et leur gravité (Bodey *et al*, 2002 ; Samaranyake *et al*, 2002).

Au plan clinique, les candidoses sont classées selon la localisation en deux groupes :

- les candidoses superficielles
- les candidoses profondes. (Lagane, 2007)

On distingue classiquement les candidoses muqueuses et les candidoses invasives.

2.2.1. Candidoses muqueuses

Les candidoses muqueuses sont les formes les plus fréquentes. Elles peuvent être observées chez les patients immunocompétents ou immunodéprimés. Elles touchent les muqueuses colonisées de façon habituelle par *C. albicans*, c'est à dire les muqueuses orales, œsophagiennes et génitales. Les signes cliniques des candidoses muqueuses associent à des degrés variables : douleur ou prurit, ulcération muqueuse et présence d'un enduit blanchâtre

peu adhérent. Il existe par ailleurs des spécificités en fonction des sites touchés. En l'absence d'autres conditions favorisantes, ces candidoses n'évoluent jamais vers une candidose systémique et sont donc rarement associées à des signes généraux tels que la fièvre. (Méar, 2014)

Ces muqueuses sont constamment colonisées par des flores bactériennes commensales. Lors de la modification des conditions physico-chimiques locales, *C. albicans* peut également coloniser des sites habituellement indemnes de sa présence. C'est le cas de la peau située à l'intérieur des grands plis (ventre, seins, pli inguinal) chez les patients obèses ou diabétiques, où la macération va créer des conditions favorables au développement de *C. albicans*. *C. albicans* entre en compétition avec les bactéries commensales pour les ressources nutritionnelles et les sites d'adhésion. La perturbation de cet équilibre, notamment par l'utilisation d'antibiotiques, permet la prolifération de *C. albicans* puis l'effraction de la barrière épithéliale (Kennedy *et al*, 1985 ; Peleg *et al*, 2010). En revanche, chez les patients de réanimation non neutropéniques, la présence de *C. albicans* est rarement synonyme d'infection, mais représente plutôt une colonisation (Meersseman *et al*, 2009).

2.2.2. Candidoses invasives

On parle de candidoses invasives ou systémiques lorsque *C. albicans* est isolé d'un site normalement stérile (sang, viscères, LCR...). Les candidoses invasives comme la candidémie (atteinte systémique) ne touchent que les patients gravement immunodéprimés (Ruhnke, 2006). Dans le monde, *C. albicans* est classé quatrième microorganisme isolé dans les hémocultures en terme de fréquence. Les candidoses invasives représentent 73% de toutes les infections fongiques invasives aux USA (Azie *et al*, 2012) et sont associées avec une mortalité importante, proche de 40% chez les patients non neutropéniques (Azie *et al*, 2012 ; Lewis, 2009). Les signes cliniques des candidoses invasives sont non spécifiques, et se résument le plus souvent à de la fièvre. Ces signes varient en fonction des organes touchés (endocardite, candidose hépato-splénique, endophtalmie...)

II. Pathogénicité des Candidoses

Les infections de la peau et des muqueuses telles que les candidoses vaginales par exemple, sont principalement dues à des modifications du pH et de l'environnement microbien, alors qu'une atteinte systémique est habituellement associée à une insuffisance des défenses de l'hôte, sur certains terrains immunodéprimés comme chez les individus âgés, ou encore ceux

traités par chimiothérapie, ou souffrant de désordre hématologique (HIV-positif, leucémie), ou chez les sujets ayant un traitement antibiotique à large spectre ou un déséquilibre endocrinien (diabète, grossesse) (Eggiman *et al*, 2003; Patterson, 2005). Le passage de l'état commensal à l'état pathogène est donc le plus souvent lié à une défaillance des systèmes de défense de l'hôte. *C. albicans* est capable de survivre comme commensal dans plusieurs sites anatomiques, chacun présentant ses propres pressions environnementales. Ceci explique les manifestations cliniques très diverses causées par ce champignon (Morgan, 2005; Tortorano *et al*, 2006).

III. Manifestations cliniques

- **Digestives** : muguet fréquent chez les nourrissons et les vieillards, candidoses oropharyngées et œsophagiennes chez les malades atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), candidoses gastro-intestinales ou coliques plus rares ;
- **Génitales** : vaginites particulièrement fréquentes chez la femme enceinte ou sous contraception orale, urétrites ou balanites chez l'homme ;
- **Cutanées et unguéales** : intertrigo interdigito-palmaire, intertrigo interfessier chez le nourrisson, folliculite chez les héroïnomanes, onyxis généralement accompagnés d'un périonyxis (ongles de la main) ;
- **muco-cutanées chroniques** : dans le cas d'un déficit de l'immunité cellulaire ;
- **viscérales et septicémiques.**

Des complications redoutables (comme des endocardites suite à des septicémies) sont fréquemment rencontrées chez les sujets à risque (immunodéprimés, transplantés, opérés du tube digestif ou du cœur). *C. albicans* est responsable d'un grand nombre de septicémies. Il peut diffuser à tous les viscères par voie hématogène ou par contiguïté. On décrit des candidoses oculaires, pulmonaires, ostéo-articulaires, urinaires, hépatiques, neuro-méningées, cardiaques (endocardites) etc. (Caraës, 2016)

Chapitre 02 :
Matériels et méthodes.

Notre travail est une étude descriptive prospective menée au laboratoire de Parasitologie-mycologie de l'HCA durant 2 mois du 10 février au 18 avril 2020. Elle consiste à faire le diagnostic des candidoses profondes chez les malades externes et hospitalisés dans divers services à l'HCA. Le motif de demande de ce diagnostic est établi sur la base de signes radiologiques, biologiques et/ou cliniques.

I. Matériel

1. Matériel biologique

Dans notre étude nous avons inclus tous les malades de la période de 2 mois. Il s'agit de 56 patients hospitalisés et externe ayant une symptomatologie faisant suspecter une mycose profonde. Ces patients ont été adressés au laboratoire de parasitologie – mycologie provenant des services de pneumologie, d'ORL (oto-rhino-laryngologie), d'urgence, d'urgence pédiatrie, de néphrologie, de maladie infectieuse, des externes de bactériologie, d'oncologie, de réanimation pédiatrique médicale, de pédiatrie, de gastro-entérologie et des olivier, et souffrant de fièvre irrégulière résistante aux antibiotique à large spectre, une altération de l'état générale, frisson, myalgie et trouble cardiovasculaire.

Les différentes répartitions des patients de l'HCA

La répartition des malades selon leurs provenances, leur âge, leur sexe, leurs principaux signes cliniques, et leurs services et types de prélèvement sont présentés en Annexe 1.

2. Matériel de laboratoire

2.1. Verrerie et matériel consommable

La verrerie et le consommable utilisés pour les analyses sont ceux couramment utilisés dans un laboratoire d'analyse de parasitologie, et mycologie, ils sont présentés en Annexe 2.

2.2. Appareil de laboratoire

Les appareils spécifiques de biologie moléculaire et du diagnostic immunologique qui sont utilisés dans le laboratoire de l'HCA son présentés en Annexe 3.

2.3. Milieux de culture

- Milieu Sabouraud chloramphénicol "SC"
- Milieu Sabouraud chloramphénicol actidione "SCA"

- Milieu Rice cream

2.4. Produits chimiques

- Tampon Véronal pH=8,2
- Agar
- Citrate de sodium 5%
- Solution de décoloration
- Eau distillée
- Eau physiologique à 9 %
- Eau déminéralisée
- Huile de vaseline
- Huile à immersion.

2.5. Colorants

- Solution de bleu Coton
- Solution de bleu de lactophénol

2.6. Réactifs

Les différents coffrets d'AUXACOLOR utilisés pour l'identification des espèces de *Candida* ainsi que les coffrets d'ELISA, de PCR et d'antifongigramme sont présentés en Annexe 4.

II. Méthode

1. Méthodes de prélèvement mycologiques

Les prélèvements superficiels sont effectués avec des écouvillons stériles en frottant les zones où les levures sont retrouvées le plus fréquemment. On prélève aussi par grattage à l'aide d'un vaccinostyle pour ramener plus de squames. En revanche, lorsque les zones concernées sont les foyers de candidoses profondes, les prélèvements sont effectués au lit du malade et acheminés au laboratoire. Ils consistent en :

Liquide céphalorachidien (LCR) : une ponction lombaire est réalisée pour recueillir le LCR. Celui-ci est recueilli directement dans un flacon stérile et acheminé le plus vite possible au laboratoire pour l'analyse. Une quantité suffisante de LCR doit être récupérée, elle servira à faire l'examen direct à l'encre de Chine, à rechercher les antigènes polysaccharidiques cryptococciques et à faire la culture. En général une quantité de 3 à 5ml est suffisante. Après réception au laboratoire, le LCR est centrifugé à 4 000 tours par minute pendant 5 minutes.

Sang : du sang veineux est prélevé dans un flacon d'hémoculture aérobie et incubé à 37°C. Un examen direct à la recherche de levures est effectué ainsi qu'une culture sur milieu Sabouraud dès réception du prélèvement ; ainsi qu'une fois par semaine pendant un mois avant de conclure à la négativité de l'hémoculture.

Urine : les urines fraîches du matin sont recueillies dans un flacon stérile. Une toilette intime préalable est souhaitable et le prélèvement doit être récupéré au milieu du jet d'urines. Les urines sont centrifugées à 4000 tours/min pendant 05 min.

Crachats : les crachats sont récupérés dans un flacon stérile. Il est préférable de faire des crachats induits afin d'éviter la contamination par la flore buccale.

Selle : les échantillons sont recueillis en pots propres étanches après avoir suivi un régime sans résidus et sans charbon.

2. Méthodes et diagnostic :

Le diagnostic mycologique est basé :

- Sur la mise en évidence de la levure dans les prélèvements soit à l'examen direct après coloration au bleu Coton, soit après culture sur milieu Sabouraud.
- Dans un second temps on passe à l'identification du genre et de l'espèce au moyen de galeries biochimiques déterminant les caractères physiologiques.
 - **Le diagnostic immunologique** se fait par la recherche des antigènes et des anticorps par la technique ELISA.
 - **Le diagnostic moléculaire** consiste en l'utilisation de la technique PCR.

2.1. Le diagnostique mycologique

2.1.1. Examen direct après coloration au bleu Coton :

Liquide céphalorachidien (LCR) : une goutte du culot est mélangée à une goutte d'encre de Chine diluée et examinée entre lame et lamelle au microscope optique aux objectifs 10 et 40.

Le surnageant est utilisé pour la recherche des antigènes par technique d'agglutination.

Sang : une goutte de sang prélevée du flacon d'hémoculture est mélangée à une goutte d'encre de Chine diluée et examinée entre lame et lamelle au microscope optique aux objectifs 10 et 40.

Urine : une goutte du culot est mélangée à une goutte d'encre de Chine diluée et examinée entre lame et lamelle au microscope optique aux objectifs 10 et 40.

Crachat : si les crachats sont trop épais, une fluidification est nécessaire au préalable. On mélange une goutte à de l'encre de Chine diluée, la préparation est ensuite examinée entre lame et lamelle au microscope optique aux objectifs 10 et 40.

La positivité se matérialise par la présence des levures de taille variable 2 à 3 microns entourées d'une membrane fine et généralement regroupées en amas.

- **Culture**

Tous les prélèvements, que ce soit le LCR, le sang, les urines, les selles ou les crachats, sontensemencés (par stries) dans des conditions stériles autour de la flamme d'un bec Bunsen et en quantité suffisante dans le milieu Sabouraud chloramphénicol ou les autres milieux.

Les cultures sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C et observées après 24 à 48 heures (Temps de pousse des levures du genre Candida).

L'algorithme décisionnel du diagnostic mycologique est présenté en Annexe 5.

Les cultures positives laisseront apparaître sur le milieu SC des colonies muqueuses blanches ou à tendance beige dès 24 heures d'incubation (figure8).

- **Identification des levures**

Sensibilité à l'actidione :

Les levures ne pousse généralement pas sur actidione, cette propriété constitue en soi un critère d'identification de la pathogénicité.

Test d'assimilation des sucres par AUXACOLOR :

1. Principe

La galerie AUXACOLOR™ 2 est un système d'identification dont le principe repose sur l'assimilation des sucres. La croissance des levures est visualisée par le virage d'un indicateur de pH. (Kurtzman, 1998)

2. Mode opératoire

Amener les réactifs à température ambiante avant utilisation.

1. Ensemencement de la microplaque

- Préparer l'inoculum à partir d'une culture de 24 à 48h réalisée sur milieu de Sabouraud (+/- antibiotiques) ou sur milieu chromogénique (CandiSelect TM 4 code 63746). Dans des conditions stériles, ensemercer le milieu de suspension (R2) avec des colonies de souche pure (exemptes de bactéries et d'association avec d'autres levures) en quantité suffisante (1 à 5 colonies identiques) pour obtenir une opacité équivalente au témoin d'opacité fourni dans le kit code 56499 (opacité égale à 1,5 McFarland). Il est nécessaire de respecter l'opacité de l'inoculum pour garantir la qualité des résultats.

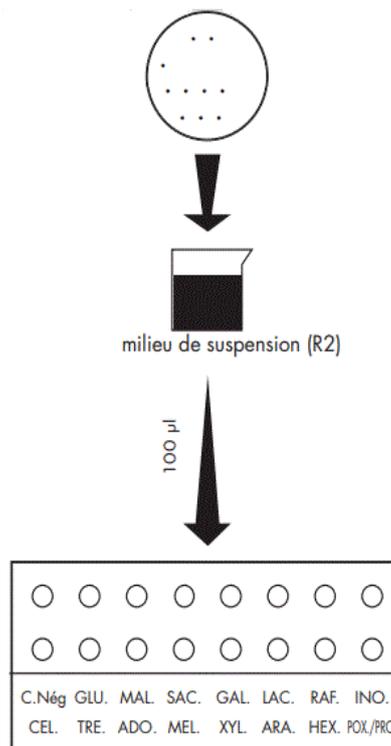


Figure 4 Les étapes à suivre pour l'identification colorimétrique des levures

- Recouvrir la microplaque (R1) avec l'adhésif en s'assurant que l'adhésion est parfaitement uniforme. Incuber 48h (72h si nécessaire) à 30°C (\pm 2°C). Les différentes photos prise au cours de la manipulation sont présentés en Annexe 6.

