

**MEMOIRE POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 25 juin 2012 par**

**Mlle Vanessa DECOOL**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990 tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Place du dosage des béta-(1,3)-D-glucanes dans le  
diagnostic des Maladies Fongiques Invasives**

---

**Membres du jury :**

**Président :** Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT

**Asseseurs :** Monsieur le Docteur Saad NSEIR

Monsieur le Professeur Eric DEHECQ

**Directeur de mémoire :** Monsieur le Professeur Boualem SENDID



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - ✉ : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Christian SERGHERAERT
Vice-présidents :	Madame Stéphanie DAMAREY Professeur Marie-Hélène FOSSE-GOMEZ Professeur Régis MATRAN Professeur Salem KACET Professeur Paul FRIMAT Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE Professeur Patrick PELAYO Madame Claire DAVAL Madame Irène LAUTIER Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Rémy PAMART
Secrétaire général :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1 <sup>er</sup> assesseur :	Professeur Damien CUNY
Assesseurs :	Mme Nadine ROGER Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs :	Monsieur André GENY

### Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mlle	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie

Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Générale
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	VION	Daniel	Droit et déontologie pharmaceutique

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie et Virologie Cliniques
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GAMOT	André	Chimie Analytique
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LHERMITTE	Michel	Toxicologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)
M.	BONTE	Jean-Paul	Chimie Analytique et (ICPAL)

### Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Générale
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BOUTILLON	Christophe	Chimie Organique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mlle	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie

Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLAMENT	Marie-Pierre	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Melle	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Virologie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Melle	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Pharmacie Galénique
Mme	POMMERY	Nicole	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Melle	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
Mme	VITSE	Annie	Parasitologie
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

### Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Clinique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

### Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	CREN	Yves	Information Médicale - Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques - Pharmacie virtuelle

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

***A mon président de Thèse,***

**Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT**

Professeur de Parasitologie-Mycologie médicale  
Laboratoire de Parasitologie-Biologie animale  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
Université de Lille II

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse  
et d'évaluer mon travail.

Soyez assuré de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

***A mes juges,***

**Monsieur le Docteur Saad Nseir**

Praticien Hospitalier,  
Service d'Urgence Respiratoire et Réanimation Médicale du  
Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse.

Je suis sensible à l'attention que vous portez à ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

**Monsieur le Docteur Eric Dehecq**

Praticien Hospitalier, MCU-PH  
Laboratoire central de Bactériologie-Parasitologie-Mycologie du  
Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille  
Hôpital Saint Philibert

Je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail.  
Trouve ici l'expression de mes sentiments les plus respectueux et de toute ma considération.

***A mon directeur de thèse,***

**Monsieur le Professeur Boualem SENDID**

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier  
Chef de Service de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Lille  
Membre de l'Equipe "Régulation moléculaire  
de l'interface glycanique hôte *Candida*"  
Inserm Unité 995

Tu m'as fait l'honneur de me confier ce travail.

Merci pour ton encadrement, tes directives, le temps que tu m'as accordé  
et tes précieux conseils.

Ton expérience m'a été d'une inestimable utilité.

Je tiens également à te témoigner mon profond respect et ma reconnaissance.

## **Je dédie cette thèse**

### ***A mes parents,***

Vous m'avez toujours soutenue et eu confiance en moi. Merci pour votre éducation, vos encouragements, votre présence et votre amour depuis toujours.

### ***A mon frère Gauthier,***

Je te souhaite toute la réussite et le bonheur que tu mérites. Bon courage pour cette année à venir et sache que je serai toujours là pour toi !

### ***A Michaël,***

Merci pour ton amour, tes attentions et ton soutien au quotidien. Tu me combles de bonheur.

### ***A toute ma famille,***

Qui m'entoure de toute son affection et sur laquelle je peux toujours compter.

### ***A mes amis lillois et rouennais,***

Merci pour ces beaux moments passés ensemble. Florence, bon courage pour finaliser ta thèse !

### ***A mes co-internes,***

Avec qui j'ai passé 4 superbes années.

### ***A toutes les personnes présentes en ce jour si particulier,***

Merci d'être venu.

### ***A toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail et m'ont accompagnée tout au long de mon parcours, notamment :***

#### **Caroline,**

Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité sans limites.

#### **Les enseignants, biologistes et leurs équipes, avec qui j'ai travaillé,**

Merci de m'avoir encadrée et formée tout au long de mes études.

#### **Le Dr Angélique Cotteau-Leroy,**

Pour sa disponibilité et les précieuses informations fournies.

#### **Sébastien Damiens,**

Merci pour le temps passé à me former sur les logiciels statistiques.

#### **Mes relecteurs attentifs,**

Merci pour le temps que vous m'avez consacré.

## SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES.....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>18</b>
<b>I. Les principales mycoses invasives.....</b>	<b>19</b>
A. Les candidoses invasives .....	19
1. Généralités .....	19
2. Epidémiologie .....	20
3. Facteurs de risque .....	20
4. Les principales espèces retrouvées en pathologie humaine .....	21
a) <i>Candida albicans</i> .....	22
b) <i>Candida glabrata</i> .....	23
c) <i>Candida tropicalis</i> .....	23
d) <i>Candida parapsilosis</i> .....	23
e) <i>Candida krusei</i> .....	23
f) Autres espèces isolées .....	23
5. Physiopathologie des candidoses systémiques : les étapes de l'infection - modèle de <i>C. albicans</i> .....	23
6. Aspects cliniques .....	26
7. Stratégies diagnostiques.....	27
a) L'imagerie .....	27
b) Méthodes mycologiques.....	28
(1) L'hémoculture .....	28
(2) Les prélèvements profonds.....	29
(3) L'index de colonisation .....	31
c) Histologie .....	32
d) Sérologie fongique .....	33
(1) Recherche d'antigènes solubles circulants .....	33
(2) Recherche d'anticorps spécifiques .....	34
e) Les techniques de biologie moléculaire.....	34
B. Les aspergilloses invasives.....	36
1. Définition, épidémiologie, facteurs de risque .....	36
a) Généralités.....	36
b) Epidémiologie .....	37

c)	Les principales espèces rencontrées en pathologie humaine.....	37
d)	Pouvoir pathogène et facteurs favorisants .....	37
2.	Aspects cliniques .....	39
3.	Les moyens diagnostiques.....	39
a)	Place de l'imagerie.....	39
b)	Examens mycologiques .....	40
(1)	Les prélèvements .....	40
(2)	L'examen direct .....	41
(3)	La culture.....	41
c)	Histologie .....	42
d)	Examens sérologiques.....	42
(1)	Recherche d'antigènes circulants .....	42
(2)	Recherche d'anticorps spécifiques .....	43
e)	La spectrométrie de masse .....	43
f)	La biologie moléculaire .....	44
(1)	La PCR.....	44
(2)	La Real-Time-PCR ou PCR en temps réel.....	44
C.	Les pneumocystoses .....	45
1.	Définition, épidémiologie, facteurs de risque.....	45
a)	Généralités.....	45
b)	Epidémiologie .....	45
c)	Facteurs favorisants.....	46
2.	Aspects cliniques .....	46
3.	Les moyens diagnostiques.....	47
a)	Tests non spécifiques .....	47
b)	Prélèvements respiratoires.....	47
c)	La culture .....	48
d)	La PCR .....	48
e)	Les BDG .....	48
D.	Prophylaxie et traitement des principales maladies fongiques invasives.....	49
1.	Les molécules disponibles .....	50
2.	Résistances aux traitements .....	52
3.	Prophylaxie des candidoses et aspergilloses invasives.....	53
4.	Traitement des candidoses et aspergilloses invasives .....	54
5.	Cas de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	56

<b>II. Les béta-(1,3)-D-glucanes .....</b>	<b>57</b>
A. Le champignon dans son ensemble.....	57
B. Structure de la paroi fongique .....	57
1. Les glucanes.....	58
2. La chitine .....	60
3. Autres composés de la paroi.....	61
<b>III. Présentation de l'étude – Contribution personnelle .....</b>	<b>62</b>
A. Contexte de l'étude.....	62
B. Patients, matériel et méthodes.....	62
1. Type d'étude .....	62
2. Matériel et méthodes .....	62
a) Critères de sélection .....	62
b) Méthodes de recueil.....	65
c) Méthodes de classification .....	66
d) Logiciels informatiques utilisés .....	67
3. Le test Fungitell® .....	68
a) Principe.....	68
b) Mode opératoire.....	69
c) Modalités d'interprétation préconisées par le fabricant.....	70
(1) Faux positifs .....	70
(2) Limites du test .....	70
C. Résultats.....	71
1. Caractéristiques de la population étudiée.....	71
2. Place des valeurs positives parmi l'ensemble des demandes de dosage de BDG.....	73
3. Classification des MFI.....	75
4. Diagrammes de Tukey .....	80
5. Influence du traitement antifongique sur la cinétique de circulation des BDG .....	83
6. Cinq cinétiques de glucanémies isolées.....	86
7. Synthèse des résultats obtenus .....	87
D. Discussion .....	89
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>96</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>108</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES**

API : aspergillose pulmonaire invasive

AUC : area under the curve (aire sous la courbe)

BDG : béta-(1,3)-D-glucanes

CDR : Candida Drug Resistance

EI : effets indésirables

FDR : facteurs de risque

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

GM : galactomannane

IC : index de colonisation

IL : interleukine

IFN $\gamma$  : interféron gamma

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LPS : lipopolysaccharide bactérien

MDR : Multi Drug Resistance

MFI : maladies fongiques invasives

PCR : polymerase chain reaction

PNN : polynucléaire neutrophile

ROC : receiver operator characteristic

T° : température

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VPN : valeur prédictive négative

VPP : valeur prédictive positive

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

**Figure 1** : Levures, blastospores et pseudomycelium

**Figure 2** : Les étapes de l'infection d'une candidose systémique

**Figure 3** : Candidose hépatique : aspects radiologiques

**Figure 4** : Coloration à l'acide périodique de Schiff

**Figure 5** : *Aspergillus fumigatus* observé au microscope électronique à balayage

**Figure 6** : Image de tomodensitométrie thoracique observée lors d'une API

**Figure 7** : Nature des traitements prescrits

**Figure 8** : Mécanisme d'action des principaux antifongiques systémiques

**Figure 9** : Structure schématique de la paroi fongique de *C. albicans*

**Figure 10** : Représentation schématique des polysaccharides de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* et de *Saccharomyces cerevisiae*

**Figure 11** : Représentation de la glucane synthase

**Figure 12** : Principe du test Fungitell®

**Figure 13** : Répartition des patients par tranches d'âge

**Figure 14** : Répartition des services prescripteurs

**Figure 15** : Répartition des patients selon le nombre de sérums disponibles

**Figure 16** : **Graphique A** : Nombre de demandes totales et positives demandées par service durant la période d'étude  
**Graphique B** : Proportion de tests BDG positifs par rapport au nombre total de prescriptions par service durant la période d'étude.

**Figure 17** : Répartition des patients selon la nature de l'infection et le niveau de preuve

**Figure 18** : Pathologies par service

**Figure 19** : Glucanémies selon l'espèce de levure responsable de la candidémie

**Figure 20** : Diagrammes de Tukey pour l'ensemble des catégories définies dans l'étude

**Figure 21** : Cinétique de circulation des BDG chez 4 patients atteints de maladie fongique prouvée et traités par antifongique

**Figure 22** : Représentation graphique de l'évolution des cinétiques comportant une valeur positive isolée de BDG sans preuve de MFI

**Figure 23** : Synthèse des causes de glucanémie positive dans notre étude

**Figure 24** : Arbre décisionnel d'interprétation du dosage de BDG

**Figure 25 (annexe 2)** : Réactivité de diverses souches microbiologiques sur le dosage des BDG par le kit Fungitell®

**Figure 26 (annexe 4)** : Cinétique de circulation des BDG chez 4 patients présentant une infection fongique et traités par antifongique

**Tableau 1** : Les principales espèces de *Candida* retrouvées en pathologie humaine

**Tableau 2** : Caractéristiques pharmacocinétiques des principaux antifongiques

**Tableau 3** : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude

**Tableau 4** : Critères de classification des épisodes infectieux selon l'EORTC-MSG

**Tableau 5** : Statistiques générales concernant le nombre de demandes totales et les glucanémies positives pour les principaux services demandeurs

**Tableau 6** : Répartition du nombre de patients selon la nature de l'infection et le niveau de preuve

**Tableau 7 (annexe 1)** : Résistance aux principaux antifongiques des espèces les plus fréquemment isolées en clinique humaine

**Tableau 8 (annexe 3)** : Résultats de l'ensemble des dosages de BDG pour chaque sérum de patients inclus dans l'étude et triés par pathologie et niveau de preuve

## INTRODUCTION

Les mycoses sont des maladies déterminées par des champignons microscopiques. Elles peuvent être restreintes aux localisations superficielles (peau et phanères) ou toucher certains organes après dissémination hémotogène et envahissement de tissus plus profonds. On parle alors de mycoses invasives.

Les mycoses invasives touchent plus particulièrement les patients dont la prise en charge est déjà lourde et exposés à certains facteurs de risque, comme la neutropénie (patients d'onco-hématologie), les thérapeutiques immunosuppressives mises en œuvre lors des greffes ou transplantations ou l'antibiothérapie à large spectre chez le patient de soins intensifs et de réanimation. Ces infections sont en nette augmentation [1, 2]. Elles sont caractérisées par une morbi-mortalité élevée, et entraînent un surcoût du séjour hospitalier non négligeable [3-5]. Leur gravité justifie les mesures préventives mises en œuvre dans certaines unités d'onco-hématologie, de chirurgie, de réanimation ou de néonatalogie.

De nombreuses espèces sont impliquées. Elles appartiennent dans la majorité des cas à trois genres principaux : *Candida sp.*, *Aspergillus sp.* et *Pneumocystis* [6].

Le diagnostic de ces infections est souvent difficile et tardif et repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et myco-sérologiques. Pourtant, plusieurs études ont souligné l'importance d'un diagnostic précoce pour le pronostic de l'infection. Ce dernier conditionne la mise en route d'un traitement antifongique approprié. Devant le manque de spécificité de l'examen mycologique réalisé sur des prélèvements dits « ouverts » comme les crachats, facilement contaminés par spores aéroportées ; le manque de sensibilité des hémocultures considérées encore comme le « gold standard » pour le diagnostic des candidoses systémiques et la difficulté de mise en évidence des kystes/trophozoïtes dans certaines formes de pneumocystose, le recours à des tests non-invasifs à fortes valeurs prédictives est aujourd'hui recommandé par la majorité des sociétés savantes pour améliorer la précocité du diagnostic des maladies fongiques invasives (MFI). La détection des polysaccharides fongiques et celle des acides nucléiques ont connu un essor considérable ces dernières années [7]. Nous nous proposons dans ce mémoire d'évaluer en pratique clinique les performances diagnostiques du test Fungitell®. Ce test, fondé sur la détection des bêta-(1,3)-D-glucanes (BDG) est recommandé pour le diagnostic des MFI mais sa spécificité a été peu étudiée. Cette étude rétrospective concerne l'analyse de l'ensemble des glucanémies positives observées au CHRU de Lille entre octobre 2008 et février 2010. Le niveau de certitude des MFI a été déterminé sur la base des données biologiques (taux de BDG, données mycologiques, données sérologiques), des données cliniques et radiologiques (lettre de sortie des patients, compte-rendus d'imagerie) et parfois des données histologiques.

# I. Les principales mycoses invasives

## A. Les candidoses invasives

### 1. Généralités

Les candidoses sont dues à des levures du genre *Candida*, c'est-à-dire des champignons unicellulaires eucaryotes ovoïdes ou cylindriques non capsulés de 4 à 8 µm se reproduisant par bourgeonnement, uni ou multipolaire, ou par fission. Dans certaines circonstances, du pseudomycelium peut se former, voire, pour *Candida albicans* et *Candida dubliniensis*, du mycelium vrai, avec alors quelquefois la présence de chlamydozoïdes à paroi épaisse à leur extrémité.

Le genre *Candida* compte plus de 200 espèces, dont une vingtaine est pathogène chez l'Homme [8].



