

UNIVERSITE MOHAMMED V –SOUISSI–
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE –RABAT

ANNEE : 2013

THESE N° : 25

**APPORT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
DANS LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS
FONGIQUES INVASIVES
REVUE DE LA LITTÉRATURE
THÈSE**

Présentée et soutenue publiquement

PAR

Mr REDOUANE TELLAA

Né le 05 MAI 1985 à AGADIR

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT
EN PHARMACIE

MOTS CLES : infection ; fongique ; invasive ; biologie moléculaire ;
diagnostic.

MEMBRES DE JURY

Mr. M. ZOUHDI
Professeur en microbiologie

PRESIDENT

Mr. H. TLIGUI
Professeur en parasitologie

RAPPORTEUR

Mme. M.SEFFAR
Professeur agrégé en microbiologie

Mme. N.LAMALMI
Professeur agrégé en anatomie pathologique

} **JUGES**

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

(البقرة: من الآية 32)



**UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI -
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

DOYENS HONORAIRES :

- 1962 – 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

- Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes : Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération : Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie : Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT
Conservateur : Ahmed ZAHIDI

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam Neurochirurgie
4. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
6. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
7. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
9. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie –Réanimation
10. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11. Pr. ABROUQ Ali*	Oto-Rhino-Laryngologie
12. Pr. BENOMAR M'hammed	Chirurgie-Cardio-Vasculaire
13. Pr. BENSOUA Mohamed	Anatomie
14. Pr. BENOSMAN Abdellatif	Chirurgie Thoracique
15. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma	Physiologie

Novembre 1983

16. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*	Pneumo-phtisiologie
17. Pr. BALAFREJ Amina	Pédiatrie
18. Pr. BELLAKHDAR Fouad	Neurochirurgie
19. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia	Rhumatologie
20. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine	Cardiologie

Décembre 1984

21. Pr. BOUCETTA Mohamed*	Neurochirurgie
22. Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil	Radiothérapie
23. Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne
24. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
25. Pr. NAJI M'Barek *	Immuno-Hématologie
26. Pr. SETTAF Abdellatif	Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

27. Pr. BENJELLOUN Halima	Cardiologie
28. Pr. BENSALID Younes	Pathologie Chirurgicale
29. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa	Neurologie
30. Pr. IHRAI Hssain *	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
31. Pr. IRAQI Ghali	Pneumo-phtisiologie
32. Pr. KZADRI Mohamed	Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

33. Pr. AJANA Ali	Radiologie
34. Pr. AMMAR Fanid	Pathologie Chirurgicale
35. Pr. CHAHED OUZZANI	Gastro-Entérologie
36. Pr. EL FASSY FIHRI Mohamed Taoufiq	Pneumo-phtisiologie
37. Pr. EL HAITEM Naïma	Cardiologie
38. Pr. EL MANSOURI Abdellah*	Chimie-Toxicologie Expertise
39. Pr. EL YAACOUBI Moradh	Traumatologie Orthopédie
40. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah	Gastro-Entérologie
41. Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
42. Pr. OHAYON Victor*	Médecine Interne
43. Pr. YAHYAOUY Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

44. Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
-------------------------------------	-----------------------

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| 45. Pr. DAFIRI Rachida | Radiologie |
| 46. Pr. FAIK Mohamed | Urologie |
| 47. Pr. HERMAS Mohamed | Traumatologie Orthopédie |
| 48. Pr. TOLOUNE Farida* | Médecine Interne |

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

- | | |
|------------------------------------|--------------------------|
| 49. Pr. ADNAOUI Mohamed | Médecine Interne |
| 50. Pr. AOUNI Mohamed | Médecine Interne |
| 51. Pr. BENAMEUR Mohamed* | Radiologie |
| 52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali | Cardiologie |
| 53. Pr. CHAD Bouziane | Pathologie Chirurgicale |
| 54. Pr. CHKOFF Rachid | Urologie |
| 55. Pr. KHARBACH Aïcha | Gynécologie -Obstétrique |
| 56. Pr. MANSOURI Fatima | Anatomie-Pathologique |
| 57. Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda | Neurologie |
| 58. Pr. SEDRATI Omar* | Dermatologie |
| 59. Pr. TAZI Saoud Anas | Anesthésie Réanimation |

Février Avril Juillet et Décembre 1991

- | | |
|---|--|
| 60. Pr. AL HAMANY Zaïtounia | Anatomie-Pathologique |
| 61. Pr. ATMANI Mohamed* | Anesthésie Réanimation |
| 62. Pr. AZZOUZI Abderrahim | Anesthésie Réanimation |
| 63. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM | Néphrologie |
| 64. Pr. BELKOUCHI Abdelkader | Chirurgie Générale |
| 65. Pr. BENABDELLAH Chahrazad | Hématologie |
| 66. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif | Chirurgie Générale |
| 67. Pr. BENSOUDA Yahia | Pharmacie galénique |
| 68. Pr. BERRAHO Amina | Ophtalmologie |
| 69. Pr. BEZZAD Rachid | Gynécologie Obstétrique |
| 70. Pr. CHABRAOUI Layachi | Biochimie et Chimie |
| 71. Pr. CHANA El Houssaine* | Ophtalmologie |
| 72. Pr. CHERRAH Yahia | Pharmacologie |
| 73. Pr. CHOKAIRI Omar | Histologie Embryologie |
| 74. Pr. FAJRI Ahmed* | Psychiatrie |
| 75. Pr. JANATI Idrissi Mohamed* | Chirurgie Générale |
| 76. Pr. KHATTAB Mohamed | Pédiatrie |
| 77. Pr. NEJMI Maati | Anesthésie-Réanimation |
| 78. Pr. OUAALINE Mohammed* | Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène |
| 79. Pr. SOULAYMANI Rachida | Pharmacologie |
| 80. Pr. TAOUFIK Jamal | Chimie thérapeutique |

Décembre 1992

- | | |
|-------------------------|------------------------|
| 81. Pr. AHALLAT Mohamed | Chirurgie Générale |
| 82. Pr. BENOUDA Amina | Microbiologie |
| 83. Pr. BENSOUDA Adil | Anesthésie Réanimation |

84. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib	Radiologie
85. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza	Gastro-Entérologie
86. Pr. CHRAIBI Chafiq	Gynécologie Obstétrique
87. Pr. DAOUDI Rajae	Ophtalmologie
88. Pr. DEHAYNI Mohamed*	Gynécologie Obstétrique
89. Pr. EL HADDOURY Mohamed	Anesthésie Réanimation
90. Pr. EL OUAHABI Abdessamad	Neurochirurgie
91. Pr. FELLAT Rokaya	Cardiologie
92. Pr. GHAFIR Driss*	Médecine Interne
93. Pr. JIDDANE Mohamed	Anatomie
94. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine	Gynécologie Obstétrique
95. Pr. TAGHY Ahmed	Chirurgie Générale
96. Pr. ZOUHDI Mimoun	Microbiologie

Mars 1994

97. Pr. AGNAOU Lahcen	Ophtalmologie
98. Pr. AL BAROUDI Saad	Chirurgie Générale
99. Pr. BENCHERIFA Fatiha	Ophtalmologie
100. Pr. BENJAAFAR Noureddine	Radiothérapie
101. Pr. BENJELLOUN Samir	Chirurgie Générale
102. Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
103. Pr. CAOUI Malika	Biophysique
104. Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
105. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT	Gynécologie Obstétrique
106. Pr. EL AOUAD Rajae	Immunologie
107. Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumato-Orthopédie
108. Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
109. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur	Médecine Interne
110. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*	Chirurgie Cardio- Vasculaire
111. Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale
112. Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
113. Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
114. Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
115. Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
116. Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
117. Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
118. Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie – Orthopédie
119. Pr. MOUDENE Ahmed*	Traumatologie- Orthopédie
120. Pr. OULBACHA Said	Chirurgie Générale
121. Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie –Obstétrique
122. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR	Dermatologie
123. Pr. SLAOUI Anas	Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

124. Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
-------------------------	----------

125. Pr. ABDELHAK M'barek
 126. Pr. BELAIDI Halima
 127. Pr. BRAHMI Rida Slimane
 128. Pr. BENTAHILA Abdelali
 129. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
 130. Pr. BERRADA Mohamed Saleh
 131. Pr. CHAMI Ilham
 132. Pr. CHERKAOUI LallaOuafae
 133. Pr. EL ABBADI Najia
 134. Pr. HANINE Ahmed*
 135. Pr. JALIL Abdelouahed
 136. Pr. LAKHDAR Amina
 137. Pr. MOUANE Nezha

Chirurgie – Pédiatrique
 Neurologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Gynécologie – Obstétrique
 Traumatologie – Orthopédie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Neurochirurgie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie

Mars 1995

138. Pr. ABOUQUAL Redouane
 139. Pr. AMRAOUI Mohamed
 140. Pr. BAIDADA Abdelaziz
 141. Pr. BARGACH Samir
 142. Pr. BEDDOUCHE Amocrane*
 143. Pr. BENZAOUZ Mustapha
 144. Pr. CHAARI Jilali*
 145. Pr. DIMOU M'barek*
 146. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*
 147. Pr. EL MESNAOUI Abbas
 148. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
 149. Pr. FERHATI Driss
 150. Gynécologie Obstétrique
 151. Pr. HASSOUNI Fadil
 152. Pr. HDA Abdelhamid*
 153. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
 154. Pr. IBRAHIMY Wafaa
 155. Pr. MANSOURI Aziz
 156. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
 157. Pr. RZIN Abdelkader*
 158. Pr. SEFIANI Abdelaziz
 159. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Gynécologie Obstétrique
 Urologie
 Gastro-Entérologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Oto-Rhino-Laryngologie

 Médecine Préventive et Santé Publique
 Cardiologie
 Urologie
 Ophtalmologie
 Radiothérapie
 Ophtalmologie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Génétique
 Réanimation Médicale

Décembre 1996

160. Pr. AMIL Touriya*
 161. Pr. BELKACEM Rachid
 162. Pr. BELMAHI Amin
 163. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
 164. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
 165. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*

Radiologie
 Chirurgie Pédiatrie
 Chirurgie réparatrice et plastique
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Parasitologie

166. Pr. GAOUZI Ahmed
 167. Pr. MAHFOUDI M'barek*
 168. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
 169. Pr. MOHAMMADI Mohamed
 170. Pr. MOULINE Soumaya
 171. Pr. OUADGHIRI Mohamed
 172. Pr. OUZEDDOUN Naima
 173. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Médecine Interne
 Pneumo-phtisiologie
 Traumatologie-Orthopédie
 Néphrologie
 Cardiologie

Novembre 1997

174. Pr. ALAMI Mohamed Hassan
 175. Pr. BEN AMAR Abdesselem
 176. Pr. BEN SLIMANE Lounis
 177. Pr. BIROUK Nazha
 178. Pr. BOULAICH Mohamed
 179. Pr. CHAOUIR Souad*
 180. Pr. DERRAZ Said
 181. Pr. ERREIMI Naima
 182. Pr. FELLAT Nadia
 183. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
 184. Pr. HAIMEUR Charki*
 185. Pr. KANOUNI NAWAL
 186. Pr. KOUTANI Abdellatif
 187. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
 188. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
 189. Pr. NAZI M'barek*
 190. Pr. OUAHABI Hamid*
 191. Pr. SAFI Lahcen*
 192. Pr. TAOUFIQ Jallal
 193. Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Neurologie
 O.RL.
 Radiologie
 Neurochirurgie
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Radiologie
 Anesthésie Réanimation
 Physiologie
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Neurologie
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

194. Pr. AFIFI RAJAA
 195. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*
 196. Pr. ALOUANE Mohammed*
 197. Pr. BENOMAR ALI
 198. Pr. BOUGTAB Abdesslam
 199. Pr. ER RIHANI Hassan
 200. Pr. EZZAITOUNI Fatima
 201. Pr. KABBAJ Najat
 202. Pr. LAZRAK Khalid (M)

Gastro-Entérologie
 Pneumo-phtisiologie
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Neurologie
 Chirurgie Générale
 Oncologie Médicale
 Néphrologie
 Radiologie
 Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

203. Pr. BENKIRANE Majid*
204. Pr. KHATOURI ALI*
205. Pr. LABRAIMI Ahmed*

Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

206. Pr. ABID Ahmed*
207. Pr. AIT OUMAR Hassan
208. Pr. BENCHERIF My Zahid
209. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd
210. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
211. Pr. CHAOUI Zineb
212. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
213. Pr. ECHARRAB El Mahjoub
214. Pr. EL FTOUH Mustapha
215. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
216. Pr. EL OTMANY Azzedine
217. Pr. GHANNAM Rachid
218. Pr. HAMMANI Lahcen
219. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
220. Pr. ISMAILI Hassane*
221. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
222. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
223. Pr. TACHINANTE Rajae
224. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

225. Pr. AIDI Saadia
226. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
227. Pr. AJANA Fatima Zohra
228. Pr. BENAMR Said
229. Pr. BENCHEKROUN Nabih
230. Pr. CHERTI Mohammed
231. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
232. Pr. EL HASSANI Amine
233. Pr. EL IDGHIRI Hassan
234. Pr. EL KHADER Khalid
235. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
236. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
237. Pr. HSSAIDA Rachid*
238. Pr. LACHKAR Azzouz
239. Pr. LAHLOU Abdou
240. Pr. MAFTAH Mohamed*
241. Pr. MAHASSINI Najat
242. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie

243. Pr. NASSIH Mohamed*
244. Pr. ROUIMI Abdelhadi

Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

Décembre 2001

245. Pr. ABABOU Adil
246. Pr. AOUAD Aicha
247. Pr. BALKHI Hicham*
248. Pr. BELMEKKI Mohammed
249. Pr. BENABDELJLIL Maria
250. Pr. BENAMAR Loubna
251. Pr. BENAMOR Jouda
252. Pr. BENELBARHDADI Imane
253. Pr. BENNANI Rajae
254. Pr. BENOUACHANE Thami
255. Pr. BENYOUSSEF Khalil
256. Pr. BERRADA Rachid
257. Pr. BEZZA Ahmed*
258. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
259. Pr. BOUHOUCHE Rachida
260. Pr. BOUMDIN El Hassane*
261. Pr. CHAT Latifa
262. Pr. CHELLAOUI Mounia
263. Pr. DAALI Mustapha*
264. Pr. DRISSE Sidi Mourad*
265. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira
266. Pr. EL HIJRI Ahmed
267. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
268. Pr. EL MADHI Tarik
269. Pr. EL MOUSSAIF Hamid
270. Pr. EL OUNANI Mohamed
271. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil
272. Pr. ETTAIR Said
273. Pr. GAZZAZ Miloudi*
274. Pr. GOURINDA Hassan
275. Pr. HRORA Abdelmalek
276. Pr. KABBAJ Saad
277. Pr. KABIRI EL Hassane*
278. Pr. LAMRANI Moulay Omar
279. Pr. LEKEHAL Brahim
280. Pr. MAHASSIN Fattouma*
281. Pr. MEDARHRI Jalil
282. Pr. MIKDAME Mohammed*
283. Pr. MOHSINE Raouf
284. Pr. NABIL Samira
285. Pr. NOUINI Yassine

Anesthésie-Réanimation
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Ophtalmologie
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Rhumatologie
Anatomie
Cardiologie
Radiologie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Pédiatrie
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Urologie

286. Pr. OUALIM Zouhir*
 287. Pr. SABBAH Farid
 288. Pr. SEFIANI Yasser
 289. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia
 290. Pr. TAZI MOUKHA Karim

Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie
 Urologie

Décembre 2002

291. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 292. Pr. AMEUR Ahmed *
 293. Pr. AMRI Rachida
 294. Pr. AOURARH Aziz*
 295. Pr. BAMOU Youssef *
 296. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 297. Pr. BENBOUAZZA Karima
 298. Pr. BENZEKRI Laila
 299. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
 300. Pr. BERNOUSSI Zakiya
 301. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
 302. Pr. CHOHO Abdelkrim *
 303. Pr. CHKIRATE Bouchra
 304. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 305. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
 306. Pr. EL BARNOUSSI Leila
 307. Pr. EL HAOURI Mohamed *
 308. Pr. EL MANSARI Omar*
 309. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 310. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 311. Pr. HADDOUR Leila
 312. Pr. HAJJI Zakia
 313. Pr. IKEN Ali
 314. Pr. ISMAEL Farid
 315. Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 316. Pr. KRIOULE Yamina
 317. Pr. LAGHMARI Mina
 318. Pr. MABROUK Hfid*
 319. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 320. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 321. Pr. MOUSTAINE My Rachid
 322. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 323. Pr. OUIJILAL Abdelilah
 324. Pr. RACHID Khalid *
 325. Pr. RAISS Mohamed
 326. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 327. Pr. RHOU Hakima
 328. Pr. SIAH Samir *

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Rhumatologie
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Urologie
 Gynécologie Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Traumatologie Orthopédie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation

329. Pr. THIMOU Amal
 330. Pr. ZENTAR Aziz*
 331. Pr. ZRARA Ibtisam*

Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

332. Pr. ABDELLAH El Hassan
 333. Pr. AMRANI Mariam
 334. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 335. Pr. BENKIRANE Ahmed*
 336. Pr. BENRAMDANE Larbi*
 337. Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 338. Pr. BOULAADAS Malik
 339. Pr. BOURAZZA Ahmed*
 340. Pr. CHAGAR Belkacem*
 341. Pr. CHERRADI Nadia
 342. Pr. EL FENNI Jamal*
 343. Pr. EL HANCHI ZAKI
 344. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 345. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 346. Pr. HACHI Hafid
 347. Pr. JABOUIRIK Fatima
 348. Pr. KARMANE Abdelouahed
 349. Pr. KHABOUZE Samira
 350. Pr. KHARMAZ Mohamed
 351. Pr. LEZREK Mohammed*
 352. Pr. MOUGHIL Said
 353. Pr. NAOUMI Asmae*
 354. Pr. SAADI Nozha
 355. Pr. SASSENOU ISMAIL*
 356. Pr. TARIB Abdelilah*
 357. Pr. TIJAMI Fouad
 358. Pr. ZARZUR Jamila

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Chimie Analytique
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Traumatologie Orthopédie
 Urologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Gastro-Entérologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Janvier 2005

359. Pr. ABBASSI Abdellah
 360. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 361. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
 362. Pr. ALLALI Fadoua
 363. Pr. AMAR Yamama
 364. Pr. AMAZOUZI Abdellah
 365. Pr. AZIZ Nouredine*
 366. Pr. BAHIRI Rachid
 367. Pr. BARKAT Amina

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Rhumatologie
 Néphrologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Pédiatrie

368. Pr. BENHALIMA Hanane	Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
369. Pr. BENHARBIT Mohamed	Ophtalmologie
370. Pr. BENYASS Atif	Cardiologie
371. Pr. BERNOUSSI Abdelghani	Ophtalmologie
372. Pr. BOUKLATA Salwa	Radiologie
373. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed	Ophtalmologie
374. Pr. DOUDOUH Abderrahim*	Biophysique
375. Pr. EL HAMZAOUI Sakina	Microbiologie
376. Pr. HAJJI Leila	Cardiologie
377. Pr. HESSISSEN Leila	Pédiatrie
378. Pr. JIDAL Mohamed*	Radiologie
379. Pr. KARIM Abdelouahed	Ophtalmologie
380. Pr. KENDOUCI Mohamed*	Cardiologie
381. Pr. LAAROUSSI Mohamed	Chirurgie Cardio-vasculaire
382. Pr. LYAGOUBI Mohammed	Parasitologie
383. Pr. NIAMANE Radouane*	Rhumatologie
384. Pr. RAGALA Abdelhak	Gynécologie Obstétrique
385. Pr. SBIHI Souad	Histo-Embryologie Cytogénétique
386. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam	Ophtalmologie
387. Pr. ZERAIDI Najia	Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*	Rhumatologie
424. Pr. AFIFI Yasser	Dermatologie
425. Pr. AKJOUJ Said*	Radiologie
426. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra	Dermatologie
427. Pr. BELMEKKI Abdelkader*	Hématologie
428. Pr. BENCHEIKH Razika	O.R.L
429. Pr. BIYI Abdelhamid*	Biophysique
430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine	Chirurgie - Pédiatrique
431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*	Chirurgie Cardio - Vasculaire
432. Pr. CHEIKHAOUI Younes	Chirurgie Cardio - Vasculaire
433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas	Gynécologie Obstétrique
434. Pr. DOGHMI Nawal	Cardiologie
435. Pr. ESSAMRI Wafaa	Gastro-entérologie
436. Pr. FELLAT Ibtissam	Cardiologie
437. Pr. FAROUDY Mamoun	Anesthésie Réanimation
438. Pr. GHADOUANE Mohammed*	Urologie
439. Pr. HARMOUCHE Hicham	Médecine Interne
440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*	Anesthésie Réanimation
441. Pr. IDRIS LAHLOU Amine	Microbiologie
442. Pr. JROUNDI Laila	Radiologie
443. Pr. KARMOUNI Tariq	Urologie
444. Pr. KILI Amina	Pédiatrie

445. Pr. KISRA Hassan	Psychiatrie
446. Pr. KISRA Mounir	Chirurgie – Pédiatrique
447. Pr. KHARCHAFI Aziz*	Médecine Interne
448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*	Pharmacie Galénique
449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*	Parasitologie
450. Pr. MANSOURI Hamid*	Radiothérapie
451. Pr. NAZIH Naoual	O.R.L
452. Pr. OUANASS Abderrazzak	Psychiatrie
453. Pr. SAFI Soumaya*	Endocrinologie
454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra	Psychiatrie
455. Pr. SEFIANI Sana	Anatomie Pathologique
456. Pr. SOUALHI Mouna	Pneumo – Phtisiologie
457. Pr. TELLAL Saida*	Biochimie
458. Pr. ZAHRAOUI Rachida	Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila	Anatomie pathologique
459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid	Anesthésie réanimation
460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid	Anesthésier réanimation
461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *	Anesthésie réanimation
462. Pr. BAITE Abdelouahed *	Anesthésie réanimation
463. Pr. TOUATI Zakia	Cardiologie
464. Pr. OUZZIF Ezzohra *	Biochimie
465. Pr. BALOUCH Lhousaine *	Biochimie
466. Pr. SELKANE Chakir *	Chirurgie cardio vasculaire
467. Pr. EL BEKKALI Youssef *	Chirurgie cardio vasculaire
468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *	Chirurgie cardio vasculaire
469. Pr. EL ABSI Mohamed	Chirurgie générale
470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *	Chirurgie générale
471. Pr. ACHOUR Abdessamad *	Chirurgie générale
472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*	Chirurgie générale
473. Pr. GHARIB Nouredine	Chirurgie plastique
474. Pr. TABERKANET Mustafa *	Chirurgie vasculaire périphérique
475. Pr. ISMAILI Nadia	Dermatologie
476. Pr. MASRAR Azlarab	Hématologie biologique
477. Pr. RABHI Monsef *	Médecine interne
478. Pr. MRABET Mustapha *	Médecine préventive santé publique et hygiène
479. Pr. SEKHSOKH Yessine *	Microbiologie
480. Pr. SEFFAR Myriame	Microbiologie
481. Pr. LOUZI Lhousain *	Microbiologie
482. Pr. MRANI Saad *	Virologie
483. Pr. GANA Rachid	Neuro chirurgie
484. Pr. ICHOU Mohamed *	Oncologie médicale
485. Pr. TACHFOUTI Samira	Ophtalmologie
486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine	Ophtalmologie

487. Pr. MELLAL Zakaria	Ophtalmologie
488. Pr. AMMAR Haddou *	ORL
489. Pr. AOUI Sarra	Parasitologie
490. Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie
491. Pr. MOUTAJ Redouane *	Parasitologie
492. Pr. ACHACHI Leila	Pneumo ptisiologie
493. Pr. MARC Karima	Pneumo ptisiologie
494. Pr. BENZIANE Hamid *	Pharmacie clinique
495. Pr. CHERKAOUI Naoual *	Pharmacie galénique
496. Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
497. Pr. MAHI Mohamed *	Radiologie
498. Pr. RADOUANE Bouchaib*	Radiologie
499. Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
500. Pr. SIFAT Hassan *	Radiothérapie
501. Pr. HADADI Khalid *	Radiothérapie
502. Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
503. Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
504. Pr. TANANE Mansour *	Traumatologie orthopédie
505. Pr. AMHAJJI Larbi *	Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes	Anatomie
Pr. AZENDOUR Hicham *	Anesthésie Réanimation
Pr. BELYAMANI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUHSAIN Sanae *	Biochimie
Pr. OUKERRAJ Latifa	Cardiologie
Pr. LAMSAOURI Jamal *	Chimie Thérapeutique
Pr. MARMADÉ Lahcen	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AMAHZOUNE Brahim*	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AIT ALI Abdelmounaim *	Chirurgie Générale
Pr. BOUNAIM Ahmed *	Chirurgie Générale
Pr. EL MALKI Hadj Omar	Chirurgie Générale
Pr. MSSROURI Rahal	Chirurgie Générale
Pr. CHTATA Hassan Toufik *	Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pr. BOUI Mohammed *	Dermatologie
Pr. KABBAJ Nawal	Gastro-entérologie
Pr. FATHI Khalid	Gynécologie obstétrique
Pr. MESSAOUDI Nezha *	Hématologie biologique
Pr. CHAKOUR Mohammed *	Hématologie biologique
Pr. DOGHMI Kamal *	Hématologie clinique
Pr. ABOUZAHIR Ali*	Médecine interne
Pr. ENNIBI Khalid *	Médecine interne
Pr. EL OUENNASS Mostapha	Microbiologie
Pr. ZOUHAIR Said*	Microbiologie
Pr. L'kassimiHachemi*	Microbiologie

Pr. AKHADDAR Ali *
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
Pr. AGADR Aomar *
Pr. KARBOUBI Lamyia
Pr. MESKINI Toufik
Pr. KABIRI Meryem
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
Pr. BASSOU Driss *
Pr. ALLALI Nazik
Pr. NASSAR Ittimade
Pr. HASSIKOU Hasna *
Pr. AMINE Bouchra
Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
Pr. KADI Said *

Neuro-chirurgie
Neurologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Radiologie
Radiologie
Radiologie
Rhumatologie
Rhumatologie
Traumatologie orthopédique
Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. CHERRADI Ghizlan
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. ALILOU Mustapha
Pr. KANOUNI Lamyia
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. MALIH Mohamed*
Pr. BOUSSIF Mohamed*
Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. RAISSOUNI Zakaria*
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. LEZREK Mounir
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. LAMALMI Najat
Pr. ZOUAIDIA Fouad
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. CHADLI Mariama*

Médecine interne
Gastro entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie réanimation
Radiothérapie
Radiologie
Radiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Médecine aérologique
Chirurgie plastique et réparatrice
Chirurgie pédiatrique
Urologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
ORL
Ophtalmologie
Hématologie
Anatomie pathologique
Anatomie pathologique
Physiologie
Biochimie chimie
Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

1. Pr. ABOUDRAR Saadia

Physiologie

2. Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie
3. Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
5. Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
8. Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
9. Pr. CHAHED OUZZANI LallaChadia	Biochimie
10. Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
11. Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
12. Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
13. Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootecnie
14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
16. Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biotechnologie
17. Pr. KABBAJ Ouafae	Biochimie
18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
19. Pr. REDHA Ahlam	Biochimie
20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
21. Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
22. Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
23. Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

** Enseignants Militaires*



Dédicaces



A Mes Très Chers Parents

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

A mes frères

Vous m'aviez toujours aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour exprimer mon profond amour et ma reconnaissance pour les honorables services soutenus.