2. Lecture des résultats

La lecture définitive doit s'effectuer à 48H. Même si une première lecture à 24H peut déjà donner un code correct et permettre l'identification de certaines levures, nous recommandons de réaliser l'interprétation définitive à 48H.

Pour faciliter la lecture, il est possible de regarder sur l'envers de la microplaque ou de décoller l'adhésif, en respectant les conditions de stérilité d'usage si une réincubation est nécessaire. Dans ce cas, recoller soigneusement l'adhésif, noter les résultats et les reporter sur le carnet prévu à cet effet.

4.3.2.3. Interprétation des résultats

A) Guide d'interprétation des réactions colorées

Pour le glucose, maltose, saccharose, galactose, lactose, raffinose inositol, cellobiose, tréhalose, adonitol, melezitose, xylose, et arabinose :

- Bleu-gris et bleu-vert sont considérés comme négatifs.
- Jaune pâle et jaune-vert sont considérés comme positifs.

Pour l'activité phénoloxydase (POX) :

- Incolore est considéré comme négatif.
- Marron est considéré comme positif.

Pour l'activité proline-arylamidase (PRO) :

- Incolore est considéré comme négatif.
- Jaune est considéré comme positif.

Méthodologie pour le codage

Les 16 caractères biochimiques, répartis dans 15 cupules (les tests POX. et PRO. étant associés dans une même cupule), sont utilisés pour l'identification des *Candida sp.*

- Un profil numérique à 5 chiffres est obtenu en regroupant par 3 les valeurs des 15 tests
- On attribue à chaque réaction négative la valeur zéro et à chaque réaction positive une valeur en rapport avec sa position dans le triplet.
- Selon Fricker-Hidalgo, (1995), l'addition des trois valeurs donne un chiffre qui permet l'obtention d'un profil numérique à 5 chiffres correspondants à une espèce spécifique du genre *Candida*.

Test de l'uréase :

Certaines espèces du genre *Candida* hydrolyse l'urée par production d'une uréase.

La mise en évidence de ce paramètre se fait par un simple test. On ensemence une colonie dans un tube contenant 1ml du milieu urée – tryptophane qui contient un indicateur coloré de pH, le rouge de phénol à 1% et on incube pendant 3 heures à 25°C.

Après 3 heures, si l'indicateur de pH vire au rouge, c'est que la levure possède une uréase qui a dégradé l'urée et changé le pH du milieu ce qui a fait virer l'indicateur.

2.1.2. Examen direct sans coloration

Un fragment du prélèvement, placé sur une lame, est dissocié dans une goutte de sérum physiologique stérile: on observe sans coloration, des petites cellules de 2 à 4 µm, à paroi

mince, rondes ou ovalaires, bourgeonnantes, accompagnées parfois de filaments mycéliens, formés d'articles de longueur variable, de 3 à 5 μm de diamètre et aux extrémités arrondies. (Figure1). En l'absence de fragment sur le prélèvement, on réalise un frottis qui sera coloré par le lugol à 2%, au bleu de lactophénol ou au noir chlorazole.

- **Culture ou isolement des champignons.**

L'ensemencement se fait sur milieu Sabouraud chloramphénicol avec et Sabouraud sans actidione, de façon stérile par des mouvements de rotation ou de balayage de l'écouvillon à la surface de la gélose dans les tubes, jusqu'à épuisement du liquide ou du prélèvement solide.

- **Identification**

-**Teste de filamentation** : dans le sérum

-**Teste de Chlamidosporulation** : en présence de colonies bien individualisées, l'identification précise de l'espèce isolée peut être réalisée par le test de chlamidosporulation → Repiquage sur Rice Cream 24 à 48h à 27°C.

La présence de chlamydozoaires, structures arrondies de 10 à 15 μm entourées d'une paroi épaisse à double contour, signifie qu'il s'agit dans 95% des cas d'un *Candida albicans*.

- **Etude de l'assimilation des sucres par AUXACOLOR** : la même technique décrite précédemment.

2.2. Détermination de la sensibilité des levures aux antifongiques par Antifongigramme.

1. Principe

L'Antifongigramme permet d'étudier, en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 tamponné, modifié, en présence d'un indicateur d'oxydo-réduction, la croissance des levures en présence de 6 antifongiques à 2 concentrations différentes.

L'appréciation de la croissance repose sur la réduction de l'indicateur coloré qui entraîne un virage du milieu du bleu au rose. Lorsque la croissance est inhibée par l'antifongique, le milieu reste bleu.

Ce teste présenté en microplaque de 16 cupules comprend :

- 2 cupules Témoin de croissance

- 12 cupules contenant les antifongiques déshydratés (6 antifongiques à 2 concentrations différentes)
- 2 cupules Témoin négatif

Un inoculum calibré de la souche à étudier est dilué dans le « milieu de suspension », puis réparti dans chaque cupule de la microplaque.

Les antifongiques présents dans chaque cupule sont ainsi réhydratés par le « milieu de suspension »ensemencé.

Selon Garrigues et al, (1996), les concentrations d'antifongiques obtenues correspondent à des concentrations discriminantes, permettant de classer les souches en :

- Souches sensibles (S)
- Souches intermédiaires (I)
- Souches résistantes (R)

2. Mode opératoire

A. Préparation de la suspension de levures

- A partir d'une culture pure et fraîche obtenue sur milieu de Sabouraud avec ou sans antibiotique, prélever 2 colonies identiques à l'aide d'une pipette et les décharger dans 3 ml d'eau distillée stérile afin d'obtenir un premier inoculum calibré d'opacité équivalente au standard n°1 de Mac Farland (Opacity control 1 Mac Farland), $\approx 3 \times 10^6$ levures/ml
- A l'aide d'une pipette calibrée, diluer 100 μ l de cet inoculum dans 1.9 ml d'eau distillée stérile.
- Ensemencer 20 μ l de la dilution obtenue dans le milieu de suspension fourni dans le coffret. La concentration de l'inoculum est alors équivalente à $\approx 1 \times 10^3$ levures/ml.

B. Inoculation de la microplaque

- A l'aide d'une pipette calibrée, répartir 100 μ l de cette suspension dans chaque cupule de la microplaque.
- Recouvrir avec l'adhésif.

C. Incubation de la microplaque

Incuber : - à 37°C pendant 48h

Les différentes photos prise au cours de la manipulation sont présentés en Annexe 6.

D. Lecture et interprétation des résultats

- N'effectuer la lecture que si les cupules Témoins de croissance (T+) sont roses.
- Observer l'éventuel virage de couleur dans les cupules contenant les antifongiques par rapport aux cupules témoin négatif (bleu).
- Interpréter en fonction de la couleur des 2 cupules pour chaque antifongique :
 - bleu-bleu = absence de croissance : souche inhibée par l'antifongique in vitro.
 - rose-bleu = faible croissance : souche intermédiaire.
 - rose-rose = croissance : souche non inhibée par l'antifongique in vitro.

3. Le diagnostic immunologique

Nous effectuons parallèlement aux prélèvements des différents sites pour le diagnostic mycologique des prélèvements de sang pour le diagnostic immunologique.

3.1. Technique d'ELISA

Principe du test serion ELISA classique

Le test ELISA (test utilisant un immunoabsorbant lié à une enzyme) est un test immunologique qui convient particulièrement à la détermination d'anticorps dans le domaine de la sérologie infectieuse. La réaction est basée sur l'interaction spécifique d'anticorps avec les antigènes correspondants. Les puits de la microplaque de dosage des coffrets SERION ELISA classique sont fixés avec l'antigène spécifique du pathogène concerné. Si les anticorps contenus dans l'échantillon de sérum du patient sont présents, ils se lient à l'antigène fixé. Un anticorps secondaire, qui a été préalablement conjugué avec l'enzyme phosphatase alcaline, détecte le complexe immun et s'y lie. Le substrat incolore p-nitrophénylphosphate est ensuite transformé en un produit coloré, le p-nitrophénol. L'intensité du signal de ce produit de réaction est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon et elle est mesurée par une méthode photométrique.

3.1.1. Recherche des anticorps circulants (IgA, IgM, IgG)

A) Modeo pérateoire

Serion ELISA classic *Candida albicans* IgA/IgG :

Dilution des échantillons Avant d'effectuer le test, les échantillons patients (V1) doivent être dilués dans le tampon de dilution (V2) avant d'effectuer le test comme suit :

$V_1 + V_2 = 1+1000$	ajouter	10 μ l	d'échantillon patient
	chacun à	1000 μ l	tampon de dilution (1 + 100)
	chacun à	20 μ l 180 μ l	de la première dilution tampon de dilution (1 + 9)

Après dilution et avant le pipetage dans la plaque de microtitration, les échantillons doivent être bien mélangés pour obtenir une solution homogène.

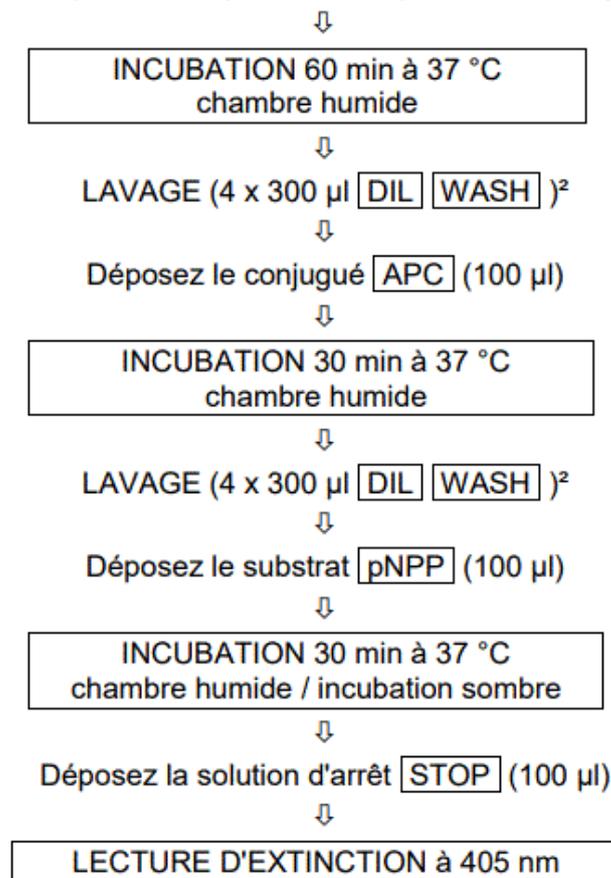
Serion ELISA classic *Candida albicans* IgM :

Échantillon patient (V4) doit être dilué dans ce tampon de dilution (V3) :

$V_4 + V_3 = 1+100$	ajouter	10 μ l	d'échantillon patient
	chacun à	1000 μ l	tampon de dilution

Aperçu générale de la procédure du teste ELISA (recherche d'anticorps) :

Pipetez les échantillons dilués et les sérums contrôle négatif / standard prêts à l'emploi dans les puits microtest (100 µl)



Les différentes photos prise au cours de la manipulation sont présentés en Annexe 6.

B) Évaluation quantitative avec Serion ELISA classic *Candida albicans* IgA/IgG/IgM :

Pour établir les fourchettes du seuil, multipliez la valeur moyenne du DO standard mesuré avec les données numériques du certificat de contrôle de la qualité.

B) Interprétation des résultats

Un résultat de test positif confirme la présence des anticorps spécifiques. Un résultat négatif indique qu'aucun anticorps cliniquement significatif contre l'agent pathogène n'est présent dans l'échantillon du patient, mais n'exclut pas l'éventualité d'une infection aigüe. En cas de résultat limite, une évaluation fiable n'est pas possible. Un diagnostic définitif ne peut être atteint qu'en testant parallèlement des échantillons de sérum appariés, prélevés dans un laps de temps de deux semaines. (Zöller *et al*, 1991)

3.1.2. Recherche des antigènes circulants

A) Mode opératoire

Avant d'effectuer le test, les échantillons (échantillon patients, standard et contrôle négatif) (V1) doivent être dilués dans le tampon de dilution (V2) comme suit :

$V_1 + V_2 = 3+1$	ajouter	300 μ l	échantillon de (V ₁)
	chacun à	100 μ l	de tampon de dilution (V ₂)

Aperçu générale de la procédure du teste ELISA (recherche d'antigènes) :

Préparation des échantillons, du sérum de contrôle négatif et du sérum standard

Ajoutez le surnageant à partir des échantillons (100 μ l)



INCUBATION 60 min. / 37 °C
chambre humide



LAVAGE (5 x 300 μ l **DIL** **WASH**)



Pipetez la solution conjuguée **PODCR** (100 μ l)



INCUBATION 60 min. / 37 °C
chambre humide



LAVAGE (5 x 300 μ l **DIL** **WASH**)



Pipetez la solution de substrat **TMB** (100 μ l)



INCUBATION 30 min. / 37 °C
chambre humide / incubation sombre



Pipetez la solution d'arrêt **STOP** (100 μ l)



LISEZ LA DENSITÉ OPTIQUE à 450 nm (réf. 650 nm)

B) Interprétation des résultats :

Les résultats positifs des tests pour les échantillons patients indiquent une fungemie à *Candida*. Les résultats ne peuvent être interprétés qu'en association avec un tableau clinique et d'autres méthodes de détection.

4. Diagnostic par biologie moléculaire

4.1. Technique moléculaire PCR (réaction en chaîne par polymérase)

A) Principe

Le kit QIAamp DSP DNA Blood Mini utilise la technologie bien établie QIAamp pour purifier l'ADN génomique. La membrane à base de silice QIAamp se lie spécifiquement à l'ADN dans l'échantillon lysé, tandis que le reste du lysat est rapidement éliminé par centrifugation ou sous vide. L'ADN lié est efficacement lavé pour éliminer les contaminants, puis élué dans des volumes de 50 à 200 µl.

B) Mode opératoire

a) extraction de l'ADN

- Mettre dans chaque eppendorf :
 - 200 µl d'eau physiologique.
 - 200 µl de tampon.
 - 10 µl de protéinase k.
 - notre suspension.
- Vortexer 10-20 secondes et mettre au bain-marie à 56°C pendant 30 minutes en vortexant chaque 5 minutes puis retirer le microtube du bain-marie
- ajouter 200 µl d'éthanol 100%, puis vortexer et transférer sur une colonne Qiagen.
- centrifuger 3 minutes à 10000 tours, puis jeter la poubelle et remettre la colonne sur une nouvelle poubelle
- ajouter 500 µl de solution lavage 1 AW1 et centrifuger 3 minutes. Jeter la poubelle et remettre la colonne sur une nouvelle poubelle,
- ajouter 500 µl de solution lavage 2 AW2 et centrifuger 3 minutes. Jeter la poubelle et remettre la colonne sur un eppendorf
- ajouter 300 µl de tampon AE puis centrifuger 3 minutes

b) Amplification de l'ADN

- Mettre dans chaque eppendorf :
 - 35 µl de tampon.
 - 21 µl de MgCl₂.