**Figure 1** : Levures, blastospores et pseudomycelium.

Les levures du genre *Candida* peuvent présenter un certain polymorphisme : unicellulaire (blastospore) ou filaments (pseudomycelium)

## **2. Epidémiologie**

Entre 85 et 90 % des levures isolées en mycologie médicale appartiennent au genre *Candida* [9]. La candidose est la troisième cause de septicémie dans les hôpitaux, juste après les cocci à gram positif et les bacilles à gram négatif, et la cinquième origine d'infection nosocomiale en France [5, 10-13]. Elle représente 8% des hémocultures positives [14] et a une incidence en constante augmentation d'environ 10 candidémies pour 100 000 journées d'hospitalisation, 2,1 à 38,2 pour 1000 admissions en réanimation [4, 15-18]. On estime que 33 à 55% des épisodes de candidémies ont lieu au cours d'un séjour en réanimation [4]. La mortalité attribuable de l'ensemble des candidémies varie selon les études de 38 à 49 % [19-21].

Parmi les candidémies, *C. albicans* est encore l'espèce la plus fréquemment retrouvée, avec un isolement dans près de 50% des cas, mais les autres espèces du genre prennent une part de plus en plus importante, liée notamment aux pratiques cliniques dans les services à risque ainsi qu'à l'âge moyen croissant des patients [8, 22-25].

On retrouve de ce fait de plus en plus souvent l'espèce *C. glabrata*, mais on assiste également à l'émergence d'autres espèces telles que *C. parapsilosis*, *C. krusei* ou encore *C. guilliermondii*, moins susceptibles aux échinocandines ou au fluconazole que la plupart des souches de *C. albicans* [1, 18, 26-29].

L'augmentation de l'incidence des espèces de levures autres que *C. albicans* a donc pour conséquence une prise en charge plus difficile des patients liée à la sensibilité plus faible aux traitements habituels ainsi qu'aux délais d'identification plus longs [30-33].

Malgré l'essor de la prophylaxie antifongique observée dans les services à haut risque de MFI, la candidémie reste la maladie fongique entraînant le plus de décès [34]. De plus la survenue de cette pathologie a pour conséquence un séjour hospitalier plus long et donc un impact économique significatif pour les unités de soins. Ce surcoût a été évalué aux USA entre 34 000 à 45 000 \$ par épisode candidémique [3].

## **3. Facteurs de risque**

Les levures du genre *Candida* sont des champignons opportunistes, c'est-à-dire qu'ils ne seront pathogènes que chez le patient déjà fragilisé par sa pathologie initiale et par les moyens mis en œuvre pour la traiter [21].

Le principal facteur de risque de développer une candidose invasive est la neutropénie, qui entraîne une baisse des capacités phagocytaires et qui favorise la colonisation par *Candida* [31]. Le risque s'accroît d'autant plus que l'aplasie est profonde et prolongée dans le temps. Cette situation est particulièrement marquée lorsque les malades sont atteints de tumeur cancéreuse, qu'elle touche des organes solides ou des lignées hématopoïétiques, lorsqu'ils ont bénéficié d'une greffe d'organe ou de moelle osseuse. L'immunodéficience

associée aux thérapeutiques immunosuppressives ou immunomodulatrices (chimiothérapie, glucocorticoïdes, anti-TNFalpha, anti-MAPKinases...) est également un facteur favorisant fréquemment retrouvé [1, 22].

D'autres causes ont été mises en évidence, notamment dans l'étude NEMIS [35] :

- la prise récente d'antibiotiques, qui détruit tout ou partie de la flore bactérienne, laissant ainsi la place aux levures pour leur développement au sein de ce tissu,
- la prise récente de triazolés qui favorise les candidémies à espèces ayant une résistance naturelle ou acquise à cette molécule [36],
- la présence d'un cathéter veineux central, porte d'entrée majeure du germe [37, 38],
- le séjour en réanimation, du fait de l'affaiblissement du malade, et ce d'autant plus qu'il est prolongé,
- une chirurgie récente,
- les âges extrêmes,
- l'insuffisance rénale,
- l'hémodialyse,
- la nutrition parentérale,
- la ventilation mécanique,
- les infections à VIH,
- ou encore le terrain particulier présenté par le malade, tel que la grossesse, ou une endocrinopathie comme le diabète [9, 39, 40].

Pour les patients non neutropéniques, les facteurs de risque de candidémie à *Candida non-albicans* seraient représentés par les traumatismes crâniens et les sepsis bactériens [41].

#### **4. Les principales espèces retrouvées en pathologie humaine**

Le genre *Candida* compte plus de 200 espèces. Cinq sont le plus souvent isolées en pratique clinique, mais les traitements utilisés dans les unités à haut risque de MFI sont à l'origine de l'émergence d'espèces inhabituelles.

Les facteurs prédictifs d'infection par des levures à *Candida non-albicans* sont divers : un traitement récent par fluconazole, une chirurgie digestive, la présence d'une voie veineuse centrale, un traitement antibiotique à large spectre ou encore l'âge supérieur à 60 ans [42-44]. Le spectre des manifestations cliniques observées chez les patients diffère selon l'espèce impliquée. Ces manifestations sont résumées dans le tableau suivant, adapté du cahier Bioforma *Les levures et levuroses* [8].

<b>Espèces les plus fréquentes</b>	
<b><i>C. albicans</i></b>	Infections cutanées ou muqueuses Candidoses systémiques / profondes
<b><i>C. glabrata</i></b>	Candidoses systémiques / profondes Infections urinaires
<b><i>C. krusei</i></b>	Candidoses systémiques / profondes Endophtalmies
<b><i>C. parapsilosis</i></b>	Candidoses systémiques / profondes chez le nouveau-né et via les dispositifs médicaux
<b><i>C. tropicalis</i></b>	Candidoses systémiques / profondes
<b>Espèces plus rarement isolées</b>	
<b><i>C. ciferrii</i>, <i>C. dubliniensis</i>, <i>C. guilliermondii</i>, <i>C. haemulonii</i>, <i>C. inconspicua</i>, <i>C. kefyr</i>, <i>C. lipolytica</i>, <i>C. lusitaniae</i>, <i>C. norvegiensis</i>, <i>C. pulcherrima</i>, <i>C. rugosa</i>, <i>C. viswanathii</i>, <i>C. zeylanoides</i></b>	

**Tableau 1** : Les principales espèces de *Candida* retrouvées en pathologie humaine

#### **a) *Candida albicans***

*C. albicans* est un saprophyte, principalement du tube digestif mais aussi des voies génito-urinaires, pouvant être transmis par la mère dès la naissance. Il est en équilibre avec les flores bactériennes, maintenant la population de levures à une faible densité. Il peut être pathogène opportuniste par passage à travers une barrière (tube digestif, vagin, muqueuse buccale par exemple).

Les principales pathologies rencontrées avec ce micro-organisme touchent les muqueuses : buccales (muguet, langue noire villosité), œsophagiennes (surtout chez les immunodéprimés et les sujets atteints par le VIH), intestinales, vaginales. La peau est aussi une cible privilégiée, avec des atteintes au niveau des grands plis (fréquemment au niveau de l'aîne ou de la région sous mammaire), des folliculites de l'héroïnomane, et des atteintes au niveau des ongles avec onyxis et périonyxis.

Chez les patients les plus fragiles, cette infection peut se manifester par des formes invasives et être alors responsable d'une candidose profonde.

#### **b) *Candida glabrata***

Les principaux réservoirs de *C. glabrata* sont également le tube digestif et les voies génito-urinaires. Cette espèce représente 20 % des isolats de candidoses invasives. Sa résistance au fluconazole est dite dose dépendante, l'isolement de souches résistantes à cet antifongique a baissé depuis les recommandations d'augmentation de posologie [8].

#### **c) *Candida tropicalis***

C'est un saprophyte de l'environnement. Son réservoir principal est représenté par la peau, le tube digestif et parfois les muqueuses génito-urinaires. Sa virulence est proche de *C. albicans*. Il représente environ 10 % des espèces isolées lors de candidoses invasives [8].

#### **d) *Candida parapsilosis***

C'est une levure commensale de la peau et des phanères. Cette espèce, et probablement ses deux génotypes proches *C. metapsilosis* et *C. orthopsilosis*, ont la particularité d'adhérer aux matériaux plastiques, et sont donc fréquemment retrouvées dans des infections de cathéters, chambres implantables et prothèses. En dehors de ces circonstances particulières, elles sont assez peu pathogènes.

#### **e) *Candida krusei***

C'est un saprophyte du milieu extérieur. Elle a émergé du fait de l'utilisation massive du fluconazole, principe actif auquel elle est naturellement résistante.

#### **f) Autres espèces isolées**

D'autres espèces sont de temps en temps retrouvées comme responsables d'infections. On peut citer par exemple *C. famata*, *C. guilliermondii* (chez l'immunodéprimé sévère), *C. kefyr* (de sensibilité au fluconazole très variable), *C. lusitaniae* (espèce émergente), *C. dubliniensis* (très proche de *C. albicans*), *C. norvegensis*.

### **5. Physiopathologie des candidoses systémiques : les étapes de l'infection - modèle de *C. albicans***

Il n'existe pas de facteurs de virulence stricto sensu pour *C. albicans*, l'infection est souvent d'origine endogène [4].

Tout d'abord les levures vont coloniser les différents epithelia, c'est-à-dire qu'elles seront présentes au niveau de la flore de différentes muqueuses [45]. Chez l'Homme, elles peuvent faire partie des micro-organismes commensaux du tube digestif, des voies urogénitales, des voies aériennes supérieures ou du revêtement cutané. Elles sont alors en équilibre avec la flore bactérienne locale et ainsi maintenues à une faible densité. Elles peuvent produire un biofilm afin d'être en partie protégées de l'environnement et des

agressions extérieures mais également pour favoriser l'adhérence de nouvelles cellules à la matrice du biofilm [46, 47]

L'adhésion tissulaire et la prolifération des *Candida* sont un préalable à l'invasion et à la dissémination.

Durant ces phases, les micro-organismes s'attachent à divers tissus via leurs adhésines et sécrètent différentes enzymes : protéases, phosphatases, lipases et participent à la régulation de l'immunité par la sécrétion de dérivés immunomodulateurs [48-52]. La cellule fongique adhère aux cellules épithéliales et dégrade les protéines formant la jonction inter-épithéliale, comme par exemple la cadhérine-E, via les différentes enzymes citées [53]. La pénétration active au sein du tissu est possible par la transition blastoconidie/hyphe. L'atteinte de vaisseaux sanguins peut conduire ensuite à une phase de candidémie. Le risque de mortalité associé à la candidémie est très élevé (1 patient sur 2) en l'absence de traitement antifongique approprié.

L'atteinte de l'endothélium vasculaire peut donner lieu à une phase d'extravasation, chronique, au niveau de différents organes tels que la rate, le foie, la peau, l'œil, le cerveau, le tissu cardiaque ou les articulations. Ces phénomènes ont principalement lieu lors d'un déficit plus ou moins important de l'immunité du patient [54]. En effet, un système immunitaire robuste évite normalement cette invasion massive. Le maintien d'un équilibre entre les signaux pro- et anti-inflammatoires va conditionner l'issue de l'interaction hôte-champignon. La réponse immunitaire comprend en effet deux composantes : la résistance vis-à-vis du pathogène, c'est-à-dire la capacité à limiter l'envahissement, et la tolérance, c'est-à-dire la limitation des dommages induits par une charge fongique importante [55].

L'immunité antifongique commence au niveau des muqueuses où des défenses innées sont présentes dans les barrières respiratoires, gastro-intestinales et génito-urinaires. Les cellules de l'hôte possèdent des récepteurs (PRRs, Pattern Recognition Receptors) qui reconnaissent des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) fongiques. Les PRRs, tels que les TLRs (Toll-Like Receptors) ou les CLR (C-type Lectin Receptors, tels que les lectines 1 et 2), sont présents notamment à la surface des cellules phagocytaires, monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles et activent le système de défense inné. A contrario, la défense spécifique sera initiée par les cellules dendritiques qui vont induire la maturation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T helper dirigés contre le micro-organisme [56].

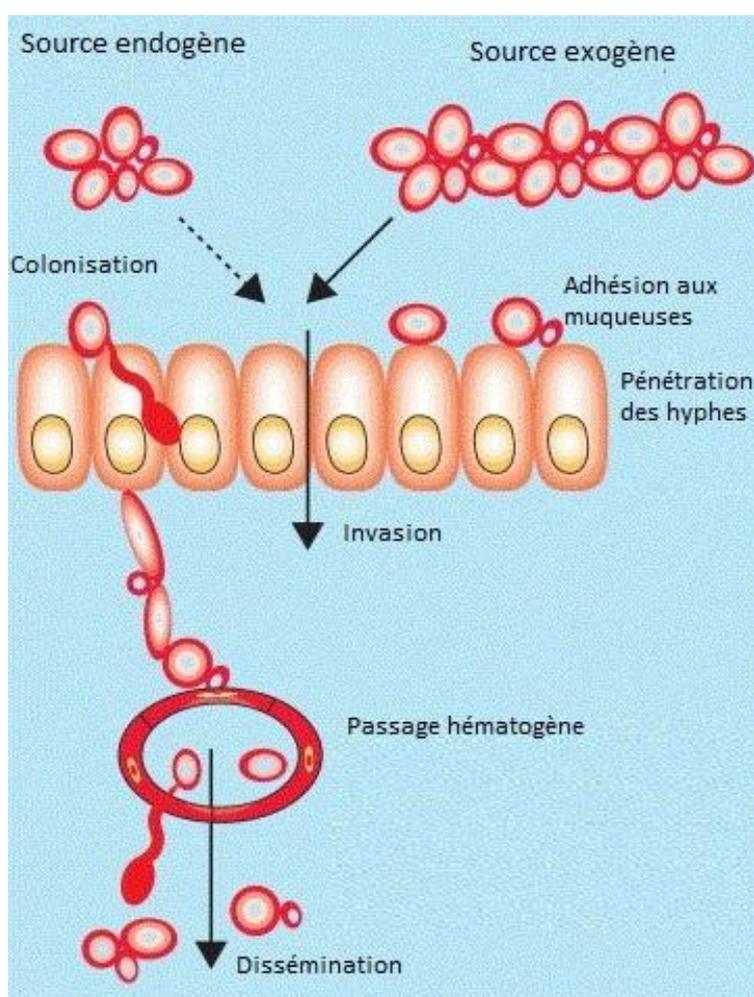
Deux grandes orientations sont donc engagées par l'hôte afin de se préserver contre le champignon : la voie dominante médiée par la réponse TH1, aboutissant à la synthèse d'IFN $\gamma$ , pro-inflammatoire, ainsi que la réponse TH17 qui est impliquée dans le recrutement des PNN, et la voie TH2, entraînant la synthèse d'IL-4 et d'IL-13, limitant les effets antifongiques.

Certains individus présentant un polymorphisme des PRRs sont plus susceptibles de développer une infection fongique [57].

D'autre part, il faut noter que certaines souches fongiques exploitent les PRRs dans le but de détourner les voies de signalisation aboutissant à la réponse inflammatoire et échapper ainsi à la réponse immunitaire organisée par l'hôte [58].

Pour conclure, il faut savoir que la composition pariétale d'une espèce varie selon son état physiologique. Ainsi, par exemple, les BDG sont masqués en phase filamenteuse. Le système immunitaire est donc complexe et nécessite une adaptation permanente de la part de l'hôte et du pathogène [59].

La figure 2, adaptée d'Eggimann et de Gow, représente les différentes étapes aboutissant à l'infection invasive [59, 60].



**Figure 2 :** Les étapes de l'infection d'une candidose systémique

## 6. Aspects cliniques

Les signes cliniques sont peu spécifiques. La porte d'entrée principale est représentée par le tube digestif, mais d'autres épisodes infectieux peuvent avoir une porte d'entrée cutanée (cathéters, brûlures, et le sujet prématuré connu pour avoir un système cutané immature), ou par contamination lors des gestes chirurgicaux (prothèses, greffons). Le mécanisme de translocation des levures de la lumière intestinale vers les voies hématogènes est mal connu. La neutropénie et le déséquilibre de l'homéostasie intestinale y jouent un rôle prépondérant [61].

*Candida* dissémine ainsi dans différents organes, soit par contiguïté, soit via un passage hématogène vers tout l'organisme. Les organes cibles préférentiels sont le rein, le foie et la rate, mais peuvent également être atteints le cerveau, le poumon, l'œil ou l'endocard.