Que cette thèse vous traduise ma profonde affection.

A ma grande famille

En témoignage de mon respect et de mon amour.

A mes amis

En souvenir des agréables moments partagés



Remerciement



A notre maitre et président de thèse

Monsieur le professeur M. ZOUIDJ

*Professeur agrégé de microbiologie à la faculté de médecine et
de pharmacie de rabat*

CHU Ibn Sina

Nous sommes très sensibles à l'honneur et au privilège que vous nous accordez en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Nous sommes fortes impressionnés par vos grandes qualités humaines qui n'ont d'égaux que votre haute compétence.

Veillez trouver dans ce travail le témoignage de notre profond respect et de notre haute estime.

A notre maitre et rapporteur de thèse

Monsieur le professeur H. TLIGUI

*Professeur agrégé de parasitologie à la faculté de médecine et
de pharmacie de rabat*

CHU Ibn Sina

Votre compétence, votre droiture et votre simplicité sont autant de qualité qui font de vous quelqu'un d'exceptionnel.

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail et de veiller à son élaboration en ne ménageant ni votre temps ni vos conseils.

Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur notre gratitude et nos vifs remerciements.

A notre maitre et juge de thèse

Madame le professeur M. SEFFAR

*Professeur agrégé de microbiologie à la faculté de
médecine et de pharmacie de rabat*

CHU Ibn Sina

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger notre travail.

Veillez trouver ici, chère maitre, l'expression de notre respectueux dévouement.

A notre maitre et juge de thèse

Madame le professeur N. LAMALMI

*Professeur agrégé d'anatomie pathologique à la faculté de
médecine et de pharmacie de rabat*

CHU Ibn Sina

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

Abréviations

PCR : Polymérase Chain Réaction.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

LCR : Liquide céphalo-rachidien.

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

LBA : Lavage broncho-alvéolaire.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

Pb : Paire de bases.

Kb: Kilobase.

Tm: Melting temperature.

SDS: Sodium Dodécyl sulfate.

dNTP : DésoxyNucléotide-Triphosphate.

BET: Bromure d'éthidium.

RFLP: Restriction fragment length polymorphism.

RT : Reverse transcription.

RTase : Reverse transcriptase.

ARNm: Acide ribonucléique messenger, ARN messenger.

ARNt : Acide ribonucléique de transfert, ARN de transfert.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomiaux, ARN ribosomiaux.

Kda : kilodalton.

Ct: Threshold cycle.

IFI : infection fongique invasive.

AI: Aspergillose invasive.

CI : Candidose invasive.

ITS: internal transcribed spacer.

IGS: intergenic spacer.

HSCT : transplantation des cellules souches hématopoïétiques.

FDA: Food and Drug Administration.

EORTC: European Organization for the Research and Treatment of Cancer.

MSG: Mycoses Study Group.

EAPCRI: European Aspergillus PCR Initiative.

ISHAM: International society for human and animal mycology.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine.

SIDA: Syndrome de l'immunodéficience acquise

REA: Restriction enzyme analysis.

EIA: Immuno Enzymo Assay.

LAT : latex agglutination test.

CFU: Colony forming unit.

Ag: antigène.

Ac: Anticorp.

Liste des figures

Figure 1: Répartitions des mycoses profondes : ONCO-HEMATOLOGIE.....	6
Figure 2: Examen direct sur LCR: levures encapsulées cryptococcique	8
Figure 3 : Hémoculture positive à candida sp.....	10
Figure 4: Technique ELISA pour la détection du galactomannane	12
Figure 5: Structure de l'ADN.....	20
Figure 6: Température de fusion moléculaire d'un fragment d'ADN.....	24
Figure 7: Shéma du principe de l'amplification de l'ADN	26
Figure 8: Cycle d'amplification PCR.....	28
Figure 9: Le suivie en temps réel d'une réaction PCR.....	29
Figure 10: Principe de la PCR nichée ou (nested PCR).....	34
Figure 11: Principe de la RT-PCR.....	36
Figure 12: Cycle PCR utilisant CYBER GREEN®	38
Figure 13: Courbe PCR en temps réel.....	39
Figure 14: Représentation schématique des différentes régions de l'ADN ribosomique....	45
Figure 15: Incidences des infections fongiques invasives.....	49
Figure 16: Les différentes régions d'ADN ribosomique fongique.....	62

Liste des tableaux

Tableau I : Mycoses profondes.....	5
Tableau II : Diagnostic des infections fongiques invasives.....	7
Tableau III : Amorce universelles ITS et régions amplifiées	46
Tableau IV : Performance des techniques PCR pour le diagnostic de la CI	65
Tableau V : Comparaison des résultats PCR classique et PCR en temps réel pour le diagnostic de cryptococcose	68
Tableau VI : Performance des tests diagnostics de l'AI pour 158 échantillons LBA	72
Tableau VII : Les statistiques de performance pour les protocoles utilisés.....	74
Tableau VIII : Les performances des différents tests pour le diagnostic de la CI	78
Tableau IX : Sensibilité et spécificité des différents tests de diagnostic pour LCR	80
Tableau X : Sensibilité et spécificité des différents tests de diagnostic pour le sérum.....	81
Tableau XI : Sensibilité et spécificité des différents tests de diagnostic pour l'urine.....	81
Tableau XII : Variations de résultats de tests sur des intervalles de temps après le début de traitement antifongique	81
Tableau XIII : Comparaison des résultats obtenus par la méthode PCR, culture et test à l'encre de Chine dans les échantillons de LCR de 72 de patients.....	83

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I : Méthodes classiques de diagnostic des infections	
fongiques et leurs limites	3
1-Examen direct	7
2-Cultures.....	9
3-Examens sérologiques.....	11
3-1-Détection d'antigènes fongiques.....	12
3-2-Détection des anticorps spécifiques	14
Chapitre II : technique de la biologie moléculaire en mycologie	
médicale.....	16
I-principe des techniques de la biologie moléculaire	17
1-1-L'extraction de l'ADN	17
1-2-PCR classique	18
1-3-Les variantes de la PCR.....	33
1-4-PCR en temps réel.....	37
II-identification moléculaire en mycologie et cible utilisée	41
2-1-Concept de la PCR fongique	41
2-2-Echantillon utilisé.....	42
2-3-Cible utilisée.....	44

Chapitre III : Application de la biologie moléculaire dans le diagnostic de certaines infections fongiques	47
I-Aspergillose	50
II-Candidose	59
III-Cryptococcose	65
Chapitre VI : Discussion	69
Conclusion.....	86
Bibliographie	88

Introduction

Depuis l'invention de la technique d'amplification par PCR (polymerase chain reaction) en 1983, la biologie moléculaire s'est implantée rapidement dans les laboratoires de biologie clinique. En effet, bien que de nombreuses techniques de microbiologie demeurent traditionnelles (examen direct, culture, sérologie, tests biochimiques), la biologie moléculaire a pu trouver sa place en routine dans un grand nombre de laboratoires d'analyses médicales. L'étude des agents infectieux à l'aide des outils de biologie moléculaire est ainsi devenue indispensable dans certaines indications.

Les infections par champignons sont de plus en plus importantes en milieu hospitalier, notamment les mycoses invasives opportunistes, les plus fréquentes étant *Aspergillus* sp, *Candida* sp, *Cryptococcus* sp et *Pneumocystis* sp. Ainsi, on estime qu'environ 30 % des aspergilloses invasives (AI) ne sont pas diagnostiquées. Il en est de même pour la recherche de *Candida* sp dans le sang après culture [1]. Quant aux mycoses cutanées, elles sont fréquentes et ne posent pas général de problème de diagnostic. En effet, le diagnostic est alors réalisé par les méthodes traditionnelles telles que l'examen direct, la culture, l'identification en galeries, voire l'histologie. À l'opposé, les mycoses invasives sont de diagnostic plus difficile et les techniques habituelles manquent souvent de rapidité, sensibilité et spécificité.

Les techniques de biologie moléculaire s'intègrent progressivement à coté des méthodes mycologiques classiques, et tendent à se généraliser dans les laboratoires spécialisés dans le diagnostic et le suivi des infections fongiques. Cette évolution est rendue nécessaire afin de garantir l'identification précise des

champignons et de diagnostiquer plus précocement les infections fongiques invasives (IFI).

Chapitre I :
Méthodes classiques de
diagnostic des infections
fongiques et leurs limites

Les infections causées par des mycoses en particulier les mycoses profondes ont considérablement augmenté et leurs agents étiologiques se sont diversifiés ces dernières années, en grande partie à cause du nombre croissant de patients aux défenses amoindries par une maladie ou son traitement (cancer, infection VIH, transplantation d'organes, traitement par corticoïdes ou immunosuppresseurs) [2]

Une classification simplifiée des principales mycoses vues en pratique médicale selon le site d'infection :

- les mycoses superficielles ou cutanées au niveau de la tête (teigne, folliculite due aux dermatophytes ou à Candida), au niveau du corps et des membres (pityriasis versicolor, dermatomycoses, atteinte des ongles, folliculite) ;
- les mycoses au niveau des muqueuses (candidose orale, œsophagite, candidose génitale, en particulier vaginale).
- les mycoses sous-cutanées rares sous nos climats comme les mycétomes ou la sporotrichose.
- les mycoses profondes ou systémiques [tab.I], dont l'approche diagnostic sera plus particulièrement développée ici.

Les mycoses profondes et systémiques sont dues essentiellement à deux genres de champignons opportunistes et ubiquitaires, *Aspergillus* et *Candida* et d'un degré moindre *Cryptococcus* [fig.1], mais le nombre de cas causés par d'autres genres ou espèces sont en augmentation. Tous deux peuvent entraîner des complications infectieuses graves, particulièrement chez des patients très

susceptibles comme les patients neutropéniques, les greffés de moelle osseuse et d'organes solides, ainsi que certains patients de soins intensifs avec multiples facteurs de risques (antibiotiques à large spectre, cathéters intravasculaires, insuffisance rénale, dialyse, intubation de longue durée). Il est donc essentiel d'avoir un indice de suspicion élevé face à de tels patients, car la présentation clinique de ces infections fongiques profondes est peu spécifique, ceci particulièrement au début, quand un traitement efficace est encore envisageable.

En plus d'une présentation clinique souvent peu évocatrice, les moyens diagnostiques conventionnels pour détecter une atteinte fongique sont insuffisamment sensibles et rapides. Il n'est dès lors pas étonnant que de nombreux développements de nouveaux tests diagnostiques aient été entrepris ces dernières années avec certains résultats prometteurs.

Tableau I : Mycoses profondes [4].

Catégories	Représentants les plus fréquents
Levures	Candida Cryptococcus neoformans Trichosporon
Champignons filamenteux	Aspergillus Mucorale, Fusarium
Champignons dimorphiques	Histoplasma

REPARTITIONS DES ETIOLOGIES

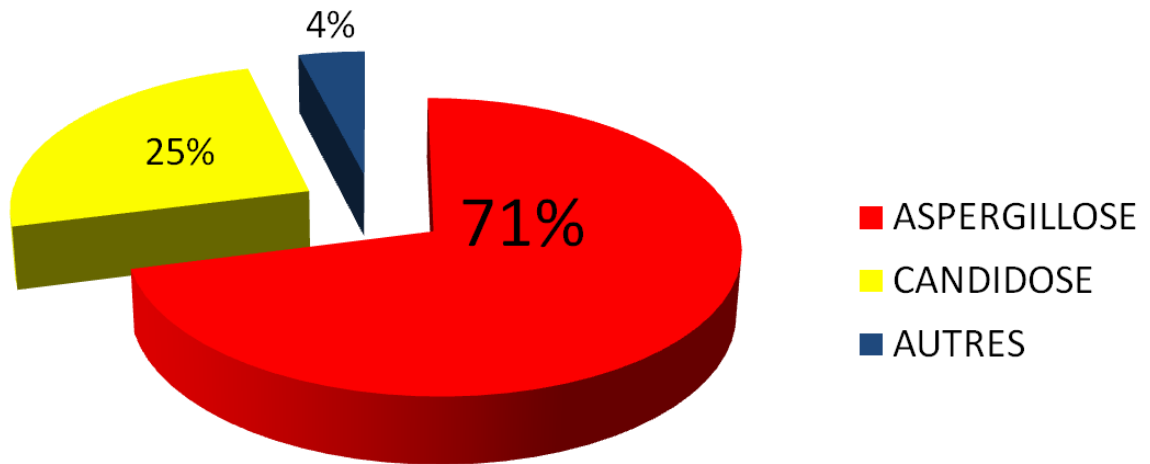


Figure 1 : Répartitions des mycoses profondes : ONCO-HEMATOLOGIE

D'après Pagano L et al, Clin Infect Dis 2007

Le diagnostic conventionnel des mycoses profondes repose sur la triade classique : examen direct, culture et examen anatomopathologique, ce dernier étant très rarement à disposition [3].

Tableau II : Diagnostic des IFI [4].

	Candida	Aspergillus	Autres
Méthodes conventionnelles			
Examen direct	+	+	+
Cultures	+	+	+
Hémocultures	+	-	+ (Fusarium)
Histopathologie	+	+	+
Méthodes modernes			
Antigènes	+ mannane + glucane	+ galactomannane + glucane	+ Cryptocoques
Anticorps	+ antimannane		

(+) Méthodes établies et disponibles.

I- Examen direct :

L'intérêt de l'examen direct est sa rapidité. En cas de résultat positif, l'interprétation doit tenir compte du site de prélèvement (site normalement stérile ou non), des facteurs de risque présents chez le patient et de la clinique associée. Vu leur aspect ubiquitaire, des champignons peuvent coloniser la peau ou les muqueuses en particulier respiratoires sans être nécessairement responsables d'un processus pathologique.

Les principaux examens directs microscopiques utilisés pour la mise en évidence d'éléments mycosiques dans les échantillons cliniques sont :

- Examen à l'état frais sans coloration, avec ou sans adjonction de KOH à 20%, réservé surtout aux prélèvements superficiels (peau, muqueuses, sécrétions vaginales) ou éventuellement les urines.

- Examen avec coloration de Gram qui sans être une coloration de choix pour les champignons permet de mettre en évidence les levures du genre *Candida* apparaissant «Gram positif». Cet examen est surtout utile lorsqu'une demande ciblée de recherche d'éléments fongiques n'a pas été envisagée ou précisée par le clinicien.
- Examen avec diverses substances fluorescentes mettant en évidence au microscope à fluorescence la paroi des champignons (Calcofluor).
- Examen avec encre de Chine, qui permet la visualisation de la capsule des Cryptocoques dans certains liquides biologiques, en particulier dans le LCR ou les urines.

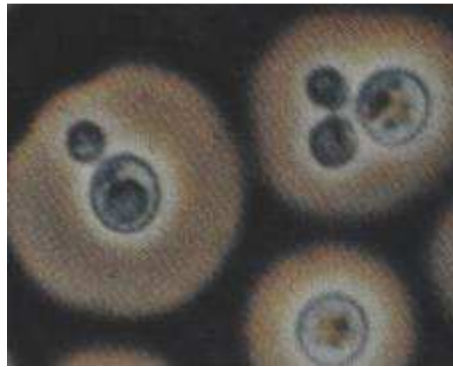


Figure 2: Examen direct sur LCR (encre de Chine x1000) : levures encapsulées cryptococcique.

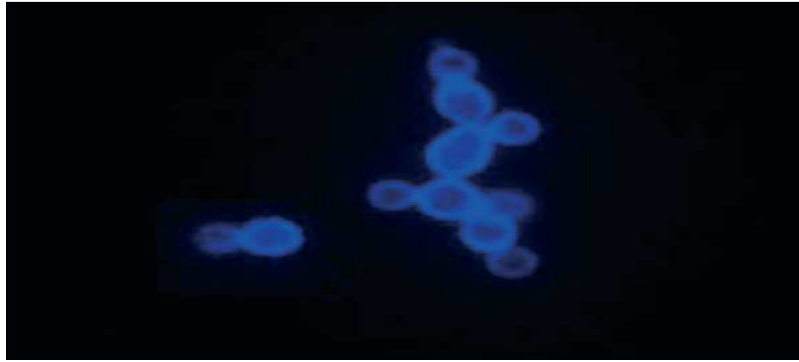
L'examen mycologique direct a de nombreuses limites par exemple il y'a risque d'obtention de résultats faux négatifs en cas de prélèvement de matériel non parasité, ou faux positifs en cas de contamination, également il peut y avoir une difficulté d'interprétation (distinction entre filaments mycéliens et pseudo filaments mycéliens).

En cas de résultat négatif, une infection fongique n'est pas exclue, vu la sensibilité très modérée de cet examen.

II- Cultures :

La culture reste actuellement la pierre angulaire du diagnostic des mycoses profondes. Elle seule permet une identification précise du genre et de l'espèce, ainsi que la détermination de la sensibilité aux agents antifongiques. Ce dernier test, appelé antifongigramme par analogie à l'antibiogramme, est de plus en plus demandé pour des espèces avec résistance connue, ou en cas de réponse thérapeutique insatisfaisante. Comme avec l'examen direct, une culture positive pour un champignon opportuniste comme *Candida* ou *Aspergillus* ne prouve pas automatiquement une infection à ces germes. Un simple traitement antibiotique de quelques jours peut favoriser la croissance de *Candida* dans des prélèvements respiratoires ou vaginaux, et la grande majorité des cultures de prélèvements respiratoires «non stériles» positifs pour *Aspergillus* représentent une simple colonisation plutôt qu'une infection nécessitant un traitement [4]. Là aussi, l'interprétation clinique d'une culture positive tiendra compte du type de patients, des facteurs de risque et d'autres paramètres biologiques ou radiologiques.

Pour le diagnostic des infections disséminées à levures (en particulier celles à *Candida*), le prélèvement de choix reste l'hémoculture, même si sa sensibilité est très imparfaite malgré les perfectionnements techniques et l'utilisation de milieux spécifiques dédiés aux champignons. A la sensibilité modeste de l'hémoculture s'ajoute le délai de positivité qui peut atteindre plusieurs jours, voire une semaine.



**Figure 3: Hémoculture positive à Candida spp,
Develoux et Bretagne EMC Maladies Infectieuses**

L'identification de ces levures repose sur l'analyse phénotypique de leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques. Plusieurs systèmes d'identification basés sur l'analyse des caractères biochimiques (assimilation et fermentation des sucres) ont été standardisés. Cependant, la base de données générée par la combinaison de ces caractères est relativement limitée et incomplète. Bien que ces systèmes permettent d'identifier avec une bonne précision les levures les plus couramment isolées en pathologie humaine, ils sont insuffisants pour l'identification précise de certaines espèces telles que des levures émergentes comme *Candida dubliniensis*, *Candida famata*... ou encore des espèces dont les profils biochimiques sont très proches.

La situation est encore plus difficile en ce qui concerne les champignons filamenteux, pour lesquels l'identification est basée exclusivement sur les seuls caractères morphologiques. Outre les difficultés inhérentes à l'identification microscopique précise, certains champignons filamenteux ont une croissance lente et difficile sur les milieux standards et ne développent pas tous les critères

morphologiques nécessaires au diagnostic d'espèce. L'hémoculture est d'une rentabilité quasi nulle.

L'identification précise (au genre et à l'espèce) des champignons poussant sur les milieux de culture fait appel à des tests de reconnaissance phénotypiques macroscopiques (morphologie et pigmentation des colonies) et microscopiques (type de mycélium, présence de levures, filaments ou pseudo-filaments), ainsi que pour les levures à des systèmes commerciaux basés sur l'assimilation de différents hydrates de carbone.

L'examen histopathologique, qui nécessite de disposer d'un fragment de tissu, est rarement pratiqué pour diverses raisons. Cet examen a l'immense avantage de permettre de visualiser les éléments fongiques directement dans les tissus au site d'infection, et est souvent requis pour poser un diagnostic de certitude, mais il reste un examen invasif difficile à réaliser chez des patients déjà traumatisés.

Ces techniques d'identification des espèces fongiques manquent de précision et nécessitent d'obtenir préalablement, à partir de l'échantillon biologique, un développement in vitro sur un milieu adapté.

III- Examens Sérologiques :

Deux catégories de tests diagnostiques ont été développées ces dernières années dans le but d'améliorer et d'accélérer le diagnostic des mycoses profondes ou systémiques : la détection d'antigènes circulants et celle d'anticorps spécifiques.

1- Détection d'antigènes fongiques :

Cette approche est utilisée depuis de nombreuses années pour détecter la présence de Cryptocoques, en particulier dans le LCR et le sérum. Elle est basée sur un test d'agglutination ou un ELISA entre un anticorps spécifique et un composant antigénique polysaccharidique soluble de la capsule des Cryptocoques présent dans le LCR ou le sérum. Ce test, réalisable en quelques minutes, avec une bonne sensibilité et spécificité pour le diagnostic d'une infection à Cryptocoques [25]. Quelques réactions croisées sont connues avec d'autres champignons, comme *Trichosporon beigelii*.

Les développements récents concernent essentiellement *Aspergillus* et *Candida*. Pour *Aspergillus*, un test commercial (Platelia *Aspergillus*, Biorad®) permet la détection par méthode ELISA d'un composant de la paroi, le galactomannane [Fig.4], dans différents échantillons cliniques, dont en particulier le sérum [5].

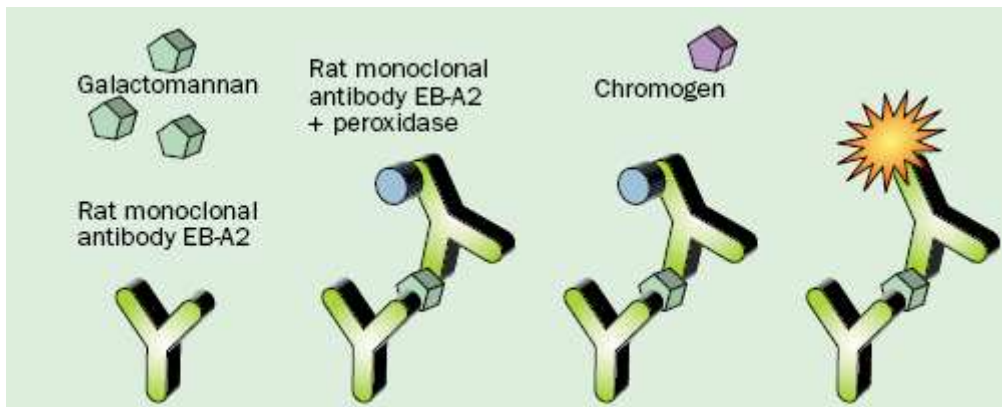


Figure 4 : Technique ELISA pour la détection du galactomannane.
Mennink-Kersen, Lancet 2003.