- 7 μl de dNTP.
- 8.75 μl de Crf et 8.75 μl de Crr (les amorces) qui ciblent le gène hwp1.
- 2.8 μl de taq polymérase.
- 196.7 μl d'eau distillée.

Pour avoir un totale de 40 μl dans chaque eppendorf.

- ajouter 10 μl de chaque ADN dans les 6 premier eppendorf puis ajouter 10 μl d'eau distillée dans le dernier eppendorf (temoin négatif). On aura donc des solutions de 50 μl .
- mettre les 7 eppendorfs dans le thermocycleur (MyCycler™ Thermal Cycler) et le programmer au protocole Crf/Crr qui comprend les étapes suivantes :
 - Dénaturation $\rightarrow 95^{\circ}\text{C} \rightarrow 45$ secondes.
 - Hybridation $\rightarrow 58^{\circ}\text{C} \rightarrow 40$ secondes.
 - Elongation $\rightarrow 72^{\circ}\text{C} \rightarrow 55$ secondes (30 cycles).

c) Révélation des produits d'amplification

• Préparation du gel d'agarose (pour un volume de 300 ml)

Mettre dans une fiole jaugée :

- 270 μl d'eau distillée.
- 30 μl de tampon.
- 4.5 g d'agar
- 30 μl de BET

Puis mettre la fiole dans un bain-marie pendant 60 minutes, lorsque la préparation devient translucide, la verser dans un moule et la laisser refroidir.

- Déposer dans chaque puits d'une plaque en verre :
 - 3 μl de colorant
 - 7 μl d'eau distillée

Ajouter 10 μl de chaque ADN dans les 7 premier puits, puis déposer 5 μl de marqueur de taille dans le dernier puits.

Transvaser le tout dans les puits du gel d'agarose et le placer dans une cuve d'électrophorèse branchée à un générateur (POWERPAC™). Le gel est ensuite déposer dans un transilluminateur UV pour la visualisation des bandes révélées avec le bromure d'éthidium.

Les différentes photos prise au cours de la manipulation sont présentés en Annexe 6.

Chapitre 03 :
Résultats et discussion.

I. Résultats

Le diagnostic des mycoses profondes est effectué au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l' HCA.

L'identification mycologique de chaque espèce a été réalisée par les techniques d'identifications usuelles. Les résultats portent, dans un premier temps, sur l'étude phénotypique des levures du genre *Candida*. Dans un deuxième temps, les caractères biochimiques et physiologiques permettent, alors, de distinguer les espèces de ce genre.

Nous divisons ces résultats en quatre parties.

- ✓ La première décrit l'aspect phénotypique du genre *Candida*.
- ✓ La deuxième détaille les caractères biochimiques et physiologiques des espèces de ce genre.
- ✓ La troisième nous renseigne sur la réponse immunitaire face au développement des espèces retrouvées, par la sérologie, en faisant la recherche qualitative et quantitative des antigènes et des antigènes présents dans le sang.
- ✓ Nous rapportons, enfin, les résultats du diagnostic moléculaire basé sur la technique PCR, obtenus en utilisant sur un couple d'amorce (Crf/Crr) spécifique du gène hwp1 ciblé et qui nous permet de distinguer les espèces morphologiquement identiques mais dont les génotypes sont différents, il s'agit de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* et *Candida africana*.

Notre échantillonnage de 56 patients est réparti selon trois paramètres : sexe, âge et services afin d'évaluer la prévalence des candidoses durant notre étude qui s'est déroulée du mois de Février au mois de Mars 2020, à l' HCA.

I. Evaluations du sexe ratio des patients ayant servis pour les tests :

- Dans la (figure 5) nous rapportons la répartition des patients selon le sexe :

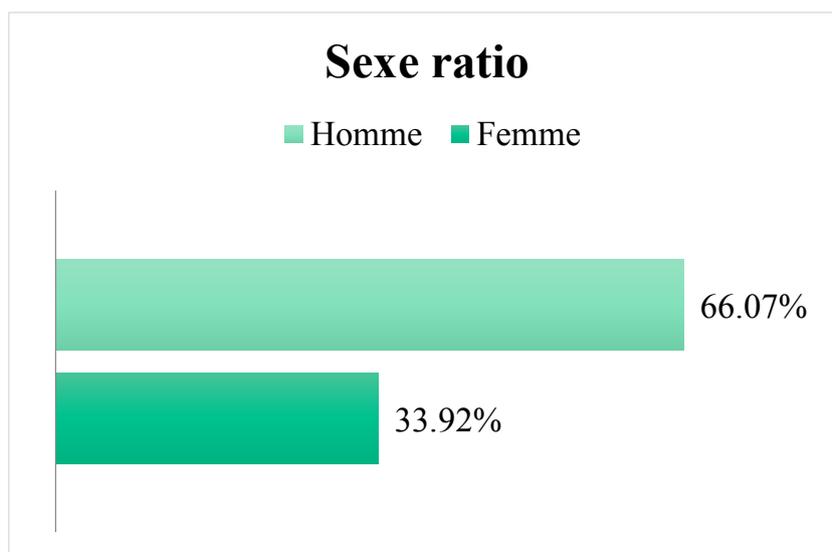


Figure 5 Evaluation du sex ratio des patients ayant servie pour les tests à l'HCA, tous services confondus

Sur l'ensemble de l'étude, le sex ratio est très en faveur des patients du sexe masculin. Avec un pourcentage de 66,07 % pour les hommes et de 33.92% pour les femmes).

II. Répartition des patients testés dans tous les services confondus

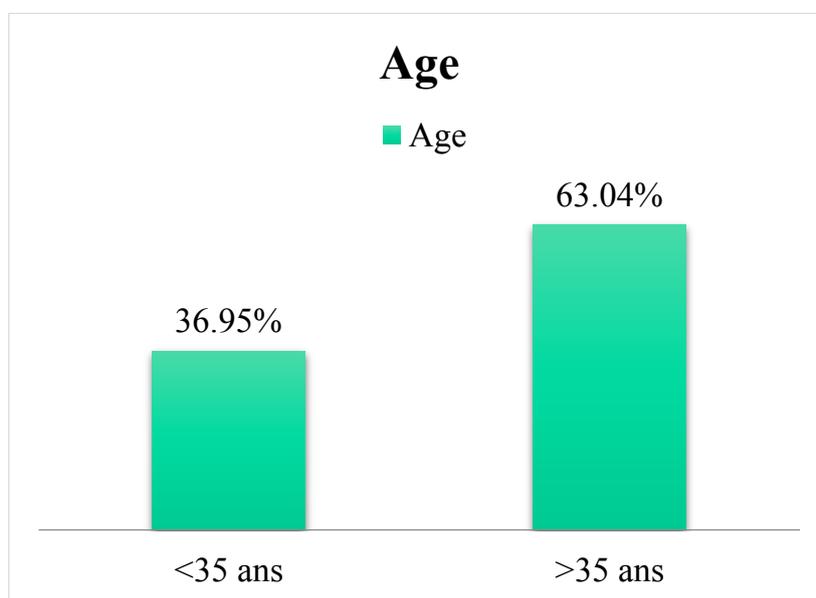


Figure 6 Répartition des patients selon l'âge (<35ans, >35ans) au laboratoire, à l'HCA, tous services confondus

D'après la (figure6) plus de 63% des patients ont un âge supérieure à 35ans et plu de 36% des patients ont un âge de moins de 35 ans. L'âge moyen des patients est de 45.07 ans, avec un

âge minimum de 6 mois et un maximum de 83 ans. Cette pathologie toucherait plus préférentiellement l'homme d'âge mur.

III. Répartition des patients en fonctions des services ciblés

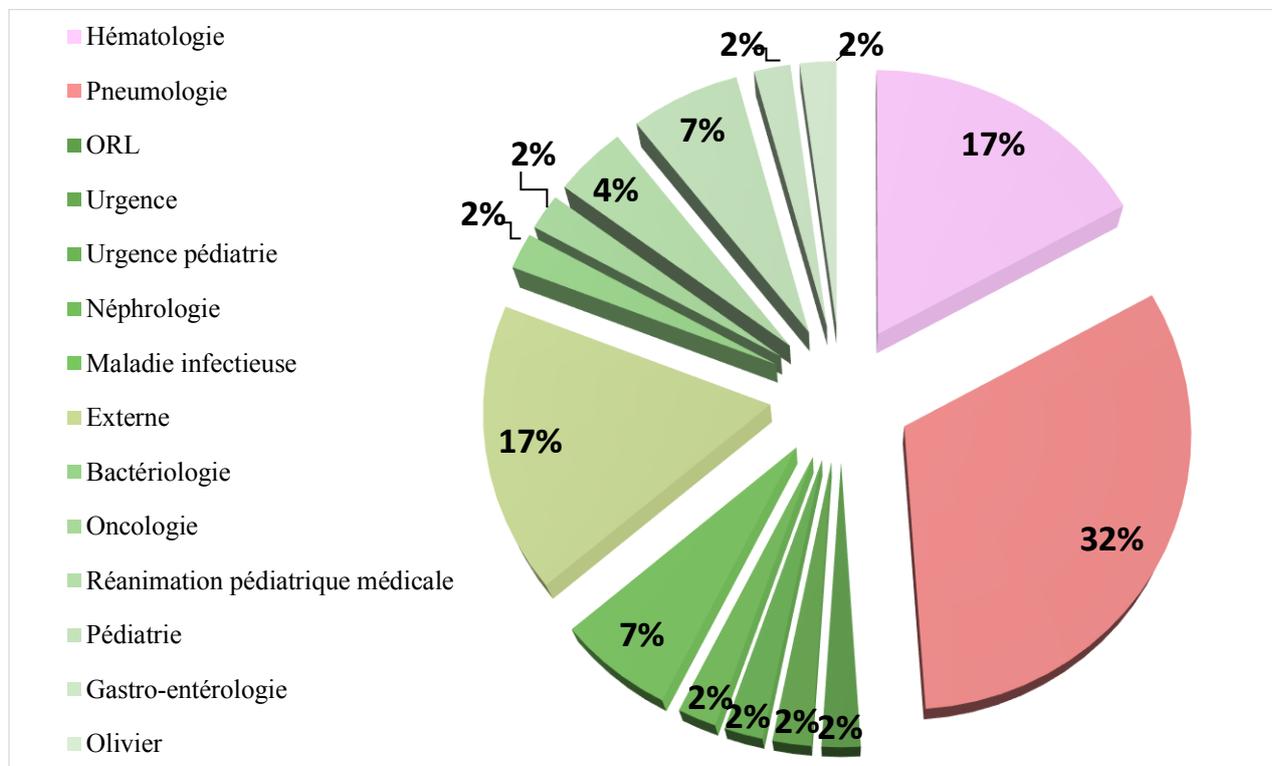


Figure 7 Distribution des patients au cours d'une candidose profonde selon les différents services de l'HCA

A partir de la (Figure7), on remarque que ces 14 services ont regroupé 56 isolats de *Candida*. Les services d'hématologie, pneumologie et les externes regroupent le plus grand nombre de patients soit au total plus de la moitié des patients (66%)

1. Résultats de l'examen direct :

a) Résultats de l'examen macroscopique des colonies : nous a permis tout d'abord d'établir la distinction entre les levures et les champignons filamenteux qui eux présentent un aspect duveteux et un développement aérien du mycélium. L'identification des colonies de *Candida* ont été faites sur la base d'une clé de référence (Grillot, 1996). D'après cette dernière les colonies du genre *Candida* possèdent des aspects et des formes très variés sur milieu Sabouraud. Leur couleur est le plus souvent blanche à crème, leur texture sèche, muqueuse ou crémeuse, leur surface peut être luisante, brillante ou mate et présenter un aspect lisse, plissé

ou rugueux. Les colonies mesurent quelques millimètres de diamètre sur milieux standard après une incubation de 24 à 48 heures à 37°C.

b) Résultats de l'examen microscopique des colonies : entre lame et lamelle, nous a apporté des informations supplémentaires sur la forme, la taille et le mode de bourgeonnement. L'observation de blastopores ronds ou ovales, à bourgeonnements multipolaires nous oriente vers une levure du genre *Candida* (Figure8). D'après la description donnée par Koenig, (1995).



Figure 8 Examen direct (Originale ; 2020), montrant :

- A) à gauche : Culture sur milieu sabouraud chloramphenicol
- B) à droite : Examen à l'état frais (objectif x40)

La recherche de la levure *Candida albicans* nécessite une culture sur milieu Rice Cream pour rechercher sa forme caractéristique, la chlamydo-spore.

2. Résultat obtenus selon la technique de chlamydo-spore :

L'espèce *C. albicans* est facilement identifiée par ses chlamydo-spores terminales caractéristiques (figure9), structures globuleuses, à paroi épaisse.

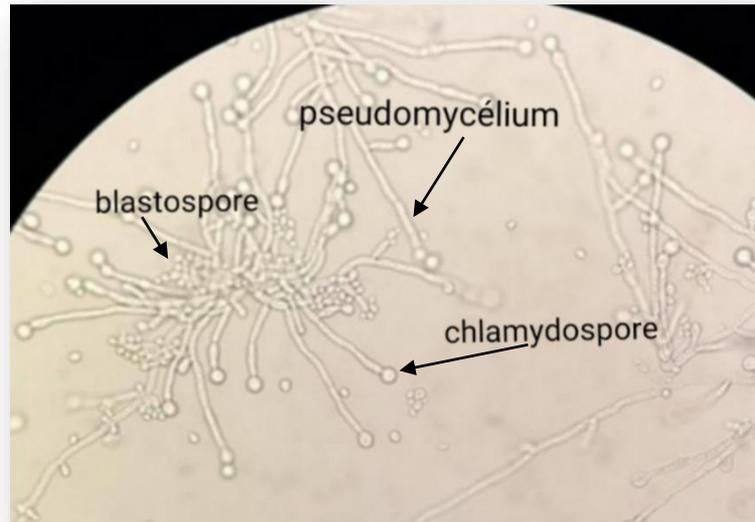


Figure 9 Chlamydospores terminales de *C. albicans* sur milieu Rice cream (Originale ; 2020)
 Néanmoins ce test ne nous permet pas véritablement de différencier *C. dubliniensis* et *C. albicans*, bien qu'une production de chlamydospores plus abondante ait été rapportée pour *C. dubliniensis*.