A partir d'un foyer infectieux, le risque de dissémination vers les autres organes est élevé.

Les signes cliniques peuvent apparaître brutalement : sepsis sévère, avec hyper ou hypothermie et hypotension artérielle, associées ou non à des frissons, ou peuvent s'installer progressivement, avec alors un tableau d'altération de l'état général, souvent accompagné de fièvre, le tout sur un terrain généralement fragilisé. Une leucocytose est retrouvée dans 50 % des cas.

Un des symptômes majeur devant faire évoquer une infection fongique invasive est la fièvre résistante à un traitement antibiotique à large spectre approprié.

Du fait d'une localisation endophtalmique possible, il peut être utile de faire pratiquer un fond d'œil en cas de suspicion de foyer candidémique. L'examen pourra alors révéler une endophtalmie avec la présence d'exsudats blancs caractéristiques, symptomatiques ou non [62, 63]. On pourra noter la présence d'une chorioretinite chez 25 % des patients ayant une hémoculture positive à *Candida sp.*

D'autre part, des lésions cutanées sont retrouvées chez 10 % des patients présentant une candidémie.

Un autre site privilégié lors de la dissémination de la levure est représenté par le couple foie-rate. On estime à environ 5 % la proportion de malades leucémiques qui vont présenter une candidose hépatosplénique [64]. D'un point de vue clinique, cette pathologie peut parfois être asymptomatique, ou alors se présenter sous la forme de fièvre, troubles digestifs, douleur de l'hypocondre droit. Le diagnostic de ces formes est réputé difficile [65, 66].

Il est à noter que malgré un isolement fréquent de levures du genre *Candida* au niveau des prélèvements de l'arbre respiratoire inférieur, les pneumonies à *Candida sp.* sont

exceptionnelles [67]. Si la suspicion est très forte, il faudra demander la réalisation d'un examen histologique pour confirmer le diagnostic [68].

## **7. Stratégies diagnostiques**

Contrairement aux candidoses superficielles dont le diagnostic est en général aisé et principalement clinique, le diagnostic de candidose invasive demeure un véritable challenge pour les cliniciens [69].

En effet, la symptomatologie clinique n'est pas spécifique et peut orienter initialement vers une septicémie bactérienne.

Il est donc important de mettre en œuvre différentes stratégies biologiques pour garantir la précocité et la fiabilité du diagnostic [7].

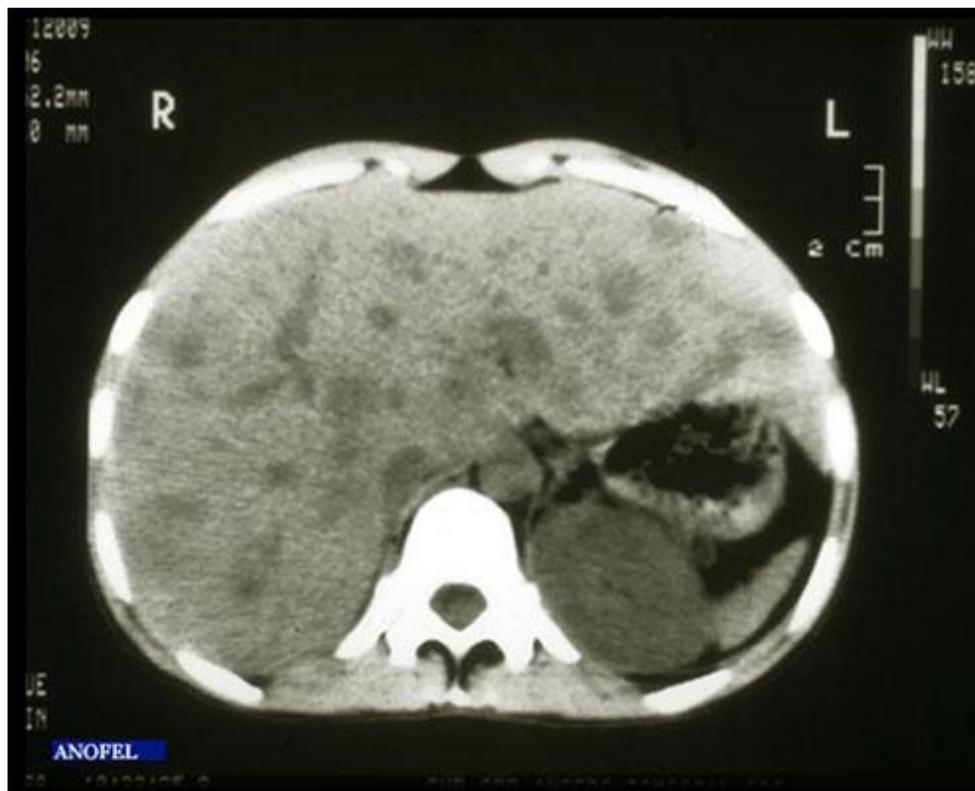
### **a) L'imagerie**

Les deux examens utiles au diagnostic de candidose invasive sont le scanner et l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) [66]. L'IRM est décrite comme plus sensible dans la recherche de candidose hépatosplénique. L'échographie est beaucoup moins performante mais peut toutefois servir à repérer des métastases septiques en sortie d'aplasie [70].

Ces explorations mettent en évidence de nombreux micro-abcès dans le parenchyme en cas de candidose hépatosplénique. Elles peuvent être d'un apport significatif pour le diagnostic des spondylodiscites et dans le cas des atteintes médullaires observées chez certains patients toxicomanes [71, 72].

Depuis quelques années, un examen d'imagerie a considérablement amélioré la recherche de tumeurs solides. Il est basé sur l'administration de  $^{18}\text{F}$  2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose, qui a la particularité de s'accumuler dans les cellules à activité métabolique intense, telles que les cellules cancéreuses ou inflammatoires, et qui produit une image lors de l'émission de positons. C'est le PET-scan : Tomographie à Emission de Positons. Cette technique a été évaluée pour la première fois dans le diagnostic des MFI, en se basant sur le fait que les sites infectés par les champignons présentent un métabolisme important, par une équipe de l'hôpital de Necker en 2010. La sensibilité est meilleure qu'avec les techniques d'imagerie classiquement utilisées [73]. Il faut toutefois prendre en compte les interférences possibles (tumeur, zone inflammatoire).

L'utilisation de ces appareils reste limitée aux hôpitaux disposant de plates-formes adaptées pour le suivi d'un grand nombre de patients. De plus leurs sensibilité et spécificité demeurent faibles d'où le recours à d'autres stratégies diagnostiques.



**Figure 3 :** Candidose hépatique : aspects radiologiques

Le scanner montrant les lacunes correspondant aux abcès fongiques à levures

### **b) Méthodes mycologiques**

La mise en évidence de *Candida sp.* dans un site colonisable par la flore fongique résidente (sphère ORL) ou transitoire (levures de l'alimentation) ne signifie pas forcément que celui-ci est pathogène. Il est donc important, dans la mesure du possible, de le rechercher dans des sites stériles tels que le sang, le LCR, la bile, le liquide articulaire, le liquide péricardique et certaines biopsies guidées par imagerie.

#### **(1) L'hémoculture**

Une seule hémoculture positive à *Candida sp.*, prélevée dans de bonnes conditions d'asepsie, est toujours significative.

Le volume prélevé a une importance majeure pour le rendement des cultures. Un volume approprié doit être compris entre 10 et 20 mL de sang.

L'inconvénient majeur de ce prélèvement est sa faible sensibilité. En effet, moins de 50 % des hémocultures prélevées chez des patients ayant eu une candidose invasive prouvée à l'autopsie s'avèrent positives [74, 75]. Ce faible rendement est en partie lié au faible inoculum présent lors de la ponction sanguine, qui est estimé par certains auteurs à moins d'1 CFU/mL dans plus de la moitié des cas [76].

En règle générale, si le laboratoire ne dispose pas de milieux de culture favorables à la croissance rapide des champignons (tel que le milieu Mycosis ICF<sup>®</sup>, Becton Dickinson), il est

dans ce cas recommandé d'utiliser des milieux en conditions d'aérobiose, bien que certaines espèces puissent se développer en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose. Une étude utilisant les automates BACTEC 9240 (Becton Dickinson) et BacT/Alert 3D (bioMérieux) a montré que *C. albicans* a une croissance plus rapide, avec un délai moyen de 35 heures entre l'insertion dans l'automate et la détection de la positivité, contre 80 heures pour *C. glabrata* [77].

Cet examen a donc une forte valeur prédictive positive mais une très faible valeur prédictive négative, et ce malgré le fait d'utiliser des milieux spécifiques pour les levures qui réduisent le temps de détection et augmentent la sensibilité [74].

## **(2) Les prélèvements profonds**

Tout prélèvement d'un site normalement stérile dont la culture met en évidence une levure *Candida sp.* doit faire évoquer une infection mycologique invasive et être traité comme telle.

La prise en charge d'un tel prélèvement consiste à effectuer un examen direct : un état frais directement entre lame et lamelle et une coloration permettant une meilleure visualisation des éléments fongiques. Les colorations usuelles sont le bleu de lactophénol, le bleu d'orthotoluidine, le May Grunwald Giemsa et le Gomori-Grocott. D'autres méthodes utilisant des réactifs fluorescents permettent d'améliorer le rendement de l'examen direct (calcofluor, fungiquil A). Les levures sont ovoïdes ou rondes, plus ou moins bourgeonnantes. Certaines espèces sont susceptibles de produire des hyphes à bords parallèles et septés similaires à ceux observés en présence de champignons filamenteux. L'apport de l'examen direct est capital pour la mise en route d'un traitement antifongique précoce mais sa sensibilité demeure faible.

En parallèle, chaque prélèvement va être ensemencé sur un milieu de Sabouraud, additionné d'antibiotiques (classiquement chloramphénicol ou amikacine). On l'associe de plus en plus souvent à un milieu chromogénique qui permet de révéler des mélanges d'espèces et l'identification présomptive des principales levures rencontrées en pathologie humaine (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*).

Les milieux de culture sont incubés à 37°C, ou plus rarement à 30°C, afin de favoriser la croissance des levures. Les colonies de levures apparaissent en 24h à 48h, le nombre de colonies sera évalué de manière semi-quantitative.

Pour l'identification des espèces isolées, plusieurs méthodes sont disponibles : les tests morphologiques, les tests rapides, les tests biochimiques ou plus récemment la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Les tests morphologiques visent à distinguer les principaux genres de levures (*Candida*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*) et à identifier de manière rapide *C. albicans*. Le test de chlamydosporulation sur milieu RAT (riz, agar, tween) permet de différencier les espèces *Candida* des autres levures (présence ou non de pseudofilaments) et d'identifier *C. albicans* / *C. dubliniensis* lorsque des chlamydo-spores peuvent être identifiées après 24h de culture. Le test de blastèse (formation de tubes germinatifs) consiste à incuber les colonies isolées dans 1 mL de sérum pendant 3 heures à 37°C. Il permet d'identifier le complexe *C. albicans* / *C. dubliniensis*. Bien que peu coûteuse et facile à réaliser cette technique est de moins en moins utilisée en raison de son manque de spécificité et de l'apparition de tests immunologiques ou enzymatiques plus spécifiques.

Ces derniers sont fondés soit sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques permettant l'identification simple et rapide de *C. albicans* (Bichrolatex albicans), *C. dubliniensis* (Bichro-Dubli), *C. krusei* (Krusei-color) et *C. glabrata* [78], soit sur les propriétés enzymatiques spécifiques d'espèce comme la tréhalase spécifique de *C. glabrata* (glabrata RTT<sup>®</sup>).

Des tests biochimiques étudiant le profil d'assimilation et de fermentation de certains sucres permet d'identifier plus de 80 % des souches isolées en mycologie médicale. Ce pourcentage est encore amélioré en présence de galeries plus discriminantes telle que API 32C<sup>®</sup>. Ces tests exigent cependant un délai supplémentaire de 24 à 48h pour identifier les autres espèces.

L'avènement des techniques de spectrométrie de masse a radicalement modifié la prise en charge diagnostique des infections bactériennes et fongiques en réduisant considérablement le délai de réponse au clinicien [79]. Sa précision, sa fiabilité, sa sensibilité, sa rapidité et son coût limité en font un système émergent pour l'identification des levures [80, 81]. Cette technique permet de plus une identification précise des espèces habituellement difficiles à discerner [82]. Elle est utilisée à la place ou en complément des méthodes traditionnelles. Ses performances sont supérieures aux galeries d'identification biochimiques mais similaires à celles du séquençage des régions ITS1 et ITS2. Elle permet en outre une identification correcte dans près de 99 % des levures isolées en milieu hospitalier [83-86].

Cette méthode, dont le principe a été décrit dès la fin du XIXe siècle par Thomson, est basée sur la séparation de molécules, qui ont été préalablement ionisées (de manière électronique ou chimique), selon leur rapport m/z (masse/charge) [87]. Elle a lieu en deux étapes :

- l'étape d'extraction : une à trois colonies sont mises en suspension dans un mélange eau déminéralisée - éthanol absolu 70 %. Après centrifugation le culot de cellules est séché puis remis en suspension dans 50 µL de l'acide formique.

- la 2<sup>e</sup> étape : ajout d'une matrice acide, source de protons favorisant l'ionisation des molécules. L'échantillon se disperse à l'intérieur de celle-ci puis le tout est déposé sur la cible métallique. L'évaporation entraîne la co-cristallisation de l'ensemble, suivie de la désorption, l'ionisation et le passage à l'état gazeux sous l'effet de 1000 tirs aléatoires du LASER à l'azote pulsé. Dans les réflecteurs à temps de vol (TOF), les ions acquièrent une grande énergie cinétique et sont séparés en fonction de leur vitesse pour arriver jusqu'au détecteur. Le temps de vol est alors converti en rapport m/z, fonction de chaque peptide. Les ions les plus légers seront également les plus rapides. Le détecteur convertit le signal de chaque impact en grandeur électrique, représenté graphiquement par des pics. Cette technique de spectrométrie de masse permet d'établir la carte peptidique des protéines, également appelée empreinte protéique [88].

Quelle que soit la méthode d'identification choisie, un antifongogramme peut être réalisé, selon le contexte clinique, la nature du prélèvement, les antécédents du patient ou devant un échec thérapeutique.

### **(3) L'index de colonisation**

Devant le manque de sensibilité des hémocultures, certains services de réanimation chirurgicale ont développé une nouvelle stratégie fondée sur la détermination de la densité fongique colonisant les sites superficiels (bouche, crachat, trachée, aspiration bronchique, écouvillon nasal, selle ou écouvillon anal, urine, drains...) en vue d'apprécier le risque d'infection invasive à *Candida* [89, 90]. Cet index, réalisé de manière bihebdomadaire, est calculé par le rapport entre le nombre de sites corporels colonisés et le nombre de sites corporels prélevés. Une valeur d'au moins 0,5 permet la mise en route d'un traitement antifongique préemptif. Cette démarche n'est actuellement validée que pour les patients de réanimation. En hématologie, la détermination de la colonisation fongique est utilisée de manière aléatoire afin d'identifier précocement les patients justifiant d'une investigation clinique, radiologique et mycologique plus approfondie. L'isolement d'espèce de sites superficiels permet parfois d'orienter le choix d'une molécule lors d'un traitement antifongique empirique [91].

Il permet de définir des patients à risque de faire une infection invasive en estimant la proportion de sites colonisés par des levures du genre *Candida* [92]. En effet des études ont prouvé que plus un patient présentait un nombre important de sites colonisés par une espèce *Candida*, plus le risque de candidose systémique est élevé [89]. L'index de colonisation représente une alternative aux hémocultures mais n'est pas validé dans toutes les unités de soin.

Les sites de prélèvements généralement recommandés pour établir cet index sont représentés par l'urine, les selles, un écouvillon au niveau des aisselles, un écouvillon nasal, les crachats, les drains, voire, si on en dispose, de prélèvements plus invasifs tels que le lavage broncho-alvéolaire (LBA).

### **Index de colonisation = nombre de sites colonisés / nombre de sites prélevés**

Bien que certains auteurs aient proposé de traiter (de manière préemptive) les patients ayant un index  $\geq 0,5$ , la spécificité de ce marqueur reste encore assez discutable. Une proportion non négligeable de patients serait très probablement traitée par excès. Il est donc important de trouver des marqueurs plus discriminants [93].