Ce test a aussi été utilisé avec succès dans des échantillons de lavage broncho-alvéolaire (LBA) [16,24], LCR et urine [23]. La diminution du taux de galactomannane circulant paraît associée à un bon pronostic, sa persistance ou son augmentation sous traitement avec un mauvais pronostic [6,22].

Par ailleurs, cette technique pose également des problèmes de spécificité, avec des taux de faux positifs pouvant atteindre 10 % en pédiatrie [71]. Plusieurs équipes françaises et italiennes ont constaté une augmentation des résultats faux-positifs avec ce test et ils ont mis en évidence une corrélation entre ces résultats et l'administration de pénicillines semi-synthétiques [170, 171, 172]. Certains aliments (céréales, lait) ont été décrits comme responsables de translocation digestive de galactomannanes [17]. Des réactions croisées avec *Histoplasma* ont été aussi décrites [18]. Les traitements antifongiques sont également une cause de diminution de la sensibilité [19,20].

Pour *Candida*, un test analogue au *Platelia Aspergillus* a été développé pour la détection d'un composé de paroi, le mannane (*Platelia Candida*, Biorad®). La sensibilité de la détection du mannane sérique pour détecter une candidose invasive (CI) est relativement basse [7], mais la détection combinée de l'antigène mannane et des anticorps antimannane permet d'accroître significativement la sensibilité et la spécificité [7].

Les mannanes fongiques ou galactomannanes peuvent être rapidement éliminés de la circulation par la formation de complexes immuns et par endocytose par les cellules de Kupffer dans le foie [10,11, 12], limitant ainsi la sensibilité de ces approches diagnostiques.

Un troisième test a été développé, qui détecte la présence d'un composé de paroi commune à la plupart des (dont notamment *Candida* et *Aspergillus*), le glucane (β (1-3) D-glucane) [9]. Ces limites sont surtout le risque de résultats faux positifs lors des bactériémies gram + et dialyse [21], et avec amoxiciline-clav [17] et l'impossibilité de détecter les espèces non porteuses de Glucane (*Cryptococcus* spp., *Basidiomycetes* spp., *Zygomycetes* spp) [15].

En résumé, l'intérêt de ces tests de détection d'antigènes circulants pour le diagnostic des IFI est double : en cas de résultats négatifs, conduire à une réduction de l'utilisation empirique d'agents antifongiques souvent très onéreux ; en cas de résultats positifs, initier une administration préemptive plus précoce d'agents antifongiques avec l'espoir d'une efficacité accrue.

2- Détection des anticorps spécifiques :

Le diagnostic définitif d'IFI est généralement basé sur la récupération et l'identification d'un agent étiologique spécifique à partir d'échantillons cliniques ou la démonstration microscopique de champignons avec des caractéristiques morphologiques distinctifs. Cependant, si aucune preuve culturelle, ni morphologique de l'infection est disponible, d'autres approches doivent être utilisées. La détection des anticorps spécifiques des réponses humorales de l'hôte peut fournir cette information supplémentaire pour le diagnostic des IFI. Bien que les tests sérologiques aient été utilisés pendant de nombreuses décennies pour établir des diagnostics d'un certain nombre d'infections fongiques [13,14]. Les tests d'anticorps sont rarement utilisés dans le diagnostic de la CI, l'AI, ou la cryptococcose [12]

La détection des anticorps spécifiques des réponses de l'hôte, est souvent utilisée dans le diagnostic des mycoses endémiques, qui sont difficiles à détecter par des méthodes traditionnelles telles que les méthodes de culture.

Les tests sérologiques ont des limites qui comprennent :

- Des réactions croisées entre les différentes espèces.
- La présence d'anticorps dirigés contre les champignons communs environnementaux ou commensaux.
- Le manque de standardisation des antigènes et des méthodes pour la détection des anticorps.
- La faible réponse immunitaire chez les patients immunodéprimés (SIDA, chimiothérapie, corticothérapie).

Chapitre II :
Technique de la biologie
moléculaire en mycologie médicale :

I- principe des techniques de la biologie moléculaire :

La biologie moléculaire comprend l'ensemble des techniques basées sur l'étude, la Détection et la modification des acides nucléiques. C'est un outil à la fois de recherche, de diagnostic et de prédiction des maladies en médecine humaine.

Les techniques de biologie Moléculaire ont connu un essor extraordinaire ces dernières années passant de processus lourds, fastidieux et longs à mettre en œuvre à des techniques partiellement ou totalement automatisées.

1- L'extraction de l'ADN :

L'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est une technique qui isole l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse.

Principales étapes :

Classiquement les principales étapes de l'extraction de l'ADN sont les suivantes :

- ✚ Destruction des tissus (en cas de biopsie) et des cellules afin de libérer l'ADN du noyau.
- ✚ Elimination des protéines et peptides.
- ✚ Précipitation de l'ADN et purification.

2- PCR classique :

2.1- Principes :

La PCR ou Polymérase Chain Réaction est une technique qui permet l'amplification des acides nucléiques humains ou exogènes. Elle repose sur la capacité d'une enzyme, une ADN polymérase, à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice.

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces (ou primer). Celles-ci sont constituées d'un segment de 17 à 30 bases d'acide nucléique. Leur association à l'ADN cible est suivie d'une élongation par la polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin. Cette amplification est répétée un certain nombre de fois afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée et analyser.

2.2- Historique de la PCR :

Cette technique révolutionnaire d'amplification de l'ADN permettant l'obtention en peu de temps de 10^6 copies d'un fragment d'ADN cible, a été inventée en 1985 par Kary Mullis, qui travaillait pour la firme Cetus, en Californie. En 1990, K. Mullis a obtenu le prix Nobel pour son invention.

La technique a été utilisée la première fois pour amplifier un fragment d'ADN de la β globine humaine en vue d'effectuer le diagnostic de l'anémie à cellules caliciformes (drépanocytose).

Deux progrès technologiques capitaux ont été à la base de l'utilisation très large de la PCR en biologie moléculaire et en biologie clinique :

- 1- L'utilisation de l'ADN polymérase thermostable supportant la température élevée de dénaturation de l'ADN. La première enzyme thermostable utilisée en PCR est la Taq polymérase isolée d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, isolée d'une source d'eau chaude du parc de Yellowstone, aux Etats-Unis. Cette molécule avait été dénommée molécule de l'année 1989 par la revue science. Depuis d'autres polymérases ont été isolées à partir d'autres microorganismes et sont commercialisées.
- 2- Le développement de blocs chauffants automatisés programmables, permettant le passage rapide et automatisé d'une température à une autre, au cours des cycles d'amplifications ; ces blocs chauffants appelés thermocycleurs ont permis l'automatisation de la technique et sa diffusion dans de nombreux laboratoires.

2.3- Acteurs de la PCR :

a- L'acide désoxyribonucléique contenant le fragment à amplifier :

Situé dans le noyau de la cellule, il est constitué de deux brins formant une double hélice. L'ADN est formé d'unités de bases, les nucléotides (une base + un sucre [le désoxyribose] + un phosphate), reliés par des liaisons phosphodiester [Fig.5]. On distingue quatre bases:

- les bases puriques: adénine (A) et guanine (G)
- les bases pyrimidiques : cytosine (C) et thymine (T)

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

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

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

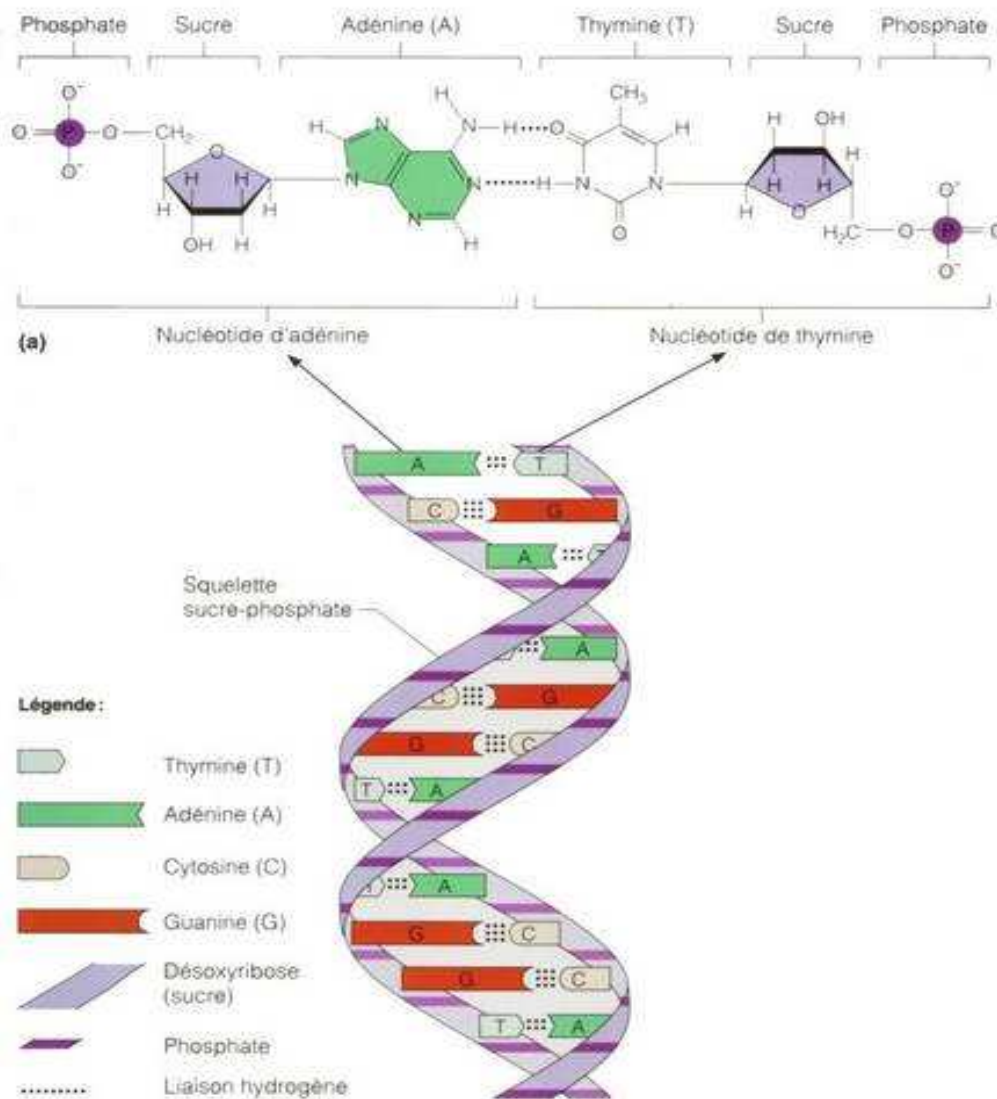


Figure 5 : Structure de l'ADN.
Site de Biologie du réseau Collégial du Québec.

Chaque brin d'ADN possède une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-hydroxyle.

Par convention une orientation a été définie: elle se fait de 5' vers 3' (5' → 3').

Par ailleurs, les Deux brins sont orientés en sens opposé : on dit qu'ils sont antiparallèles. On peut facilement séparer les liaisons hydrogènes : on parle alors de dénaturation. Celle-ci est réversible. La réassociation s'appelle la renaturation ou hybridation. Elle peut se faire ADN/ADN, ADN/ARN ou ARN/ARN.

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

b- Les amorces: sens et antisens :

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

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

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

c- L'ADN polymérase et ses inhibiteurs :

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

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

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

Il existe des moyens de lever cette inhibition: par dilution de l'échantillon, par chauffage de l'échantillon, par purification de l'échantillon "réextraction", par changement d'ADN polymérase: elles sont plus ou moins résistantes à l'action des inhibiteurs, par utilisation de "facilitateurs" (la sérum-albumine-bovine, la bétaïne, alpha2-macroglobuline ...).

d- Les nucléotides dNTPs :

Les quatre désoxyNucléotides-Triphosphates: dGTP, dATP, dTTP et dCTP, seront

Assemblés par la Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire.

e- Le Magnésium (Mg ++) :

Ce cation est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation des précurseurs. Il doit être apporté en concentration précises sous forme de MgCl₂.

Tous ces composants seront mélangés dans le même tube réactionnel.

2.4- Notion de température de fusion ou T_m :

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

Ce T_m dépend de plusieurs facteurs:

- la composition en bases : Les appariements AT (deux liaisons hydrogènes) Sont moins stables que les appariements GC (trois liaisons hydrogène) en milieu salin (NaCl).
- la composition en sels du milieu : Une diminution de la concentration en sels du milieu diminue la force ionique et par conséquent diminue le T_m et inversement. Par convention, on parle de solution stringente quand la concentration en sels est faible (le T_m diminue alors).
- la quantité de mésappariements (ou mismatches) : On considère qu'il y'a une diminution du T_m de 1° C pour 1% de mismatch dans l'ADN.

- la longueur du fragment : Cet effet est minime quand la taille des fragments Hybridés est supérieure à 500 Pb.

- la présence d'agents "déstabilisants" (par exemple la formamide et l'urée).

Le T_m est calculé par des logiciels informatiques (bioinformatique) ou approché par une formule plus pratique: $(2^\circ\text{C par base nucléotidique A ou T}) + (4^\circ\text{C par base G ou C})$ [Fig.6].

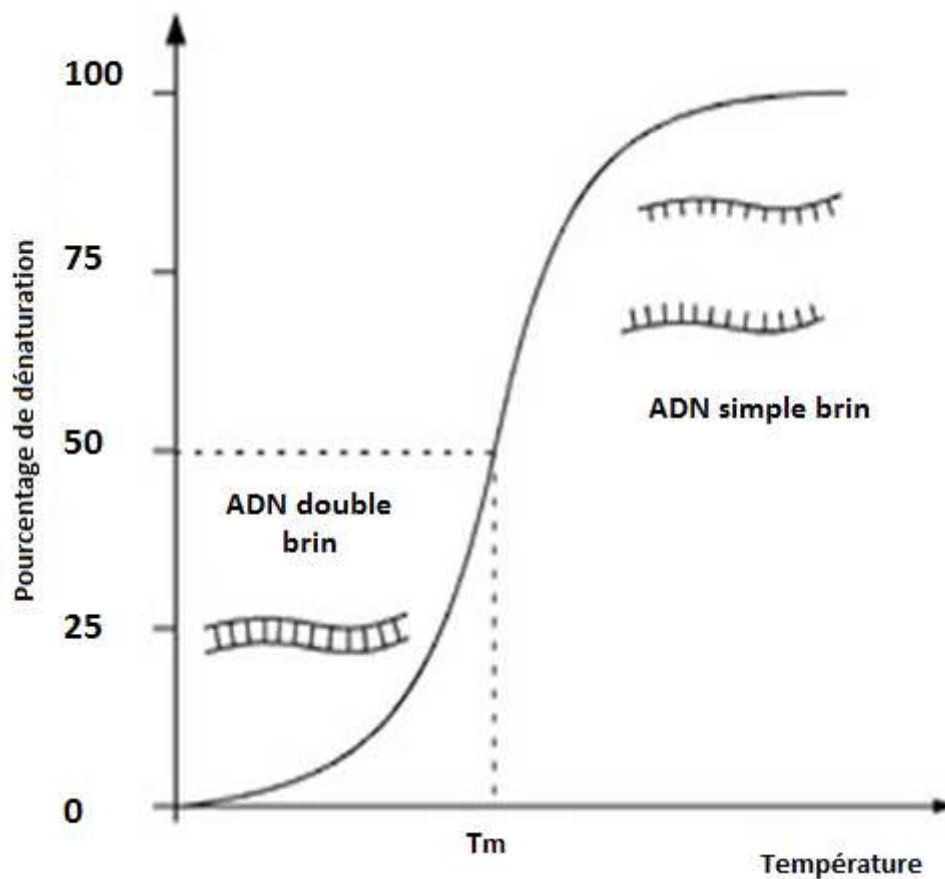


Figure 6 : Température de fusion moléculaire d'un fragment d'ADN.
Joëlle Brodeur , Martin Toussaint, Projetbleu. CCDMD. 2006.

2.5- La réaction :

Pour initier le processus, deux segments d'acide nucléique complémentaire du brin d'ADN matrice sont utilisés comme amorces (une sens et une anti sens). Celle-ci subira une élongation par la polymérase, une fois hybridée à l'ADN cible. Ceci aboutit à la synthèse d'un ADN double brin [Fig.7].

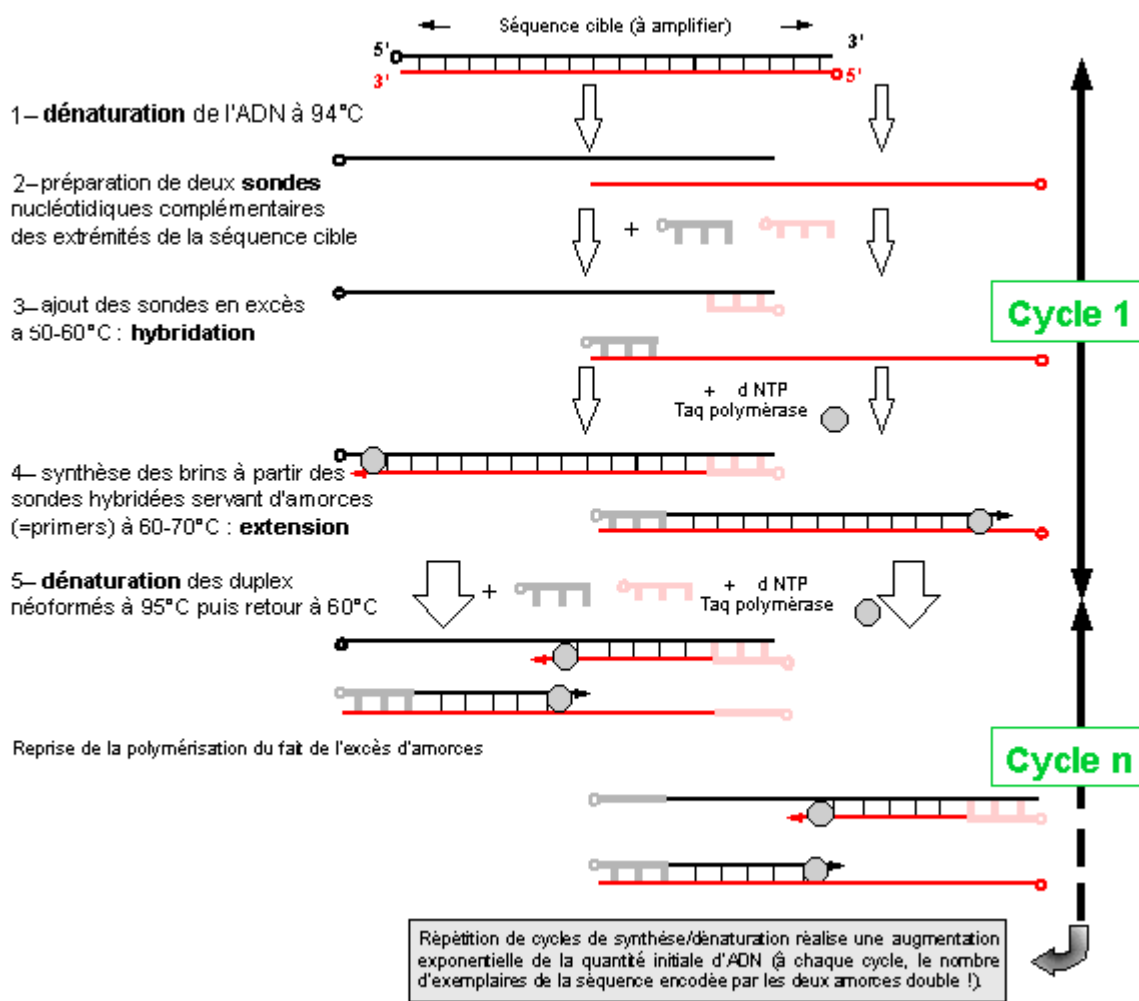


Figure 7: Schéma de principe de la technique de PCR
ENS Lyon. 2008.

Polymérase Chain Réaction (amplification en chaîne par polymérase). Cette technique permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN (environ 1 million de copies en quelques heures). C'est, généralement suffisant pour une utilisation ultérieure.

a- Etape de dénaturation thermique:

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

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

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

c- Etape d'élongation :

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

A la fin du premier cycle, un deuxième cycle thermique comprenant les mêmes étapes est effectué, puis un troisième etc. jusqu'au dernier cycle. Le nombre de

cycles varie suivant la cible que l'on amplifie et le protocole choisi. En moyenne, 30 à 35 cycles sont réalisés au cours d'une PCR classique.

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

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

La réaction a lieu dans un thermocycleur. Il s'agit d'un appareil programmable réalisant automatiquement et très rapidement les changements de température nécessaire aux cycles d'amplification. Celui-ci peut chauffer jusqu'à 100°C par une résistance et être refroidi à 0 °C par effet Peltier en moins de 2 minutes. La PCR comprend une succession de cycles (au moins 30) de trois étapes [Fig.8].

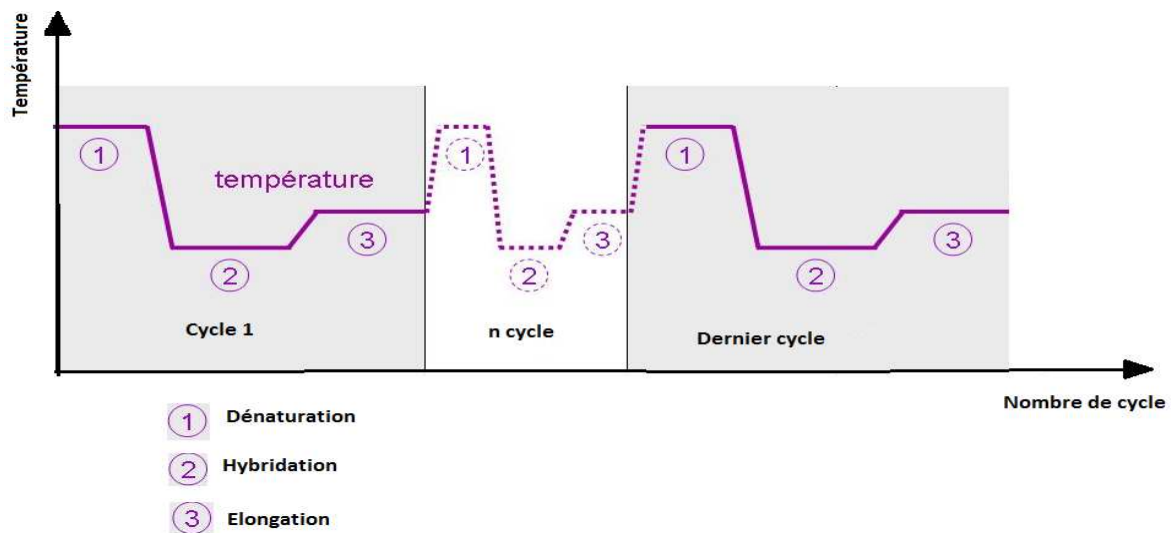


Figure 8 : cycle d'amplification PCR.
Ygonaar, 7 March 2006 (UTC)

d- La cinétique de la réaction de PCR :

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

Cette courbe peut être divisée en trois phases [Fig.9]:

- Phase d'initiation;
- phase exponentielle : cette deuxième phase correspondant à une amplification exponentielle qui est modélisable.
- phase de plateau : elle correspond à un ralentissement de l'amplification qui peut être du à l'épuisement des différents réactifs de la PCR comme les amorces.

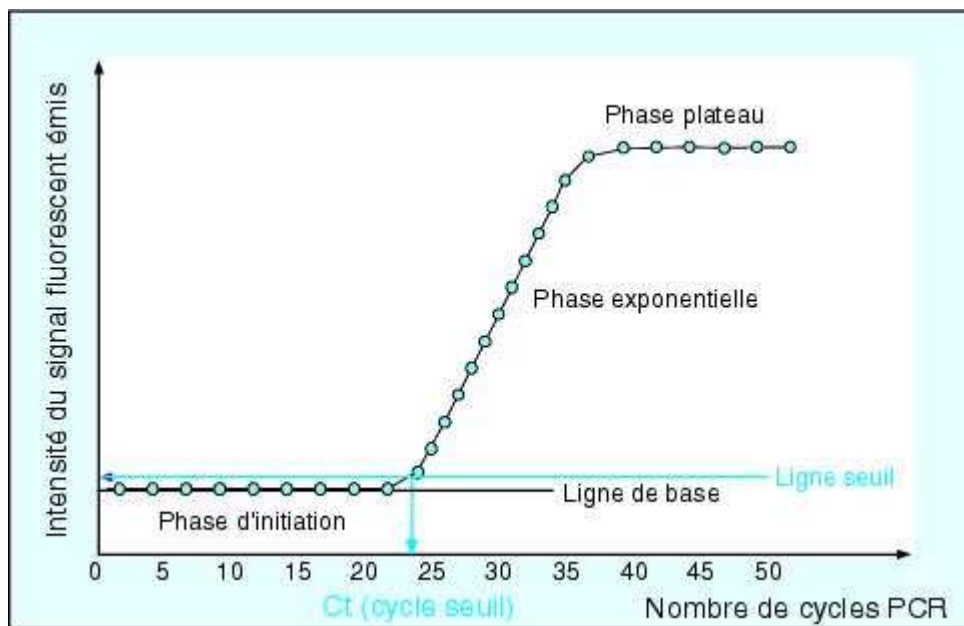


Figure 9 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR.