3. Résultats sur la cinétique d'absorption des sucres par *C. albicans* selon la technique AUXACOLOR

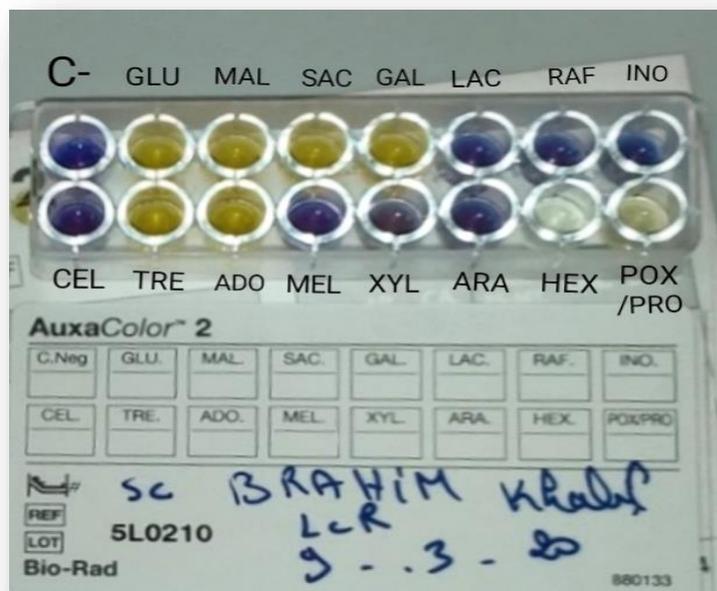


Figure 10 Plaque de microtitration du kit AuxaColor™ 2 après 24 à 48h d'incubation
 (Originale ; 2020)

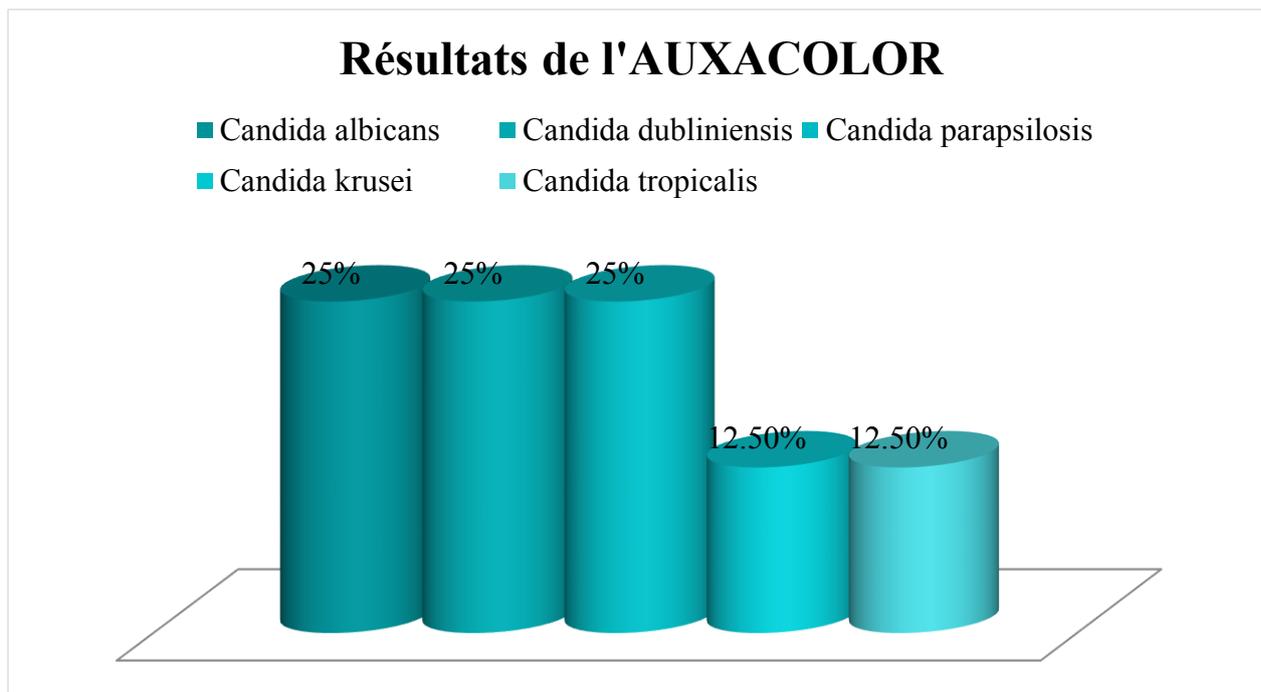


Figure 11 Pourcentage de chaque espèce obtenue par AUXACOLOR

Dans la (figure11) on note la présence de 5 espèces de candida dont 4 sont non albicans, *C. parapsilosis* (25%), *C. dubliniensis* (25%), *C. krusei* (12.5%) et *C. tropicalis* (12.5%).

4.Résultat de la technique de l'Antifongigramme :

Pour les antifongiques suivants : 5-Fluorocytosine, Amphotéricine, Miconazole, Kétoconazole, Itraconazole, Fluconazole. Les résistances retrouvées chez les différentes souches des patients inclus dans l'étude sont exposées dans les (Figure12, 13).



Figure 12 Résultats d'Antifongogramme effectué pour l'espèce *Candida albicans/dublinsiensis* (Originale ; 2020)

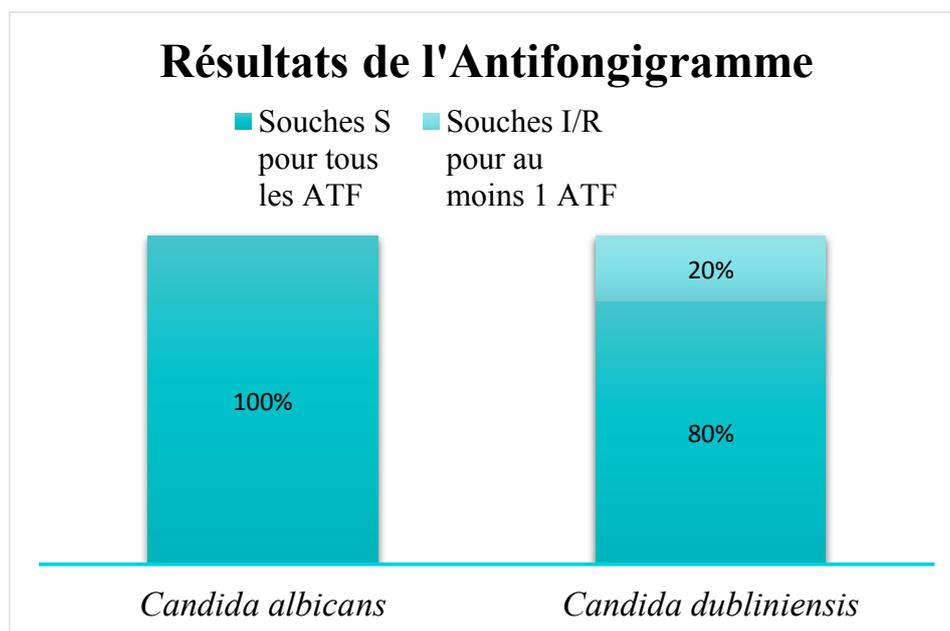


Figure 13 Résistances des souches de *Candida albicans/dublinsiensis* de notre étude aux différents antifongiques testés au laboratoire

Seule une souche de *C. dubliniensis* est intermédiaire au Miconazole, les autres sont sensibles à tous les antifongiques testés.

5. Résultats de la technique ELISA :

Sur les 56 patients, seuls 28 ont eu des sérologies demandées. Les résultats sont présentés dans les (Figure14, 15, 16).

A) Recherche des anticorps (Ac)

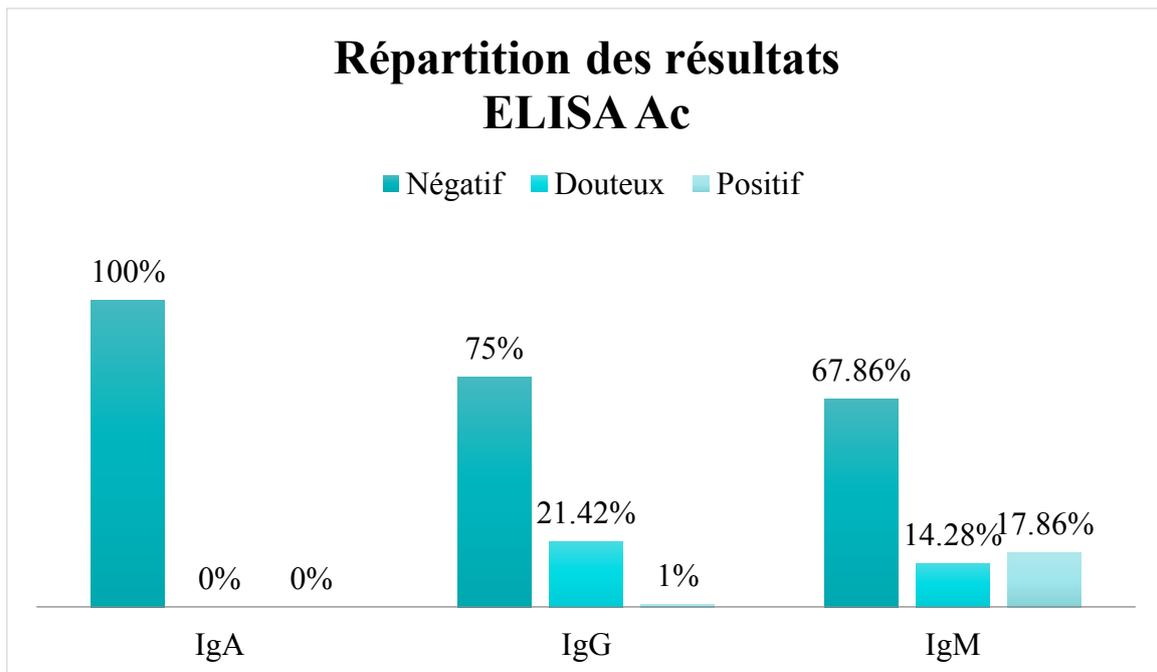


Figure 14 Distribution des résultats Serion ELISA Anticorps (IgA, IgG, IgM)

D'après la (figure14), on peut voir que le taux de positifs ne dépasse pas les 18%

B) Recherche d'Ag

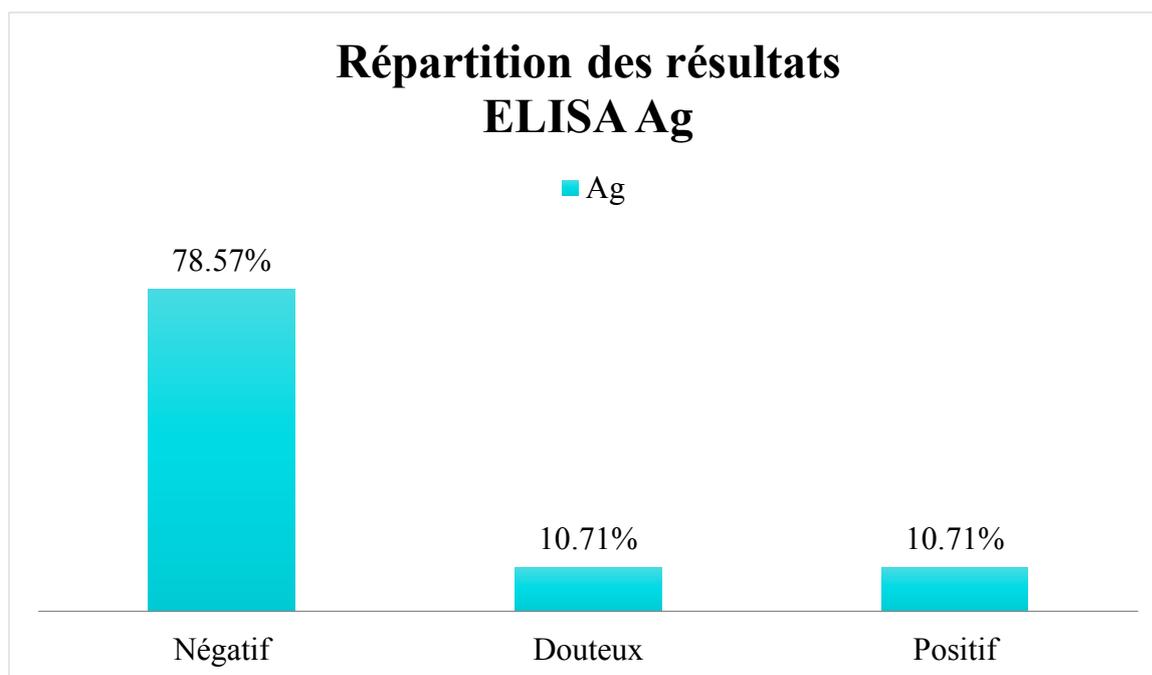


Figure 15 Distribution des résultats Serion ELISA Antigène

D'après la (figure15), on remarque que le pourcentage de positifs est encore plus faible que celui des anticorps 10.71%.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection aiguë. L'Ag peut-être masqué par les Ac anti-Candida, le processus de dénaturation au cours de la préparation de l'échantillon peut ne pas être suffisant pour permettre la détection de l'Ag.