Dans ce contexte, Léon *et al.* avaient proposé un autre marqueur dénommé « Candida Score » qui prend en compte non seulement les données de la colonisation mais également d'autres signes de gravité du patient [92]. Ce score intègre l'existence d'une nutrition parentérale, une chirurgie récente et un sepsis sévère. Selon les auteurs, un traitement préemptif « précoce » devrait être envisagé pour des scores supérieurs à 2,5 [94].

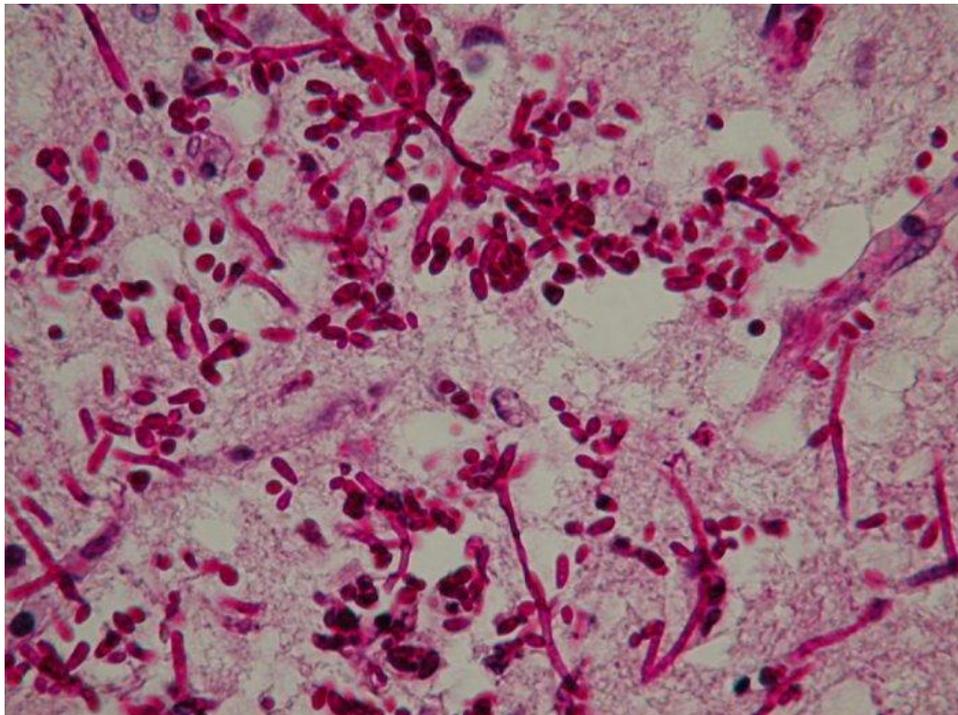
### **c) Histologie**

L'examen histologique, s'il se révèle positif, affirme l'infection du tissu examiné, et contourne les faux positifs par contamination possiblement observés lors d'une culture. Il présente cependant une faible sensibilité [95].

Les biopsies, réalisées à l'aiguille, sont rarement obtenues du fait du risque hémorragique généralement important chez l'immunodéprimé qui présente souvent des troubles de l'hémostase.

Une fixation des sections de tissus est d'abord réalisée, puis une coloration HES (Hémalun Eosine Safran) permet de révéler les éléments fongiques, suivie soit par une coloration au May Grünwald Giemsa, soit par une coloration à l'acide périodique de Schiff, soit par une coloration par imprégnation argentique (Gomori-Grocott) [96]. Afin d'améliorer la spécificité, l'examen peut être complété par l'ajout d'anticorps marqués par un fluorochrome.

Les formes visibles sur les coupes histologiques sont principalement des levures en bourgeonnement ou des filaments/pseudofilaments dans le cas d'infection à *C. albicans*.



**Figure 4 :** Coloration à l'acide périodique de Schiff  
(neuropathology.medicine.dal.ca)

#### **d) Sérologie fongique**

La sensibilité des différents examens cités précédemment étant relativement faible, d'autres techniques ont été développées depuis quelques années et sont maintenant utilisées au quotidien dans certains hôpitaux, afin d'améliorer la précocité et la fiabilité du diagnostic biologique en vue d'optimiser la prise en charge des patients.

Cette démarche concerne la détection de molécules fongiques circulantes et celle des anticorps dirigés contre des constituants antigéniques [97].

##### **(1) Recherche d'antigènes solubles circulants**

Différents éléments de la paroi des *Candida* peuvent être détectés :

- *des protéines cytoplasmiques :*

Deux antigènes ont été identifiés, mais leur utilisation a été restreinte aux activités de recherche.

- l'énolase, dont le développement commercial du test, Directigen<sup>®</sup>, a été rapidement interrompu.
- la sous-unité HSP 90, non utilisée pour les tests de routine

- *des métabolites spécifiques :* le ratio urinaire de D-arabinitol/L-arabinitol

- *des polyosides antigéniques pariétaux :*

- *mannane :* Platelia *Candida* antigène plus<sup>®</sup> : test d'immunocapture ELISA utilisant un anticorps monoclonal [98]

- *BDG* : test enzymatique. Il existe deux tests principaux commercialisés : Associates Cape Cod (Fungitell®), et Wako, firme japonaise ayant développé le premier test pour la détection des BDG.

## **(2) Recherche d'anticorps spécifiques**

Cet examen est réalisé grâce au kit Platelia Candida Ac Plus® ou Virion/Serion IgG (test ELISA), utilisant un antigène complexe.

C'est l'analyse des cinétiques conjointes de l'antigène mannane et des anticorps anti-mannane qui est contributive au diagnostic des candidoses systémiques. La combinaison de ces deux marqueurs permet de compenser le caractère transitoire et fugace de la mannanémie [98-101].

Le problème principal est la différenciation entre colonisation et infection, d'une part le patient immunodéprimé, même infecté, conservera une réponse humorale faible, et d'autre part les individus fortement colonisés peuvent présenter des taux d'anticorps évocateurs de candidose invasive. Il s'agit donc de déterminer le seuil ayant le meilleur compromis sensibilité / spécificité pour identifier le maximum de patients infectés. A l'inverse, les taux d'anticorps élevés associés aux colonisations de sites corporels superficiels, peuvent être utilisés comme facteur de risque d'invasion, plus facile à réaliser que la détermination de l'IC.

D'une manière générale, il est conseillé de pratiquer un prélèvement dès l'admission dans un service à haut risque de MFI puis de réaliser un suivi sérologique incluant antigène et anticorps de manière bihebdomadaire. La pratique des deux tests est plus précoce que l'hémoculture puisque leur utilisation conjointe permet un diagnostic positif en moyenne 4 jours avant l'isolement d'une levure du tissu sanguin.

Le faible niveau de réactions croisées entre les mannanes de *C. parapsilosis*, *C. krusei* et *C. albicans* justifie en partie, les faibles performances diagnostiques des tests Platelia au cours des infections déterminées par ces deux espèces.

## **e) Les techniques de biologie moléculaire**

Plusieurs méthodes ont été décrites pour la détection d'ADN fongique dans le sang périphérique avec une assez bonne sensibilité et spécificité.

Ces méthodes, fondées sur le principe de la PCR, visent à détecter des séquences spécifiques de champignons (test panfongique), des séquences spécifiques de genre (*Candida*, *Aspergillus*...) ou des séquences spécifiques d'espèce (*A. fumigatus*) [102].

Ces tests visent à amplifier des séquences hautement conservées comme celles de l'ARN 18S. La détection des amplicons quant à elle a fait l'objet de plusieurs développements en particulier des procédures de PCR utilisées :

- La PCR conventionnelle avec une séparation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose et une détection par fluorescence (BET...).
- La PCR en temps réel qui offre de meilleures performances que la PCR conventionnelle puisqu'elle est plus rapide, plus sensible, plus spécifique et qu'elle limite la survenue des faux positifs. La détection des amplicons se fait par des sondes fluorescentes spécifiques aux différentes plates-formes utilisées (LightCycler, Abiprism...).
- La PCR nichée, aux performances comparables à la PCR conventionnelle [103]. Son principe est d'utiliser dans un premier temps un couple d'amorces dites « externes » puis sur cet amplicon on utilise un couple d'amorces « internes » aux premières, souvent de petite taille. Ceci permet d'éviter une hybridation sur un site autre que la cible, et augmente donc la spécificité de l'analyse, d'autant plus que le nombre de cycles est plus élevé.

Quel que soit le protocole de PCR utilisé, la sensibilité de détection est généralement faible. Son rendement est comparable à celui de l'hémoculture [102].

## **B. Les aspergilloses invasives**

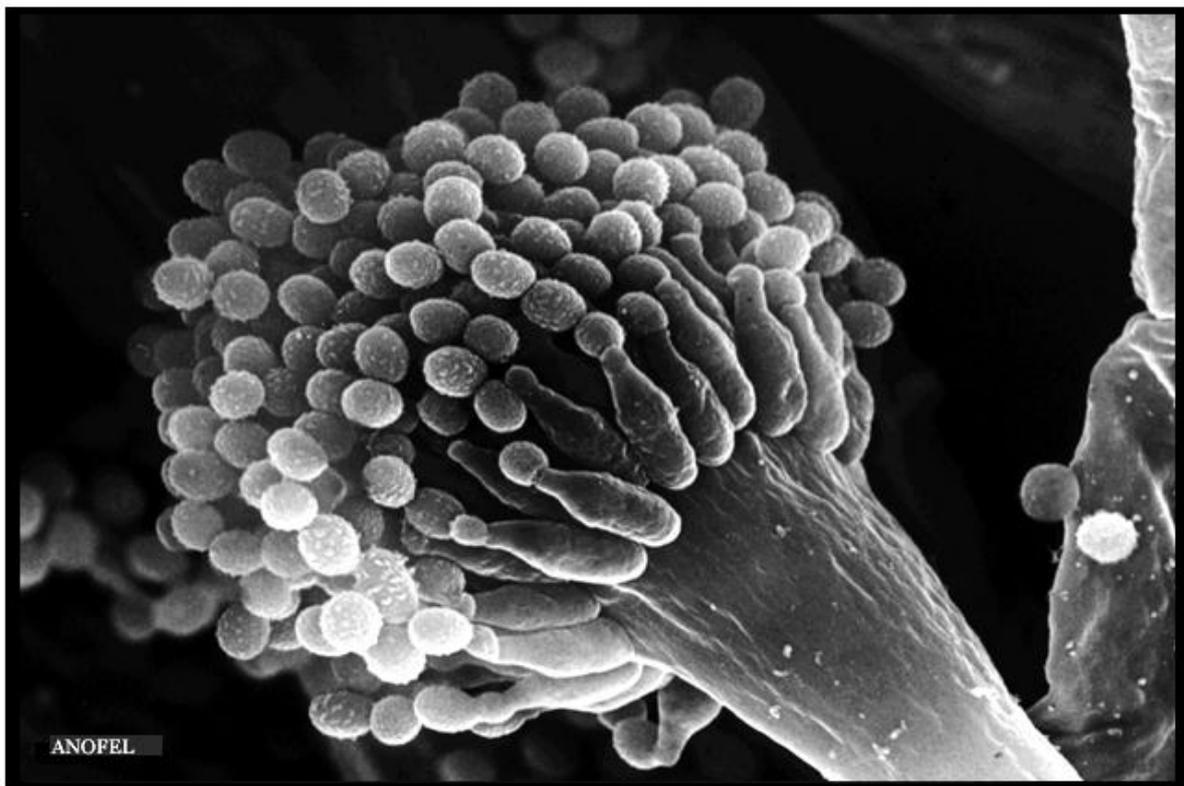
### **1. Définition, épidémiologie, facteurs de risque**

#### **a) Généralités**

L'aspergillose est une infection opportuniste peu fréquente mais grave, souvent mortelle chez l'immunodéprimé, due au développement d'un champignon du genre *Aspergillus*.

Ce genre comporte près de 300 espèces différentes.

*Aspergillus* est très fréquent dans le milieu extérieur, cosmopolite, quel que soit le climat. Ces moisissures vivent en général au dépend de matières organiques en décomposition. Ainsi, on le retrouve dans le sol, la poussière (sous forme de spores), les végétaux, les épices, le foin, les céréales, les matériaux d'isolation dégradés par l'humidité ou encore certains aliments lyophilisés [104].



**Figure 5 :** *Aspergillus fumigatus* observé au microscope électronique à balayage  
On observe une seule rangée de phialides, en forme de bouteille, dressées sur le sommet de la vésicule. Les conidies âgées sont échinulées.

## **b) Epidémiologie**

L'aspergillose invasive est une cause majeure de mortalité chez les patients greffés de moelle osseuse ou traités pour hémopathie maligne [1]. Cette infection est associée à une mortalité variant de 30 à 90 % selon les études [105-108]. Ces chiffres sont en diminution depuis la mise sur le marché du voriconazole et des échinocandines [109].

Un traitement instauré rapidement, c'est-à-dire moins de dix jours après l'apparition des premiers signes cliniques, entraîne une baisse significative de la mortalité (90 % à 40 % chez les patients d'onco-hématologie) [110].

L'incidence de l'API est estimée à 8,4 % chez les greffés pulmonaires, et 6,4 % chez les receveurs de cellules souches médullaires [111]. Elle représente 30 à 50 % des MFI dans les services d'hématologie clinique.

L'aspergillose pulmonaire invasive (API) est en augmentation depuis les années 80, en partie du fait de l'essor des thérapeutiques immunosuppressives [112, 113].

L'incidence croissante de cette pathologie est également observée chez les sujets non neutropéniques (réanimation,...) [114].

## **c) Les principales espèces rencontrées en pathologie humaine**

L'espèce la plus isolée est *Aspergillus fumigatus*, qui représente 80 à 90 % des identifications au sein du genre *Aspergillus* [104]. Outre sa virulence, cette espèce est thermo-tolérante.

Trois autres espèces sont régulièrement retrouvées : *A. flavus*, *A. niger* et *A. terreus*.

Il existe toutefois quelques variations en fonction des régions et des populations étudiées, d'autres espèces pouvant être incriminées en pathologie.

## **d) Pouvoir pathogène et facteurs favorisants**

Le principal mode de contamination est respiratoire [115]. Dans de rares cas le foyer initial peut être une plaie chirurgicale ou le site d'implantation d'une prothèse ou d'un greffon. La faible taille des spores (2 à 3  $\mu\text{m}$ ) permet à ce champignon d'atteindre la muqueuse alvéolaire pour s'y multiplier. Chez le sujet immunodéprimé, ces spores sont susceptibles de germer et d'envahir les tissus.

*A. fumigatus* est par ailleurs aérobic strict. Il peut donc se développer dans des cavités aériennes préformées telles que les sinus ou encore des lésions préexistantes dues à certaines bactéries (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycoplasma*) [116].

*Aspergillus sp.* peut être responsable d'infections chroniques (allergie aspergillaire, aspergillose broncho-pulmonaire allergique ou ABPA, aspergillome) mais sa forme la plus redoutable est l'API. Cette dernière touche plus particulièrement le sujet immunodéprimé.

Elle peut être localisée au niveau pulmonaire (dans la majorité des cas), mais peut aussi disséminer, surtout au niveau cérébral ou cutané. Tous les tissus et organes peuvent cependant être atteints (foie, rein, cœur, tube digestif, os...).

Dans tous les cas, l'évolution est fulgurante et la dissémination très rapide par voie hématogène.

De plus un grand nombre d'espèces du genre est capable de synthétiser des toxines, la plus connue étant l'aflatoxine, à effet immunomodulateur et cancérigène [117, 118]. Ces toxines peuvent ainsi être à l'origine d'intoxications aiguës lors d'une prise alimentaire.

Les facteurs prédisposant à l'infection aspergillaire sont divers :

- facteurs généraux :
  - neutropénie : c'est le facteur principal. L'infection se développera d'autant plus facilement que la neutropénie sera profonde et prolongée
  - greffes d'organes : le risque est d'autant plus majoré dans les premiers jours suivant la greffe
  - greffe allogénique de moelle osseuse : représente un facteur de risque majeur [119]
  - granulomatose septique chronique
  - brûlures étendues et profondes
- facteurs environnementaux expliquant la source de contamination du sujet fragilisé hospitalisé, avec relation directe entre le nombre de spores dans l'air inspiré et le risque de développer une API :
  - travaux à proximité
  - plantes en pot
  - locaux vétustes
  - contamination de l'eau, par exemple en utilisant des humidificateurs en oxygénothérapie
  - ventilateur
  - tabac
  - alimentation (épices)
- certains facteurs locaux sont également une source de prédisposition :
  - antécédents de tuberculose
  - lésion(s) bronchique(s)
  - infection bactérienne (*Mycoplasma pneumoniae*) ou virale (CMV) associée

Chez les patients non neutropéniques, des facteurs de susceptibilité à l'infection sont représentés par une BPCO, une maladie hépatique (cirrhose) à un stade avancé, l'hémodialyse ou encore le diabète [114].