C. Tse, J. Capeau, Hôpital Tenon, Laboratoire de biochimie et d'hormonologie 2003,

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

- L'épuisement des substrats (amorces, désoxyribonucléotides [dNTPs]).
- La dégradation des désoxyribonucléotides [dNTPs] consécutive à la température élevée.
- L'inactivation thermique progressive de l'ADN polymérase.
- La concentration limitant de l'enzyme et/ou l'inhibition progressive de l'enzyme par les pyrophosphates générés au cours de la PCR.
- La réhybridation des produits formés gênant l'accès des différents réactifs aux séquences cibles.

2.6- Migration électrophorétique et révélation :

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

Le gel forme des mailles au sein des quelles les acides nucléiques sont piégés. A pH= 7, leur migration se fait vers l'anode. En parallèle des fragments étudiés, on fait migrer un marqueur de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue.

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

La visualisation des acides nucléiques se fait après addition de bromure d'éthidium (BET), agent intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques (à manier avec précaution car cancérigène). Le BET contenu dans le

gel, quand il est intercalé entre ces bases, va présenter une fluorescence orangée sous lumière ultraviolette (U.V. de longueur d'onde 312 nm).

Un gel peut aussi être visualisé après coloration au nitrate d'argent ou à l'acridine orange ou après ajout de SYBR®Green, agent intercalant plus sensible que le BET. Ce colorant donnera une fluorescence vert -pomme.

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

2.7- PCR-RFLP polymorphisme de longueur des fragments de restrictions :

L'approche PCR-RFLP conduit à comparer la longueur des fragments de restriction d'une région choisie du génome et préalablement amplifiée par PCR, afin de déterminer le polymorphisme. Cette région est utilisée comme substrat pour les enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui reconnaissent spécifiquement une séquence courte (4 à 8 bases) et coupent la chaîne d'ADN chaque fois qu'elles reconnaissent cette séquence élémentaire. L'ADN se retrouve ainsi fragmenté en morceaux de différentes longueurs séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un support physique. Un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court. Un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction est ainsi mis en évidence. Les profils observés permettent l'analyse de la diversité des souches.

Cette méthode permet d'éviter l'étape d'hybridation et l'utilisation de sonde radioactive.

2.8- Avantage de la PCR :

- Sensibilité : La PCR est une technique très sensible car capable de générer une très grande quantité d'acide nucléique à partir de quelques copies de la séquence recherchée.
- Rapidité : Aussi elle permet un important gain de temps par rapport aux autres techniques comme la culture (élimination des temps de cultures et d'incubation).
- Spécificité.

2.9- Limite de la PCR :

La PCR reste une technique parfois délicate à réaliser et à interpréter du faite :

- des risques d'inter contamination lors des prélèvements.
- de la possible dégradation des acides nucléiques en particulier de l'ARN ainsi que de la présence d'inhibiteurs de PCR lors de certains prélèvements.
- de la contamination facile du milieu réactionnel lors de l'analyse au laboratoire.
- Des faux positifs dus à la sensibilité extrême de la technique.
- La contamination par aérosols de produits PCR.

3- Les variantes de la PCR :

3.1- PCR nichée (ou nested PCR) :

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

La « nested PCR » permet une meilleure spécificité: le produit issu de la première PCR est de nouveau amplifié au cours d'une deuxième PCR [Fig.10]. Dans cette technique, deux couples d'amorces différents sont successivement utilisés:

- un couple d'amorces externes : Ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un premier fragment d'ADN amplifié, selon une PCR classique. Les fragments d'ADN obtenus servent alors de matrice pour une seconde PCR.
- un couple d'amorces internes : Ce couple d'amorces délimite une région située à l'intérieur (ou nichée) du fragment nucléotidique obtenu avec le 1er couple d'amorces, et donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la 1ère.

Cette méthode est très sensible : après une première PCR de 30 cycles, on obtient théoriquement 2^{30} cibles amplifiées (pour un rendement de 100%). La deuxième PCR de 30 cycles permettra d'obtenir $[2^{30}]^{30}$ soit $[2^{60}]$ cibles en théorie. Deux couples d'amorces étant utilisés, la spécificité de la réaction est accrue.

Cependant, les résultats de cette PCR sont à interpréter avec prudence dans la mesure où cette méthode associe deux PCR classiques successives et permet certes d'augmenter la sensibilité et la spécificité; cependant elle est difficilement utilisable pour un usage de routine sur des grandes séries car elle nécessite beaucoup de temps de manipulation. Cette technique reste très exposée aux risques de contaminations (du fait des deux PCR successives).

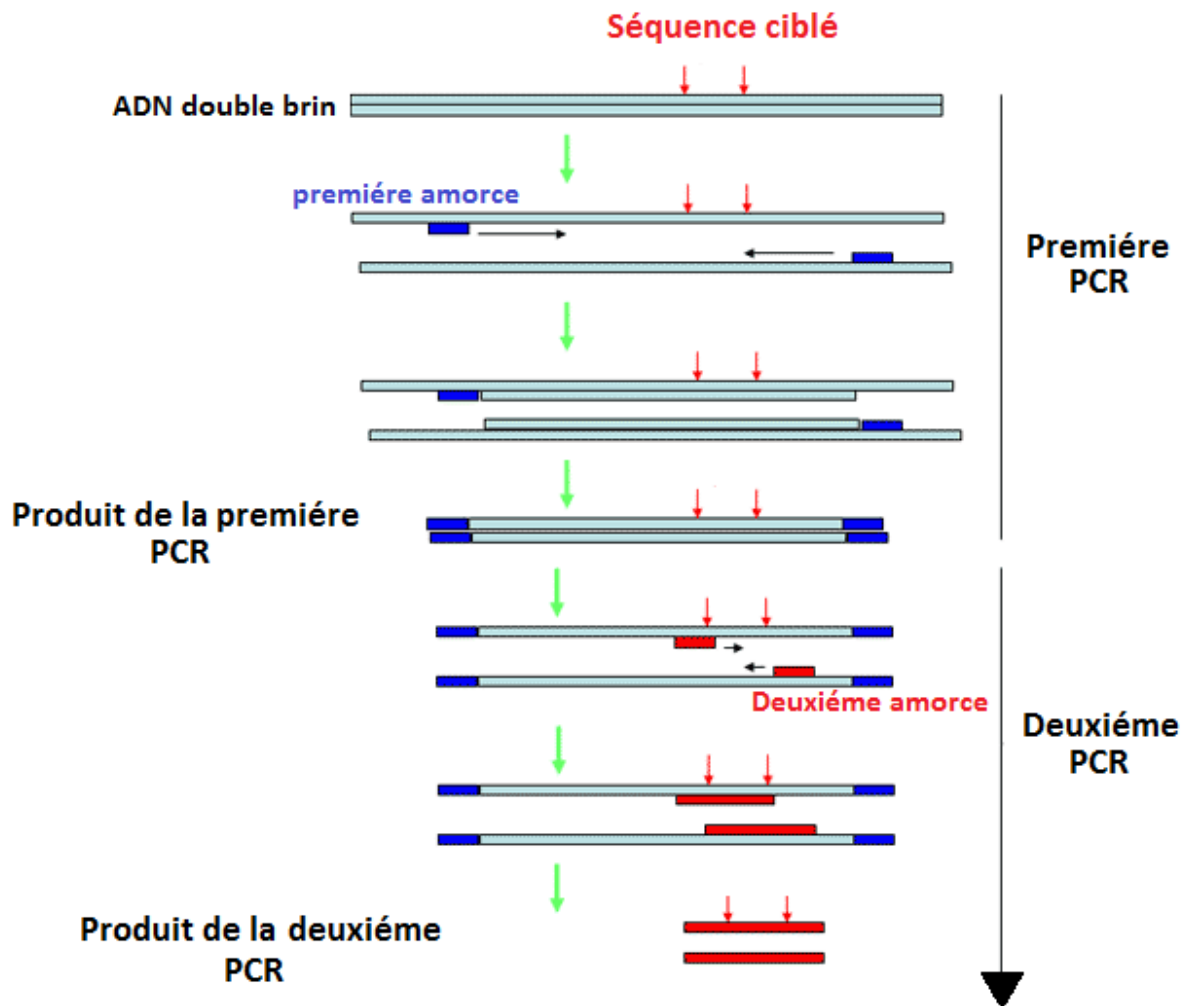


Figure 10 : Principe de la PCR Nichée (ou Nested PCR).

3.2- PCR « Multiplex » :

PCR « Multiplex » : consiste à amplifier, dans un tube unique, avec plusieurs couples d'amorces spécifiques et différents, une partie du gène à étudier (il s'agit souvent de gènes avec de nombreux exons), les produits d'amplifications

doivent avoir chacun une taille différente de manière à pouvoir les différencier lors de l'analyse électrophorétique.

4- La RT-PCR :

a- Principe :

La PCR repose sur des cycles successifs de réplication d'une séquence spécifique d'ADN matrice par une ADN polymérase. Les ADN polymérases thermostables utilisées pour la PCR sont ADN dépendantes. Lorsqu'on recherche à amplifier des ARN messagers, il est impératif d'introduire une étape préalable de transcription inverse (reverse transcription ou RT). On parle alors de la RT-PCR. L'étape de RT va consister à synthétiser le brin complémentaire (ADN) des ARN à partir d'une amorce oligonucléotidique, grâce à une enzyme à activité ADN polymérase ARN dépendante, la transcriptase inverse (reverse transcriptase ou RTase).

b- Réalisation pratique :

La RT-PCR se déroule en deux phases : Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en ADN complémentaire (ADN) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADN synthétisé. Dans la première phase, l'ARN messager à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul ARNm auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme d'ADN simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique [fig.11].

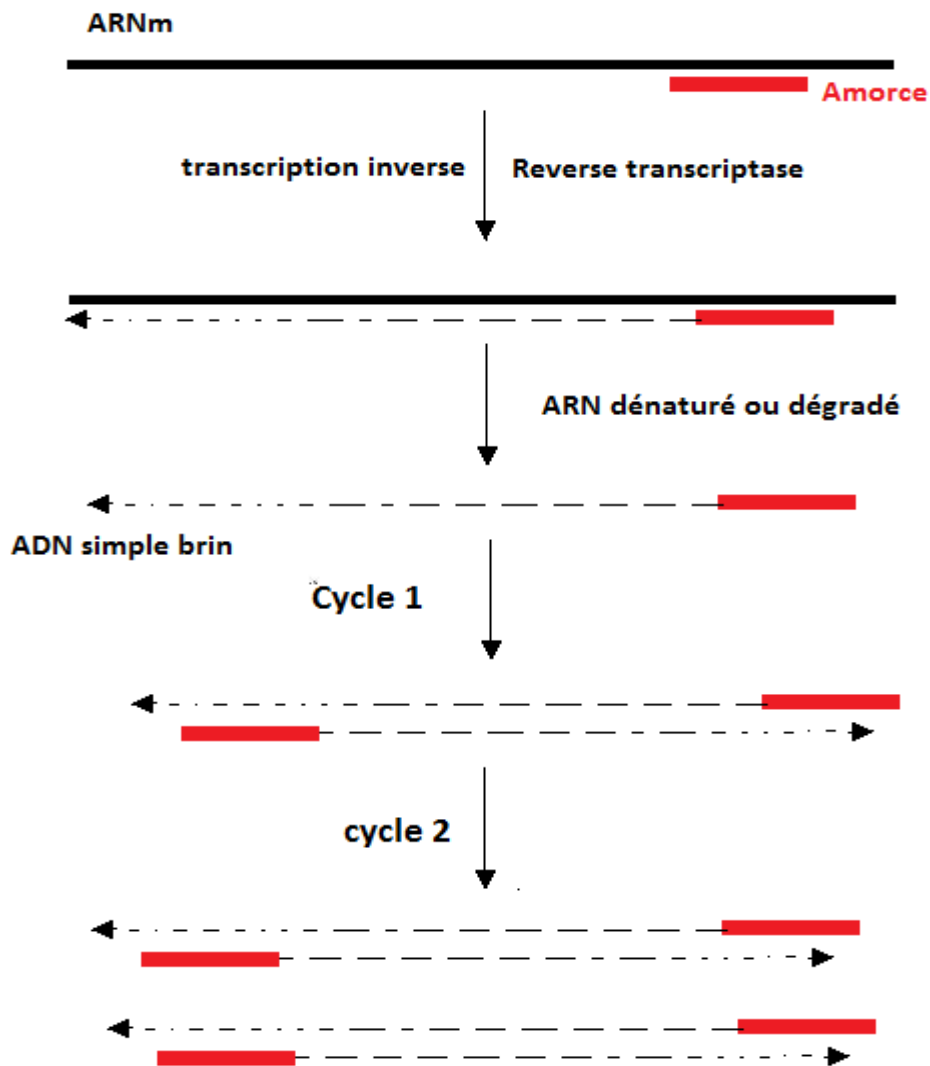


Figure 11 : principe de la RT-PCR.

c- Limites de la technique :

Si la technique de la RT-PCR ne présente pas de difficulté technique particulière, elle est, cependant, rendue délicate par le caractère extrêmement

labile de l'ARN, ainsi que la contamination possible des échantillons d'ARN par de l'ADN, ce qui impose de prendre un certain nombre de précautions dans la réalisation de l'analyse, surtout lorsque l'on souhaite l'utiliser pour le diagnostic clinique.

1.4 PCR en temps réel :

Les techniques classiques d'amplification génique (PCR) sont utilisées en routine depuis plus d'une dizaine d'années par les laboratoires de biologie pour identifier des micro-organismes pathogènes. Ces techniques dites "classiques" nécessitent, comme nous l'avons vu précédemment plusieurs étapes expérimentales, parfois complexes et difficiles à mettre en œuvre dans des laboratoires de routine (PCR puis détection du produit amplifié).

De plus, en raison de la multiplicité des procédures, ces tests requièrent les mêmes délais, voir des délais supérieurs à ceux des méthodes de diagnostic conventionnels, auxquels s'ajoutent les risques de contamination. Cette dernière décennie, des automates réalisant dans un seul mélange réactionnel ("système fermé") à la fois la réaction de PCR et la détection du produit amplifié (amplicon) ont été développés. Ces appareils sont à la fois des thermocycleurs extrêmement performants (vitesse de thermocycling très rapide) et des fluorimètres qui détectent spécifiquement en temps réel l'amplicon formé.

1.4.1- Principes :

La technique de PCR en temps réel est directement inspirée de la PCR classique. Les cycles de PCR successifs induisent une augmentation exponentielle du

produit d'amplification, et par conséquent de la fluorescence émise. Pour la détection des amplicons, cette PCR utilise soit l'agent intercalant SYBR®Green [fig.12], soit elle fait appel à des amorces spécifiques du gène à amplifier associées à un système de sondes fluorescentes qui se fixent spécifiquement sur le brin amplifié. On distingue trois grands types de sondes: les sondes d'hydrolyse TaqMan®, les sondes d'hybridation FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfert) et les molecular beacons (balises moléculaires).

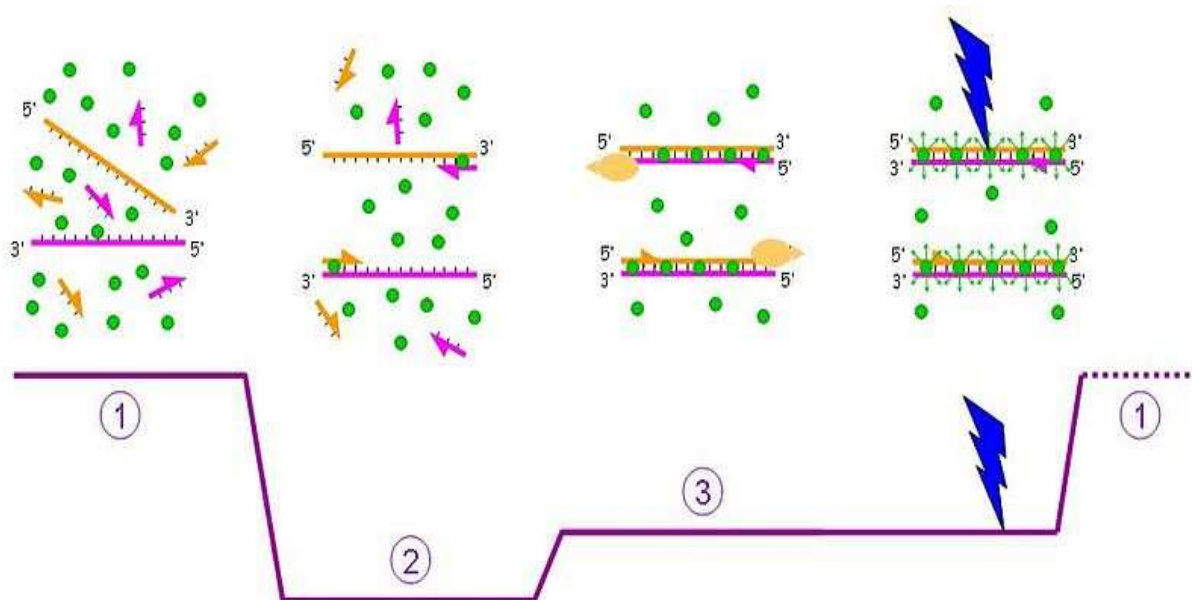


Figure 12 : Cycle PCR utilisant CYBER GREEN ®.

(1) Dénaturation; (2) Hybridation ; (3) Elongation

Ygonaar 23:09, 7 March 2006

Le temps de détection du signal est directement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans le mélange réactionnel. Durant les premiers cycles, la fluorescence reste à son niveau de base. Le " Threshold cycle" (Ct) correspond au cycle à partir du quel la courbe de fluorescence croise la droite

correspondant au seuil de détection. Il est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon biologique avant la réaction. Dès lors, un Ct précoce correspond à une réaction très positive et une concentration initiale d'ADN élevée, un Ct tardif reflète une quantité d'ADN moindre, en fin un Ct égal au nombre de cycles réalisés correspond à une réaction négative, dans ce cas la fluorescence mesurée au cours de la réaction ne dépasse pas le seuil de détection [Fig.13] .Cette possibilité de quantification est à la base des techniques développées en virologie qui permettent la détermination des charges virales.

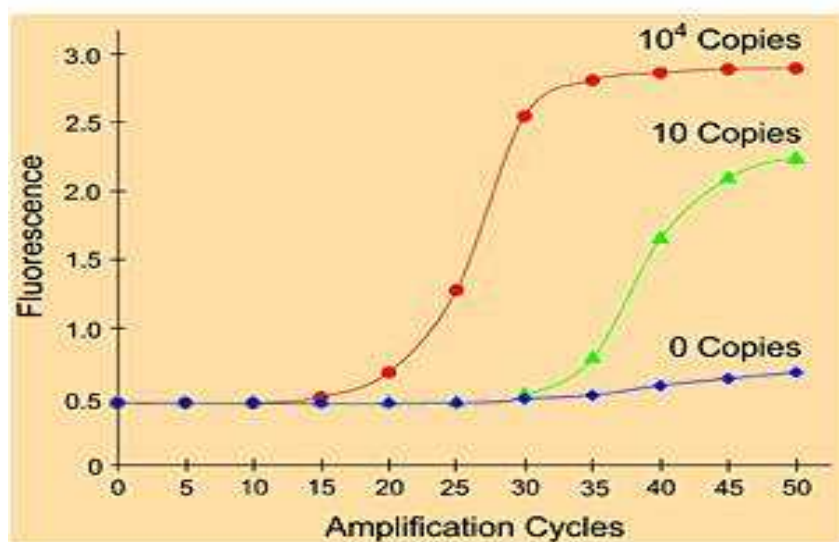


Figure 13 : Courbe PCR en temps réel.
<http://www.roche-applied-science.com/lightcycler-online>

1.4.2- Intérêts de la PCR en temps réel :

1. Pour la PCR classique, 2 heures sont nécessaires pour réaliser 30 à 40 cycles alors que 20 à 30 minutes sont nécessaires pour le même nombre de cycles pour la plupart des appareils de PCR en temps réel.

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

3. la PCR en temps réel présente l'avantage de pouvoir quantifier la cible détectée dans l'échantillon biologique.

1.4.3- Applications :

La PCR en temps réel est utilisée pour de nombreuses applications telles l'analyse d'expression de gènes, de mutations, de génotypage, de détection et quantification rapide d'agents pathogènes, de quantification d'ADN et d'ARN, d'essais d'expression et de distribution pour la thérapie génique.

9999999

II- Identification moléculaire en mycologie et cible utilisée

1- Concept de la PCR fongique :

En principe, un système PCR parfait doit fournir une sensibilité ultime sans compromettre la spécificité. En effet, la charge fongique peut être très limitée dans les échantillons, donc le seuil de détection de l'essai doit être à un niveau ne compromettant pas la spécificité.

Dans la pratique, les dosages ultrasensibles génèrent toujours des résultats faussement positifs, et un équilibre entre la détection précoce des infections et un faible taux de contamination est nécessaire.

La performance d'une méthode PCR dépend de la conception et l'utilisation d'oligonucléotides optimaux ainsi que l'optimisation minutieuse des analyses expérimentales. L'efficacité de système d'amplification PCR peut-être même limitée par le protocole d'extraction d'acide nucléique, qui par conséquent sera influencée par la nature de l'échantillon prélevé et les cibles fongiques possibles dans cet échantillon. En outre, le traitement antifongique peut réduire la charge fongique dans l'hôte et peut également modifier la cible de champignons en endommageant la paroi / membrane cellulaire fongique, libérant l'ADN et fournissant un ADN libre en circulation plutôt que d'un ADN associé aux cellules [26]. Si l'ADN ciblé est libre, alors des simples systèmes de purification d'acides nucléiques commercialisés peuvent être utilisés, alors que si l'ADN ciblé est associé aux cellules, des mesures pour la lyse des cellules fongiques doivent être appliquées [27].

Les résultats faux positifs restent une préoccupation majeure, ils peuvent être dus à La contamination des échantillons par l'air au cours de l'extraction ou par

l'utilisation de certains réactifs de biologie moléculaire (zymolase par exemple) [27]. Ces sources de contamination d'échantillons demeurent un problème presque impossible à déterminer. Les faux résultats peuvent également être générés par l'utilisation d'oligonucléotides inappropriés qui se lient à l'ADN humain ou ayant des réactions croisées avec d'autres microorganismes [27].

Dans la conception d'un test PCR, les régions conservées du gène cible sont généralement utilisées pour amplifier les régions variables où les sondes peuvent fournir la spécificité de l'essai. Pour les tests utilisant d'oligonucléotides ciblant le complexe ADNr, les régions conservées peuvent également partager des similarités significatives avec des complexes de gènes humains homologues, de faux positifs peuvent alors survenir [28].

2- Echantillon utilisé :

Un grand nombre d'IFI survient après l'inhalation de spores fongiques. Tester les échantillons respiratoires peut offrir une occasion pour détecter l'agent pathogène dans l'hôte le plus tôt possible, ce qui permet l'instauration d'un traitement empirique ou préventif dans les groupes de patients «à haut risque». Ceci doit être mis en balance avec le caractère invasif de l'obtention des LBA et la possibilité de résultats faussement positifs en raison de la détection de la contamination ou la colonisation des champignons dans les voies respiratoires. Comme le nombre de prélèvements LBA pris par patient est susceptible d'être limité, leur utilisation n'est pas adaptée à un système de dépistage à haute fréquence.

Tester les échantillons respiratoires permet la détection de tous les champignons qui peuvent causer une infection pulmonaire ou une sinusite, y compris les

espèces d'*Aspergillus*, les Mucorales, espèces endémiques, *Penicillium marneffeii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Scedosporium* sp. et *Fusarium* sp. Les espèces de *Candida* peuvent aussi être ciblées, mais elles représentent habituellement des organismes commensaux dans les voies respiratoires.

De nombreuses études ont utilisé des échantillons de sang comme source de d'ADN pour la PCR fongique. Ce qui peut fournir le type d'échantillon optimal pour une analyse à grande fréquence.