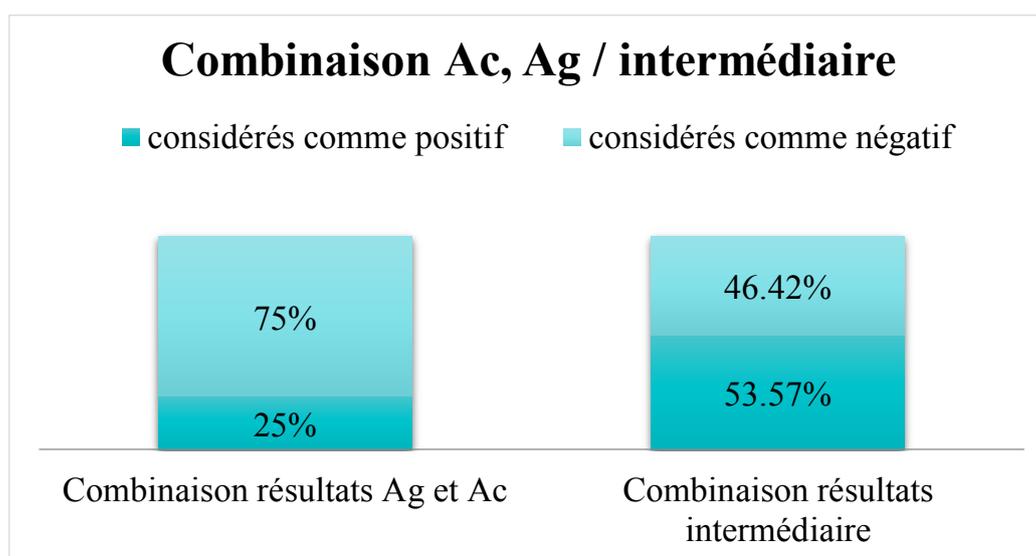


Figure 16 Performance des sérologies *Candida* Antigène et Anticorps en incluant ou pas les résultats intermédiaires

D'après la (Figure16) le taux de positivité augmente de 25 % pour la combinaison des Ac/Ag et de 53.57% pour la combinaison des intermédiaires aux résultats positifs.

6. Résultats de la technique moléculaire (PCR) :

Nous avons utilisé la technique moléculaire PCR (réaction en chaîne par polymérase) afin de différencier entre les 2 souches *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* en utilisant un couple d'amorce (Crf/Crr) qui cible la protéine hwp1.

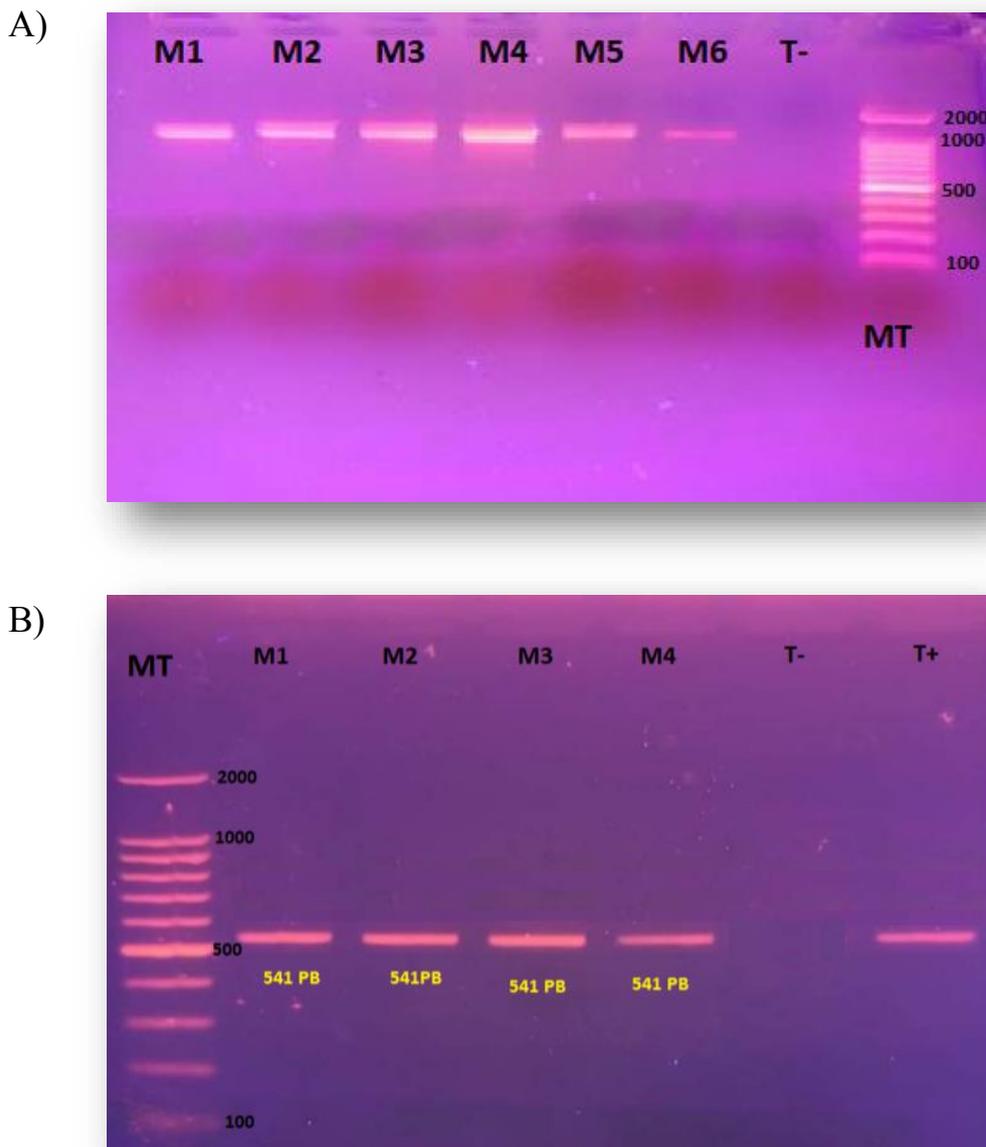


Figure 17 Visualisation des produits PCR des souches de Candida (Originale ; 2020), montrant :

A) *Candida albicans*

B) *Candida dubliniensis*

D'après la (figure17) on peut visualiser les couples d'amorces spécifiques d'espèces de *Candida* ont permis d'amplifier les fragments de longueur variable, par PCR.

L'amplicon observé mesure:

- 976 pb pour *C. albicans*.

- 541 pb pour *C. dubliniensis*.

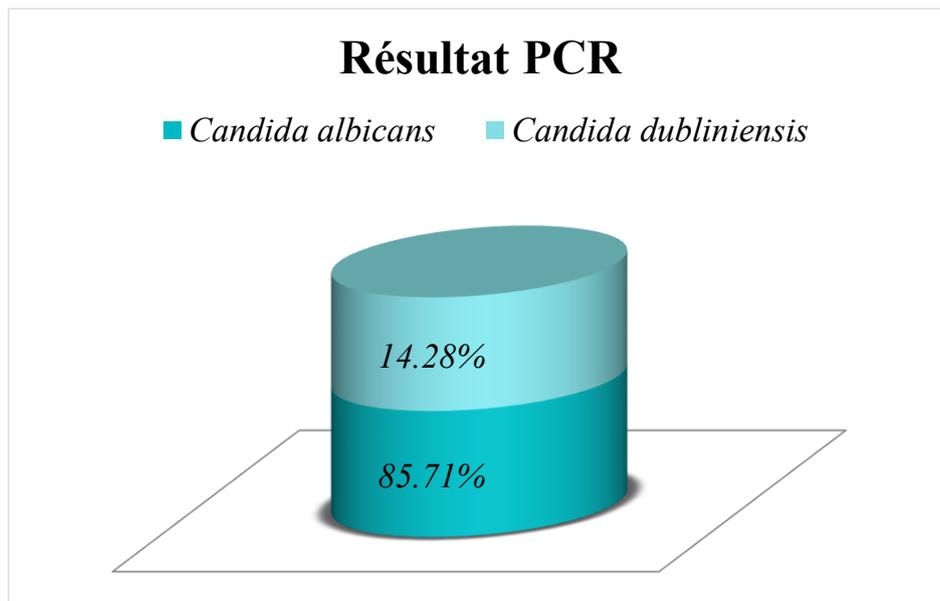


Figure 18 Répartition par espèce des résultats de PCR

Dans la (figure18) on remarque une forte prédominance de l'espèce *albicans* qui est de 85.71% contre 14.28% de *dubliniensis*

- Dans la (figure19) nous rapportons la distribution des espèces de *Candida* retrouvées dans les prélèvements profonds à l'HCA, toutes techniques confondues, (n=56)

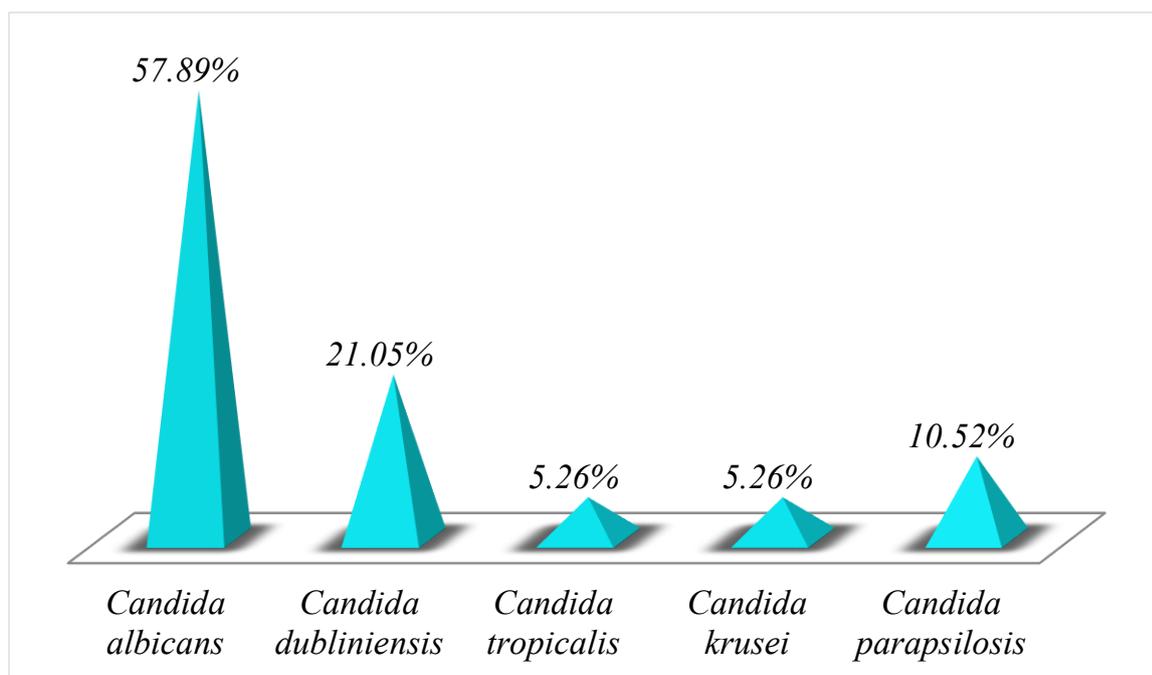


Figure 19 Répartition par espèce des souches de *Candida* responsables de candidémie (toutes techniques confondues) diagnostiqués dans le laboratoire de parasitologie-mycologie de 2020 à l'HCA

D'après la (figure19), la souche *C. albicans* est la plus présente est responsable de candidémie dans les services de parasitologie et mycologie d'Ain naâdja avec un pourcentage de 57.89% suivi par *C. dubliniensis* avec un pourcentage de 21.05% ; cependant *C. tropicalis* et *C. krusei* et *C. parapsilosis* sont peu présentes avec un pourcentage qui ne dépasse pas les 11%

II. Discussion

Notre étude révèle une nette prédominance de patients du sexe masculin (37 patients sur les 56 soit 66.07%). Nos patients sont âgés en moyenne de 47.07 ans. Ces données sont retrouvées dans la plupart des études sur les candidémies (Quindós, 2014). En France, l'Observatoire Des Levures en Ile-de-France décrit des chiffres similaires concernant le sexe mais une petite différence pour l'âge retrouvé une moyenne d'âge de 60 ans et 60% d'hommes (Grillot, 2013). Les causes de prédominance masculine ne sont pas encore clairement identifiées mais l'incidence plus importante des hémopathies et cancers gastro-intestinaux chez l'homme pourrait expliquer cette répartition (Toubas, 2013). Cette prédominance se retrouve également dans d'autres études traitant des candidémies (Riche *et al*, 2002).

De façon attendue, les services les plus touchés par les épisodes de candidémies à l'HCA sont les principaux services accueillant les patients à risque : les services de Pneumologie (33.33%) et d'hématologie (20.37%), comme illustré dans de nombreuses publications scientifiques (Tortorano *et al*, 2006), (Leroy *et al*, 2009), (Arendrup *et al*, 2011) et (Eggimann *et al*, 2003). Selon les dernières données de l'ODL (Observatoire Des Levures), 40 % des candidémies survenaient chez des patients hospitalisés en réanimation et 17 % chez des patients ayant une hémopathie (Grillot, 2013). Rappelons que la levure du genre *Candida* est un champignon opportuniste qui exerce son pouvoir pathogène chez des sujets dont les réactions de défense sont fragilisées.

Le diagnostic mycologique effectué à partir des différents prélèvements de nos malades a donné un nombre important de positifs (75%)

La proportion de candidémies causées par des souches de *Candida* résistantes ou de sensibilités diminuées aux principaux antifongiques demeure faible dans la population de notre étude, comme ceci est décrit dans l'ensemble des publications européennes (Tortorano *et al*, 2006).

Le diagnostic immunologique basé sur la recherche des Antigènes et des Anticorps peut aider au diagnostic de candidose invasive, il n'en est pas pour autant le signe pathognomonique. Ainsi le champignon étant un saprophyte habituel des voies digestives, on peut avoir une sensibilisation à la levure et posséder un certain taux d'anticorps.

Individuellement ces deux tests avaient des sensibilités médiocres pour le diagnostic de candidoses invasives. Avec les niveaux de seuil de positivité indiqués par le fabricant, l'antigène a été détecté chez 3/28 des patients (10.71 %) et les anticorps étaient positifs dans 4/28 cas (14.28 %). Quand ces tests étaient associés, la sensibilité de détection était de 25 % ; néanmoins celle-ci était de 53.57 % lorsque les résultats intermédiaires étaient considérés comme positifs. Des meilleures performances diagnostiques étaient ainsi obtenues en utilisant les valeurs intermédiaires de 62,5 pg/mL et 3.2 UA/mL comme seuils de positivité pour l'antigène et les anticorps respectivement. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature (Pianetti, 2015).