## **2. Aspects cliniques**

Les principaux signes cliniques d'API sont une pneumopathie aiguë fébrile associée à une fièvre résistante aux antibiotiques chez un patient à risque de MFI.

On retrouvera alors une toux non productive, des râles, une douleur thoracique ou encore des hémoptysies. Les signes sont en rapport avec l'organe atteint. Ainsi, si le patient présente une localisation cérébrale, on retrouvera des signes d'encéphalite ou de méningite, si l'atteinte est digestive le patient pourra présenter des ulcérations et/ou hémorragies, ou encore des signes d'endocardite à hémoculture négative si l'atteinte est cardiaque [120].

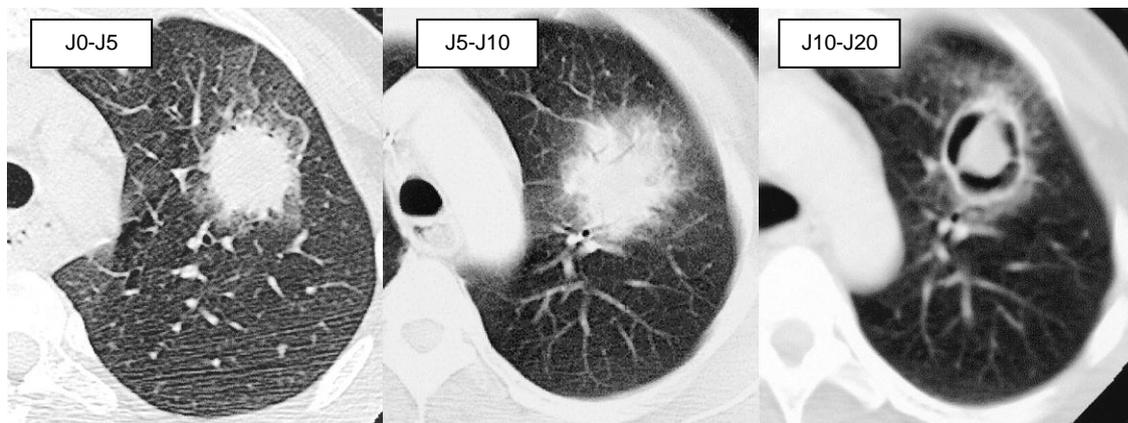
C'est donc un faisceau d'arguments cliniques et radiologiques qui permet d'orienter le clinicien dans sa recherche étiologique.

## **3. Les moyens diagnostiques**

### **a) Place de l'imagerie**

Le scanner représente la meilleure technique diagnostique d'API, la radiographie pulmonaire devant être abandonnée dans cette indication [70]. Sa réalisation doit être envisagée dès que possible pour permettre une prise en charge thérapeutique précoce. Selon le délai entre le début de l'infection et la réalisation du scanner, différentes images peuvent être observées [121] :

- de J0 à J5 : signe du halo, hautement évocateur d'aspergillose, avec une opacité en verre dépoli autour de la lésion. Il représente un signe précoce mais d'apparition fugace.
- de J5 à J10 : condensation alvéolaire, correspondant à un infarctus pulmonaire du fait de l'invasion vasculaire par *Aspergillus*. Ce signe n'est pas spécifique. On le retrouve notamment lors d'une tuberculose.
- de J10 à J20 : croissant gazeux. C'est un signe tardif assez spécifique. Il est dû à l'action des polynucléaires neutrophiles. Si la lésion est située près d'un vaisseau, des hémoptysies seront possibles.



**Figure 6** : Image de tomodensitométrie thoracique observée lors d'une API [122]  
 Signe du halo (J0-J5), image non spécifique (J5-J10) et signe du croissant gazeux (J10-J20)

Le scanner peut également être utile pour le diagnostic d'atteintes extra-pulmonaires (cérébrales, articulaires, rénales).

Les autres techniques d'imagerie (radiographie, échographie) sont beaucoup moins contributives et d'apport souvent tardif.

## **b) Examens mycologiques**

Le diagnostic de MFI peut se faire par méthodes conventionnelles (microscopie, culture et sérologie) mais de nouvelles approches telles que la biologie moléculaire et la spectrométrie de masse peuvent aider à documenter un épisode infectieux chez un sujet à risque.

### **(1) Les prélèvements**

Ils doivent être en rapport avec le site de l'infection et en fonction des signes d'appel.

- Au niveau endobronchique, le LBA représente le prélèvement de choix [123, 124]. Les prélèvements réalisés sous fibroscopie sont en effet de meilleure qualité, d'où l'intérêt également des prélèvements bronchiques distaux protégés. Les crachats sont eux à éviter dans la mesure du possible du fait du problème d'interprétation d'une culture qui s'avèrerait positive. En cas d'examen direct et de culture négative, si la suspicion clinique est forte, il peut être utile de renouveler ces prélèvements.
- L'apport des hémocultures est limité [125], cependant un examen rapide d'importance conséquente peut être une biopsie d'organe. Les biopsies d'organes ont une valeur diagnostique très élevée mais sont de réalisation souvent difficile

en raison des possibles complications hémorragiques chez le sujet neutropénique. Le rapport bénéfice-risque doit être mesuré pour chaque patient.

## **(2) L'examen direct**

On peut réaliser un état frais directement entre lame et lamelle, ou après coloration (bleu de toluidine, Giemsa, acide périodique de Schiff ou Gomori-Grocott).

On recherche ainsi la présence de filaments mycéliens septés à bords parallèles et avec des ramifications parfois à angle droit.

L'examen du LBA ou des tissus ne montre ni spores ni têtes aspergillaires.

Un point important réside dans le fait que la présence de filaments à l'examen direct est très évocatrice d'infection mycologique mais qu'elle ne signe pas la présence d'*Aspergillus sp.* En effet, ces filaments peuvent être observés pour d'autres infections à champignons filamenteux (*Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* ou *Scedosporium sp.*). Le diagnostic du genre et de l'espèce ne peut être réalisé qu'au moyen de la culture.

## **(3) La culture**

L'ensemencement se réalise sur un milieu de Sabouraud-chloramphénicol ou Sabouraud-gentamicine sans actidione à 24, 30 et/ou 37°C. L'identification est facilitée par les milieux Czapek ou malt qui facilitent la fructification. De même, une température allant jusqu'à 57°C peut parfois être utile pour différencier certaines espèces morphologiquement proches.

La culture apparaît généralement en 24 à 48 heures, parfois plusieurs jours, et les têtes aspergillaires, nécessaires pour l'identification de l'espèce, apparaissent vers le 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> jour de culture.

L'identification des isolats nécessite 2 étapes :

- 1) l'aspect macroscopique : délai de culture, taille, couleur et pigmentation des colonies
- 2) l'aspect microscopique des colonies après coloration au bleu de lactophénol
  - Morphologie de la tête aspergillaire : ronde ou en fuseau, vésicule sphérique ou allongée
  - Aspect du conidiophore : long ou court, lisse ou échinulé, droit ou sinueux
  - Les phialides : mono ou bisériées
  - Aspect des spores : lisses ou échinulées, incolores ou colorées
  - Présence d'éléments supplémentaires tels que des ascospores

### **c) Histologie**

Elle permet de mettre en évidence le champignon dans les tissus. *Aspergillus* sera représenté par des filaments septés ramifiés, comme pour les autres champignons microscopiques. Les foyers pulmonaires contiennent de nombreux polynucléaires et les filaments aspergillaires envahissent les vaisseaux.

### **d) Examens sérologiques**

#### **(1) Recherche d'antigènes circulants**

Dans cette catégorie, deux antigènes sont recherchés en pratique courante :

1) Le galactommanane (GM) : c'est un hétéropolysaccharide thermostable présent dans la paroi de la plupart des espèces aspergillaires, sécrété par le champignon en phase de croissance et relargué précocement dans l'organisme lors des processus invasifs [126].

La production de GM est proportionnelle à la charge fongique présente dans les tissus et la cinétique des taux sériques présente un intérêt pronostique puisque la persistance de taux élevés chez des patients sous thérapeutique antifongique adaptée est associée à une évolution défavorable [127].

La technique utilise un anticorps monoclonal de rat de type IgM. Sa positivité est plus précoce que le scanner (7 jours avant), la culture (7 jours avant) voire que l'apparition des signes cliniques (6 à 10 jours avant). Ce marqueur permet d'exclure le diagnostic d'API car sa VPN est très élevée.

La généralisation de ce test a permis cependant d'identifier plusieurs sources de réactions faussement positives, notamment :

- au cours des infections à *Cryptococcus sp.*, *Histoplasma sp.*, ou encore à *Bifidobacterium sp.*
- ou d'origine exogène :
  - Alimentaire (présents en quantité importante dans le lait pour nourrissons et nouveaux nés) [128]
  - Prise d'antibiotiques (principalement avec l'association pipéracilline-tazobactam et d'une manière générale avec les pénicillines) [129-131]
  - Solutés de nutrition parentérale [132]

2) Détection des bêta-1,3-D-glucanes (BDG) : l'intérêt de ce test sera abordé dans le chapitre III.

## **(2) Recherche d'anticorps spécifiques**

Elle a peu d'intérêt en cas d'infection aiguë, du fait du délai d'apparition des anticorps. Elle est plus utile dans le cadre d'ABPA et d'aspergillome. Elle peut être utile chez le sujet neutropénique au sortir d'aplasie pour documenter un épisode infectieux.

Les techniques classiques utilisées pour la recherche de manière semi-quantitative d'anticorps anti-aspergillaires sont de plusieurs types.

- Les techniques d'immunoprécipitation
  - o Immunoélectrophorèse (présence d'arcs de précipitation) : technique peu sensible mais très spécifique. Elle est longue et consommatrice d'antigènes. Une microméthode est aujourd'hui disponible permettant d'obtenir les résultats en 48 heures.
  - o Diffusion et précipitation en milieu gélifié (technique d'Ouchterlony), d'utilisation plus aisée.

Les techniques d'immunoprécipitation permettent toutefois de mettre en évidence les activités catalasique et chymotrypsique, considérées comme hautement spécifiques d'aspergillose.

- Les techniques immunoenzymatiques (Platelia *Aspergillus* anticorps) : il s'agit d'une technique très sensible et de réalisation plus adaptée au dépistage d'un grand nombre de sujets à haut risque. Elle permet de détecter des anticorps spécifiques de plusieurs protéines recombinantes d'*A. fumigatus*.

Les Conférences de Consensus recommandent un suivi régulier de l'antigène circulant, des anticorps et des prélèvements trachéo-bronchiques pour les patients à haut risque d'API afin d'apprécier le niveau de certitude d'API.

On essaie de coupler les recherches d'antigène galactomannane et d'anticorps anti-aspergillaire, et de renouveler les examens dans le but d'observer la cinétique de ces deux marqueurs dans le temps, ceci afin d'apprécier au mieux le processus infectieux.

Cette recherche sera moins efficace si le sujet est leucopénique, car d'une part il y aura moins d'anticorps détectables et d'autre part les champignons seront moins dégradés par les polynucléaires neutrophiles donc il y aura peu de galactomannane circulant.

### **e) La spectrométrie de masse**

Tout comme pour les espèces de *Candida*, cette technique est également fiable pour l'identification des moisissures isolées au laboratoire, puisqu'elle présente environ 99 % de

similitude de résultats avec la technique de référence, l'identification par les gènes des champignons. Elle est donc plus performante que l'identification morphologique macro et microscopique des espèces [133, 134].

## **f) La biologie moléculaire**

### **(1) La PCR**

Cette technique présente de très bonnes sensibilité et spécificité, comprises entre 90 et 95 % [135]. Un résultat négatif peut ainsi permettre d'éviter la prise d'un traitement chez un patient.

### **(2) La Real-Time-PCR ou PCR en temps réel**

Un nouveau test, le Septifast, utilisé sur l'automate LightCycler, réalise une PCR en temps réel sur sang total directement.

Cette technique permet l'identification de 25 pathogènes (bactéries et champignons), couvrant 90 % des infections, et ceci en moins de 6 heures.

Les principaux inconvénients sont le coût de la technique ainsi que les mauvais résultats obtenus pour les levures du genre *Candida*. Elle peut donc être utile en complément lors d'une forte suspicion de MFI lorsque les hémocultures demeurent négatives [136, 137].

## **C. Les pneumocystoses**

### **1. Définition, épidémiologie, facteurs de risque**

#### **a) Généralités**

*Pneumocystis jirovecii* est un champignon extracellulaire eucaryote strictement humain dont l'apparition des symptômes cliniques est très insidieuse, notamment chez le sujet atteint par le VIH et non traité [138].

D'abord classé en tant que protozoaire du fait de ses caractères microscopiques, culturels (absence de culture sur les milieux usuels), et thérapeutiques (les molécules utilisées sont celles administrées dans le traitement de diverses protozooses), il a été récemment relié au règne des champignons grâce au développement des techniques de biologie moléculaire et de morphologie cellulaire [139, 140].

#### **b) Epidémiologie**

*Pneumocystis jirovecii* est isolé au niveau des voies aériennes. La population générale serait porteuse du champignon dans les voies respiratoire à hauteur de 20 % [141]. Elle est plus importante durant l'enfance, chez les sujets VIH+ (68 %), chez les patients avec une pathologie pulmonaire sous-jacente (41 %) ainsi que lors de la prise de glucocorticoïdes [142-145].

La fréquence d'isolement du champignon a connu 2 pics au cours des dernières années, le premier du fait de l'apparition du Virus de l'Immunodéficience Humaine (les malades y sont très susceptibles lorsque leur taux de lymphocytes T CD4+ passe sous le seuil de 200/mm<sup>3</sup>), le second à cause de la multiplication des traitements immunosuppresseurs lors des transplantations et par l'utilisation de traitements biologiques tels que les anti-TNF $\alpha$ .

On assiste à une augmentation de l'incidence chez les sujets VIH négatifs, avec alors une mortalité plus importante.

Le diagnostic de pneumocystose permet parfois de révéler une infection à VIH méconnue. Toute découverte de pneumocystose devrait faire pratiquer, avec l'accord du patient, un examen afin de vérifier le statut sérologique vis-à-vis du VIH.

**Habitat :** c'est un champignon extracellulaire retrouvé dans l'alvéole pulmonaire de nombreux mammifères. Il présente une spécificité d'hôte (il existe des pneumocystoses humaines, des pneumocystoses spécifiques au rat...)

La transmission se fait principalement de manière aérienne. Une transmission transplacentaire a été décrite chez le lapin et chez l'Homme mais elle est minoritaire.

L'intensité de l'infection n'est pas proportionnelle à la quantité de micro-organisme détectée au niveau des prélèvements pulmonaires [146].

Une colonisation est fréquente chez les sujets atteints par le virus du SIDA et chez les personnes présentant une pathologie sous-jacente affaiblissant le système immunitaire ou traitées par immunosuppresseurs ou glucocorticoïdes.

Une primo-infection avec séroconversion est observée chez plus de 90 % des enfants immunocompétents à l'âge de 4 ans. La recherche d'anticorps spécifiques chez l'adulte n'a aucune valeur diagnostique.

### **c) Facteurs favorisants**

Les terrains à risque sont principalement représentés par l'immunodépression sévère, que celle-ci soit due à l'infection par le VIH, à un traitement par médicaments immunosuppresseurs tels que la chimiothérapie, les traitements anti rejet suivant une greffe d'organe solide ou de moelle osseuse, un traitement par glucocorticoïdes au long cours, ou tout sujet neutropénique [147-150]. Le risque de développer une pneumocystose est majorée chez un patient ayant moins de 200 CD4/mm<sup>3</sup> [151].