La situation est compliquée par l'utilisation de sérum / plasma pour le test PCR des IFI. En choisissant le sérum / plasma, l'ADN fongique libre en circulation est ciblé, comme toute source d'ADN cellulaire sera perdue au cours de la séparation des constituants du sang. En utilisant du sang total, l'ADN libre sera décanté avec le surnageant pendant les premiers stades de la procédure d'extraction. Même si l'ADN devait être sédimenté, il serait peu susceptible à survivre aux procédures d'extraction vigoureuse utilisées pour cibler des cellules fongiques [27].

Des échantillons de liquide céphalo-rachidien (LCR) peuvent être utilisés pour améliorer le diagnostic de la méningite fongique ou une encéphalite. Ce sont des infections rares et il est difficile de déterminer la procédure d'extraction idéale, même si les deux sources d'ADN libres et associés aux cellules ont été ciblées [26]. Le caractère invasif de prélèvement rend son application difficile chez des patients en soins intensifs.

Plusieurs études ont effectué la PCR sur l'ADN fongique extrait de biopsies de tissus. Lors de l'utilisation des tissus, il est préférable d'utiliser des échantillons

frais plutôt que des échantillons en paraffine et il est essentiel de digérer le tissu totalement pour améliorer l'accès aux champignons envahissant [29].

Des échantillons d'urine peuvent également être utilisés pour la PCR [60].

3- Cible utilisée :

Le principe consiste à amplifier des régions d'acide désoxyribonucléique (ADN) présentes chez tous les champignons et dont les séquences sont suffisamment différentes entre espèces pour permettre de les identifier précisément.

Classiquement, les gènes de l'ADN ribosomique constituent la cible de choix : présents chez tous les micro-organismes, ils sont connus pour accumuler des mutations à un taux constant. Il s'agit d'une famille de gènes répétés en tandem plusieurs dizaines de fois. Chaque unité comprend des régions codantes et non codantes (les espaceurs). Chaque unité comprend une copie d'un gène codant pour l'ARN 18 S (petite sous-unité), d'un gène codant pour le 5,8 S, d'un gène codant pour l'ARN 28 S (grande sous-unité) et deux espaceurs, ITS ou espaceur interne transcrit et IGS ou espaceur intergénique [fig.14].

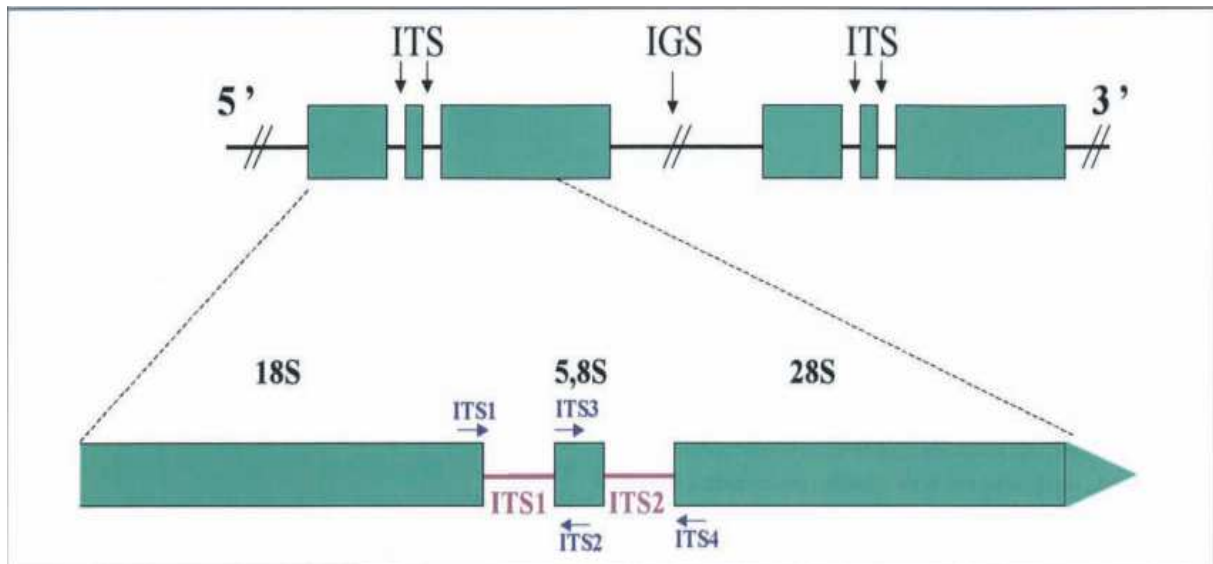


Figure 14: Représentation schématique des différentes régions de l'ADN ribosomique.

Les rectangles indiquent les régions codantes. Les amorces et les positions d'hybridation sont illustrées par des flèches bleues [29].

Une partie de ces molécules est hautement conservée et utilisée comme support pour l'étude de la divergence entre espèces. Les régions conservées alternent avec les régions variables. Les régions ayant la vitesse d'évolution la plus rapide sont celles qui séparent les gènes codant pour les ARN ribosomiques, à savoir les ITS et les IGS [32]. Les séquences des régions ITS et IGS des différentes espèces appartenant à un même genre ne sont donc pas strictement identiques et, de ce fait, leur polymorphisme peut être utilisé comme support pour l'identification moléculaire des espèces fongiques [33,34].

D'autres gènes ont été également utilisés pour la PCR fongique par certaines études, comme les gènes codant pour le cytochrome P450, protéine de choc thermique pour la détection d'*Aspergillus* [47], ou Les gènes codant pour les protéines de biosynthèse de la capsule CAP59, CAP1, GEF1 pour la *Cryptococcus* [124, 111, 123] ou le gène FKS1 pour *Candida* [92].

Exemple d'amorces ITS consensus, leurs séquences et les régions qu'elles encadrent sont rapportées dans le tableau III.

Tableau III : Amorce universelles ITS et régions amplifiées [29].

	Amorces universelles	Régions amplifiées
Nom/couple	Séquence (5' → 3')	
ITS1 et ITS2	ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS2 : 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	Extrémité 3' 18S, ITS1 et extrémité 5' 5,8S
ITS 3 et ITS4	ITS3 : 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Extrémité 3' 5,8S, ITS2 et extrémité 5' 28S
ITS1 et ITS4	ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Extrémité 3' 18S, ITS1, 5,8S, ITS2 et extrémité 5' 28S

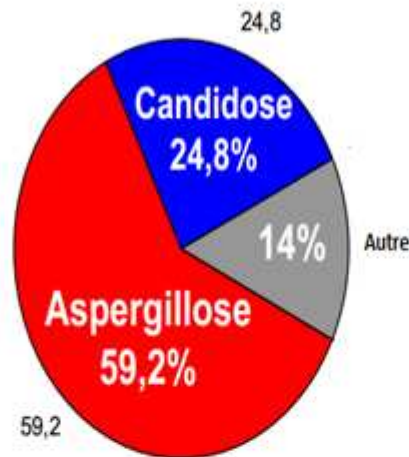
Chapitre III :

**Applications de la biologie
moléculaire dans le diagnostic de
certaines infections fongique**

Les infections fongiques invasives sont des infections à divers types d'espèces fongiques et représentent souvent un sérieux danger pour la vie. Les IFI les plus rencontrées en milieu médical incluent les aspergilloses, les candidoses, et les cryptococcoses. Leur incidence a augmenté sensiblement pendant les deux dernières décennies, car les populations des patients à risque n'ont cessé d'augmenter.

Les infections aux moisissures de type *Aspergillus* et celles dues aux levures du genre *Candida* représentent plus de 80 % des IFI [39], et sont essentiellement d'origine nosocomiale [fig.15].

Répartition des étiologies



Aspergillose :

- 52% non documentées par culture
- 48% documentées par culture
- *Aspergillus fumigatus* : 78 %
- *Aspergillus flavus* : 9%
- *Aspergillus niger* : 9%
- *Aspergillus sp.*: 5%

Candidose : candidémie

- 100 % documentées par culture
- *Candida albicans* : 25 %
- *Candida non albicans* : 75%
- *Candida glabrata* : 43%
- *C. parapsilosis*, *C. krusei*,
C. tropicalis : 27%

Neofytos D. coll., CID 2009

Figure 15 : Incidence des Infections fongique invasives.
Neofytos D. coll. CID 2009.

L'épidémiologie des IFI est toutefois bien différente. Le risque d'infection à levures concerne, à l'instar des infections bactériennes, la plupart des patients hospitalisés. Les infections à *Aspergillus*, ne sont, elles, observées que chez

les patients profondément immunodéprimés comme par exemple en cas de greffes d'organes ou de chimiothérapies très aplasiantes.

Ces infections fongiques sont graves, à l'origine d'une mortalité élevée, de l'ordre de 30 à 50 % pour les CI et de 70 à 90 % pour les AI [40].

Actuellement, le diagnostic mycologique classique qui repose majoritairement sur la mise en évidence directe ou après culture des champignons dans les prélèvements biologiques n'est pas satisfaisant, car il manque de sensibilité et ne permet pas d'assurer un diagnostic précoce des IFI. Or, la précocité du diagnostic qui conditionne, en partie, celle du traitement antifongique, est un élément clé en termes de pronostic de ces infections. C'est pourquoi le développement de méthodes de biologie moléculaire plus sensibles, est un enjeu important et une préoccupation constante des mycologues.

Par la suite nous verrons l'application de la biologie moléculaire pour le diagnostic de certaines IFI les plus rencontrées, à savoir l'aspergillose, la candidose et la cryptococcose.

I- Aspergillose :

Avec un taux de mortalité de 70% à 90% [40], Les infections fongiques par l'AI opportuniste essentiellement *Aspergillus fumigatus* est une cause majeure de mortalité chez les personnes immunodéprimées. Les patients qui ont plus de risque sont ceux qui présentent une longue période de neutropénie, par exemple pendant le traitement de leucémie aigue ou la transplantation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (HSCT) ou après greffe d'organes solides [41].

L'*A. fumigatus* est un saprophyte moisissure ubiquitaire qui forme des conidies aéroportées. Les êtres humains inhalent, en moyenne, chaque jour des centaines de ces conidies Fongiques qui ont une gamme de tailles allant du 1-3 μm et se propagent facilement dans l'environnement par de nombreuses voies, y compris l'air. Chez les hôtes immunocompétents, les conidies sont tuées et effacées par les cellules du système immunitaire pulmonaire.

Cependant, les patients immunodéprimés peuvent développer une aspergillose pulmonaire invasive, une infection potentiellement mortelle, causée principalement par *A. fumigatus*. La réussite du traitement de l'AI chez ces individus dépend non seulement de renverser l'immunité compromise, en réduisant par exemple la dose ou l'arrêt des immunosuppresseurs, mais aussi sur le diagnostic précoce et l'instauration d'un traitement antifongique efficace.

La détection précoce d'AI est cruciale pour le rétablissement du patient. L'incidence croissante des AI, chez les patients immunodéprimés, met l'accent sur la nécessité d'améliorer les outils de diagnostic actuellement limités. Les tests classiques de diagnostic, tels que la culture du sang ne sont pas très utiles pour la détection d'Aspergillus. [42-43]. Il ya eu quelques Progressions dans le diagnostic de l'AI ces dernières années, principalement en raison de l'utilisation de scan haute résolution CT-scan et d'autres techniques d'imagerie. Pourtant, l'AI établie est difficile à traiter avec un taux de mortalité de 80 - 90% [44 - 45].

D'autres méthodes non-culture basées sur la détection d'antigènes fongiques systémiques ont été développées. Le dosage du galactomannane (Platelia®, BioRad) et de β -1-3-glucane [47], sont commercialement disponibles et approuvés par la FDA, ainsi qu'ils ont été inclus en Europe dans les critères de

l'Organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer / Mycoses Study Group (EORTC-MSG) [46, 48].

Plus récemment, des protocoles de PCR pour le diagnostic des infections fongiques dues à *Aspergillus* ont été décrits [49]. Une gamme de différentes PCR (classique, niché, en temps réel) ont été développés, en ciblant les régions de gènes différents (cytochrome p450, protéines de choc thermique, 18S, 5.8S, 28S). L'essai PCR qui est le plus approprié dépend des exigences du procédé. La PCR peut être utilisée comme moyen pour le diagnostic précoce de l'AI idéalement avant l'apparition des symptômes cliniques et comme outil pour surveiller la thérapie antifongique préventive. Selon l'objectif de l'essai, les différents aspects techniques doivent être envisagés, y compris les types d'échantillons, l'extraction des acides nucléiques, les cibles d'ADN fongique et la fréquence de l'échantillonnage.

Ces tests moléculaires offrent un potentiel élevé en terme de sensibilité et de spécificité, mais varient beaucoup dans leur faisabilités et sont jusqu'à présent non normalisés.

Types d'échantillons :

Un nombre limité d'essais préliminaires pour la normalisation ont été réalisés même si plusieurs questions restent sans réponse. Le premier facteur est l'échantillonnage. La plupart des études publiées préconisent l'utilisation du sang ou du sérum, tandis que d'autres utilisent différents prélèvements tels que le LBA [50], LCR [51], ou une biopsie tissulaire [52]. Toutefois, l'obtention de tels échantillons nécessite des procédures invasives qui sont rarement adaptées aux patients gravement malades. Bien que le LBA a l'avantage de cibler le site

primaire de l'infection, cette procédure est sujette à la contamination sous forme de spores d'*Aspergillus* qui peuvent être présentes dans les voies respiratoires supérieures ce qui rend difficile, voire impossible, de distinguer entre la présence de conidies étrangères et l'invasion tissulaire réelle [53].

Le choix de l'échantillon a une grande influence sur la méthodologie d'extraction, le sang est l'échantillon le plus souvent testé car il est facile à obtenir et offre la possibilité à l'analyse prospective. Ce qui le conduit à devenir l'échantillon de choix [54].

A propos de la meilleure fraction du sang qui doit être choisie pour le test (composant cellulaire, plasma ou sérum), aucun consensus n'a encore été atteint [55].

Le test sur les échantillons de sérum par PCR repose sur la détection de l'ADN circulant libre d'*Aspergillus*, tandis que l'utilisation de l'échantillon l'EDTA-sang totale permet de détecter l'ADN associé aux conidies ou fragments mycéliens et l'ADN libre en circulation.

Loeffler et al. ont constaté que le sang total est le meilleur prélèvement pour une extraction de l'ADN fongique comparé au plasma [58].

En 2011 Une étude comparative pour analyser la performance de la PCR pour la détection de l'ADN d'*A. fumigatus* dans le sang et le sérum a été effectuée sur des patients atteints d'AI. Un total de 711 séries d'échantillons (356 sur sang total et 355 échantillons de sérum) de 38 patients adultes ont été analysés. Les résultats positifs de PCR ont été observés dans 93,5% des cas pour lesquels le sérum a été analysé contre 93,9% des cas dont l'échantillon de sang total a été

analysé. Les performances de ce test basé sur la PCR en temps réel ont été similaires pour les deux échantillons de sérum et de sang [75].

Le « UK–Irish fungal PCR consensus group » a recommandé l'utilisation de 5 ml de l'ensemble du sang prélevé dans l'EDTA [70], afin d'avoir accès à la fois à l'ADN libre et associé aux cellules. En outre, l'EDTA est connu pour inhiber les DNases qui sont naturellement présentes dans le sang sans interférer avec la PCR qui se produit souvent en présence de citrate, l'héparine doit être évitée en raison de Taq-inhibition [59].

Méthodes d'extractions :

Il n'y a pas de consensus atteint sur la méthode de choix pour l'extraction et la purification d'acide nucléique d'*Aspergillus*. L'ADN est généralement considéré comme une cible de choix en raison de sa relative stabilité et la facilité d'extraction (comparé à l'ARN) [59]. Les prélèvements tels que le plasma et le sérum, dans lequel l'ADN serait libre en solution, permettent des protocoles plus rapides et moins complexes (Tampon pour la lyse des globules rouges et des globules blancs ne sont pas nécessaires) pour l'extraction de l'acide nucléique par rapport au sang total [47]. Si des éléments mycéliens ou conidies sont présents dans les échantillons, les protocoles doivent compter un processus plus long et plus complexe. Cela est dû au fait que la paroi cellulaire du champignon est difficile à briser, afin de libérer l'ADN. Pour le sang total Des tampons hypotoniques de lyse cellulaire de globules rouges et blancs sont souvent utilisés.

Les protocoles utilisés pour briser la paroi cellulaire fongique s'appuient généralement sur la digestion enzymatique, comme la lyticase recombinant

[60], ou la perturbation mécanique par broyage à billes [61]. Si la lyse enzymatique est effectuée, la lyticase recombinant doit être utilisée à la place de zymolyases [61].

Il est constaté que la méthode d'extraction d'ADN fongique est cruciale car l'ADN extrait à partir de différents fluides corporels ne contient pas seulement l'ADN humain, mais peut également contenir l'ADN fongique, bactérien, viral et parasitaire. La quantité totale d'ADN peut varier considérablement d'un échantillon à l'autre. [47].

Acide nucléique Fongique cible pour le dosage :

Le troisième élément clé à convenir est la cible moléculaire. L'ADN plutôt que l'ARN est généralement considéré comme le cible de choix en raison de sa relative stabilité et la facilité d'extraction [59, 62].

Plusieurs gènes du génome d'*Aspergillus*, tels que les opérons ribosomiaux, sont présents dans de multiples copies, Le ciblage de ces gènes offre l'avantage d'augmenter les chances que l'amplification d'ADN permet d'atteindre des niveaux détectables. Au cours de ces dernières années, la région d'ADN ribosomiaux composée de gène de la 18S (1800pb), le gène de la 5.8S (159pb) et le gène 28S (3396pb) constituent des cibles prometteuses. Jusqu'à présent, de nombreuses études ont porté sur les différentes composantes, 18S [63,64], 28S [65], ITS1 [66] et ITS 2 [49].

Une étude a révélé que le dosage de 28 S est plus précis que le dosage de 18 S, en particulier depuis que la 18 S a été utilisée pour amplifier une partie du gène humain ADNr [57].

D'autres gènes cibles tels que ceux de la mitochondrie ne sont pas véritablement des gènes multi-copie, mais peuvent en fait être considérés comme tel car il a été estimé qu'il ya 12 copies du génome mitochondrial pour chaque copie de génome d'*Aspergillus* [67].

Il est également important de considérer la nature environnementale d'*Aspergillus*. Ces hyphes et ces spores sont omniprésents dans l'environnement et constitue une source de contamination, ce qui représente un défi pour les scientifiques à tous les niveaux [68].

Réaction en chaîne de la polymérase (PCR) :

Une multitude de techniques PCR ont été utilisées pour amplifier l'ADN fongique, il ya eu peu de standardisation des procédures et très peu d'études de validation inter-laboratoires.

Les techniques le plus souvent décrites sont la technique de la PCR conventionnelle, la PCR nichée (nested-PCR), et la PCR en temps réel avec révélation directe de l'ADN amplifié par des sondes fluorescentes [71].

Une étude a été publiée par White et al. qui ont utilisé une approche PCR nichée avec des amorces ciblant la région 28S des opérons ADN ribosomiaux pour enquêter sur un groupe de 203 patients à risque sur une Période de 1 an [63,69]. Les auteurs ont rapporté une bonne sensibilité 92,3% et une spécificité de 94,6%. L'approche PCR nichée est sensible à la contamination croisée entre les échantillons, et aussi rend toute quantification précise de l'agent infectieux impossible.

White et ses collègues ont publié une étude multicentrique utilisant l'approche PCR en temps réel, comparant l'utilisation trois machines (LightCycler (Roche), Applied Biosystems 7500 Real-time PCR system avec des sondes d'hydrolyse, et enfin Rotor-Gene (Corbett Research). Les plates-formes se sont révélées avoir une influence importante sur le dosage [57]

L'introduction des Contrôles pour la contamination de la PCR fournit la preuve de la cohérence des essais et leurs Performances. Les contrôles doivent être inclus pour détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR. Ceci est réalisé par dopage d'échantillons cliniques avec un acide nucléique cible alternatif (plasmide) qui est amplifié dans les mêmes conditions mais n'interfère pas avec la spécificité de l'épreuve. À ce jour, un grand nombre d'études entreprises n'ont pas inclus tous ces contrôles stricts [55].

Cependant, le manque de standardisation des techniques est une des principales raisons pour lesquelles l'EORTC / MSG n'a pas encore inclus la PCR dans la liste qui a été publiée sur les critères pour le diagnostic de l'AI.

Tentatives de Standardisation de la détection d'Aspergillus par PCR :

L'amplification de l'ADN Aspergillus par PCR a été décrite depuis le début des années 1990, et beaucoup d'études sur le sujet ont été publiées. Toutefois, comme il est mentionné précédemment, les protocoles varient largement en fonction de la sélection des prélèvements cliniques appropriés (échantillons de sang total, sérum, LCR ou LBA), les Procédés d'extraction d'ADN (lyse enzymatique ou procédures mécanique), et la sélection de la séquence cible

adéquate, y compris les amorces, sondes et les systèmes PCR. Ce qui a conduit à des résultats contradictoires.

Ce manque de standardisation des techniques a conduit à des tentatives pour définir un consensus pour une PCR destinée au diagnostic d'AI.

White et al. ont réalisé la première étude multicentrique des méthodes de détection d'espèces d'*Aspergillus* par PCR utilisées au Royaume-Uni et en Irlande, par la distribution et l'analyse de plusieurs panneaux d'échantillons [72]. Le groupe était composé de 10 laboratoires différents. Ils ont fait la comparaison entre deux ensembles d'amorces (28S et 18S) et de trois plates-formes (LightCycler [Roche], Rotor-Gene [Corbett Research, Mortlake, NSW, Australie], et TaqMan [Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis]). Dans cette étude, le dosage 28S a été jugé plus spécifique que le dosage 18S. Se fut principalement dû au fait que l'ensemble amorce / sonde utilisée pour amplifier / détecter l'amplicon 18S a été trouvé pour amplifier et détecter une partie du gène humain ADNr en l'absence d'ADN d'*A. fumigatus*. Ce phénomène était responsable d'une diminution de la sensibilité. Dans l'ensemble, la sensibilité et la spécificité, étaient plus élevées en utilisant l'amorce 28S qu'avec l'amorce 18S, quelle que soit la plate-forme utilisée [72].

Un autre consensus de collaboration australo-allemande impliquant six laboratoires a également été créé pour évaluer les méthodes d'extraction de l'ADN et de la PCR utilisées. Il semblerait que la PCR en temps réel utilisée pour les essais en combinaison avec lyse efficace de la paroi cellulaire fongique présentent une forte reproductibilité. Néanmoins, le groupe consensus EORTC-MSG pour définir les IFI a conclu malheureusement qu'il n'y a que trop peu de

progrès pour permettre l'inclusion de la PCR dans les définitions révisées des IFI [73].

Un groupe de travail de la Société internationale de Mycologie humaine et animale (ISHAM) a été formé. Ils ont mis en place une fondation appelée «European Aspergillus PCR Initiative" (EAPCRI). Son objectif est d'établir une standardisation pour Aspergillus PCR pour qu'il soit validé en tant qu'outil de dépistage.

Depuis la fondation de ce Groupe de travail, des panneaux d'extraction d'ADN et des échantillons dopés de sang ont été distribués aux 24 laboratoires participants. Les résultats préliminaires montrent que l'extraction de l'ADN semble être le majeur obstacle plutôt que les différentes techniques de PCR utilisées. Le groupe a pu démontrer que la lyse mécanique des conidies d'*A. fumigatus* est supérieure à la lyse enzymatique, et qu'un volume de sang ≥ 3 ml offre un meilleur rendement, de plus, la PCR en temps réel est supérieure à la PCR conventionnelle [74].

II- Candidose :

Les candidoses invasives sont des infections provoquées par des levures appartenant au genre *Candida*. Ces appellations recouvrent les candidémies et les candidoses viscérales profondes [76,77]. Au cours de ces trois dernières décennies, la prévalence des candidoses systémiques a augmenté considérablement en raison d'une part, de l'augmentation de la population à risque (transplantation d'organes, alimentation parentérale, chirurgie cardiaque...) et d'autre part, des progrès en réanimation qui prolongent la survie de cette population [77]. Les candidoses systémiques se situent au quatrième

rang des infections nosocomiales avec un pourcentage de 10 à 15 % [78,79]. Elles se rencontrent surtout dans les unités de soins intensifs de réanimation chirurgicale digestive et cardiovasculaire, de brûlés et de réanimation médicale, dans les unités de greffes d'organes, dans les services d'oncohématologie et dans les services de néonatalogie [79,80]. *Candida albicans* est l'espèce la plus fréquemment incriminée (60 %), suivi de *C. glabrata* (20 %) dont l'incidence a augmenté ces dernières années sous la pression des antifongiques azolés, puis de *C. tropicalis* (10 %) et de *C. parapsilosis* (5 %) [77, 78, 81, 82].

Une nouvelle espèce de *Candida* ayant des caractéristiques phénotypiques similaires à celles de *C. albicans* a été identifiée en 1995 et a été nommée *C. dubliniensis* [83]. La majorité des isolats de *C. dubliniensis* ont été découverts au niveau de la cavité buccale des sujets infectés par le virus VIH. Cependant, cette espèce a été isolée récemment au niveau d'autres sites incluant le poumon, le vagin, le sang...aussi bien chez des sujets infectés par le virus VIH que des sujets non infectés par ce virus [84].