La recherche d'anticorps anti-*Candida* est plus fréquemment positive que l'antigénémie malgré la présence d'une immunodépression sévère d'étiologies diverses (chimiothérapies myéloablative, traitements immunosuppresseurs...) chez un grand nombre de patients. Ceci s'explique par la fugacité des antigènes, phénomène connu dans l'immunité au cours des

mycoses. Il s'agit d'un paramètre pouvant être d'un grand intérêt dans le diagnostic des mycoses car il signe la présence des champignons dans les tissus. Toutefois 28.57 % des résultats des anticorps étaient intermédiaires, la réponse humorale est en effet souvent diminuée chez les personnes immunodéprimées. Comme Sendid et al. l'avaient initialement rapporté dans leur étude (Sendid *et al*, 1999) puis d'autres (Yera *et al*, 2001) (Prella *et al*, 2005), la détection combinée d'anticorps et d'antigène dans le sérum a permis d'augmenter de façon considérable la sensibilité du diagnostic immunologique. D'autre part, l'étude de la cinétique des anticorps chez les sujets hospitalisés, est d'un apport certain y compris chez ceux qui ont des taux faibles. L'appréciation des résultats se fait sur l'augmentation des taux et non par rapport au seuil de positivité.

Une revue de la littérature de 14 études principalement rétrospectives sur une période de plus de 10 ans utilisant la méthode ELISA PLATELIA® (Bio-rad) représentant au total 453 patients nous a permis de comparer nos résultats (Mikulska *et al*, 2010). La population étudiée était aussi hétérogène. D'après ces résultats, il apparaît évident que la faible sensibilité de l'antigénémie ne permet pas à elle seule de réaliser le diagnostic de Candidose invasive. Plusieurs explications peuvent justifier ces chiffres.

Tout d'abord cette moindre sensibilité en cas de Candidose invasive peut s'expliquer par le caractère précoce et très transitoire de l'apparition de l'antigénémie (Herent *et al*, 1992). Ces Antigènes ont une demi-vie courte et ont une élimination hépato-rénale.

La formation de complexes immuns peut aussi empêcher la détection des antigènes. Verduyn et son équipe avaient remarqué que les patients non neutropéniques avaient plus fréquemment des anticorps positifs que des antigènes. Leur hypothèse était que la présence d'anticorps facilitait la clairance de l'antigène par formation de complexe immun (Verduyn-Lunel *et al*, 2009).

D'autres causes sont également possibles :

- Les traitements antifongiques peuvent entraîner une diminution de l'antigénémie, or cette donnée n'a pas été recherchée pour les différents prélèvements des sérums.
- Nos sérums avaient pu subir plusieurs cycles de congélation-décongélation pour la réalisation des analyses, ce qui a également pu altérer ces antigènes.

Par conséquent, le moment au cours de l'infection auquel l'échantillon est prélevé, un échantillon inadéquat, une piètre préparation de l'échantillon ou un mauvais stockage peuvent être responsables d'un résultat négatif.

La technique ELISA est une bonne technique au plan de la spécificité et de la sensibilité. Elle serait même un peu trop sensible et pouvant donner des faux positifs. Elle a le grand avantage d'être automatisée et a le mérite de traiter un nombre important de sérums en une fois afin de faire un gain de temps et réaliser un diagnostic rapide.

La proportion de *C. albicans* retrouvée sur la technique moléculaire PCR ainsi que sur l'ensemble de ce travail est en accord avec les données de la littérature. En effet, *C. albicans* est l'espèce retrouvée dans plus de la moitié des prélèvements à l'HCA de Ain naâdja (57.89 %) comme dans la majorité des études européennes et américaines sauf dans quelques études menées en Espagne (Tortorano *et al*, 2006 ; Arendrup, 2010).

D'autre part, si l'on compare ces données avec des études françaises et américaines publiées ces dernières années, on remarque que la distribution de *Candida* spp. autres que *C. albicans* ne dépasse pas 50 %.

Les principales espèces retrouvées ici sont *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*. Ces données sont en accord avec les données de la littérature. Cependant on retrouve sur la cinquième et sixième place *C. krusei* puis *C. tropicalis*, toujours en accord avec les résultats de la littérature (Tortorano *et al*, 2006) (Bouza *et al*, 2008). Ainsi, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, et *C. tropicalis* représentent plus de 90 % des isolats issus de prélèvements profonds. Mise à part *C. krusei*. Bien que *Candida albicans* soit l'espèce la plus fréquemment incriminée, on note que l'incidence croissante d'isolats de *Candida non albicans* est de plus en plus décrite. Cet accroissement est attribué à l'usage des antifongiques en prophylaxie chez les patients et aux techniques de soins de plus en plus invasives. (Matta *et al*, 2007)

Il serait donc intéressant d'étudier la répartition locale des différentes espèces à l'HCA sur plus grande échelle et sur plusieurs années pour confirmer ces résultats afin de vérifier l'absence d'émergence de *C. glabrata* qui est normalement décrite (Quindós, 2014).

La prédominance de *C. albicans* est expliquée par sa capacité importante à l'adhésion aux muqueuses grâce à la présence des récepteurs cellulaires au ligand *Candida* permettant l'expression de ses facteurs de virulence, sa germination et sa transformation de l'état saprophyte sous forme de blastospores, à l'état pathogène sous forme filamenteuse. (Grigoriou,

et al, 2006). Elle possède une distribution hétérogène en fonction des régions géographiques (se référer à l'annexe 7).

La candidose invasive est grave et son pronostic, qui reste très sévère malgré les nouveaux antifongiques, est variable selon le terrain sous-jacent et l'espèce responsable.

Il est important de connaître le profil de l'épidémiologie local afin d'adapter au mieux le traitement antifongique c'est pour cela qu'il est important de poursuivre les identifications afin de personnaliser les traitements. La sensibilité aux antifongiques évolue sans cesse du fait surtout d'une utilisation non orientée. Il s'avère donc très utile de procéder aux identifications poussées afin de pouvoir instaurer le traitement adéquat. Le tableau des sensibilités des principales espèces de *Candida* aux antifongiques est présenté en Annexe 8

Traitement des candidoses invasives

Tous les patients atteints par une candidémie doivent être traités par un antifongique et le plus tôt possible. La mortalité est inférieure à 15 % chez des patients atteints de candidémie et traités dans les 12 heures qui suivent les résultats de la culture et passe à 41 % chez les patients traités à partir du troisième jour (Garey *et al*, 2006 ; Morrell *et al*, 2005).

Les molécules antifongiques disponibles sur le marché pour traiter les candidémies incluent les azolés, les échinocandines et l'amphotéricine B dans sa formulation lipidique (Pappas *et al*, 2004). Il est également recommandé d'enlever les cathéters puisqu'une étude démontre que ceci augmente la clearance des *Candida* du sang (Rex *et al*, 1995).

- Le fluconazole est le traitement de référence pour les candidémies. Cet agent est actif sur la plupart des *Candida*. Cet antifongique a peu d'effets secondaires et est relativement bon marché. Cependant, il est peu efficace contre *C. glabrata* et inactif contre *C. krusei*.
- L'amphotéricine B, un polyène, a été le traitement de prédilection pendant les 30 dernières années pour soigner les candidémies. Les effets secondaires importants liés à cette molécule, notamment une atteinte rénale, ont obligé les laboratoires pharmaceutiques à produire de l'amphotéricine B sous forme liposomale afin d'atténuer ces effets indésirables, mais ce n'est plus le traitement de choix pour soigner les candidémies.
- La caspofongine est aussi efficace que l'amphotéricine B mais reste moins toxique pour les reins que cette dernière. Il manque cependant des données fiables concernant l'efficacité de la caspofongine comparée au fluconazole ou à l'amphotéricine B.
- Le voriconazole a un spectre d'action supérieur au fluconazole puisqu'il est actif sur quelques champignons filamenteux et sur les espèces de *Candida* résistantes comme *C. glabrata* et *C. krusei*. Son indication dans les candidoses comprend les infections graves à *Candida* résistantes au fluconazole et le traitement des candidémies chez les patients neutropéniques.
- L'itraconazole a un spectre d'activité plus étendu que le fluconazole mais il reste peu indiqué dans le traitement des candidoses invasives en raison d'une mauvaise biodisponibilité orale et d'un risque de défaillance cardiaque sous forme intraveineuse.

D'autres antifongiques à activité anti-*Candida* ont vu le jour depuis quelques années comme la micafongine, une nouvelle échinocandine, ou le posaconazole. Des études restent encore à

entreprendre pour certaines de ces nouvelles molécules afin d'évaluer leur réelle efficacité comparée aux traitements déjà en place et pour pouvoir les proposer sur le marché (Karthaus et al, 2007).

Prophylaxie

La prophylaxie généralement se divise en deux types : prophylaxie générale et prophylaxie individuelle. (Pasteur *et al*, 1982)

1) Prophylaxie générale

Elle se résume comme suit :

- Education sanitaire,
- Dépistage et traitement des porteurs sains,
- Stérilisation du matériel utilisé au niveau du service de gynécologie,
- Utilisation d'écouvillons stériles,
- Contrôle systématique, afin de prévenir la survenue d'une propagation d'infection.

2) Prophylaxie individuelle

Le fluconazole est, dans la majorité des cas, utilisé en prévention des candidoses chez les patients immunodéprimés en raison de sa meilleure tolérance par les patients tout au long du traitement comparée à l'amphotéricine B. Mais, l'utilisation prolongée de fluconazole comme prophylaxie et le traitement des candidoses orales récurrentes chez les patients atteints par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) conduisent à une augmentation du nombre de cas liés à des espèces résistantes à cette molécule. Ainsi, compte tenu de la possibilité de sélectionner des souches résistantes, l'utilisation d'antifongiques dans un but préventif doit être décidée avec circonspection (Martin, 1999).

Conclusion

Le genre *Candida sp.* est responsable d'infections graves chez le patient immunodéprimé (neutropénie, corticothérapie à forte dose au long cours, greffés...). Cette infection opportuniste est fréquemment mortelle puisque sa létalité est estimée à environ plus de 50 %.

La stratégie retenue dans cette étude épidémiologique a été de se limiter aux seuls isolats issus des prélèvements profonds et correspondants donc aux candidoses profondes. Il n'a donc été utilisé aucun isolat provenant de prélèvements superficiels. Cette étude a donc eu pour objectif d'évaluer, l'épidémiologie fongique évolutive chez les patients à risque de candidoses viscérales.

Le fait d'inclure dans cette étude tous types de prélèvements présentait l'avantage de collecter un grand nombre d'isolats. Les infections profondes à *Candida* sont peu fréquentes. Ainsi, sur la courte durée de l'étude, nous avons pu répertorier 56 isolats provenant de prélèvements d'origine profonde, ce qui est suffisant pour dégager des tendances épidémiologiques statistiquement significatives.

Les performances de la détection des Ac et des Ag dans les sérums sont liées à la fréquence des tests réalisés chez les patients ; afin d'augmenter la sensibilité et la précocité de la positivité du test, un suivi régulier des patient à risque est important. Néanmoins, la présence d'Ac anti-*Candida* chez les patients suspects de candidose systémique n'est pas d'interprétation facile du fait de leur présence possible chez des porteurs sains. Elle ne permet pas toujours de différencier l'infection et la colonisation intense, mais cette dernière est un facteur de risque majeur de Candidose invasive.

Malgré la petite taille de cette étude rétrospective, ces observations suggèrent que l'Ag et les Ac puissent être utiles pour le diagnostic précoce des Candidoses invasives chez les patients à risque, en particulier lorsque les cultures sont négatives ou que l'histopathologie n'est pas réalisable. Le plus intéressant est de faire l'étude de la cinétique des anticorps pour voir s'il y a ascension ou pas. La simplicité, la standardisation et le coût abordable des tests représentent les avantages majeurs de cette approche diagnostique. Des études prospectives seraient nécessaires pour déterminer l'impact d'une sérologie positive sur la prise en charge et le devenir des patients à risque de Candidoses invasives.

Dans un tel contexte, il nous paraissait donc opportun d'évaluer une nouvelle technique diagnostique in vitro permettant de faire bénéficier au patient d'une thérapeutique plus précoce et donc mieux adaptée au genre *Candida sp.* Nous avons alors orienté notre étude vers la biologie moléculaire. Elle permet de différencier entre deux souches phénotypiquement identiques *Candida albicans* et *Candida dubliniensis*. Malgré le cout élevé de ce teste il reste le plus fiable avec des résultats indubitables. Il apporte donc un argument supplémentaire pour confirmer ou non un diagnostic précoce, afin de pouvoir prendre en charge le plus rapidement possible le patient.

Au terme de ce travail, et dans le cadre du diagnostic de laboratoire, compte tenu du faible nombre de patient inclus dans notre étude, biais inhérent à cette pathologie, il est difficile de répondre sur la valeur diagnostique de notre technique. Notre souhait est de réévaluer sur une plus large population. Il s'avère nécessaire de poursuivre ce travail en essayant d'optimiser les performances des techniques.

Bibliographie

- Anonyme. (2014). Candidoses, Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL), UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone, p : 612.
- Arendrup M.C. (Oct 2010). Epidemiology of invasive candidiasis. Department of Microbiological Surveillance and Research, Division of Microbiology and Diagnostics, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark. *Curr Opin Crit Care*. 16 : 445-452.
- Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. (Sept. 2011). Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. *J Clin Microbiol*. 49(9):3300-3308.
- Aubert D, Puygauthier-Toubas D, Leon P, Pignon B, Foudrinier F, Marnef F, et al. (juin 1996). Characterization of specific anti-Candida IgM, IgA and IgE: diagnostic value in deep-seated infections. *Mycoses*. 39(5-6):169-76.
- Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, Horn D. (Aug. 2012). The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 73(4):293-300.
- Barnett J. A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (2000). "Yeasts : Characteristics and Identification." Cambridge University Press 3rd edition, 1139 pages.
- Belkaid M, Zenaidi N, Tabet O, Kello D. (Sept. 1992). Cours de parasitologie, Tome 3. Alger, ALgerie : Edition : OPU (Office des publications universitaire). 3539 : 247 p.
- Benedict, S. and Colagregco, J., (1994). Fungal infections associated with malignancies, treatments, and AIDS. *Cancer Nurs*. 17: 411-417.
- Bodey, G. P., Mardani, M., Hanna, H. A., Boktour, M., Abbas, J., Girgawy, E., Hachem, R. Y., Kontoyiannis, D. P. and Raad, II, (2002). The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med*. 112: 380- 385.
- Bouchara J-P, Pihet M, De Gentile L, Cimon B, Chabasse D. (2010). Les levures et levuroses. *Bioforma*. Paris; volume 44, 200 p.
- Bougnoux M-E, Espinasse F. (mars 2003). Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *Rev Fr Lab*. (351):67-71.
- Bouza E., Munoz P. (2008). Epidemiology of candidemia invasive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2 : 87-91.
- Buffo, J., Herman, M. A. and Soll, D. R., (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. Department of Zoology, University of Iowa, Iowa City, Iowa, U.S.A. *Mycopathologia*. 85: 21-30.