## **2. Aspects cliniques**

La contamination est interhumaine [152]. En effet, l'hétérogénéité des espèces impose une spécificité d'hôte. La séroprévalence de 90 % à 4 ans démontre que le champignon est très présent dans l'environnement [153]. Il est pathogène soit par activation de formes latentes déjà présentes chez l'hôte soit, le plus fréquemment, par acquisition *de novo*.

Les principaux individus touchés sont :

- les nouveau-nés présentant des symptômes de bronchiolite [154],
- les patients mucoviscidosiques (25 % des malades). *Pneumocystis jirovecii* a un rôle dans l'évolution de la maladie [155],
- les immunodéprimés : la maladie se présente initialement sous forme d'infection pulmonaire (pneumonie interstitielle) puis évolue le plus souvent en fibrose

Les symptômes, peu spécifiques, sont une dyspnée, une toux sèche et un fébricule qui évolue en fièvre [156]. L'infection se transforme ensuite en insuffisance respiratoire aiguë.

Chez le sujet VIH+, l'installation est progressive et l'évolution lente.

Chez le sujet VIH-, le début est brutal et l'évolution rapide.

Ce constat a pour conséquence un diagnostic plus rapide de la pathologie chez le VIH- (5 jours en moyenne) que chez le VIH+ (3-4 semaines) [157].

Le diagnostic est d'autant plus difficile que l'auscultation pulmonaire est le plus souvent normale et que la radiologie de thorax ne montre, la plupart du temps, qu'un infiltrat bilatéral diffus plus ou moins prononcé.

Chez l'enfant, l'infection est très souvent asymptomatique.

De très rares formes extra-pulmonaires peuvent être observées, principalement au niveau des ganglions lymphatiques, de la rate, du foie, de la moelle osseuse, de l'œil et de l'oreille [158].

### **3. Les moyens diagnostiques**

#### **a) Tests non spécifiques**

La numération formule sanguine et la vitesse de sédimentation n'ont pas d'intérêt puisqu'elles ne présentent pas d'anomalies notables.

On peut observer, du fait de l'hypoxie et donc d'une augmentation de la fréquence respiratoire, une légère alcalose sanguine.

Trois examens peuvent avoir un intérêt pour évaluer le pronostic : la PaO<sub>2</sub> qui est de mauvais pronostic si sa valeur est inférieure à 50 mm de Hg, une valeur de LDH très augmentée ainsi qu'un nombre élevé de polynucléaires neutrophiles dans le LBA qui diminuent les chances de survie du patient [159, 160].

#### **b) Prélèvements respiratoires**

Le champignon étant présent au niveau de l'alvéole pulmonaire, ces prélèvements sont d'une grande valeur diagnostique.

*Pneumocystis jirovecii* se présente sous plusieurs formes distinctes [161, 162].

- le trophozoïte, mesurant de 2 à 5 µm,
- le prékyste, mesurant de 3 à 6 µm,
- le kyste mûr, mesurant de 4 à 6 µm, contenant plusieurs trophozoïtes,
- le kyste vide, en forme de croissant de lune.

Tout prélèvement d'origine respiratoire peut être envisagé (LBA, aspiration bronchique, rinçage oro-pharyngé, crachat), mais celui qui donne de meilleurs résultats et qui reste la référence est le LBA.

Différentes colorations peuvent alors être pratiquées pour l'observation du LBA : on différencie le May Grünwald Giemsa, qui présente l'avantage d'une coloration panoptique, des autres techniques qui ne colorent que la paroi kystique : le Gomori Grocott, le bleu d'ortho-toluidine, le violet de crésyl, ou encore le calcofluor [163].

Le nombre de kystes est faible chez le sujet VIH négatif, l'examen direct est souvent de faible rendement.

Afin d'augmenter la sensibilité de cet examen, en particulier lorsque les prélèvements sont pauci-parasités, certains laboratoires recherchent la présence de kystes par immunofluorescence [164, 165]. Ce test consiste à utiliser un anticorps monoclonal dirigé contre les BDG marqué à la FITC.

Un examen direct positif affirme l'infection.

### **c) La culture**

*Pneumocystis jirovecii* est un agent non cultivable [166]. La mise en culture des prélèvements respiratoires a donc pour seul but d'isoler les autres micromycètes responsables de pneumopathies chez le sujet immunodéprimé.

### **d) La PCR**

Du fait de sa grande sensibilité, la technique de PCR en temps réel présente de nombreux faux positifs [167, 168]. Un résultat positif doit donc s'interpréter également en fonction de l'examen direct et de la clinique.

En revanche, un résultat sera significatif s'il est négatif ou s'il est positif chez un grand immunodéprimé.

Le gène cible le plus fréquemment utilisé fait partie de l'ARN mitochondrial (mt LSU rRNA) [169].

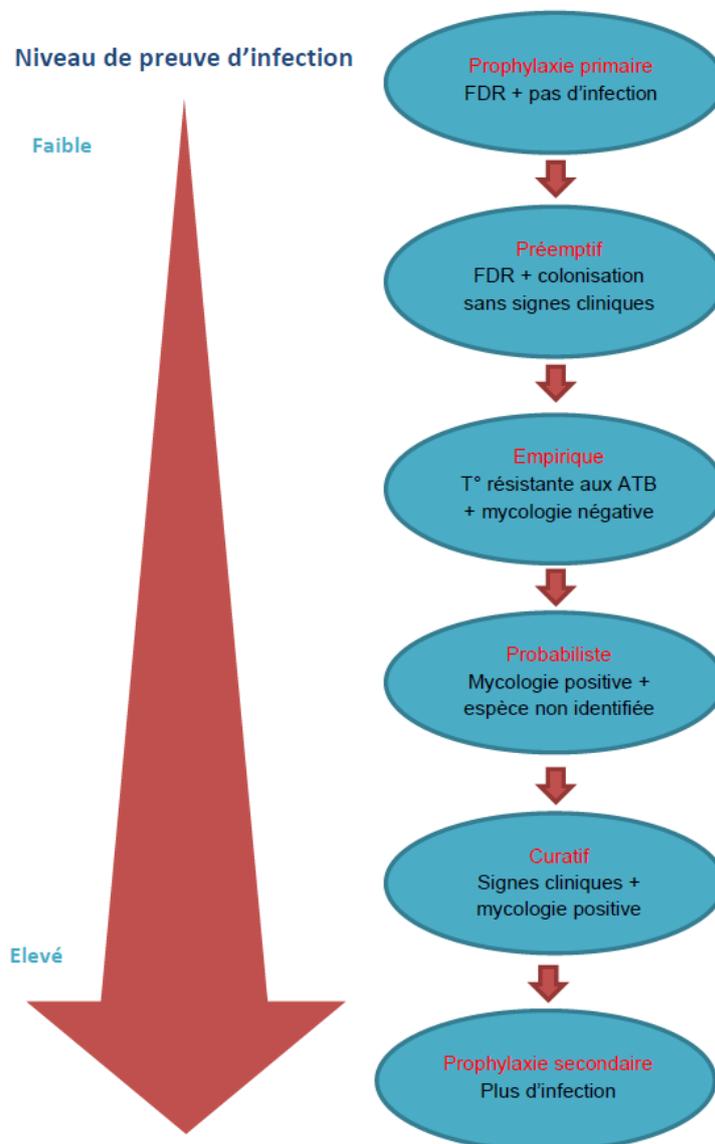
### **e) Les BDG**

Ils sont présents dans les formes kystiques [170]. Cet examen est particulièrement intéressant dans cette pathologie puisque la sensibilité est réputée très élevée et que les taux obtenus sont très élevés, régulièrement supérieurs à 1000 pg/mL [171-173]. Ils pourraient servir à différencier la colonisation de la pneumonie [174].

## ***D. Prophylaxie et traitement des principales maladies fongiques invasives***

Compte tenu de la gravité des MFI, la prise en charge thérapeutique des patients doit être la plus précoce possible. La nature des molécules administrées initialement a des répercussions immédiates et importantes sur l'issue de l'infection [175]. L'amphotéricine B, largement utilisée depuis les années 80s, a laissé la place à de nouvelles thérapeutiques à large spectre et de moindre toxicité [176].

Selon le niveau de preuve de l'infection, différents types de traitement peuvent être mis en œuvre :



**Figure 7** : Nature des traitements prescrits

## 1. Les molécules disponibles

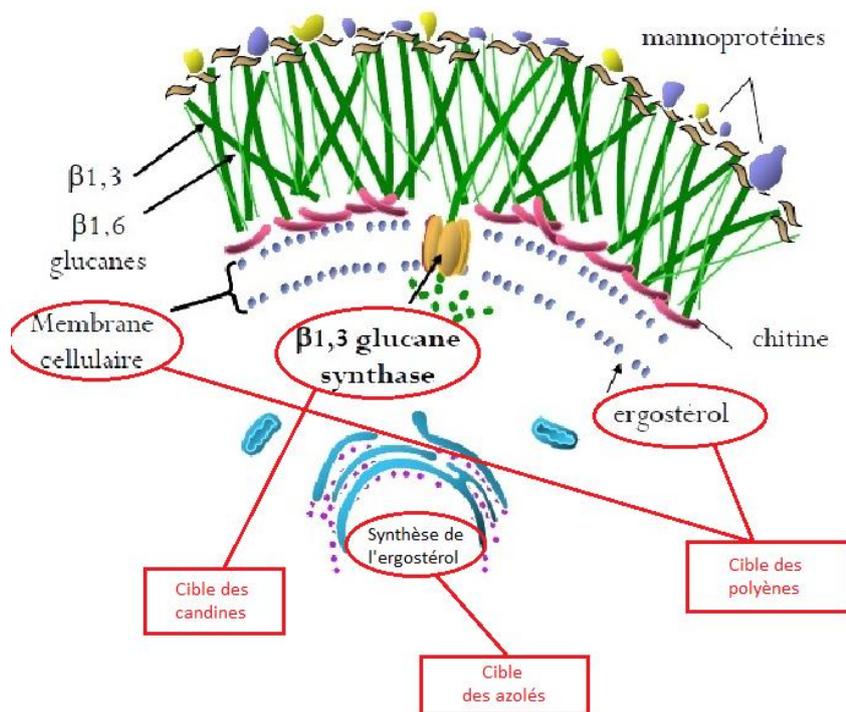
Les antifongiques utilisés dans le cadre d'une MFI appartiennent à 3 classes thérapeutiques : les polyènes, les azolés et les échinocandines.

Les polyènes ainsi que les azolés ont comme cible thérapeutique la membrane plasmique tandis que les échinocandines agissent au niveau de la paroi.

L'enzyme inhibée par la présence de triazolés est la lanostérol-14- $\alpha$ -stérol-déméthylase pour les levures et la 14- $\alpha$ -stérol-déméthylase pour les moisissures. Ces enzymes ont pour fonction de transformer le lanostérol en ergostérol, lipide participant à l'architecture membranaire du champignon. L'inhibition de sa synthèse altère donc parallèlement la structure et la fonction de la membrane.

Les polyènes se fixent sur l'ergostérol et induisent la formation de pores membranaires. Des échanges ioniques ont alors lieu et ont pour conséquence un effet fongicide [177].

Les échinocandines inhibent la béta-1,3-D-glucane synthase et empêchent ainsi la synthèse de la paroi.



**Figure 8** : Mécanisme d'action des principaux antifongiques systémiques  
Schéma adapté de Maertens *et al* [178].

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques et leurs spectres d'action sont représentés dans le tableau 2 :

	POLYÈNES			AZOLÉS			ÉCHINOCANDINES				
	Amphotéricine B classique Fungizone®	Amphotéricine B liposomale Ambisome®	Amphotéricine B lipidique Abelcet®	Fluconazole Triflucon®	Itraconazole Sporanox®	Voriconazole VFend®	Posaconazole Noxafil®	Caspofongine Cancidas®	Micafongine Micamine®	Anidulafongine Ecaltra®	
Administration	Voie parentérale			Voie parentérale, voie orale			Voie parentérale				
Absorption	Nulle par voie orale			Influence de l'alimentation Dose de charge			Nulle par voie orale				
				Absorption digestive totale	Absorption digestive irrégulière Maximale après le repas	Absorption digestive totale A distance du repas	Prendre lors d'un repas gras				
Distribution	Forte liaison protéique (non dialysable) Pas de diffusion au niveau LCR et urines			Faible liaison protéique			Liaison protéique intermédiaire			Forte liaison protéique	
Métabolisme	Mal connu			Métabolisme par le cytochrome P450 : interactions médicamenteuses			En partie hépatique			Hépatique Non hépatique	
Élimination	Lente (demi-vie : 1 à 5 jours)			Principalement rénale Demi-vie : 25h			Hépatique (métabolite actif) Demi-vie : 17-24h			Hépatique Demi-vie : 15h Demi-vie : 26h	
Spectre	Large Levures et filamenteux			Candida			Candida Aspergillus Fusarium, Scedosporium			Fongicide sur <i>Candida</i> Fongistatique sur <i>Aspergillus</i>	
Genres ou espèces non couverts	<i>C. lusitanae</i> <i>Trichosporon</i> <i>A. terreus</i> Irrégulièrement <i>Fusarium</i> et <i>Scedosporium</i>			<i>C. glabrata</i> : 60 % S <i>C. krusei</i> : R			Certains souches de <i>C. glabrata</i> Mucorales			<i>C. neoformans</i> <i>Trichosporon</i> Mucorales	
EI principaux	Liés à la perfusion (libération de cytokines) Insuffisance rénale			Cytolyse hépatique Troubles digestifs			Hépatiques				

Tableau 2 : Caractéristiques pharmacocinétiques des principaux antifongiques

## 2. Résistances aux traitements

Sous l'effet de la pression de sélection exercée par les antifongiques, les champignons ont développé différents mécanismes de résistance [179, 180].

Chez *Candida sp*, les mécanismes de résistance aux azolés les plus étudiés sont l'induction de pompes à efflux codées par les gènes MDR ou CDR, qui sont alors surexprimés, ainsi que l'acquisition de mutations au niveau du gène codant pour l'enzyme cible, ERG11, qui a sa structure modifiée et présente donc une affinité moindre pour les azolés.

D'autres mécanismes de résistance, plus rares, sont décrits, tels que l'hyper-expression de la cible, ce qui a pour conséquence un nombre insuffisant de molécules de principe actif pour couvrir l'ensemble des enzymes à inhiber.

L'utilisation du fluconazole depuis 1990 est médiée par la proportion de *C. glabrata*, dont la résistance vis-à-vis de cette molécule est en augmentation [181]. En effet, selon l'étude ARTEMIS (antifungal surveillance program), la proportion de *C. glabrata* isolée au niveau des prélèvements serait passée de 18 % entre 1992 et 2001 à 25 % entre 2001 et 2007, et durant cette même période la part de souches résistantes au fluconazole serait passée de 9 à 14 %. Une surveillance étroite est nécessaire du fait du risque d'émergence de *C. glabrata* MDR (Multi-Drug Resistant).

La résistance du genre *Candida* à la famille des échinocandines est quant à elle principalement la cause d'une mutation au niveau d'un des deux « hot-spot » du gène FKS1 (HS1, HS2), qui code pour la sous-unité majeure catalytique de la glucane synthase. Des mutations supplémentaires au niveau du gène FKS2 ont été mises en évidence au sein de l'espèce *C. glabrata* [182, 183]. D'autres espèces peuvent également avoir une sensibilité moindre aux échinocandines telles que *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* et *C. albicans* [184, 185].

Chez *Aspergillus*, les résistances aux azolés et aux échinocandines restent rares. Il a été décrit la présence émergente de mutations au niveau du gène Cyp51A, entraînant une altération de la cible de la 14 $\alpha$ -stérol déméthylase. L'hypothèse d'une résistance aux polyènes par altération de l'ergostérol membranaire qui empêcherait le principe actif d'atteindre sa cible est avancée, il est aussi évoqué une possible diminution de la teneur membranaire en stérols. Ceci justifie une surveillance régulière de l'épidémiologie [186].

### 3. Prophylaxie des candidoses et aspergilloses invasives

Elle n'est pas systématique. Il faut cibler les populations à risque pour lesquelles le rapport bénéfice-risque est favorable. Il s'agit principalement des patients greffés de moelle osseuse, les patients en phase d'induction de traitement de leucémie aiguë mais également les transplantés pulmonaires ou les patients sous traitement prolongé par glucocorticoïdes à forte dose.

En prophylaxie, la classe pharmacologique privilégiée est la famille des triazolés, puisqu'elle couvre une grande partie des espèces et qu'elle est d'un moindre coût.