Le taux de mortalité attribué aux candidoses systémiques est de 40 à 60 % [78, 80, 85]. La difficulté d'établissement d'un diagnostic rapide et spécifique est la raison principale de ce taux élevé de mortalité. En effet, le diagnostic des candidoses systémiques est difficile et tardif devant la non-spécificité des signes cliniques et les difficultés du diagnostic biologique [77]. La symptomatologie est polymorphe et n'est pas spécifique. Elle se présente habituellement par une fièvre isolée, persistante et ne répondant pas à une antibiothérapie à large spectre. Des localisations viscérales pouvant être présentes, doivent être recherchées [79,80, 86],

Le diagnostic biologique se heurte à de nombreuses difficultés vu le manque de sensibilité et/ou de spécificité des techniques utilisées, d'où le retard du diagnostic aggravant le pronostic de la maladie. Pour cela, de grands efforts sont effectués pour la détection d'une méthode de diagnostic rapide et spécifique. Durant les dernières années, plusieurs publications ont montré l'intérêt de la PCR pour le diagnostic des candidoses. Elles ont précisé la bonne sensibilité de la méthode, la spécificité semble également être excellente.

Types d'échantillons :

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

Lorsque les conditions sont requises pour passer du stade de colonisation à celui d'invasion-infection, *Candida* constituent de véritables foyers mycosiques dans certains organes. Des techniques PCR ont été développées mais elles sont invasives et nécessitent de ponctionner ou de biopsier l'organe suspecté [174]. Outre le fait que la biopsie puisse être en zone saine, les localisations organiques sont déjà tardives dans l'évolution clinique de la CI. Pour ces raisons ce type de prélèvement ne paraît pas adapté à un diagnostic précoce de CI.

Actuellement les échantillons les plus testés sont le sang total et le sérum [94].

Le premier test PCR en temps réel qui a été disponible dans le commerce est (SeptiFast) [95], il est réalisé directement sur un échantillon de sang, mais la

présence d'inhibiteurs de la PCR peut conduire à des résultats faussement négatifs. Des résultats faussement positifs peuvent également survenir en raison de la contamination des échantillons par l'air [96].

Une étude récente pour l'évaluation clinique des analyses par PCR en temps réel sur des échantillons de sérum a rapporté des sensibilités et des spécificités > 90% pour la détection des espèces *Candida* dans les échantillons de patients de réanimation [96].

Une autre étude a révélé que la PCR sur sérum donne des résultats mieux que sur le sang total [97].

Acide nucléique Fongique cible pour le dosage :

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

Les molécules qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'analyses phylogénétiques sont comme pour l'*Aspergillus* les ADN ribosomiques [Fig.16]. Les premières études pour *Candida* ont ainsi été réalisées en séquençant directement les ADN ribosomiques.

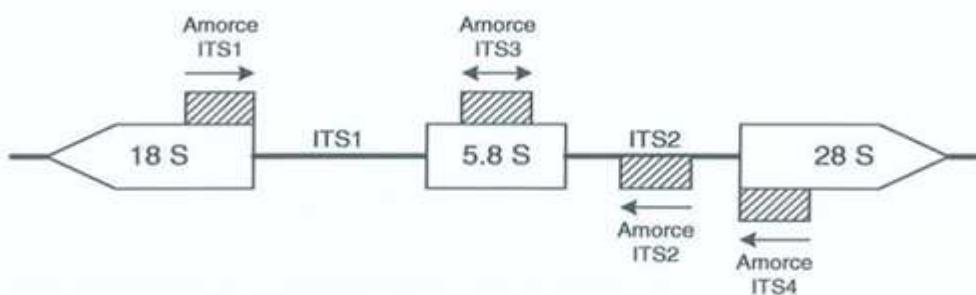


Figure 16 : Les différentes régions de l'ADN ribosomique fongique.
Olivier Béréziat. 2004

Les premières publications utilisant la PCR pour la détection de CI ont été réalisées en 1995 par Williams et al. [87], ils ont développé cette technique en ciblant les espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS4. Il s'agissait d'une technique longue, peu sensible et peu spécifique dont l'application est limitée [88].

Dans la littérature, la partie du génome de *Candida* la plus couramment amplifiée est celle qui code pour la sous unité ARNr 18S. Cette séquence est commune à de nombreux champignons dont *Candida* sp. Ainsi Reiss et al. ont pu démontré que la PCR classique amplifiant 18S DNAr était plus sensible que les hémocultures [89].

En 2000, Loeffler et al. [90] ont repris l'amplification précédente du 18S rDNA. Ils ont démontré une excellente sensibilité.

En 2003 Korabecna M et al. ainsi que Ferrer et al. ont amplifié le gène ribosomal 5.8S et sa région immédiatement contiguë ITS2 [91].

Une étude comparative en 2011 a utilisé deux cibles différentes, le gène FKS1 et le 5,8S, ce qui a montré une concordance de 100 % entre les résultats des deux cibles [92]. Une autre étude paru la même année a utilisé la cible 28S pour l'amplification par PCR-REA (PCR- restriction enzyme analysis) a démontré une sensibilité de 100% [93].

Réaction en chaîne de la polymérase (PCR) :

Les techniques couramment utilisées comprennent la PCR classique [98], semi-nichées et la PCR nichée [101, 104], la PCR immuno-enzymatique [96,

92], différentes variantes de PCR en temps réel [102, 103, 104, 105] et la PCR multiplex [99, 100, 105]. Historiquement, la PCR classique est la technique la plus utilisée mais d'autres méthodes plus récentes ont été développées.

Huang et al [98] ont repris le travail sur la cible fongique ADNr 5,8S par PCR classique et sont parvenus à une sensibilité de 10³ à 10⁴ cellules de *C. albicans* /ml de suspension de culture. Par la suite certains auteurs ont développé diverses techniques de diagnostic sur deux ou plusieurs espèces de *Candida* simultanément: technique multiplex mais sans améliorer la sensibilité [99, 100].

Divers travaux de PCR-EIA (PCR-Immuno Enzymo Assay) ont été développés. Dans cette méthode, le produit d'amplification obtenu par PCR a été révélé par immun-enzymologie sur plaque, cette méthode est robuste et hautement reproductible [92]. L'inconvénient c'est qu'elle prend beaucoup de temps et de possibles problèmes de digestion enzymatique peuvent se produire [92].

De meilleurs résultats sont obtenus avec la PCR nichée. La révélation se fait en utilisant des sondes radioactives ou des sondes à révélation immunoenzymatique. Selon la cible amplifiée, la sensibilité de la méthode varie de 1 à 500 levures/ml de sang. La PCR nichée est caractérisée par une bonne spécificité (98 %) [101].

Les études d'évaluation cliniques des analyses de la PCR en temps réel ont rapporté des sensibilités et des spécificités > 90% [104, 105]. Dans une étude évaluant la PCR en temps réel chez 122 patients ayant une candidose systémique, la sensibilité était de 100 % et la spécificité de 97 % [103].

Le premier test PCR en temps réel qui a été disponible dans le commerce est (SeptiFast), conçu pour détecter les 25 pathogènes microbiens les plus fréquemment isolés en circulation sanguine, dont cinq espèces *Candida*, a été introduit par Roche Diagnostics [95]. Le test est réalisé par PCR en temps réel, et il est achevé en environ 6h [95].

Le tableau suivant regroupe quelques tests PCR pratiqués et leurs performances [96].

Tableau IV : Performance des techniques PCR pour le diagnostic de la CI [96]

Molecular assay or format	Commercially available	DNA extraction procedure	% Sensitivity*	% Specificity*
PCR with probe detection	No	Manual	100	98-100
Seminested/nested PCR	No	Manual	100	98-100
Multiplex PCR	No	Manual	75	97
Real-time PCR	No	Manual	91-100	97-100
SeptiFast	Yes	Automated	90	97

III- Cryptococcose :

La cryptococcose est une maladie opportuniste et cosmopolite due à une levure *Cryptococcus neoformans*. Sa contamination se fait essentiellement par voie respiratoire [117]. *C. neoformans* infecte surtout les patients immunodéprimés.

Dans les pays développés, l'incidence de la cryptococcose a augmenté chez les patients infectés par le VIH à la fin du 20ème siècle [116]. L'introduction de la thérapie antirétrovirale hautement active a permis de réduire l'incidence, mais pas la mortalité associée à la cryptococcose méningée [118]. Ces dernières années, d'autres facteurs tels que la transplantation d'organes ont été associés à un risque accru de contracter la cryptococcose [110]. En outre, son incidence est

encore importante dans les régions en développement, comme en Afrique, où la cryptococcose est la cause d'environ 650.000 de morts par an [118]. *C. gattii* a attiré l'attention de la communauté scientifique, car il touche des personnes sans déficit immunitaire [113], il a été identifié comme l'agent causal de l'épidémie qui s'est produite dans l'île de Vancouver, en Colombie-Britannique, Canada [115], et qui semble se répandre dans le nord-ouest des États-Unis [114].

C. neoformans existe sous 3 variétés :

- *C. neoformans* var. *neoformans* (sérotypage D): cosmopolite. Infecte les sujets immunodéprimés.
- *C. neoformans* var. *gattii* (sérotypes B – C) : régions subtropicales (majoritaire en Afrique sub-saharienne).
- *C. neoformans* var. *grubii* (sérotypage A) qui infecte le plus souvent les sujets immunodéprimés VIH.

Le test sérologique précédemment utilisé pour différencier les différents sérotypes *Cryptococcus* a été interrompu par le fabricant. Actuellement, la classification correcte des différentes variétés repose principalement sur l'analyse de séquence d'ADN [119].

Le diagnostic des cryptococcoses est établi facilement pour une méningo-encéphalite cryptococcique par coloration de LCR avec l'encre de Chine, par détection de l'antigène, ou par culture, mais il peut être plus difficile pour les autres échantillons cliniques tels que les liquides de LBA, des biopsies ou de sang. Bien que la détection d'antigène est un outil de diagnostic sensible et spécifique, de faux-positifs, ainsi que des tests faussement négatifs ont été

décrits, et il n'est pas fiable pour surveiller l'efficacité du traitement antifongique d'où l'importance de l'approche moléculaire.

Des protocoles PCR ont été mis en place pour détecter les espèces de *Cryptococcus* [128, 129, 130]. Ces tests moléculaires peuvent se faire dans divers échantillons cliniques, tels que le sang, sécrétions, LCR, LBA et l'urine. Le LCR semble être l'échantillon qui a donné les meilleurs résultats [121, 125]. Pour l'extraction de l'ADN plusieurs techniques existent. L'extraction d'ADN simple avec des billes de verre, l'extraction d'ADN avec des méthodes à iodure de sodium, avec le thiocyanate de guanidine, et des méthodes plus complexes faisant intervenir des enzymes [127], toutes les méthodes sont efficaces pour l'extraction de l'ADN à partir de cultures de *Cryptococcus*. Une étude a été réalisée ayant pour but de déterminer la meilleure méthode d'extraction d'ADN, prenant en compte l'efficacité de l'extraction, la vitesse, la simplicité de la manipulation, la facilité d'obtention des matériaux et le coût bas, étant donné que ces exigences sont indispensables pour s'assurer que la méthode est applicable pour une utilisation de routine au laboratoire. L'extraction avec du thiocyanate de guanidine s'est révélée être rapide, permet une exécution facile, peu coûteuse et beaucoup plus efficace pour l'extraction dans les échantillons de LCR. Cela a été démontré pour être la seule technique efficace pour l'extraction ADN de *C. neoformans* à partir d'échantillons cliniques, même avec des petites quantités de levure [127].

Une multitude de Cibles ont été utilisées. Les gènes codant pour les protéines de biosynthèse de la capsule CAP59 [124, 111] CAP1, GEF1 [123]. Les gènes hautement conservés codant pour les ARN ribosomiques 23S, 16S et 5,8S ont permis d'atteindre un seuil de détection de 1 cellule / ml [127]. Les espaceurs

internes transcrits ITS1/ITS2 ont été également ciblés [125, 127, 112]. Cette dernière étude a donné une sensibilité et une spécificité de 100% [112].

La détection peut également prendre comme cible l'ARNm du gène CAP10 codant pour la capsule en utilisant la RT-PCR, ce qui permet d'atteindre un seuil de détection de 1-10 CFU/ ml⁻¹ [126].

La plupart des études utilisent comme technique pour l'amplification de l'ADN cryptococcique la PCR nichée. Les résultats de cette PCR indiquent une bonne sensibilité avec une limite de détection rapportée de 10 cells ml⁻¹ [122]. Une autre étude comparant la PCR classique à la PCR en temps réel a montré la supériorité de cette dernière [tab.V] [120]. La PCR-REA est une approche facile à utiliser et ne nécessite que des matériaux moléculaires communs, Cette méthode permet une identification rapide et fiable de tous les serotypes de *Cryptococcus neoformans* [124], une étude récente a démontré la rapidité et la sensibilité plus élevée de la PCR-REA, par rapport aux autres méthodes de diagnostic classique [111].

Tableau V : comparaison des résultats PCR classique et PCR en temps réel pour le diagnostic de cryptococcose [120]

Souche	Origin	Classic PCR	TaqMan® PCR (Ct)
<i>C. gattii</i>	LBA	Positive	Positive (29,2)
<i>C. gattii</i>	Moelle	Negative	Positive (37,2)
<i>C. gattii</i>	LBA	Positive	Positive (20,2)
<i>C. neoformans</i> var <i>grubi</i>	LCR	Positive	Positive (28,3)
<i>C. neoformans</i> var <i>grubi</i>	Sang total	Negative	Positive (38,1)

Chapitre IV : Discussion

Les progrès qu'ont connus les interventions médicales ont fourni un nombre croissant des patients immunodéprimés qui sont confrontés aux risques d'infections fongiques opportunistes. L'utilisation prophylactique des médicaments antifongiques a conduit à l'émergence d'un nombre croissant de souches fongiques résistantes. Les tests de diagnostic classiques, comme la culture de sang montrent une faible sensibilité pour la détection des *Candida* et *Aspergillus* spp. Les fournisseurs de soins de santé assument également des frais supplémentaires, le coût annuel du traitement des infections fongiques en Europe en cours est évalué en millions d'euros [132]. En outre, les patients diagnostiqués avec des IFI ont souvent besoin de soins prolongés à l'hôpital, entraînant des coûts supplémentaires, ce qui souligne l'importance médicale et socio-économique d'un diagnostic efficace des IFI [132].

Il est donc nécessaire d'élaborer et évaluer des méthodes non-culture basées sur la détection des acides nucléiques pour les infections fongiques profondes. L'utilisation de la PCR pour la détection d'une infection fongique systémique a été largement étudiée et offre un potentiel en termes de sensibilité et de spécificité.

On discutera par la suite, l'utilité de diagnostic moléculaire pour les IFI les plus communes à savoir l'aspergillose, la candidose et la cryptococcose, et sa comparaison avec les méthodes de diagnostic les plus utilisées.

🚩 L'une des infections fongiques qui a fait l'objet de plus grand nombre d'études visant à évaluer l'utilité de l'application de la PCR dans son diagnostic est l'AI. Malgré une meilleure connaissance et capacité à la diagnostiquer, le diagnostic définitif de l'AI reste difficile et la mycologie classique est rarement

utile. Sans un diagnostic précis, les cliniciens ont souvent recours à un traitement antifongique empirique, exposant les patients à des traitements inutiles et une toxicité élevée et des effets secondaires associés.

L'introduction des techniques non culture a renforcé la capacité de diagnostiquer l'AI chez les patients à haut risque. Des anomalies pulmonaires compatibles avec l'AI tels que des nodules entourés par un "signe halo" peuvent être détectées par tomodensitométrie à haute résolution [134]. Cependant, le signe du halo est transitoire et n'est détectable que durant le début de l'infection, après quoi les signes radiologiques deviennent non spécifiques ou semblent trop tardifs pour être thérapeutiquement utiles [133]. Actuellement, la technique commercialisée la plus performante est la recherche par méthode ELISA d'un antigène, le galactomannane, composant de la paroi cellulaire spécifique du genre *Aspergillus* (Platelia ®*Aspergillus*, Biorad, France), mais il présente des caractéristiques de performance variables et elle est influencée par : la prévalence de la maladie, l'âge, un traitement en parallèle par certains antimicrobiens, et même la consommation de certains aliments [135, 136, 137, 138].

Une étude comparative réalisée en 2011 sur 158 échantillons de LBA a rapporté un taux de sensibilité et spécificité de la PCR respectivement de (94,1% - 98,5%), contre (94,1% - 97,1%) pour la détection de l'antigène galactomannane [tab.VI], ce qui montre une spécificité légèrement plus élevée de la PCR [163].

Tableau VI : Performance des tests de diagnostic de l'AI pour 158 échantillons de LBA [163].

	Test result [no. of specimens with result/no. tested] by:	
	MycAssay <i>Aspergillus</i> PCR	GM ELISA
Sensitivity (%)	94.1 (71-99) [16/17]	94.1 (71-99) [16/17]
Specificity (%)	98.6 (94-99) [139/141]	97.9 (93-99) [138/141]

En 2012 une revue systématique des études qui compare entre les performances de la PCR et la détection d'antigène galactomannane a été réalisée, la PCR semble avoir une sensibilité et une spécificité légèrement plus élevée [164].

Malgré les résultats encourageant de la performance de la PCR, l'acceptation généralisée du diagnostic de l'AI par PCR a été entravée par un manque de standardisation, aggravée par une connaissance limitée du processus de la maladie.

L'United Kingdom Fungal PCR Consensus Group a publié une méthodologie convenable pour assister au diagnostic par PCR des AI au Royaume-Uni et en Irlande [139]. Ces rapports ont poussé un groupe d'experts, principalement européens pour la formation de l'European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPCRI) groupe de travail de la Société Internationale pour les mycoses humaines et animales (ISHAM), auquel ont participé plus de 60 centres à travers l'Europe et incluant également des centres en Australie et au Moyen-Orient. L'EAPCRI a accepté de collaborer pour le développement des normes pour une méthode de diagnostic de l'aspergillose par PCR, et de les valider dans les essais cliniques afin que la PCR puisse être incorporée dans des futures

définitions consensuelles pour le diagnostic des IFI. EAPCRI se compose de laboratoire, cliniques et statistiques, des groupes de travail et un comité de pilotage chargé de concentrer la direction générale du groupe, assurant un lien entre les groupes de travail, ainsi que les fonds nécessaires [147].

Ils ont publié en 2010 un travail qui semble être l'une des études les plus complètes réalisées pour le diagnostic de l'AI par PCR. Le processus, les résultats et la méthodologie recommandée par le groupe de travail EAPCRI pour une PCR réalisée sur des échantillons du sang sont comme suivant:

Les résultats de cette étude ont montré que la plupart des systèmes d'amplification PCR évalués (90%) détectent efficacement l'équivalent de 50 conidies de *Aspergillus fumigatus* par échantillon, et que (45%) étaient capables de détecter l'équivalent de 5 conidies de *A. fumigatus*. Cependant, la moitié des centres subissent des réductions spectaculaires de seuils de détection quand ils ont testé le panneau WB 2007 comparé au panneau WB 2008 (différence dans le protocole d'extraction entre les deux panneaux), mettant en évidence l'impact des procédures utilisées dans l'extraction d'ADN de sang total. En effet, la procédure d'extraction semble être l'étape facteur limitant. Une évaluation détaillée des méthodes d'extractions utilisées avec les deux panneaux a montré que les protocoles utilisant le spécimen entier et le broyage à billes ont été associés aux meilleures performances (panneau WB 2008) et sont recommandés comme procédure d'analyse, entraînant une amélioration des taux de positivité.

Les sensibilités pour les centres conformes étaient > 80% [tab.VII], supérieures à celles des centres non conformes (classés non conformes pour ne pas avoir suivi

les recommandations). Un seul centre conforme (centre 15) a généré des sensibilités pauvres.

Les spécificités pour les centres conformes étaient > 79% [tab.VII], supérieurs à celles des centres non conformes. Un seul centre conforme (centre 16) avait une faible spécificité.

Tableau VII: Les statistiques de performance pour les protocoles utilisés [131]

	Sensibilité		Spécificité	
	%	%	%	%
Conforme	88.7	79.8–94.0	91.6	79.1–96.9
Non conforme	57.6	37.9–75.2	77.2	61.2–87.9
All	80.6	68.2–88.9	86.3	76.1–92.6

Un degré élevé de sensibilité analytique est essentiel, car la charge fongique circulante dans le sang est faible [140, 141]. L'utilisation de volumes d'échantillons plus importants permet la détection de faibles concentrations de charge fongique parce que la quantité générale de la cible et la possibilité pour la récupération sont augmentées [142]. Paradoxalement, trop d'ADN extrinsèque peut inhiber le processus de la PCR, il est donc essentiel qu'un contrôle interne soit utilisé pour empêcher la survenue de résultats faussement négatifs.

L'analyse statistique entre la sensibilité et les autres covariables a montré que les recommandations (utilisation du spécimen entier, le broyage à bille, et le contrôle interne de la PCR) et l'étape de lyse des cellules blanches ont été toutes positivement associées à la sensibilité. En revanche, les corrélations négatives

ont été associées aux volumes importants d'élution (>100 µL), ce qui a réduit la concentration finale d'ADN.

Il n'y avait pas de corrélation significative entre la sensibilité et la cible PCR.

Recommandations de l'EAPCRI.

Puisque les analyses statistiques entre la sensibilité et la spécificité et les autres covariables ont montré que l'extraction et l'étape de lyse des cellules blanches ont été toutes positivement associées à la sensibilité, les recommandations portent surtout sur cette étape.

Le protocole recommandé pour l'extraction d'ADN fongique préconise l'utilisation d'échantillon de sang total-EDTA.

Il est recommandé que l'EDTA soit l'unique anticoagulant utilisé pour les échantillons de sang, puisque l'héparine et le citrate de sodium ont été respectivement associés à l'inhibition et à la contamination [145]. Les volumes de sang relativement élevés (≥ 3 ml) sont nécessaires, et il est important de bien lyser à la fois les globules rouges et blancs avant de pratiquer le broyage à billes pour perturber les cellules fongiques. La lyse fongique par digestion à la lyticase recombinante devrait être remplacée par le broyage à billes, ce qui supprime des dépenses considérables et un temps de traitement supplémentaire (30 à 60 min). Après que les Cellules fongiques soient lysées, les protocoles commerciaux peuvent être utilisés pour purifier, isoler et éluer l'ADN. La contamination du réactif peut être problématique lorsque la PCR fongique est réalisée [146]. Il est recommandé de tester les réactifs pour la contamination en utilisant les contrôles négatifs d'extraction, mais aussi des contrôles positifs d'extraction avec des charges fongiques uniformes et représentatives pour surveiller les performances

de la procédure d'extraction. L'utilisation des volumes d'élution d'ADN supérieurs à 100 µl doit être évitée.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment la validité analytique de la PCR *Aspergillus* pour le dépistage et la détection d'*Aspergillus* et constitue un premier pas vers sa standardisation. Mais jusqu'à l'heure actuelle en raison de la grande disparité des tests et des résultats publiés, la technique ne pourrait être utilisée comme technique de référence pour le diagnostic de routine de l'AI au laboratoire, la stratégie de diagnostic de cette infection fongique repose encore, chez les patients à risque, sur l'association des éléments cliniques, de l'apparition d'images radiologiques sur le scanner, de la recherche du champignon par les méthodes classiques, et de la détection du galactomannane sérique par méthode ELISA.

- ✚ Si on a essayé une standardisation de la PCR pour l'*Aspergillus*, et un groupe international a été créé pour ce but, ça n'était pas le cas pour les autres infections fongiques comme la CI, Le principal problème confrontant les études menées était de savoir comment évaluer la précision d'un test en l'absence de règles standard.

La norme de référence actuelle pour le diagnostic de la CI est la culture du sang, une analyse systématique de 54 études (incluant 4694 patients) évaluant la précision de diagnostic de la PCR dans des échantillons de sang chez les patients cliniquement suspects pour une probable CI, a révélé que la sensibilité de la PCR était de 85% beaucoup plus élevée que celle des hémocultures 35% [148]. Ces résultats sont compatibles avec la conclusion que la PCR permet une plus grande sensibilité que les hémocultures pour le diagnostic de la CI, avec une

spécificité supérieure à 90% [148]. En plus de la sensibilité médiocre, la culture du sang prend 24 à 48 h pour devenir positive [149, 154]. Les études démontrent qu'un délai de 12 à 48 h dans un traitement antifongique approprié est associé à une augmentation significative de mortalité [150, 151]. A l'inverse, l'utilisation d'un traitement antifongique empirique pour les patients à risque est très répandue, conduisant à une augmentation des coûts et des effets écologiques néfastes [148]. Les méthodes non culture, telles que la détection de l'ADN par PCR, ont été développées afin d'aider dans le diagnostic rapide des infections, ce qui permet l'initiation de la thérapie ciblée sur les espèces 6 h après le début de la septicémie [152].