- Caraës, N., (2016). Épidémiologie des candidoses profondes au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. Sciences pharmaceutiques. HAL Id: dumas-01323570, 200 p.
- Chabasse D., Robert R., Marot A., Pihet M. (2006). *Candida* pathogènes. Paris, Lavoisier, Editions TEC et DOC, 182 p.
- Chabasse D, Pihet M, Bouchara J-P., 2009. Emergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine. Revue Francophone des Laboratoires. Vol N° 416 - p.71-86.
- Chabasse D, Guiguen C, Contet-Audonneau N. (1999). Mycologie médicale. Éditeur Elsevier / Masson. Paris; 319 p.
- Cole, G. T., Seshan, K. R., Phaneuf, M. and Lynn, K. T., (1991). Chlamyospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. Can J Microbiol. 37: 637-646.
- Coulibaly K. (2003). Le diagnostic étiologique de l'écoulement vaginal et évaluation de sa prise en charge syndromique par les prescripteurs. Th. Doct. En médecine, Faculté de médecine et de pharmacie. : Université de Bamako, P : 15.
- Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect.;18:9-18.
- Dupont, P. F. 1995. *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. Journal of the American Podiatric Medical Association 85:104-115.
- Edwards, J. E. (2009). *Candida* Species. In G. L. Mandell, J. E. Bennett & R. Dolin (Eds.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. (7th ed.,). USA: (c) Churchill Livingstone, New York.
- Eggimann P., Pittet D. (2000). Candidoses invasives en réanimation. Schweiz. Med. Wochenschr, 130: 1525-1537.
- Eggimann P., Garbino J and Pittet D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet. Infect. Dis. 3: 685-702.
- Euzeby J. (1994). Mycologie médicale comparée. Edition Mérieux. Fondation manuel, Tome II, 88-251.
- Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE. (Août 2009). Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. Diagn Microbiol Infect Dis. 64(4):402-7.
- Fricke-Hidalgo, H., Lebeau, B., Kervroedan, P., Faure, O., Ambroise-Thomas, P., Grillot, R. (1995). AuxacolorTM, a new commercial system for yeast identification: evaluation of 182 strains comparatively with ID 32C. Ann. Biol. Clin. (Paris). 53(4): 221-5.
- Fridkin S.K., and W. R. Jarvis W. (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin. Microbiol. 9, pp 499-511
- Garnier M, Delamare V. (2002) Dictionnaire des termes de médecine. 27ème édition, Maloine, Paris. 1001 pages.

- Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, et al. (juill 2006). Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 43(1):25-31.
- Garrigues ML, Mallie M, Dupont B, Bastide JM, Carls B, Dromer F. (Novembre 1996). Evaluation d'une galerie pour tester la sensibilité des levures aux antifongiques, Colloque de la Société Française de Mycologie Médicale, Institut Pasteur, 22-23.
- Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, T. G. and Vilgalys, R., (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 12473-12477.
- Grigoriou O, Baka S, Makarakis E, hassiakos D, kapparos G, kouskouni E., 2006. Prevalence of clinical vaginal candidiasis in a university hospital and possible risk factors. *Eur J obstet Gynecol Repordbiol ;* 126 : 121_5.
- Grillot R. (Avr. 2013) Numéro thématique Mycoses invasives en France : épidémiologie, enjeux diagnostiques et thérapeutiques. *BEH - Bull Épidémiologique Hebd ;* (12- 13):107-28.
- Grillot R., 1996. Les mycoses humaines: démarche diagnostic. Collection option Bio., Elsevier. 392 pages.
- Guignard J.L., Bouchet P., Madulo G., Regli P. (1989). *Mycologie générale et médicale. Abrégé Masson,* 107-120,108-109.
- Herent P, Stynen D, Hernando F, Fruit J, Poulain D. (Août 1992). Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. *J Clin Microbiol.* 30(8):2158-64.
- Kaouech E. (2003). Diagnostic biologique des parasitoses et mycoses opportunistes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU La Rabta, Tunisie, P 8.
- Karthaus, M., and O. A. Cornely. (2007). Treatment options in candidaemia. *Mycoses* 50:44-49.
- Koenig H. (1995). *Guide de mycologie médicale.* Edition Ellipses, Paris. 288 pages.
- Kennedy MJ, Volz PA. (Sep. 1985). Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun.* 1;49(3):654–63.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (1998). *The Yeasts. A taxonomic study, Fourth Revised and Enlarged Edition.* Editions Elsevier.1076 pages.
- Lagane, C. (2007). Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR-gamma dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida Albicans*. Implication de PPAR-gamma.

- Lepape A. (1999). Candidoses graves en réanimation. In : BLANLOEIL Y, eds. Conférences d'actualisation 1999, 41ème Congrès national d'anesthésie et de réanimation, Paris, Elsevier, 495-503.
- Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. (Mai 2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). Crit Care Med. 37(5):1612-8.
- Lewis R.E. (2009 Jul). Overview of the changing epidemiology of candidemia. Curr Med Res Opin. 25(7):1732–40.
- Martin, M. V. (1999). The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. J Antimicrob Chemother 44:429-37.
- Matta, D.A. Almeida, L.P. Machado,A.M. Azevedo,A.C. Kusano, E.J. Travassos,N.F. Salomao,R. Colombo, A.L. (2007) Antifungalsusceptibility of 1000 *Candida* bloodstreamisolates to 5 antifungaldrugs: results of a multicenterstudyconducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003.Diagnostic microbiology and infectious disease, 57 : 399- 404.
- Mavor, A. L., Thewes, S. and Hube, B., (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. Curr Drug Targets. 6: 863-874.
- Meersseman W, Lagrou K, Spriet I, Maertens J, Verbeken E, Peetermans WE, et al. (Sep. 2009). Significance of the isolation of *Candida* species from airway samples in critically ill patients: a prospective, autopsy study. Intensive Care Med. 1;35(9):1526–31.
- Méar, J.B., (2014). Etude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II. Français. ffNNT : 2014LIL2S013ff. fftel-01084801f.
- Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. (2010). The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. Crit Care. 14(6):R222.
- Mimoz O. (2000). Colonisation et infection par les levures en milieu chirurgical, In : 18èmes journées internationales de mise au point en anesthésie-réanimation, Paris,: 633- 637.
- Morgan J. (2005). Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. Curr .Infect. Dis. Rep. 7:429-39.
- Morrell, M., V. J. Fraser, and M. H. Kollef. (2005). Delaying the empiric treatment of *candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. Antimicrob Agents Chemother 49:3640-5.
- Odds FC. (1988). *Candida* and candidosis, 2nd edition.Baillière Tindall, London. 476 pages.

- Pappas, P. G., J. H. Rex, J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, T. J. Walsh, and J. E. Edwards. (2004). Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38:161- 89.
- Pasteur, L., in J. Hambourger. (1982). *Dictionnaire de médecine*. Ed. flammariion. p896.
- Patterson T.F. (2005). Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 366:1013-25.
- Peleg AY, Hogan DA, (2010). Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Micro*. May 1;8(5):340–9.
- Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Messer, S. A., Houston, A., Coffman, S. and Hollis, R. J., (2000). Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother*. 44: 747-751.
- Pihet M, Marot A. (mars 2013). Diagnostic biologique des candidoses. *Rev Francoph Lab*. (450):47-61.
- Pramayon, Sylviane. (2001). Les candidoses systémiques en réanimation : difficultés diagnostiques et thérapeutiques, attitude consensuelle actuelle. Th. doct. : Pharmacie. Grenoble. Université Joseph Fourier : faculté de pharmacie de Grenoble. P17, 18, 33, 35, 38.
- Prella M, Bille J, Pugnale M, Duvoisin B, Cavassini M, Calandra T, et al. (Févr 2005). Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 51(2):95-101.
- Quindós G. (Mars 2014). Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol*. 31(1):42-8.
- Rex, J. H., J. E. Bennett, A. M. Sugar, P. G. Pappas, J. Serody, J. E. Edwards, and R. G. Washburn. (1995). Intravascular catheter exchange and duration of candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Clin Infect Dis* 21:994-6.
- Riche H., Roux P., Des Champs C., Esnault Y., Andremont A. (2002). Candidemia in French Hospitals : incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect*. 8 : 405-412.
- Ruhnke, M. (2006). Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non- *Candida albicans* yeasts. *Current Drug Targets*, 7(4), 495-504.
- Samaranayake, L. P., Fidel, P. L., Naglik, J. R., Sweet, S. P., Teanpaisan, R., Coogan, M. M., Blignaut, E. and Wanzala, P., (2002). Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis*. 8 Suppl 2: 151-160.
- Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. (Mai 1999) New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol*. 37(5):1510-7.
- Tortorano A.M., Kibbler C., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L and Grillot R. (2006). Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 27: 359- 66.
- Toubas D. (mars 2013). Epidémiologie des candidoses invasives. *Rev Francoph Lab*. (450):27-36.

Trick, W. E., S. K. Fridkin, I. R. Edwards, R. A. Hajjeh, and R. P. Gaynes. (2002). Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin. Infect. Dis.* 35, pp 627-630

Verduyn Lunel FM, Donnelly JP, van der Lee H a. L, Blijlevens NMA, Verweij PE. (Avr. 2009). Circulating *Candida*-specific anti-mannan antibodies precede invasive candidiasis in patients undergoing myelo-ablative chemotherapy. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 15(4):380-6.

Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. (Déc 2001). Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 20(12):864-70.

Zöller, L., Krämer, I., Kappe, R., Sonntag, H.G. (1991) Enzyme Immuno Assay for Invasive *Candida* Infections: Reactivity of somatic Antigens of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1860 – 7.

Annexes

Annexe 1 : les différentes répartitions des patients de l'HCA

1. Répartition des patients selon leur provenance

Tableau 1 : Répartition des malades selon leur provenance

Services	Nombre des patients (n = 56)	Pourcentage des patients (%)
Hématologie	11	20.37%
Pneumologie	18	33.33%
ORL	1	1.85%
Urgence	1	1.85%
Urgence pédiatrie	1	1.85%
Néphrologie	1	1.85%
Maladie infectieuse	3	5.55%
Externe	8	14.81%
Bactériologie	1	1.85%
Oncologie	1	1.85%
Réanimation pédiatrique médicale	2	3.70%
Pédiatrie	4	7.40%
Gastro-entérologie	1	1.85%
Olivier	1	1.85%

1.2 Répartition des malades selon l'âge

Tableau2 : Répartition des patients selon l'âge au HCA de Ain naadja, tous services

Age <35	Age >35
(36.95%)	(63.04%)

1.1. Répartition des malades selon le sexe

Tableau 3 : Répartition hommes/femmes dans les candidoses profondes au HCA de Ain naâdja, tous services confondus

Femmes	Hommes
37 (66.07%)	19 (33.92%)

1.4. Répartition des malades selon les principaux signes cliniques

Tableau 4 : Répartition des signes cliniques de la candidose profonde selon la fréquence (n = 56)

Signes cliniques	Effectif	Pourcentage (%)
Otite externe	1	1.78%
Brulure mictionnelle	1	1.78%
Leucorrhée	1	1.78%
Toux	6	10.71%
Douleur thoracique	5	8.92%
Otorrhée	4	7.14%
Lymphome	2	3.57%
Surinfection sur DDB	3	5.35%
Micro abcès cérébraux	1	1.78%
Mucite leucémie	3	5.35%
Aphthose buccale	2	3.57%
LNH	1	1.78%
Fièvre	4	7.14%
Douleur abdominales	1	1.78%
Langue noire	1	1.78%
VIH	1	1.78%
Asthme d'effort	1	1.78%
Hyperéosinophilie sanguine	1	1.78%
Septicémie staphylocoque	1	1.78%
Hyponatrémie	1	1.78%
Hypokaliémie	1	1.78%
Syndrome infectieux	3	5.35%
Diabète déséquilibré	1	1.78%
Condensation pulmonaire excavée	1	1.78%
Détresse respiratoire aiguë (intubé, ventilé)	2	3.57%
Crachat purulent	1	1.78%
Hémoptysie	1	1.78%
Aplasie médullaire	1	1.78%
Méningite à germe indéterminé	1	1.78%
Hyperéosinophilie pulmonaire	1	1.78%
Pneumonie	1	1.78%
Sinusite chronique	1	1.78%

1.5.1. Répartition des malades selon les services et type de prélèvements

Tableau 5 : Distribution des patients au cours d'une candidose profonde selon les services et type de prélèvements

	Hémocultures	LBA	Sang	crachats	Ecouvillon buccal	Urine	Selles	Auriculaire
Hématologie	/	/	/	2	5	2	/	/
Pneumologie	1	4	8	3	/	/	/	/
ORL	/	/	/	/	/	/	/	1
Urgence	/	/	/	/	1	/	/	/
Urgence pédiatrie	/	/	1	/	/	/	/	/
Néphrologie	/	/	/	/	/	1	/	/
Maladies infectieuses	/	/	1	/	2	/	/	/
Bactériologie	/	/	/	/	/	/	1	/
Oncologie	/	/	1	/	/	/	/	/
Réanimation pédiatrique médicale	/	/	2	/	/	/	/	/
Pédiatrie	/	/	3	/	/	/	/	/
Gastro-entérologie	/	/	1	/	/	/	/	/
Olivier	/	/	1	/	/	/	/	/

Annexe 2 : Liste du matériel de laboratoire utilisé dans les laboratoires de parasitologie et de mycologie (verrerie/consommables et appareillage)

Verrerie	Matériel consommable
- Tubes de conservation	- Anse de platine
- Tubes secs stériles	- Pipettes Pasteur
- Eprouvettes	- Pipettes réglables automatiques
- Fioles	- Embouts stériles
- Bacs de coloration et de lavage	- Pissettes
- Plaques en verre	- Portoirs pour les tubes
	- Entonnoir
	- Lames et lamelles
	- Papier Wattman
	- Pots et écouvillons stériles
	- Gants stériles.