L'épidémiologie des infections à *Candida* ayant évolué dans les deux dernières décennies, avec une augmentation de la proportion de *Candida non-albicans*, dont certains sont réputés moins sensibles aux antifongiques classiquement utilisés. Par ailleurs, l'arrivée de nouvelles molécules a incité les sociétés savantes à proposer de nouvelles stratégies de prévention et de traitement curatif des principales MFI [33, 187].

Pour la prophylaxie de ces pathologies, l'ECIL et l'IDSA recommandent en première intention le posaconazole. En cas d'intolérance ou d'indisponibilité, le fluconazole ou l'itraconazole pourront être utilisés.

De par la dispersion et la propagation des spores fongiques dans l'environnement, des mesures préventives spécifiques supplémentaires peuvent être appliquées pour prévenir les infections à *Aspergillus spp.* chez les patients présentant des périodes d'aplasie prolongées. Ces mesures peuvent être générales ou spécifiques au patient :

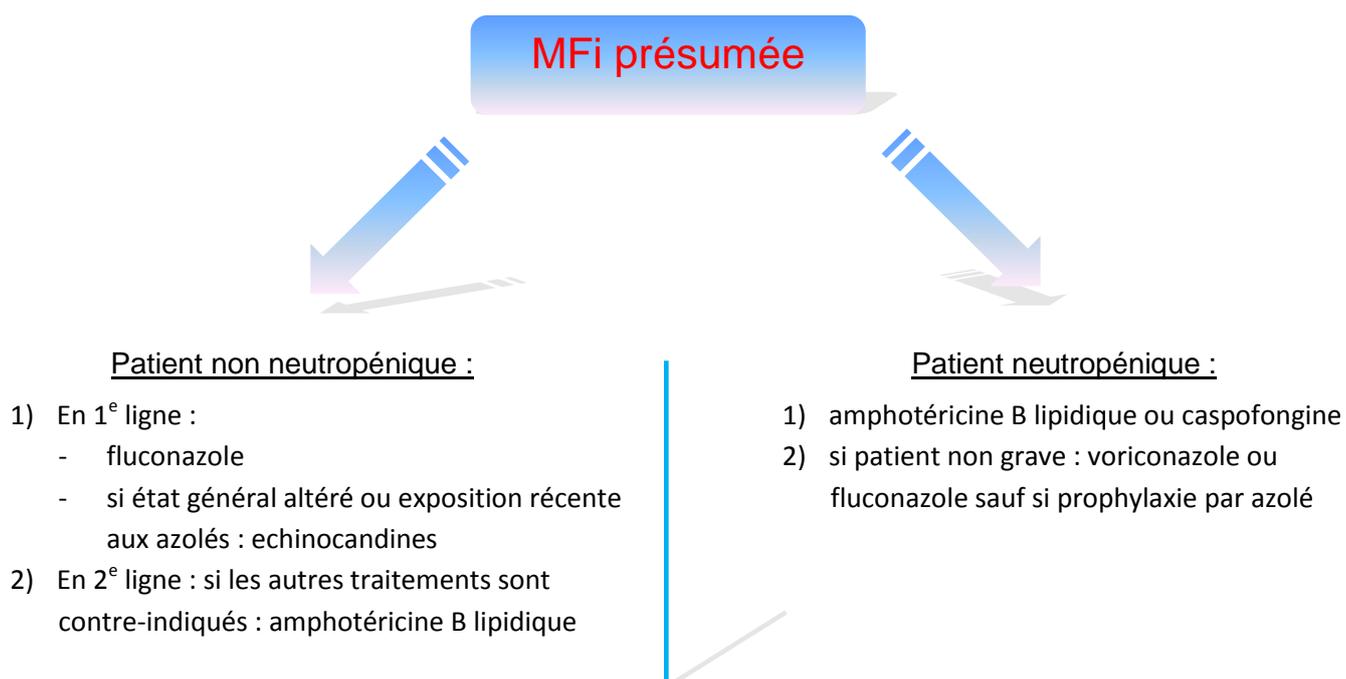
- mesures générales :
  - o hygiène hospitalière
  - o absence de plantes et fleurs dans les chambres d'hôpital
- décontamination de l'air ambiant :
  - o mise en place de filtres
  - o création de chambres stériles à flux laminaire
  - o prélèvements systématiques d'air, de surface et d'eau
- prophylaxie appliquée au malade :
  - o recherche d'une colonisation fongique, écouvillonnage nasal ou analyse répétée des crachats
  - o sérologie fongique hebdomadaire
  - o chimioprophylaxie :
    - spray nasal d'amphotéricine B
    - posaconazole ou itraconazole en systémique chez l'adulte
    - micafongine en systémique chez l'enfant

#### 4. Traitement des candidoses et aspergilloses invasives

Des recommandations récentes de l'IDSA (Infectious Diseases Society of America), publiées en 2008 et 2009, proposent les conduites thérapeutiques à adapter en fonction du stade diagnostique et du terrain de chaque patient [188, 189].

Une synthèse des instructions préconisées est présentée dans le document ci-après. Les grandes lignes consistent à utiliser dans la cadre d'une suspicion ou d'une infection prouvée à *Candida sp.* le fluconazole si le patient est stable ou une échinocandine si la forme est considérée comme sévère (patient instable) [39, 190]. Pour l'API, la molécule référence dans le traitement d'une maladie avérée est le voriconazole [191].

De nombreuses études suggèrent le caractère majeur de la précocité de mise en route du traitement dans le cadre des infections fongiques invasives, un délai supérieur à 48 heures étant très délétère sur la survie des patients [192].



## Candidémie

### Patient non neutropénique :

- En 1<sup>e</sup> ligne :
- fluconazole
  - ou echinocandine si exposition récente aux azolés ou si forme moyennement sévère à sévère.
- En 2<sup>e</sup> ligne : amphotéricine B, seulement si intolérance ou indisponibilité des autres antifongiques.

### Patient neutropénique :

- 1) echinocandine ou amphotéricine B liposomale
- 2) si forme non grave sans exposition préalable à un azolé : fluconazole voire voriconazole (spectre plus large).

- Durée de traitement : 2 semaines après la négativation des hémocultures et si le patient n'est pas/plus neutropénique.
- Toujours désescalader si possible après identification de l'espèce : relais par fluconazole si la souche est sensible, la forme peu grave et l'évolution favorable.
- Retrait cathéter à discuter si neutropénique.

## API

### Pour tous les patients

- 1) En 1<sup>e</sup> ligne : voriconazole IV puis relais par VO
- 2) En 2<sup>e</sup> ligne : amphotéricine B liposomale ou échinocandine

- Durée de traitement : au moins 6 à 12 semaines, et couvrant toute la période d'immunosuppression

## **5. Cas de *Pneumocystis jirovecii***

La prophylaxie est instaurée chez le sujet VIH+ lorsque les lymphocytes T CD4+ sont inférieurs à 200/mm<sup>3</sup>, chez l'aplasique ou en cas de greffe d'organe, c'est-à-dire lorsque le risque de développer une pneumopathie à *Pneumocystis* est majeur.

On utilise un traitement par Bactrim<sup>®</sup> (triméthoprim-sulfaméthoxazole) par voie orale, inhibiteur de la synthèse d'acide folique, à faibles doses, ou par atovaquone si intolérance, ou par aérosol de pentamidine [193, 194].

Le traitement curatif de première intention consiste en la prise de l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole à forte posologie, durant 21 jours [195]. Il sera administré par voie intraveineuse en cas d'infection modérée ou sévère alors que la voie orale sera préférée si l'infection est peu sévère.

Il est à noter les effets indésirables nombreux présentés par ce médicament, notamment fièvre, atteintes dermiques, atteintes hématologiques, vomissements.

De plus, son importante utilisation en prophylaxie a pour conséquence la sélection de mutants résistants par modification de la structure de la DHPS (dihydroptéroate synthétase), l'enzyme cible des sulfamides [168, 196].

En cas d'échec ou d'intolérance à ce traitement, on peut le remplacer par l'association dapsone + pyriméthamine, la pentamidine par voie intraveineuse ou encore l'atovaquone, un inhibiteur du transport mitochondrial des électrons, si le patient ne présente pas de signes de gravité [197, 198].

On y associe des glucocorticoïdes dans le but de diminuer l'inflammation due à la lyse du champignon par le traitement curatif [199].

## II. Les bêta-(1,3)-D-glucanes

### **A. Le champignon dans son ensemble**

Les cellules fongiques sont des organismes eucaryotes hétérotrophes, assimilant les matières organiques par absorption et caractérisés par la présence d'une paroi à rôle de protection et de résistance.

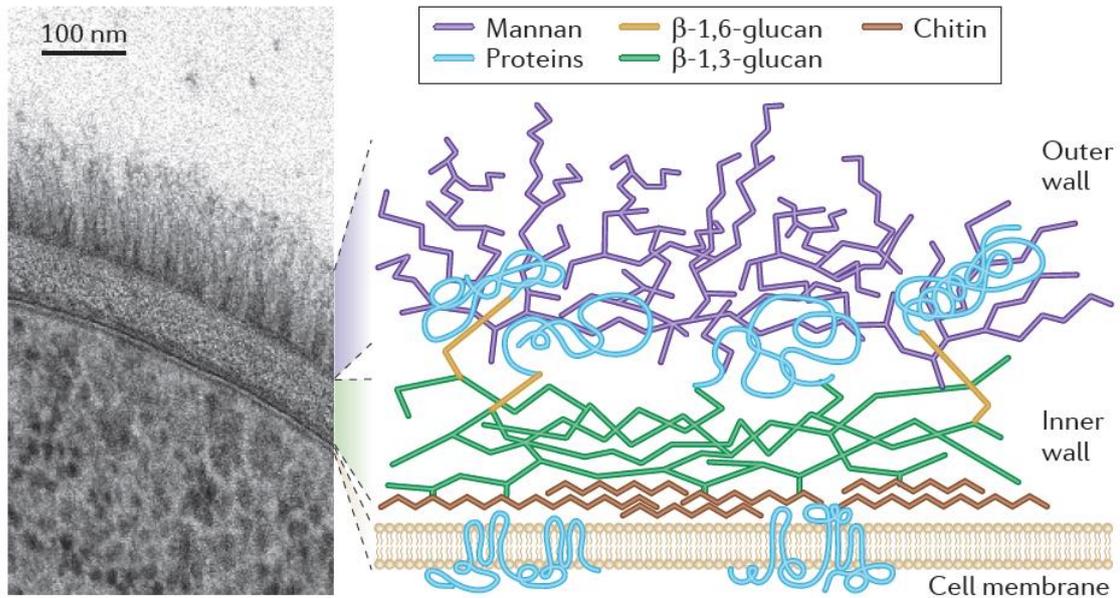
Ces cellules se composent d'un appareil végétatif, ou thalle, qui est soit levuriforme, soit filamenteux, entouré d'une paroi riche en polymères de N-acétylglucosamine (chitine) ou de glucose (bêta-1,3 et bêta-1,6 glucanes).

### **B. Structure de la paroi fongique**

La paroi est une structure tridimensionnelle dynamique qui protège l'intégrité de la cellule des divers stress extérieurs tels que la pression osmotique, la variation de pH, la température ou les chocs mécaniques en agissant en tant que barrière, mais qui possède également un rôle actif via la libération de molécules toxiques détruisant les différentes substances de l'environnement immédiat pouvant être néfastes pour le champignon. Elle représente environ 25 % du poids sec total de la cellule [200]. Sa structure est unique et diffère significativement de la base cellulosique composant la paroi des cellules végétales.

Longtemps considérée comme un exosquelette inerte, il est maintenant établi qu'elle est une structure dynamique en perpétuel changement, s'adaptant également à l'environnement extérieur. Elle est surtout constituée de polysaccharides (glucanes et chitine) ainsi que de glycoprotéines dont les sucres, les mannanes pour le genre *Candida* et les galactomannanes pour le genre *Aspergillus*, sont greffés par des liaisons O- et N-.

La nature exacte des différents composants ainsi que leur arrangement structural est propre à chaque espèce.



**Figure 9** : Structure schématique de la paroi fongique de *C. albicans* [59]

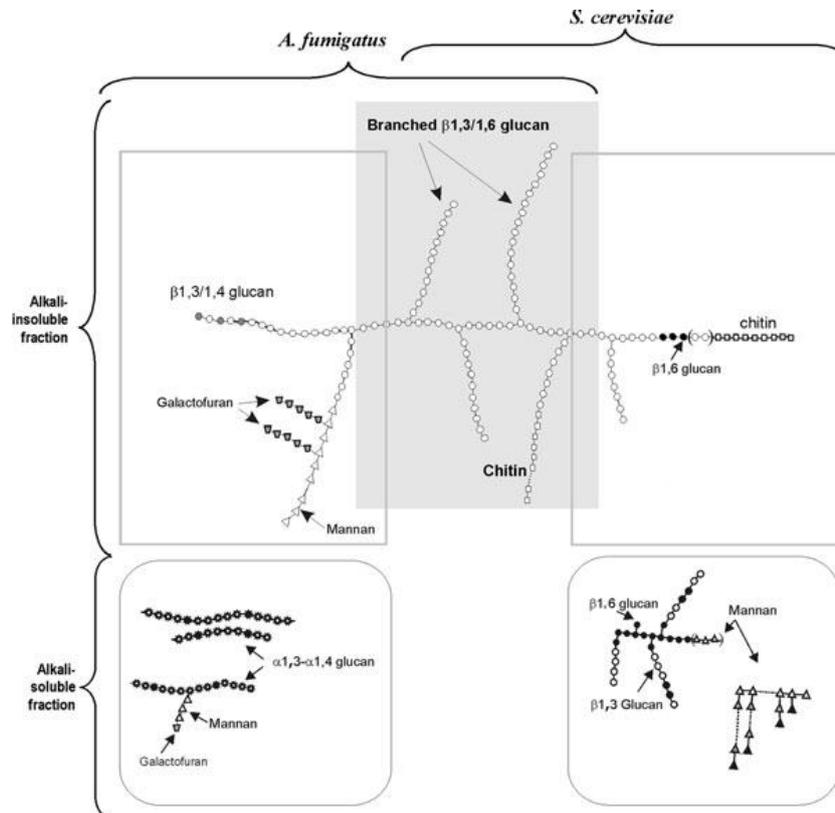
### 1. Les glucanes

Ils comptent pour plus de 50 % du poids sec de la paroi. Ce sont des polysaccharides d'importance majeure dans la structure pariétale. Ils sont constitués de multimères de glucose assemblés sous forme de longues chaînes linéaires et ramifiées.

Selon le type de liaisons chimiques, on distingue les bêta-(1,3)-glucanes, représentant entre 65 et 90 % de l'ensemble des glucanes de la paroi, les  $\beta$ -(1,6)-, le reste étant composé de  $\beta$ -(1,4)-,  $\alpha$ -(1,3)-,  $\alpha$ -(1,4)-glucanes [201, 202]. C'est sur ces composants que se fixent par liaison covalente les autres constituants de la paroi.

Leur synthèse est assurée par un complexe protéique membranaire, la glucane synthase, de structure très conservée, et qui utilise l'UDP-glucose intracellulaire pour le transformer en chaînes de  $\beta$ -(1,3)-glucanes linéaires [203]. Ces molécules nouvellement synthétisées vont être modifiées et associées aux autres composants de la paroi afin de former une structure rigide [204].

Les  $\beta$ -(1,3)-D-glucanes sont ainsi branchés par des liaisons covalentes à la chitine, au mannane ou au galactomannane.



**Figure 10** : Représentation schématique des polysaccharides de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* et de *Saccharomyces cerevisiae* [201].