Plusieurs autres tests pour la détection des antigènes et anticorps candidémiques sont commercialisés, Une étude publiée en 2012 [154], a comparé les sensibilités et les spécificités de la PCR en temps réel avec :

- Platelia Candida Ag test (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), pour la détection d'antigène Mannan.
- Fungitell (Associates of Cape Cod Inc, East Falmouth, MA, USA), pour la détection de l'antigène 1,3- β -D glucan.
- Platelia Candida Anticorps (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), pour la détection des anticorps anti-mannan.
- Platelia Candida Ag + Ac, pour la détection d'anticorps anti-mannan, combinée à la détection de l'antigène Mannan.

Tableau VIII: Les performances des différents tests pour le diagnostic de la CI [154]

Commercial assay	Antigen and/or antibody detected	% Sensitivity*	% Specificity*
Fungitell	1,3- β -D glucan	77	85
Platelia <i>Candida</i> Ag	Mannan	58	93
Platelia <i>Candida</i> Ab	Anti-mannan antibodies	59	83
Platelia <i>Candida</i> Ag + Ab	Mannan + anti-mannan antibodies	83	86
SeptiFast PCR	DNA	90	97

Les résultats montrent une excellente sensibilité et spécificité de la PCR comparé aux autres techniques de diagnostic non culture [tab.VIII]. Ces résultats sont confirmés par une autre étude qui rapporte des sensibilités et des spécificités > 90% pour la détection des espèces *Candida* dans les échantillons de sérum de patients de réanimation [155]. La PCR offre alors une alternative intéressante pour améliorer le diagnostic en temps opportun chez les patients à haut risque.

Malgré le potentiel élevé des tests basés sur la PCR, la détection de l'acide nucléique *Candida* dans les fluides corporels peut avoir quelques difficultés en raison de la faible charge pathogène et la dure paroi cellulaire des champignons qui fait obstacle à une lyse efficace pour la libération de l'ADN, conduisant à des résultats faussement négatifs [159]. Des résultats faussement positifs peuvent également survenir en raison de la contamination des échantillons par l'air. En outre, comme de nombreuses espèces *Candida* sont des colonisateurs de la peau de l'homme, des muqueuses ou des surfaces d'autres sites anatomiques, la détection des acides nucléiques cibles correspondant à quelques

cellules *Candida* dans les échantillons cliniques provoque des difficultés à distinguer la colonisation de l'infection [153].

Des techniques commercialisées pour la détection de la CI sont récemment devenues disponibles. Le premier test PCR en temps réel qui a été disponible dans le commerce est SeptiFast (Roche Diagnostics), conçu pour détecter les 25 pathogènes microbiens les plus fréquemment isolés en circulation sanguine, dont cinq espèces *Candida* [156]. L'évaluation initiale de l'essai SeptiFast en a été prometteuse car elle présentait 83% de concordance avec les résultats de culture du sang et les résultats discordants étaient en faveur de SeptiFast étant donné que des échantillons provenant de patients cliniquement suspects étaient positifs à la PCR, mais testés négatifs par la culture. Des évaluations subséquentes, employant des populations de patients plus importantes et plus diversifiées, y compris les nouveau-nés et des enfants, ont donné des résultats similaires [157, 158].

Compte tenu de ces résultats, la PCR est capable de poser le diagnostic des candidoses systémiques d'une façon précoce et spécifique. Elle permet ainsi, d'instaurer un traitement le plus rapidement possible et de l'adapter selon l'espèce. Bien que les méthodes de PCR soient développées depuis longtemps, elles restent non standardisées et non disponibles en routine pour la détection des CI.

✚ Pour la cryptococcose, son diagnostic au laboratoire est basé sur la démonstration directe, la culture et la détection de l'antigène par test d'agglutination au latex (LAT). Les méthodes microscopiques et de culture, bien qu'ils soient spécifiques, montrent une sensibilité modérée de 50-80% [160]. En

outre, la culture prend du temps et nécessite des volumes plus grands d'échantillons et de la main-d'œuvre. Le LAT est plus sensible, mais a l'inconvénient de générer des faux positifs [162] ainsi que des taux élevés de faux négatifs [160]. La subjectivité apparente de la lecture et d'interprétation de la réaction LAT pose des problèmes supplémentaires, en particulier dans les cas limites. Le Test immuno-enzymatique (EIA) est une autre méthode pour la détection des antigènes polysaccharidiques capsulaires de *C. neoformans* dans les échantillons cliniques. Des études ont démontré la faible réactivité croisée de cette technique [160].

La PCR offre alors une excellente alternative pour le diagnostic précoce de la cryptococcose comparativement aux méthodes conventionnelles, car elle est rapide, permet de détecter une faible charge fongique, et peut être utilisée pour un échantillon de petite taille [161].

Une étude comparative des méthodes conventionnelles (examen direct, culture), LAT, EIA et PCR a été réalisée sur un total de 359 échantillons provenant de 82 patients [160]. L'évaluation comparative a été effectuée séparément sur des échantillons de LCR, sérum et urine. Les résultats sont regroupés dans les tableaux suivant.

Tableau IX: Sensibilité et spécificité des différents tests de diagnostic pour LCR [160]

Test		Diseased (n=46)	Control (n=30)	Sensitivity (%)	Specificity (%)																																										
Culture	Positive	44	0	95.7 (84, 99.2)	100 (85.9, 100)																																										
	Negative	2	30			India ink	Positive	43	0	93.5 (81.1, 98.3)	100 (85.9, 100)	Negative	3	30	Gram stain	Positive	39	0	84.8 (70.5, 93.2)	100 (85.9, 100)	Negative	7	30	LAT	Positive	46	4	100 (90.4, 100)	86.7 (68.4, 95.6)	Negative	0	26	EIA	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)	Negative	0	30	PCR	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)
India ink	Positive	43	0	93.5 (81.1, 98.3)	100 (85.9, 100)																																										
	Negative	3	30			Gram stain	Positive	39	0	84.8 (70.5, 93.2)	100 (85.9, 100)	Negative	7	30	LAT	Positive	46	4	100 (90.4, 100)	86.7 (68.4, 95.6)	Negative	0	26	EIA	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)	Negative	0	30	PCR	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)	Negative	0	30						
Gram stain	Positive	39	0	84.8 (70.5, 93.2)	100 (85.9, 100)																																										
	Negative	7	30			LAT	Positive	46	4	100 (90.4, 100)	86.7 (68.4, 95.6)	Negative	0	26	EIA	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)	Negative	0	30	PCR	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)	Negative	0	30															
LAT	Positive	46	4	100 (90.4, 100)	86.7 (68.4, 95.6)																																										
	Negative	0	26			EIA	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)	Negative	0	30	PCR	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)	Negative	0	30																								
EIA	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)																																										
	Negative	0	30			PCR	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)	Negative	0	30																																	
PCR	Positive	46	0	100 (90.4, 100)	100 (85.9, 100)																																										
	Negative	0	30																																												

Tableau X: Sensibilité et spécificité des différents tests de diagnostic pour le sérum [160]

Test		Diseased (n=35)	Control (n=30)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
LAT	Positive	35	2	100 (87.7, 100)	93.3 (78.3, 98.4)
	Negative	0	28		
EIA	Positive	35	0	100 (87.7, 100)	100 (85.9, 100)
	Negative	0	30		
PCR	Positive	35	0	100 (87.7, 100)	100 (85.9, 100)
	Negative	0	30		

Tableau XI : Sensibilité et spécificité des différents tests de diagnostic pour l'urine [160]

Test		Diseased (n=28)	Control (n=30)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Culture	Positive	6	0	21.4 (9, 41.5)	100 (85.9, 100)
	Negative	22	30		
India ink	Positive	9	0	32.1 (16.6, 52.4)	100 (85.9, 100)
	Negative	19	30		
Gram stain	Positive	5	0	17.9 (6.8, 37.6)	100 (85.9, 100)
	Negative	23	30		
LAT	Positive	28	3	100 (85, 100)	90 (72.3, 97.4)
	Negative	0	27		
EIA	Positive	28	0	100 (85, 100)	100 (85.9, 100)
	Negative	0	30		
PCR	Positive	28	0	100 (85, 100)	100 (85.9, 100)
	Negative	0	30		

Tableau XII : Variations de résultats de tests sur des intervalles de temps après le début de traitement antifongique (nombre d'échantillon positif / nombre total d'échantillon) [160]

Pre-treatment		Days after starting antifungal treatment (AT)							Total (AT)
		6-13	14-21	22-29	30-37	38-45	46-65	66-90	
CSF									
Culture	44/46	6/7	5/10	5/9	4/6	1/9	0/4	0/5	21/50
Gram stain	39/46	6/7	7/10	7/9	4/6	4/9	2/4	1/5	31/50
India ink	43/46	7/7	7/10	6/9	5/6	4/9	2/4	1/5	32/50
LAT	46/46	7/7	10/10	9/9	6/6	9/9	2/4	3/5	46/50
EIA	46/46	7/7	10/10	9/9	6/6	9/9	2/4	3/5	46/50
PCR	46/46	7/7	10/10	9/9	6/6	9/9	4/4	3/5	48/50
Serum									
LAT	35/35	23/23	9/9	6/6	3/3	1/1	1/2	0/2	43/46
EIA	35/35	23/23	9/9	6/6	3/3	1/1	1/2	0/2	43/46
PCR	35/35	23/23	9/9	6/6	3/3	1/1	1/2	0/2	43/46
Urine									
Culture	6/28	4/29	0/14	0/6	0/7	0/2	0/4	0/2	4/64
Gram stain	5/28	0/29	0/14	0/6	0/7	0/2	0/4	0/2	0/64
India ink	9/28	3/29	0/14	0/6	0/7	0/2	0/4	0/2	3/64
LAT	28/28	29/29	14/14	5/6	5/7	0/2	1/4	0/2	54/64
EIA	28/28	29/29	14/14	6/6	6/7	1/2	1/4	0/2	57/64
PCR	28/28	29/29	14/14	6/6	6/7	2/2	2/4	0/2	59/64

Selon ces résultats, il y avait concordance de 100% entre l'EIA et la PCR dans tous les échantillons avant traitement antifongique, ce qui démontre que les deux tests sont comparables. Après l'initiation de traitement, lorsque l'EIA est négatif, tous les autres tests l'étaient également, à l'exception de la PCR. Ceci affirme que la PCR est le test le plus sensible. En outre, la PCR n'a pas détecté de l'ADN dans aucun des échantillons de contrôle, ce qui démontre sa spécificité.

Pour les échantillons obtenus après le début du traitement (suivi des échantillons) [tab.XII], la durée de la positivité de la LAT, EIA et la PCR dans le LCR était plus longue (> 90 jours), suivie par le sérum (~ 65 jours), puis l'urine (~ 45 jours). Bien que la charge fongique dans l'urine fût faible, la présence de l'antigène cryptococcique dans l'urine était suffisante pour être détectée. Par conséquent, la détection dans l'urine, en particulier par PCR et EIA peut être utile lorsque l'obtention des échantillons invasifs telles que la LCR et le sérum se révèle difficile.

Ainsi, en conclusion, il a été démontré que LAT, EIA et la PCR ont une sensibilité plus élevée que les méthodes microscopiques directes. Celle-ci ont été positives, même si la culture était négative, la PCR a la meilleure sensibilité puisqu'elle donne des résultats positifs lorsque tout les autres tests donnent des résultats négatifs.

Une autre étude pour La détection de *C. neoformans* dans le LCR par la PCR a été réalisée [161]. Les résultats démontrent que la technique PCR a une sensibilité et une spécificité élevée (92,9% et 100%, respectivement), supérieure à la culture (85,7% et 100%) et l'encre de Chine (76,8% et 100%) [Tab.XIII]. En plus la PCR pouvait détecter 1 cellule / ml de LCR.

Tableau XIII : Comparaison des résultats obtenus par la méthode PCR, culture et test à l'encre de Chine dans les échantillons de LCR de 72 de patients [161]

Samples n = 72		Cryptococcal meningitis n = 56	Other meningites n = 16	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Culture	Pos	43	0	76.8	100
	Neg	13	16	(63.3-86.6)	(75.9-100)
China Ink Test	Pos	48	0	85.7	100
	Neg	8	16	(73.2-93.2)	(75.9-100)
PCR	Pos	52	0	92.9	100
	Neg	4	16	(81.9-97.7)	(75.9-100)

L'analyse comparative des trois méthodes, encre de Chine, la culture et la PCR a démontré que cette dernière est beaucoup plus sensible et spécifique, et peut être utilisée comme technique dans le diagnostic au laboratoire de la cryptococcose [161].

Sur la base de ces données, l'utilisation de la PCR est recommandée, car elle est sensible, et offre une aide spécifique et précieuse dans l'établissement d'un diagnostic de cryptococcose et dans sa détection précoce, réduisant ainsi la morbidité et la mortalité surtout que l'incidence de la maladie augmente de façon alarmante.

Questions à aborder :

Si la PCR doit être utilisée en routine dans les laboratoires, il existe des facteurs de grande importance. Par exemple Le volume de sang à traiter doit être compris dans le champ des volumes qui sont habituellement prélevés chez un patient. Encore une fois, un écart important existe entre les études, avec des volumes d'échantillons sanguins allant de 200 microlitres [165] à 10 ml [166]. Sachant

que la charge fongique dans la circulation d'un patient peut être inférieure à un génome par ml, il est recommandé d'utiliser entre 3 et 5 ml, ce qui correspond au volume de sang en charge par la plupart des tubes de prélèvement EDTA dans les hôpitaux. Un volume sanguin plus grand augmente la sensibilité de l'essai en raison de l'augmentation du nombre de cellules fongiques [167]. Une autre considération cruciale dans le développement d'un test de diagnostic en laboratoire des IFI serait le potentiel pour l'automatisation de la méthode.

La plupart des études récentes qui font usage de la PCR en temps réel pour le diagnostic des IFI ont ignoré l'aspect quantitatif de la PCR. En fait, peu d'études rapporte la quantité d'ADN trouvée dans l'échantillon clinique traité, ils utilisent simplement la PCR en temps réel comme critère d'évaluation, les échantillons sont décrits comme étant soit positifs (franchissement du seuil de fluorescence avant un certain nombre de cycles) ou négatifs. Or l'étude quantitative de l'ADN peut être nécessaire dans le suivi des réponses thérapeutiques. La PCR en temps réel pourrait être utilisée quantitativement afin de permettre une surveillance plus étroite des réponses de l'IFI à la thérapie.

L'amplification d'une séquence d'ADN cible par PCR n'indique pas la viabilité des organismes sources. La détermination de la viabilité de l'agent pathogène est importante pour déterminer si l'infection est encore active ainsi qu'à l'évaluation de l'efficacité d'un traitement particulier. L'amplification et la détection de l'ARNm par RT-PCR peut donc être un moyen de suivi de l'efficacité du traitement antifongique.

Certaines études utilisent des échantillons provenant de donneurs sains dopés par des cellules fongiques pour évaluer la performance de la PCR [168], ceci

peut ne pas refléter la sensibilité de l'essai clinique lorsque des échantillons provenant de personnes malades sont analysés.

Une présence transitoire d'ADN fongiques dans le prélèvement clinique pourrait être possible, mais une infection ne peut être exclue. L'interprétation d'un seul test PCR positif doit être mise en relation avec les facteurs de l'hôte, les facteurs de risque individuels, les signes cliniques du patient et la spécificité de la PCR [169]. A titre d'exemple, dans un état critique, de neutropénie chez un patient à haut risque, un seul test PCR *Aspergillus* positif indiquerait le lancement immédiat d'un traitement antifongique.

Il ya également certaines questions à aborder lors de l'utilisation de ces tests, tels que le risque de contamination (qui peut être minimisé par l'utilisation de dosage PCR en temps réel). La fréquence d'échantillonnage éventuel. La fréquence des tests PCR nécessaires chez les patients à haut risque pour détecter l'IFI assez tôt pour parvenir à une réduction de la mortalité par le lancement immédiat d'un traitement.

Outre l'utilisation de la PCR pour le diagnostic des IFI chez les patients symptomatiques, cette technologie hautement sensible peut également être effectuée à titre préventif pour surveiller les patients à risque de développer des IFI, une stratégie utilisée avec succès pour contrôler les infections virales opportunistes. Chez ces patients, les sensibilités maximales et Les spécificités élevées sont obligatoires afin de minimiser le risque de résultats faussement négatifs.

Conclusion

Les techniques de la biologie moléculaire sont des techniques prometteuses qui offrent une meilleure sensibilité et spécificité et un gain de temps considérable comparées aux méthodes de diagnostic conventionnelles. Le diagnostic des IFI par PCR seul, ou combiné à d'autres testes convient comme test de dépistage simple et rapide avec des sensibilités élevées et des délais d'exécutions rapides. Ainsi, elle peut contribuer à réduire le traitement antifongique empirique et peut-être un outil précieux pour l'initiation précoce et le suivi de la thérapie antifongique. Néanmoins, comme toute technique à grande sensibilité le risque de contamination est important et donc de faux positifs, des résultats faux négatifs peuvent également subvenir à cause de la sensibilité aux inhibiteurs de la PCR.

Malgré tout les avantages qu'offre la biologie moléculaire, elle n'a pas encore sa place dans le diagnostic de routine en mycologie médicale à l'inverse d'autres domaines comme la virologie et la bactériologie. Le manque de standardisation est la cause de l'absence d'un test de diagnostic des IFI approuvé par les instances concernées (FDA, EORTC-MSG..).

Bibliographie

[1] Bretagne S, Costa JM.

Towards a nucleic acid-based diagnosis in clinical parasitology and mycology.

Clin Chim Acta. 2006; 363, pp 221–28.

[2] Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, et al.

Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals : Secular trends.

Clin Infect Dis. 2004; 38, pp 311-20.

[3] Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA.

British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections.

The Lancet Infectious Diseases. 2003; 3, pp 230-40.

[4] Bille J.

Le diagnostic des infections fongiques invasives.

Revue Médicale Suisse. 2005 ; 1, 13, pp 904-09

[5] Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, et al.

Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients.

Cochrane Database Syst Rev. 2008; 4, CD007394.

[6] Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, et al.

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

Cancer. 2001; 91, pp 311-18.

[7] Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, et al.

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

J Clin Microbiol. 1999; 37, pp 1510-517

[8] Prella M, Bille J, Pugnale M, et al.

Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 51, pp 95-101

[9] Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al.

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

Clin Infect Dis. 2004; 39, pp 199-205.

[10] Latge JP.

Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*.

Curr Top Med Mycol. 1995. 6, pp 245-281.

[11] Martins TB, Jaskowski TD, Mouritsen CL, Hill HR.

Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to *Coccidioides immitis*.

J Clin Microbiol. 1995; 33, pp 940-943.

[12] Siew FY, Wong B.

Current Status of Non culture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections.

Clin Microbiol Rev. 2002; 15, 3, 465-484.

[13] Hamilton AJ.

Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends.

Med Mycol. 1998; 36, pp351-364.

[14] Walsh, TJ, Chanock SJ.

Diagnosis of invasive fungal infections: advances in non culture systems.

Curr Clin Top Infect. 1998; 18, pp101-153.

[15] Pickering JW et al.

Diagnostic d'une aspergillose invasive en reanimation.

J Clin Microbiol. 2005; 43, pp 57-59.

[16] Bergeron A, Belle A, Sulahian A, et al.

Contribution of galactomannan antigen detection in BAL to the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies.

Chest. 2010; 137, pp 410-15.

[17] Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweij PE.

1,3- β -d-Glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid.

N Engl J Med. 2006; 354, pp 2834-835

[18] Wheat LJ, et al.

Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia Aspergillus enzyme immunoassay.

Clin Vaccine Immunol. 2007; 14, pp 638-40.

[19] Tamma P.

The galactomannan antigen assay.

Pediatr Infect Dis J. 2007; 26, pp 641-42

[20] Marr AK, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W.

Antifungal therapy decreases sensitivity of the Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay.

Clin Infect Dis. 2005; 40, pp 1762-769

[21] Digby J, Kalbfleisch J, Glenn A, Larsen A, Browder W, Williams D.

Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care units.

Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10, pp 882-85.

[22] Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, et al.

Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients.

J Clin Oncol. 2002; 20, pp 1898-906.

[23] Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE.

Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens.

Clin Infect Dis. 2004; 39, pp 1467-474.

[24] Maertens J, Maertens V, Theunissen K, et al.

Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases.

Clin Infect Dis. 2009; 49, pp 1688-693.

[25] Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV.

Detection of Cryptococcus by conventional, serological and molecular methods.

Journal of Medical Microbiology. 2009; 58, pp 1098-105.

[26] White PL, Barnes RA.

Aspergillus PCR. *Aspergillus Fumigatus and Aspergillosis*.

Washington DC: ASM Press. 2008; 39, pp 373-90.

[27] White PL, Perry MD, Barnes MA.

An update on the molecular diagnosis of invasive fungal disease.

FEMS Microbiol Lett. 2009; 296, pp 1-10.

[28] White PL, Barnes RA.

Aspergillus PCR—platforms, strengths and weaknesses.

Med Mycol. 2006; 44, pp 191-198.

[29] Bournoux M E, Espinasse F.

Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale.

Revue Française des Laboratoires. 2003 ; 351, pp 67-71.

[30] Fuller DD, Davis TE, Denys GA, York MK.

Evaluation of bacter Myco/F lytic medium for recovery of mycobacterium, fungi and bacteria from blood.

J Clin Microbiol. 2001; 39, pp 2933-936.

[31] Latge J P.

Aspergillus fumigatus and Aspergillosis.

Clin Microbiol Rev. 1999; 12, pp 310-50.

[32] White TJ, Burns TD, Lee SB, Taylor JW.

Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics PCR protocols.

A guide to methods and applications Academic Press, Inc., San Diego, California. 1990; pp 315-22.

[33] Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME.

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

Med Mycol. 2002 ; 40, 1, pp 87-109.

[34] Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T.

Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 region of trichosporon species.

J Clin Microbiol. 2002; 40, 5, pp 1826-830.

[35] Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, Lafe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT.

Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes.

J Clin Microbiol. 2000; 38, 6, pp 2302-310.

[36] Lee FJ.

Modified protocol for yeast DNA mini preparation.

Biotechniques. 1992; 12, 5, p 677.

[37] Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM.

Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region automated fluorescent capillary electrophoresis

J Clin Microbiol. 1999; 37, 6, pp 1846-851.

[38] Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, Lafe K, Bui U, Limaye AP, Cookson BT.

Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts,

J Clin Microbiol. 2001; 39, 11, pp 4042-051.

[39] Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, Pfaller M, Chang C, Webster K, Marr K.

Epidemiology and Outcome of Invasive Fungal Infection in Adult Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance Registry.

Clin Infect Dis. 2009; 48, pp 265–73.

[40] Bougnoux ME, Espinasse F, Kac G.

Epidémiologie des infections nosocomiales fongiques : évolution et tendances.

Médecin thérapeutique. 2000 ; 6, pp 24-31.

[41] Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, et al.

Incidence of Invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid Organ transplantation: interim results of a prospective multicenter Surveillance program.

Med Mycol. 2005; 43, pp 49-58.

[42] Meyer MH, Letscher-Bru V, Jaulhac B, et al.

Comparison of mycosis IC / F and plus aerobic / F media for diagnosis of fungemia by the Bactec 9240 system.

J Clin Microbiol. 2004; 42, pp 773-77.

[43] Verweij PE, Meis JF.

Microbiological diagnosis of invasive fungal Infections in transplant recipients.

Transpl Infect Dis. 2000; 2, pp 80-87.

[44] Kim MJ, Lee KS, Kim J, et al.

Crescent sign in invasive pulmonary aspergillosis: frequency and related CT and clinical factors.

J Comput Assist Tomogr. 2001; 25, pp 305-10.

[45] Horger M, Einsele H, Schumacher U, et al.

Invasive pulmonary aspergillosis: frequency and meaning of the 'hypodense sign' on unenhanced CT.

Br J Radiol. 2005; 55, pp 437-44.

[46] Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, et al.

Defining opportunistic Invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus.

Clin Infect Dis. 2002; 34, pp 7-14.

[47] Klingspor L, Loeffler J.

Aspergillus PCR formidable challenges and progress.

Medical Mycol. 2009; 47, 1, pp 241-47

[48] Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al.

Beta-D-glucan as a Diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cut off development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome.

Clin Infect Dis. 2004; 39, pp 199-205.

[49] Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, et al.

Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important Aspergillus and Candida species in clinical specimens.

J Clin Microbiol. 2007; 45, pp 906-14.

[50] Raad I, Hanna H, Huaranga A et al.

Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis using polymerase chain reaction-based detection of *Aspergillus* in BAL.

Chest. 2002; 121, pp 1171-176.

[51] Hummel M, Spiess B, Kentouche K et al.