Annexe 3 : Appareils utilisés dans les laboratoires de parasitologie et de mycologie

Nom de l'appareil

Photo prise de l'appareil

**Poste de sécurité
microbiologique II,
(Originale ; 2020)**



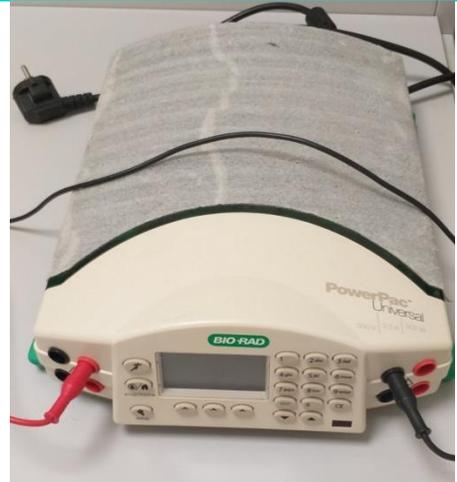
**Le thermocycleur MyCycler™
Thermal Cycler System,
(Originale ; 2020)**



**Cuve d'électrophorèse
SUB20/SUB20C submarine 20
x 20 cm, (Originale ; 2020)**



**Générateur PowerPac™ Basic
Power Supply, (Originale ;
2020)**



**Transluminateur UV de la
marque vilber lourmat,
(Originale ; 2020)**



**Laveur de barrettes de
microplaques ELx50™
BioTek™, (Originale ; 2020)**



**Lecteur de microplaques
EL×800 de la marque BioTek
(Originale ; 2020)**



Annexe 4 : Liste des réactifs et du matériel fournis dans les coffrets suivant :

1) Coffret Auxanogramme colorimétrique pour l'identification des principales levures d'intérêt médicale (AUXACOLOR™ 2)

Coffret de 20 tests, code 56513, contenant :

- 20 × R1 microplaques de 16 cupules sous emballage individuel
- 20 adhésifs
- 20 × R2 milieux de suspension prêts à l'emploi
- 1 carnet de feuilles de résultats
- 1 notice

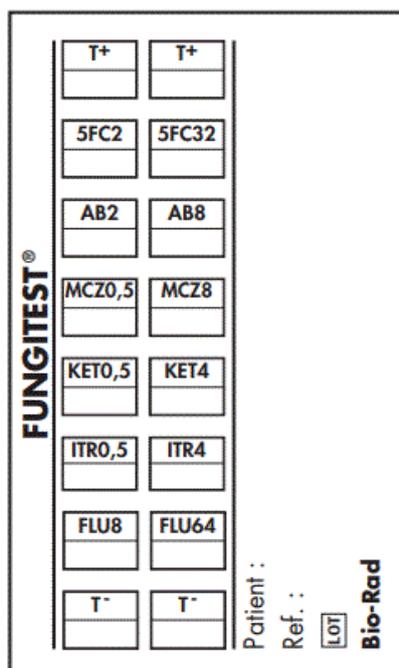
2) Coffret Antifongiramme pour la détermination de la sensibilité des levures aux antifongiques (FUNGITESTE™)

FUNGITEST® comprend :

- Microplate : 10 microplaques de 16 cupules sous emballage individuel - 10 adhésifs
- Suspension medium : 10 flacons contenant de 3 ml de milieu de suspension

Chaque microplaque est conditionnée sous sachet individuel en aluminium avec un adhésif et un sachet déshydratant.

Schéma de la microplaque



T + ⇨ Témoins positifs

5 FC ⇨ 5-Fluorocytosine (2-32 µg/ml)

AB ⇨ Amphotéricine B (2-8 µg/ml)

MCZ ⇨ Miconazole (0,5-8 µg/ml)

KET ⇨ Kétoconazole (0,5-4 µg/ml)

ITR ⇨ Itraconazole (0,5-4 µg/ml)

FLU ⇨ Fluconazole (8-64 µg/ml)

T - ⇨ Témoins négatifs

3) Coffret SERION ELISA classic *Candida albicans*

a) Recherche des anticorps circulants IgA/IgG/IgM

Composants pour le test	Pièces / Volume
Barrettes de huit puits unitaires coâtés avec un antigène (au total 96) MTP, 1 cadre. Le produit de coating est inactivé.	12 pièces
Sérum standard (prêt à l'emploi) STD, Protéine sérique humaine contenant du tampon phosphate; négatif pour l'AcantiVIH, HBs-Ag (antigène de surface du virus de l'hépatite B) et l'Ac anti-VHC; agent de conservation : < 0,1 % azoture de sodium; colorant : Amaranth O	2 x 2 ml
Sérum pour le contrôle négatif (prêt à l'emploi) NEG, Protéine sérique humaine contenant du tampon phosphate; négatif pour l'AcantiVIH, HBs-Ag (antigène de surface du virus de l'hépatite B) et l'Ac anti-VHC; agent de conservation : < 0,1 % azoture de sodium; colorant : Vert de lissamine V	2 ml
Conjugué anti IgA, anti IgG ou anti IgM humain (prêt à l'emploi) APC, IgAAnti-humain, IgG ou anticorps polyclonalIgM, conjugué à la phosphatase alcaline, stabilisé avec une solution contenant des protéines; agent de conservation : < 0,1 % méthylisothiazolone et < 0,1 % bromnitrodioxane	13 ml
Concentré de solution de lavage (en quantité suffisante pour 1000 ml) WASH, Solution de chlorure de sodium avec Tween 20 et 30 mM Tris/HCl, pH 7,4; agent de conservation : < 0,1 % azoture de sodium	33,3 ml
Tampon de dilution (prêt à l'emploi) DILB, Protéine contenant du tampon phosphate avec Tween 20; agent de conservation : < 0,1 % azoture de sodium; colorant : 0,01 g/l bleu de bromophénol	2 x 50 ml

Solution d'arrêt (prêt à l'emploi) STOP, < 0,1 N Hydroxyde de sodium, 40 mM EDTA	15 ml
Substrat (prêt à l'emploi) pNPP, Para-nitrophénylphosphate dans un solvant ne contenant pas de tampon; agent de conservation : < 0,1 % azoture de sodium	13 ml
Certificat de contrôle de la qualité avec courbe d'étalonnage et tableau d'évaluation INFO, (quantification des anticorps en IU/ml ou U/ml)	2 pages

b) Recherche des antigènes circulants

Composants pour le test	Pièces / Volume
Séparez chaque barrette de test de microtitraion, chacun à huit puits uniques recouverts d'anticorps, (au total 96) MTP, 1 cadre.	12 pièces
Sérum standard STD, Candida albicans antigen dans le sérum humain supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF) ; négatif pour l'Ac anti-VIH, HBs-Ag (antigène de surface du virus de l'hépatite B) et l'Ac anti-VHC; agent de conservation : < 0,1 % azoture de sodium.	3 x 3 ml
Sérum de contrôle négatif NEG, Sérum humain supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF) ; négatif pour l'Ac anti-VIH, HBs-Ag (antigène de surface du virus de l'hépatite B) et l'Ac anti-VHC; agent de conservation : < 0,1 % azoture de sodium.	2 x 3 ml
Conjugué anti-Candida albicans (prêt-à-l'emploi) PODCR, Anticorps anti-Candida albicans conjugué à la peroxydase de raifort ; stabilisé avec une solution de stabilisation de protéine contenant un détergent ; agent de conservation : 0,1 % ProClin® 300.	13 ml
Concentré de solution de lavage (en quantité suffisante pour 1 500 ml) WASH, Solution de sel tamponné avec du TRIS avec Tween 20 ; 30 fois concentrée ; agent de conservation : < 0.1 % ProClin® 300.	2 x 25 ml
Tampon de dilution SAMB, Solution acide sans agent de conservation.	15 ml
Solution d'arrêt STOP, Acide sulfurique à 0,5 N.	13 ml
Solution de substrat (prêt à l'emploi) TMB, Solution de substrat de peroxyde d'hydrogène TMB ; agent de conservation : < 0.01 % Kathon CG.	13 ml

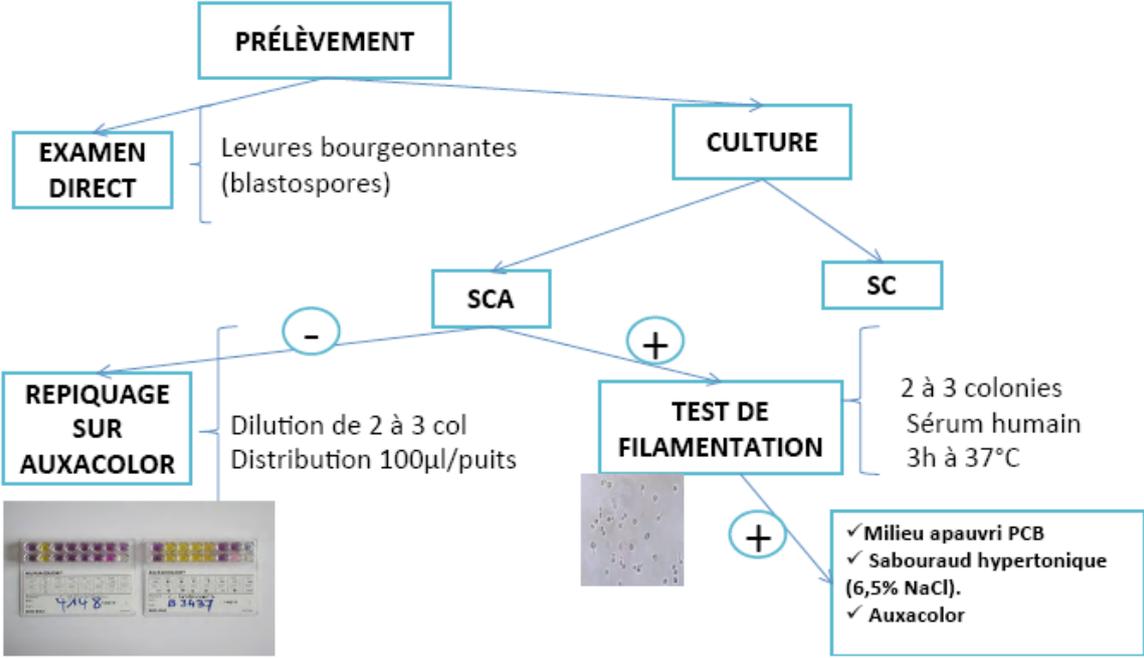
Certificat de contrôle de la qualité avec courbe d'étalonnage et tableau d'évaluation INFO,
(quantification des antigènes en U/ml).

2 pièces

4) Coffret QIAamp® DNA Blood Mini kit (50) QIAGEN Technologies d'échantillonnage et d'analyse(PCR)

Kits d'ADN QIAamp	(50)
No de catalogue	51104
Nombre de préparations	50
Mini colonnes Spin QIAamp	50
Tubes de collecte (2 ml)	150
Tampon AL	12 ml
Tampon AW1	19 ml
Tampon AW2	13 ml
Tampon AE	15 ml
Protéase QIAGEN	1 flacon
Solvant de protéase	1.2 ml
Protéinase K	1.2 ml
Guide de sélection	1

Annexe 5 : diagnostic mycologique des candidoses profonde



(Figure 03): L’algorithme décisionnel du diagnostic mycologique

Annexe 6 : photos prise lors du mode opératoire dans les techniques suivante :

AUXACOLOR Originale ; 2020

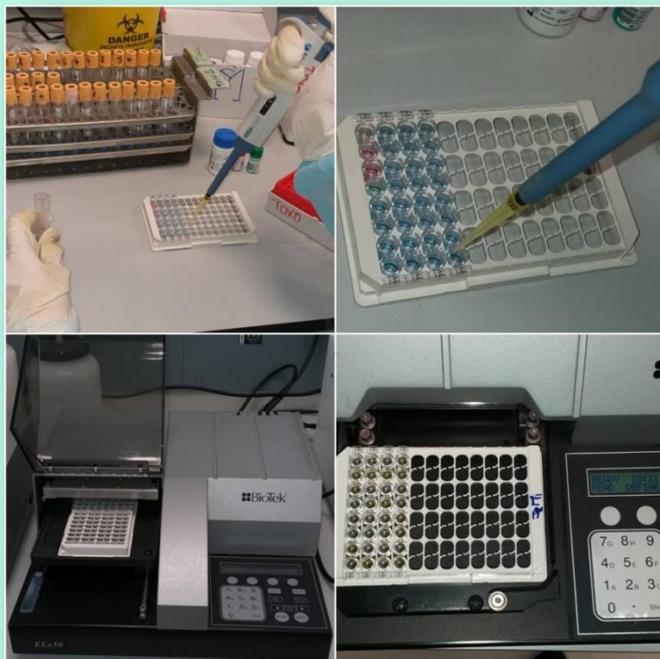


Antifongigramme Originale ; 2020



ELISA Originale ; 2020





PCR Originale ; 2020



Annexe 7 : distribution hétérogène de *C. albicans* en fonction des régions géographiques

Tableau 6 : Données au moyen orient

État	Prél.	HIV+	HIV-	ND	Réf.
Arabie Saoudite	Resp.	-	-	9.3% (7/75)	Fotedar R, 2004
Koweït	Vagin, Urines	-	-	0.2% (3/1644)	Al-Sweih, 2005
Turquie	Vagin	-	0.17% (1/600)	-	Acikgoz Z, 2004
	Bouche	-	0% (0/47)	-	Tekeli A, 2004

Tableau 7 : Données en Europe

État	Prél.	HIV+	HIV-	ND	Réf.
Allemagne	Resp.	-	11% (6/54)	-	Peltroche , 2002
Angleterre	Bouche	-	8% (9/104)	-	Bagg J, 2003
	Hémoc.	-	-	2.2% (3/136)	Sullivan D, 2004
Belgique	ND	-	-	1% (5/469)	Martins, 2002
Italie	Bouche	1.5% (2/132)	0% (0/42)	0% (0/487)	Faggi E, 2005

Annexe 8 : Spectre des molécules antifongiques utilisables pour le traitement des candidoses systémiques

Tableau 8 : sensibilité des principales espèces de *Candida* aux traitements antifongiques.

Souches	Résultat de la cultures en 48h à 37°C							
	T+	5FC	AB	MCZ	KET	ITRA	FLU	T-
<i>C. tropicalis</i>	Rose	S	S/I	S/I	S	S/I	S	Bleu
<i>C. krusei</i>	Rose	I	S/I	I	S/I	S/I	I	Bleu
<i>C. albicans</i>	Rose	S	S/I	S/I	S	S	S	Bleu
<i>C. glabrata</i>	Rose	S	S	S/I	I	I/R	I/R	Bleu
<i>C. parapsilosis</i>	Rose	S	S	S/I	S	S/I	S	Bleu
<i>C. neoformans</i>	Rose	S/I	S	S/I	S/I	S/I	I/R	Bleu

S : sensible

R : résistant

I : intermédiaire