Detection of *Aspergillus* DNA in cerebrospinal fluid from patients with cerebral aspergillosis by a nested PCR assay.

J Clin Microbiol. 2006; 44, pp 3989-993.

[52] Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E et al.

Cerebral aspergillosis diagnosed by detection of *Aspergillus flavus*-specific DNA, galactomannan and (1→3)-β-D-glucan in clinical specimens.

J Med Microbiol. 2007; 56, pp 129-32.

[53] Tuon FF.

A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples.

Rev Iberoam Micol. 2007; 24, pp 89-94.

[54] Rickerts V, Mousset S, Lambrecht E et al.

Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens.

Clin Infect Dis. 2007; 44, pp 1078–083.

[55] Duval SM, Rogers T, Loeffler J.

Update on polymerase chain reaction for invasive aspergillosis.

Current Fungal Infection Reports. 2007; 1, pp 121-28.

[56] Simoneau E, Kelly M, Labbe AC, et al.

What is the clinical significance of positive blood cultures with *Aspergillus* spin hematopoietic stem cell transplant recipients? A 23 year experience.

Bone Marrow Transplant. 2005; 35, pp 303-06.

[57] White PL, Barton R, Guiver M, et al.

A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections.

J Mol Diagn. 2006; 8, pp 376-84.

[58] Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, et al.

Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR.

J Clin Microbiol. 2000; 38, 3830-833.

[59] Garcia ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D.

Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergilosis.

J Clin Microbiol. 2002; 40, pp 1567-568.

[60] Paterson PJ, Seaton S, Mc Laughlin J, Kibbler CC.

Development of molecular methods for the identification of *Aspergillus* and emerging moulds in paraffin wax embedded tissue sections.

Mol Pathol. 2003; 56, pp 368-70.

[61] Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, et al.

Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR.

J Med Microbiol. 2006; 55, pp 1187-191.

[62] Duval SM, Rogers T, Loeffler J.

Update on polymerase chain reaction for invasive aspergillosis.

Current Fungal Infection Reports. 2007; 1, pp 121–28.

[63] Klingspor L, Jalal S.

Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. From clinical samples using real-time PCR.

Clin Microbiol Infect. 2006; 12, pp 745-53.

[64] Rickerts V, Just-Nu'bling G, Konrad F, et al.

Diagnosis of invasive Aspergillosis and mucormucosis in immunocompromised patients By seminested PCR assay of tissue samples.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006; 25, pp 8-13.

[65] White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA.

The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting.

Clin Infect Dis. 2006; 42, pp 479-86.

[66] Lau A, Chen S, Sorrell T, et al.

Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens.

J Clin Microbiol. 2007; 45, pp 380-85.

[67] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ et al.

Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*.

Nature. 2005; 438, pp 1151–156.

[68] McDevitt JJ, Lees PS, Merz WG et al.

Development of a method to detect and quantify *Aspergillus fumigatus* conidia by quantitative PCR for environmental air samples.

Mycopathologia. 2004; 158, pp 325–35.

[69] Lass-Flörl C, Gung'or E, Gastl G, et al.

Clinical evaluation of *Aspergillus* PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients.

Mycoses. 2005; 48, pp 12-17.

[70] Duval SM, Peter JP, Barne R, Löffler J.

PCR-Based Methods with *Aspergillosis* as a Model.

J invasive fungal infect. 2008; 2, pp 46-51.

[71] Challier S, Abachin E.

Abachin E. PCR-based method's advantages in the diagnosis of invasive aspergillosis for immunocompromised patients.

La Lettre de l'Infectiologue. 2005; 3, pp 82-87.

[72] White PL, Barton R, Guiver M et al.

A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom–Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections.

J Mol Diagn. 2006; 8, pp 376-84.

[73] Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al.

Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group.

Clin Infect Dis. 2008; 46, pp 1813-821.

[74] White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, Finnstrom N, Mengoli C, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J.

Aspergillus PCR: one step closer to standardization.

J Clin Microbiol. 2010; 48, 4, pp 1231-240.

[75] Bernal-Martínez L, Gago S, Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M.

Analysis of Performance of a PCR-Based Assay To Detect DNA of *Aspergillus fumigatus* in Whole Blood and Serum: a Comparative Study with Clinical Samples.

J. Clin. Microbiol. 2011; 49, 10, pp 3596-599.

[76] Ascioğlu S, Rex JH, Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al.

Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and haematopoietic stem cell transplants: an international consensus.

Clin Infect Dis. 2002; 34, pp 7-14.

[77] Anane S, Khalfallah F.

Diagnostic biologique des candidoses systémiques difficultés et perspectives.

Pathologie Biologie. 2007 ; 55, pp 262-72.

[78] Eggimann P, Pittet D.

Candidoses invasives en réanimation.

Schweiz Med Wochenschr. 2000; 130, pp 1525–537.

[79] Yera H, Sendid B, François N, Camus D, Poulain D.

Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001; 20, 864-70.

[80] Poulain D.

Physiopathologie et diagnostic des candidoses systémiques.

La lettre de l'infectiologue. 2000; 15, 5, pp 182-90.

[81] Hanna S, Blancard A, De la Roziere JC, Dumon J, Manelli JC.

Diagnostic des candidémies par PCR nichée et comparaison avec les hémocultures.

J Mycol Med. 2003; 13, pp 61–66.

[82] Rimek D, Singh J, Kappe R.

Cross-reactivity of the Platelia Candida antigen detection enzyme immunoassay with fungal antigen extracts.

J Clin Microbiol. 2003; 41, 7, pp 3395–398.

[83] Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennet DE, Coleman DC.

Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals.

Microbiol. 2005; 141, 7, pp 507-21.

[84] Fotedar R, Hedaithy SS.

Candida dubliniensis at a university hospital in Saudi Arabia.

J Clin Microbiol. 2003; 41, 5, pp 1907-911.

[85] Granier F.

Les infections fongiques invasives : épidémiologie et nouvelles thérapeutiques.

Presse Med. 2000; 29, 37, pp 2051-056.

[86] Richardson MD, Kokki MH.

New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections.

Ann Med. 1999; 31, pp 327-33.

[87] Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ.

Identification of candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA.

J Clin Microbiol. 1995; 33, pp 2476-479.

[88] Cresti S, Posteraro B, Sanguinetti M, Guglielmetti P, Rossolini GM, Morace G, Fadda G.

Molecular typing of Candida spp. By random amplification of polymorphic DNA and Analysis of restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA repeats.

New Microbiol. 1999; 22, 1, pp 41-52.

[89] Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP, Hanazawa R, Latge JP, Lortholary J, Makimura K, Morrison CJ, Murayama SY, Naoe S, Paris S, Sarfati J, Shibuya K, Sullivan D, Uchida K, Yamaguchi H.

Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections.

Med Mycol. 1998; 36, 1, pp 249-57.

[90] Loeffler J, Hebart H, Magga S, Schmidt D, Klingspor L, Tollemar J, Schumacher U, Einsele H.

Identification of rare Candida species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2000; 38, 4, pp 207-12.

[91] Korabecna M, Liska V, Fajfrlik K.

Primers ITS 1, ITS2 and ITS4 detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene region in clinical isolates of fungi.

Folia Microbiol. 2003; 48, 2, pp 233-238.

[92] Amanda D, Eva R and David S. Perlin G. Garcia-Effron, Emilia C, Javier P.

Methods for Identification of Candida Assessment of two New Molecular.

J Clin Microbiol. 2011; 49,9, pp 32-57.

[93] Deshpande P, Shetty A, Mehta A, Kapadia F, Hedge A, Soman R, Rodrigues C.

Standardization of fungal polymerase chain reaction for the early diagnosis of invasive fungal infection.

Indian J Med Microbiol. 2011; 29, 4, pp 406-10.

[94] Coignard C, Hurst SF, Benjamin LE, Brandt ME, Warnock DW, Morrison CJ.

Resolution of discrepant results for Candida species identification by using DNA probes.

J Clin Microbiol. 2006; 42, 2, pp 858-61.

[95] Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefl A, et al.

A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples.

Med Microbiol Immunol. 2008; 197, pp 313-24.

[96] Ahmad S, Khan Z.

Invasive candidiasis: A review of nonculture-based laboratory diagnostic methods.

Indian J Med Microbiol. 2012; 30, 3, pp 264-69.

[97] Avni T , Leibovici L , Paul M.

PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta analysis.

J Clin Microbiol. 2011; 49, 2, pp 665-70.

[98] Huang CC, Tsai WC, Hseu RS, Wang HH.

Identification of *Candida albicans* by specific primers of polymerase chain reaction and DNA probes.

J Microbiol Immunol Infect. 2000; 30, 1, pp 18-31.

[99] Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU.

Seminested PCR for diagnosis of candidemia : comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification .

J Clin Microbiol. 2002; 40, 7, pp 2483-489.

[100] Selvarangan R, Limaye AP, Cookson BT.

Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridization.

J Clin Microbiol. 2002 ; 40, pp 4308-312.

[101] Hanna S, Blancard A, De la Roziere JC, Dumon J, Manelli JC.

Diagnostic des candidémies par PCR nichée et comparaison avec les hémocultures.

J Mycol Med. 2003; 13, pp 61–66.

[102] Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F.

Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real time PCR based assay.

J Clin Microbiol. 2004; 42, 7, 3159–163.

[103] Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Vilalobos H, Aoun M, et al.

Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay.

J Clin Microbiol. 2007; 41, 7, pp 3293–298.

[104] Khlif M, Mary C, Sellami H, Sellami A, Dumon H, Ayadi A, et al.

Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia.

Clin Microbiol Infect. 2009; 15, pp 656-61.

[105] Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, et al.

Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood.

Clin Microbiol Infect. 2010; 15, pp 774-79.

[106] Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ.

Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia.

Crit Care Med. 2008; 36, pp 1487-492.

[107] von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, et al.

Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia.

J Clin Microbiol. 2009; 47, pp 2405-410.

[108] Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, et al.

Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis.

J Clin Microbiol. 2011; 49, pp 2252-258.

[109] Avni T, Leibovivi L, Paul M.

PCR diagnosis of invasive candidiasis: Systematic review and meta-analysis.

J Clin Microbiol. 2011; 49, pp 665-70.

[110] Bartlett K, et al.

The emergence of *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island and expansion in the Pacific Northwest In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*.

Washington DC: ASM Press. 2011; p 313–25.

[111] Cordeiro RA, Costa AK, Brilhante SN, Chaves RA, Castelo-Branco M, Ribeiro JF, Monteirod AJ, Rocha FA, Sidrim JC, Rocha FG.

PCR-REA as an important tool for the identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from human and veterinary sources.

Vet microbiol. 2011; 154, 1-2, pp 180-84.

[112] Gago S, Zaragoza O, Cuesta I, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Buitrago MJ.

High-Resolution Melting Analysis for Identification of the *Cryptococcus neoformans* *Cryptococcus gattii* Complex.

J Clin Microbiology. 2011; 49, 10, pp 3663-666.

[113] Bovers M, et al.

AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid.

Emerg Infect. 2008; 14, pp 1105-108.

[114] Byrnes EJ, Heitman J.

Cryptococcus gattii outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences.

F1000 Biol. 2009; 1, p 62.

[115] Fyfe M, et al.

Cryptococcus gattii infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment.

Can Commun Dis. 2008; 34, pp 1-12.

[116] Govender N, Mitchell TG, litvintseva AP, Miglia KJ.

Cryptococcosis in Africa. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung J, Perfect JR, Casadevall A, editors. *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*.

Washington DC: ASM Press. 2011; pp 269-85.

[117] Mitchell TG, Castaneda E, Nielsen K, Wanke B, Lazera MS.

Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect J, Casadevall A, editors. *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*.

Washington DC: ASM Press. 2011; pp 237-60.

[118] Park BJ, et al.

Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS.

AID. 2009; 23, pp 525-30.

[119] Sidrim JJ, et al.

Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review.

Can J Microbiol. 2010; 56, pp 445-58.

[120] Veron V, Simon S, Blanchet D, Aznar C.

Real-time polymerase chain reaction detection of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples.

Diag Microbiol and Infect Dis. 2009; 65, pp 69-72

[121] Shahindokht BJ, Mansor A, Khaksar A.

Detection of *Cryptococcus Neoformans* by seminested PCR in cerebrospinal fluid.

MJIRI. 2006; 20, 2, pp 62-65.

[122] Champa SD, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV.

Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods.

J Med Microbiol. 2009; 58, pp 1098-105.

[123] Xiaobo F, Zhirong Y, Daming R, Wanqing L.

Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis.

J Med Microbiol. 2008; 57, 12, pp 1481-490.

[124] Enache-Angoulvant A, Chandénier J, Symoens F, Lacub P, Bolognini J, Douchet C, Poirot JL, Hennequin C.

Molecular Identification of *Cryptococcus neoformans* Serotypes.

J Clin Microbiol. 2007, 45, pp 1261-265.

[125] Rappelli P, Are R, Casu G, Fiori P, Cappuccinelli P, Aceti A.

Development of a Nested PCR for Detection of *Cryptococcus neoformans* in Cerebrospinal Fluid. .

J Clin Microbiol. 1998; 36, pp 3438-440.

[126] Amjad M, Kfoury N, Cha R, Mobarak R.

Quantification and assessment of viability of *Cryptococcus neoformans* by LightCycler amplification of capsule gene mRNA.

J Med Microbiol. 2009; 53, 12, pp 1201-206.

[127] Paschoal RC, Hirata MH, Hirata RC, Carvalho MS, Tranches AL, Paula CR.

Neurocryptococcosis: Diagnosis by PCR method.

Rev Ins Med trop Sao Paulo. 2004; 46, 4, pp 203-07.

[128] Carvalho VG, Terceti MS, Dias AL, Paula CR, Lyon JP, de Siqueira AM, Franco MC.

Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR.

Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007; 49, pp 207-10.

[129] Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S, Vidotto V.

Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR.

Mycoses. 2007; 50, pp 277-81.

[130] Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC, Vainstein MH.

Cryptococcus species identification by multiplex PCR.

Med Mycol. 2008; 46, pp 377-83.

[131] White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, et al.

Aspergillus PCR: one step closer to standardization.

J Clin Microbiol. 2010; 48, pp 1231-240.

[132] Tong KB, Lau CJ, Murtagh K, Layton AJ, Seifeldin R.

The economic impact of aspergillosis : analysis of hospital expenditures across patients ubgroups.

Int J Infect. 2009; 13, pp 24-36.

[133] Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, Lopez J, Couillault G, Piard F, Vagner O, Guy H.

Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients.

J Clin Oncol. 2001; 19, 1, pp 253-59.

[134] Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, Wingard JR, Herbrecht R, Ribaud P, Patterson TF, Troke PF, Denning, JE, Bennett DW, Pauw BE, Rubin RH.

Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis : clinical significance of the halo sign.

Clin Infect Dis. 2007; 44, pp 373-79.

[135] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW.

Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis.

Lancet Infect Dis. 2005; 5, pp 609-22.

[136] Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE.

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

Lancet Infect Dis. 2004; 4, pp 349-57.

[137] Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N.

Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis.

Clin Infect Dis. 2006; 42, pp 1417-427.

[138] Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA.

Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality.

Clin Infect Dis. 2007; 44, pp 531-40.

[139] White PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, Gomez BL, Carr MJ, Kimmitt PT, Seaton S, Rajakumar K, Holyoake T, Kibbler CC, Johnson E, Hobson RP, Jones B, Barnes RA.

A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections.

J Mol Diagn. 2006 ; 8, pp 376-84.

[140] Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, et al.

Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus.

Clin Infect Dis. 2002 ; 34, pp 7-14.

[141] Millon L, Piarroux R, Deconinck E, Bulabois CE, Grenouillet F, Rohrllich P, Costa JM, Bretagne S.

Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis.

J Clin Microbiol. 2005; 43, pp 5097-101.

[142] Schulz B, Weber K, Radecke C, Scheer C, Ruhnke M.

Effect of different sample volumes on the DNA extraction of *Aspergillus fumigatus* from whole blood.

Clin Microbiol Infect. 2009; 15, pp 686-88.

[143] Herrera ML, Vallor AC, Gelfond JA, Patterson TF, Wickes BL.

Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA copy numbers in *Aspergillus fumigatus*.

J Clin Microbiol. 2009; 47, pp 1325-332.

[144] Khot PD, Fredricks DN.

PCR-based diagnosis of human fungal infections.

Expert Rev Anti Infect Ther. 2009; 7, pp 1201-221.

[145] Nolan T, Hands RE, Ogunkolade BW, Bustin SA.

SPUD: a qPCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations.

Anal Biochem. 2006; 351, pp 308-10.

[146] Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, Al-Mohsen I, Almodavar E, et al.

Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*.

J Med Microbiol. 2005; 54, pp 243-48.

[147] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al.

Primer sequence disclosure: a clarification of the MIQE guidelines.

Clin Chem. 2011; 57, pp 919-21.

[148] Avni T, Leibovici L, Mical P.

PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis.

J Clin Microbiol. 2011; 49, 2, pp 665-70.

[149] De Pauw, B, et al.

Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group.

Clin Infect Dis. 2008; 46, pp 1813-821.

[150] Bassetti, M., et al.

Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 58, pp 325-31.

[151] Labelle AJ, Micek ST, Roubinian N, Kollef MH.

Treatment related risk factors for hospital mortality in Candida blood stream infections.

Crit Care Med. 2008; 36, pp 2967-972.

[152] McMullan R, et al.

A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults.

Clin Infect Dis. 2008; 46, pp 890-96.

[153] Khlif M, Mary C, Sellami H, Sellami A, Dumon H, Ayadi A, *et al.*

Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia.

Clin Microbiol Infect. 2009; 15, pp 656-61.

[154] Ahmad S, Khan Z.

Invasive candidiasis: A review of nonculture-based laboratory diagnostic methods.

Indian J Med Microbiol. 2012; 30, pp 264-69.

[155] Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, *et al.*

Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood.

Clin Microbiol Infect. 2010; 15, pp 774-79.

[156] Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefl A, *et al.*

A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples.

Med Microbiol Immunol. 2008; 197, pp 313-24

[157] von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, *et al.*

Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia.

J Clin Microbiol. 2009; 47, pp 2405-410.

[158] Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, *et al.*

Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis.

J Clin Microbiol. 2011; 49, pp 2252-258.

[159] Peman J, Zaragoza R.

Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings.

Mycoses. 2010; 53, pp 424-33.

[160] Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV.

Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods.

J Med Microbiol. 2009; 58, 8, pp 1098-105.

[161] Paschoal RC, Hirata MH, Hirata RC, Melhem MS, Dias AL, Paula CR.

Neurocryptococcosis : Diagnosis by PCR method.

Rev Inst Med trop S Paulo. 2008; 46, 4, pp 203-07.

[162] Stoeckli TC, Burman WJ.

Inactivated pronase as the cause of false-positive results of serum cryptococcal antigen tests.

Clin Infect Dis. 2001; 32, pp 836–37.

[163] Torelli R, Maurizio M, Moody A, Pagano L, Caira M, Carolis E, Fuso L, Pascale G, Bello G, Antonelli M, Fadda G, Posteraro B.

Diagnosis of Invasive Aspergillosis by a Commercial Real-Time PCR Assay for *Aspergillus* DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from High-Risk Patients Compared to a Galactomannan Enzyme Immunoassay.

J Clin Microbiol. 2011; 49, 12, pp 4273-278.

[164] Zou M, Tang L, Zhao S, Zhao Z, Chen L, et al.

Systematic Review and Meta-Analysis of Detecting Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosing Invasive Aspergillosis.

Plos one. 2012; 7, 8, Special section p1.

[165] Kami M, Fukui T, Ogawa S, et al.

Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis.

Clin Infect Dis. 2001; 33, pp 1504-512.

[166] Lass-Flörl C, Gunsilius E, Gastl G, et al.

Clinical evaluation of *Aspergillus* PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients.

Mycoses. 2005; 48, pp 12-17.

[167] Klingspor L, Loeffler J.

Aspergillus PCR formidable challenges and progress.

Medical Mycology. 2009; 47, 1, pp 241-47.

[168] Florent M, Katsahian S, Vekhoff A, et al.

Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies.

J Infect Dis. 2006; 193, pp 741-47.

[169] As Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, et al.

Defining opportunistic Invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus.

Clin Infect Dis. 2002; 34, pp 7-14.

[170] Sulahian A, Touratier S, Ribaud P.

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

N Engl J Med. 2003; 349, pp 2366-367.

[171] Viscoli C, Machetti M, Cappellano P et al.

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

Clin Infect Dis. 2004; 38, 6, pp 913-16.

[172] Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Van Eldere J.

False-positive Aspergillus galactomannan antigen test results.

Clin Infect Dis. 2004; 39, 2, pp 289-90.

[173] Singh N, Obman A, Husain S, Aspinall S, Mietzner S, Stout JE.

Reactivity of Platelia Aspergillus galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum.

Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48, 6, pp 1989-992.

[174] Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL.

Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections.

J Clin Microbiol. 2001; 39, 8, pp 2873-879.

RESUME

Résumé

Titre : Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives

Auteur : REDOUANE TELLAA.

Mots clés : infection ; fongique ; invasive ; biologie moléculaire ; diagnostic.

Les infections fongiques invasives représentent un réel danger pour la vie humaine, elles sont graves et à l'origine d'une mortalité élevée, Leur incidence a augmenté sensiblement pendant les deux dernières décennies.

Actuellement, le diagnostic mycologique classique qui repose majoritairement sur la mise en évidence directe ou après culture des champignons dans les prélèvements biologiques n'est pas toujours satisfaisant et parfois ne permet pas un diagnostic précoce. Or, la précocité du diagnostic conditionne la qualité de la prise en charge thérapeutique.

Les méthodes moléculaires ont le potentiel de fournir à la fois des taux de détection élevée, une identification spécifique et un gain de temps dans le diagnostic des infections fongiques. En outre, plusieurs questions doivent être abordées avant que les méthodes basées sur la détection d'acide nucléique fongique soient adaptées à un diagnostic de routine.

Nous rapportons dans ce travail les derniers progrès réalisés ainsi qu'une évaluation des techniques de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques comparées avec les méthodes conventionnelles.

Abstract

Title: Contribution of molecular biology in the diagnosis of invasive fungal infections.

Author: REDOUANE TELLAA.

Keywords: infection; fungal; invasive; molecular biology; diagnostic.

Invasive fungal infections are a real danger to human life, they are serious and cause high mortality, their impact has increased significantly over the past two decades.

Currently, conventional mycological diagnosis based mainly on direct evidence or after culturing fungi in biological samples is not always satisfactory and sometimes does not allow early diagnosis. However, early diagnosis determines the quality of the therapeutic management.

Molecular methods have the potential to provide both high detection rate, specific identification and saves time in the diagnosis of fungal infections. In addition, several issues must be addressed before the methods based on the detection of fungal nucleic acid can be adapted to the diagnostic routine.

We report in this work the recent progress and an evaluation of molecular biology techniques in the diagnosis of fungal infections compared with conventional methods.

المخلص

العنوان : مساهمة البيولوجيا الجزيئية في تشخيص الأمراض الفطرية الغازية.

الكاتب: رضوان الطلاع.

الكلمات الأساسية: العدوى؛ الفطرية؛ الغازية؛ البيولوجيا الجزيئية؛ التشخيص.

الالتهابات الفطرية الغازية تشكل خطرا حقيقيا على حياة الإنسان، فهي خطيرة وتسبب وفيات عالية، و زاد تأثيرها بشكل ملحوظ على مدى العقدين الماضيين.

حاليا التشخيص التقليدي للفطريات يقوم أساسا على الرؤية المباشرة أو بعد زراعة الفطريات في عينات بيولوجية ليست دائما مرضية ولا تسمح أحيانا بالتشخيص المبكر. علما أن التشخيص المبكر يحدد نوعية إدارة العلاج.

التقنيات الجزيئية لديها القدرة على تقديم معدلات كشف عالية، تحديد نوعي و ربح للوقت في تشخيص الأمراض الفطرية. لكن، يجب معالجة العديد من القضايا قبل أن يتم تكييف هذه التقنية لإستعمالها التشخيص الروتيني.

في هذا العمل، سنرى آخر المستجدات و تقييم لتقنيات البيولوجيا الجزيئية في تشخيص الأمراض الفطرية، كما سنرى مقارنة مع طرق التشخيص التقليدي



Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à législation en vigueur aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne pas dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*





جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحسن باللهن العظم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



مساهمة البيولوجيا الجزيئية في تشخيص الأمراض

الفطرية الغازية - استعراض الأدبيات

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم: /... /...
من طرفه

السيد : رضون الطلام

المزاد في 05 ماي 1985 بأكادير

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية : العدوى؛ الفطرية؛ الغازية؛ البيولوجيا الجزيئية؛ التشخيص.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

السيد :
رئيس : أستاذ في علم الاحياء المجهرى

السيد :
مشرف : أستاذ في علم الطفيليات

السيدة :
أعضاء : أستاذة في علم الاحياء المجهرى

السيدة :
أعضاء : أستاذة في علم التشريح المرضي