En gris la structure de base commune à la majorité des espèces fongiques

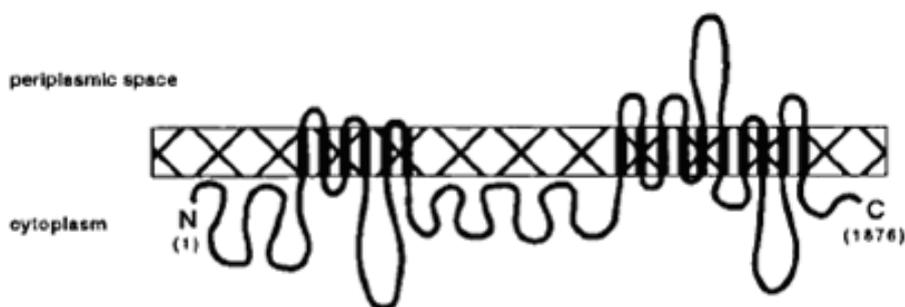
La glucane synthase, qui comprend une fraction membranaire et une fraction soluble GTP-liée, est composée de deux parties actives :

- Une sous unité catalytique FKSp, codée par les gènes FKS. Elle est essentielle pour la synthèse de glucanes et a donc un rôle clé dans la synthèse de la paroi fongique. Les gènes FKS 1 et 2, autrefois appelés GSC 1 et 2, sont très similaires. Les produits de leur synthèse sont intégrés dans la membrane et possèdent 16 domaines transmembranaires [205]. La délétion d'un seul gène fragilise le micro-organisme tandis que la délétion des 2 lui est létale.

La protéine FKS 1 est concentrée au niveau des sites de croissance du champignon.

- Une sous unité régulatrice Rho1p, activée par le GTP. La protéine Rho1 maintient l'intégrité de la cellule et régule l'activité de la  $\beta$ -glucane synthase. Elle est principalement localisée au niveau du pôle de la cellule où elle participe au processus de bourgeonnement. Rho1p est indispensable à la viabilité de la cellule, à sa croissance et aurait un rôle dans la colonisation et l'infection de différents organes [206].

En cas de mutation du gène Rho1, l'activité des échinocandines est très diminuée.



**Figure 11** : Représentation de la glucane synthase [202]

## 2. La chitine

La chitine est un composant quantitativement mineur de la paroi fongique, représentant 1 à 2 % du poids sec total de la paroi chez *Candida sp.* contre 10 à 20 % chez *Aspergillus sp.* C'est une molécule absente des cellules végétales et des animaux vertébrés.

Elle est formée par la chitine synthase, une enzyme intégrée dans la membrane qui catalyse le transfert de N-acétylglucosamine provenant de l'uridine diphosphate (UDP)-N-acétylglucosamine. Malgré sa plus faible représentation quantitative au niveau pariétal, c'est un composé d'homopolymères de molécules de N-acétylglucosamine reliés en  $\beta$ -(1,4)-cependant très important pour maintenir la structure en forme et les échanges osmotiques avec l'extérieur.

Selon les espèces, le nombre d'enzymes synthétisant la chitine varie.

Le modèle le plus étudié est celui de *Saccharomyces cerevisiae* qui possède 3 types de chitine synthase : CHS 1 à 3 [207].

- CHS3 est responsable de la synthèse de la majorité de la chitine de cette espèce. Son activité est augmentée en cas de stress.

- CHS2 forme les septa.

- CHS1 agit en réparant les parois lors des séparations cellulaires.

Ce sont des protéines de 100 à 130 kDa, transportées dans la membrane plasmique sous forme inactive [208].

Le nombre de gènes de chitine synthase varie selon les espèces de 1 à plus de 20, mais la quantité de chitine produite n'est pas proportionnelle à leur nombre [209].

Certains sont essentiels à la survie du micro-organisme, d'autres sont importants mais leur inactivation n'est pas fatale pour le champignon.

En dépit des similitudes génétiques, les gènes des différentes chitines synthases ont donc des rôles spécifiques et distincts au sein de chaque espèce.

La régulation de la chitine synthase semble complexe, faisant intervenir un contrôle passant par différents intermédiaires tels que PKC, HOG et la voie de la calcineurine [210].

### **3. Autres composés de la paroi**

Il est à noter que d'autres composés sont aussi inclus dans la paroi, notamment des protéines et des lipides.

La part des protéines dans la paroi d'un champignon représente 30 à 50 % du poids sec. Certaines ont un rôle dans le maintien de la structure, d'autres ont un rôle enzymatique. Les plus fréquemment retrouvées sont des glycoprotéines sur lesquelles sont fixées des chaînes oligosaccharidiques, dont la nature est variable.

On trouve ainsi deux sortes de protéines liées par des liaisons covalentes au noyau de base de la paroi :

- Les plus abondantes, les GPI protéines, liées aux  $\beta$ -1,6-glucanes via la GPI (glycophosphatidylinositol). Il en existe 115 classes différentes [211].
- Les Pir protéines (Proteins with internal repeats), liées directement aux glucanes [212]

Il existe également des protéines non liées par des liaisons covalentes, distribuées de manière hétérogène à la surface de la cellule.

Parmi les différentes enzymes retrouvées dans la structure fongique, on peut citer des glucanosyltransférases, des transglucosidases, des glucanases, des chitinases, des lipases, des estérases, des phosphatases. Toutes ont un rôle spécifique qui aide à l'homéostasie au sein de la cellule.

### **III. Présentation de l'étude – Contribution personnelle**

#### ***A. Contexte de l'étude***

La détection des BDG s'est imposée comme une alternative intéressante pour le diagnostic des MFI. Cependant certaines études récentes ont montré l'existence de faux positifs chez le patient de réanimation avec en particulier l'impact de la colonisation et l'existence d'interférences déjà identifiées par le fabricant [213, 214]. Compte tenu de ces données, nous avons voulu connaître la proportion de faux positifs sur une collection de sérums parvenus au laboratoire pour dosage de BDG. L'objectif du travail est de définir les limites et les indications de ce test en pratique clinique.

#### ***B. Patients, matériel et méthodes***

##### ***1. Type d'étude***

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée chez 95 patients d'octobre 2008 à février 2010 pour lesquels une demande de BDG a été réalisée au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Lille sur la base d'un avis d'un infectiologue.

##### ***2. Matériel et méthodes***

###### **a) Critères de sélection**

Les patients inclus correspondent à l'ensemble des sujets pour lesquels au moins un résultat de BDG dans la période octobre 2008 - février 2010 est supérieur à 120 pg/mL. Le seuil de 120 pg/mL a été préféré à celui de 80 pg/mL préconisé par le fabricant afin de s'affranchir des valeurs borderline et de sélectionner une population ayant normalement une élévation assez franche et significative de la glucanémie circulante. En effet, certaines études montrent que des valeurs à la limite de la normale peuvent être observées chez des patients cancéreux ou en séjour en soins intensifs, du fait des infections intercurrentes et des nombreux soins apportés [215, 216].

Notre étude a concerné 95 patients et 98 épisodes de glucanémie positive puisque deux patients ont présenté distinctement une aspergillose et une candidose à quelques semaines ou mois d'intervalle et un patient a développé simultanément les deux pathologies.

Parmi l'ensemble des sujets de l'étude, 85 étaient hospitalisés au CHRU de Lille alors que 10 demandes émanaient de laboratoires extérieurs faisant partie d'hôpitaux généraux ou de CHU.

Les caractéristiques cliniques et démographiques de ces patients sont présentées dans le tableau 3 :

**Tableau 3 : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude**

<b>N° patient</b>	<b>Age</b>	<b>Catégorie de service</b>	<b>Pathologie sous jacente</b>
7	51	Maladies du sang	AREB greffée
9	72	Maladies du sang	LAM
14	64	Maladies du sang	LAM
16	35	Maladies du sang	LAL Burkitt
19	52	Maladies du sang	LAM greffée
27	53	Maladies du sang	LAM
33	51	Maladies du sang	Lymphome greffé
36	34	Maladies du sang	LAM
41	20	Maladies du sang	LAM
47	72	Maladies du sang	Syndrome de Richter
48	25	Maladies du sang	Aplasie médullaire réfractaire greffée
53	60	Maladies du sang	LAM
56	67	Maladies du sang	LAM
62	63	Maladies du sang	LAM / cellulite du membre droit / API 1 an avant
65	31	Maladies du sang	LAM
67	34	Maladies du sang	SMD greffé / GVH pulmonaire
80	52	Maladies du sang	AREB1
81	57	Maladies du sang	LAM
84	55	Maladies du sang	Leucémie à cellules dendritiques greffée
85	62	Maladies du sang	LA greffée
86	46	Maladies du sang	LMC acutisée d'emblée en LALB Appendicite, hernie étranglée et péritonite
88	67	Maladies du sang	LAM greffée
90	50	Maladies du sang	SMD greffé
94	46	Maladies du sang	LAM
2	42	Maladies du sang / Réanimation	LNH greffée
20	53	Maladies du sang / Réanimation	Lymphome acutisé en LAM greffé
26	70	Maladies du sang / Réanimation	LAM / Crohn
60	69	Maladies du sang / Infectiologie	LLC acutisée en LAM
70	45	Maladies du sang / Réanimation	Aplasie médullaire idiopathique greffée
89	81	Maladies du sang / Infectiologie	Myélome
63	39	Maladies du sang / Maladie de l'appareil digestif	Maladie de Crohn
10	72	Infectiologie	Poumon pathologique
21	41	Infectiologie	Maladie de Wegener
31	72	Infectiologie	Emphysème / Abestose
32	63	Infectiologie	PAR traitée par MTX
37	33	Infectiologie	Toxicomanie / Ulcère chronique de jambe
49	70	Infectiologie	LLC traitée
51	86	Infectiologie	PTAI traité par Mabthera
71	72	Infectiologie	LLC
77	41	Infectiologie	Transplantation cardiaque
91	38	Infectiologie	Toxicomanie
6	5	Réanimation	Déficit immunitaire héréditaire
12	60	Réanimation	méningiome
13	53	Réanimation	PAR traitée par MTX
17	74	Réanimation	Ischémie mésentérique IRC dialysée
23	62	Réanimation	Carcinome du rein gauche

<b>N° patient</b>	<b>Age</b>	<b>Catégorie de service</b>	<b>Pathologie sous jacente</b>
25	74	Réanimation	Dysplasie artérielle / double pontage aorto-coronarien
34	70	Réanimation	Cardiopathie ischémique
40	71	Réanimation	Carcinome pulmonaire (post exposition à l'amiante) Cirrhose du foie
50	51	Réanimation	Tuberculose pulmonaire
55	72	Réanimation	Cardiopathie ischémique Intoxication sévère à la metformine
61	76	Réanimation	Valvulopathie aortique prothésée
64	56	Réanimation	Choc septique avec défaillance multi-viscérale
68	32	Réanimation	Choc septique / splénectomie
74	64	Réanimation	IRC dialysée
76	74	Réanimation	Cancer du sein gauche / Cholécystite chronique
83	77	Réanimation	Immunodépression secondaire à une corticothérapie prolongée sur méningiome frontal gauche
87	69	Réanimation	Carcinome pulmonaire (post exposition à l'amiante)
92	74	Réanimation	Corticothérapie au long cours (dermatopolymyosite)
11	66	Cardiologie	cardiomyopathie ischémique sévère post IDM
35	61	Cardiologie	Mésothéliome malin de la plèvre droite (post exposition à l'amiante)
42	34	Cardiologie	Transplantation cardiaque
58	87	Cardiologie	Valve aortique
75	75	Cardiologie	Cardiopathie ischémique sévère
79	33	Cardiologie	résection de membrane sous-valvulaire aortique
44	44	Cardiologie / Réanimation / Hôpitaux extérieurs	Greffe cardiaque sur cardiomyopathie ischémique sévère
59	45	Cardiologie / Infectiologie	Greffé cardiaque sur cardiomyopathie ischémique
1	47	Maladie de l'appareil digestif	Cirrhose terminale pré-greffe
4	85	Maladie de l'appareil digestif	Cirrhose greffée
18	50	Maladie de l'appareil digestif	Colite ischémique sévère
22	48	Maladie de l'appareil digestif	Cirrhose du foie greffé
28	46	Maladie de l'appareil digestif	AREB acutisée en LAM / Maladie de Crohn
29	61	Maladie de l'appareil digestif	Cirrhose
30	57	Maladie de l'appareil digestif	Cirrhose greffée / Hepatite C
38	24	Maladie de l'appareil digestif	Maladie de Crohn perforante / Iléostomie
39	56	Maladie de l'appareil digestif	Anévrisme de l'artère mésentérique / Sigmoidectomie
43	47	Maladie de l'appareil digestif	Varices oesophagiennes / Cirrhose prégreffe
45	61	Maladie de l'appareil digestif	Péritonite perforée opérée le 29/10/09
54	66	Maladie de l'appareil digestif	Cirrhose greffée
66	59	Maladie de l'appareil digestif	Cirrhose pré-greffe
69	59	Maladie de l'appareil digestif	Greffe de rein Rupture d'anévrisme abdominal Coloproctectomie totale, iléostomie Fistule grelocutanée
82	77	Maladie de l'appareil digestif	Colectomie sur tumeur du colon Perforation colique

N° patient	Age	Catégorie de service	Pathologie sous jacente
95	53	Maladie de l'appareil digestif	Cancer du rein et du foie
73	60	Chirurgie	Abcès hépatique greffé
24	41	Autre (Médecine interne)	Syndrome de Sjögren Scléromyosite avec fibrose pulmonaire
78	61	Autre (Endocrinologie)	
3	44	Hôpitaux extérieurs	
5		Hôpitaux extérieurs	LAM
8	53	Hôpitaux extérieurs	LAL
15	4	Hôpitaux extérieurs	
46	43	Hôpitaux extérieurs	
52	65	Hôpitaux extérieurs	
57	58	Hôpitaux extérieurs	VIH
72	44	Hôpitaux extérieurs	VIH
93	51	Hôpitaux extérieurs	Lymphome

### b) Méthodes de recueil

Une fois recueillis les identités des malades présentant une valeur de BDG supérieurs à 120 pg/mL, leur âge et le service dans lequel ils ont été hospitalisés, un tableau récapitulatif a été créé dans le but de recueillir différentes informations utiles pour documenter le niveau de certitude d'une MFI.

Ces données ont été recherchées pour la partie biologique dans le système de gestion informatique du laboratoire (Molis<sup>®</sup>), et pour la partie clinique incluant les comptes rendus d'imagerie au moyen des logiciels dédiés au sein du CHRU (Otalía<sup>®</sup> et Sillage<sup>®</sup>), en accord avec les cliniciens.

Il a ainsi été extrait pour la biologie les dates et types de prélèvements mycologiques et bactériologiques effectués, des données concernant l'hémolyse / la lipémie / l'ictère du prélèvement ainsi que la valeur de CRP.

Les renseignements concernant les patients extérieurs au CHRU de Lille ont été collectés par le bon de demande de l'analyse et par données téléphoniques ou par fax grâce à la mise en relation avec les biologistes demandeurs.

De plus les données relatives aux traitements antifongiques reçus par les patients ont été extraites du logiciel de la pharmacie grâce à l'aide du Dr Angélique Leroy-Cotteau, responsable de ce secteur.

Par ailleurs, afin d'évaluer la variation du taux de BDG dans le temps, différents sérums ont été recueillis dans la limite du possible au sein de la sérothèque des laboratoires de Virologie et de Parasitologie-Mycologie dans le but d'établir la cinétique de circulation sérique de ce polysaccharide.

Au total, un ensemble de 389 dosages a ainsi pu être analysé dans ce travail dont 40 cinétiques composées d'au moins 4 sérums par patient.

### c) Méthodes de classification

La classification des épisodes infectieux en candidémies ou en aspergilloses invasives est basée notamment sur les définitions revues en 2008 de l'European Organization for Research and Treatment of Cancer / Invasive Fungal Infections Cooperative Group et du National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) [217]. Le comité de révision de l'EORTC révisé les définitions dans le but de standardiser les inclusions des patients inclus dans les études cliniques.

Selon leur niveau de probabilité, les MFI sont étiquetées en infections prouvées, probables ou possibles. En règle générale, les infections sont dites prouvées lorsque la culture d'un site réputé stérile mettra en évidence un micromycète et que la clinique et/ou l'imagerie plaidera en faveur de ce diagnostic. La distinction entre les infections probables et possibles se fera par l'absence de preuves mycologiques (culture d'un site ouvert, présence d'anticorps et d'antigènes spécifiques) dans le cas des infections possibles. Un facteur de susceptibilité de l'hôte ainsi que des signes cliniques en faveur sont exigés pour ces deux dernières formes.

En pratique clinique, cette classification ne doit cependant pas être utilisée comme une règle absolue et stricte pour poser ou exclure un diagnostic de MFI. En effet, elle présente certaines limites, comme notamment la non prise en compte des particularités liées à l'état d'immunodépression ou des patients hospitalisés en soins intensifs [218].

En résumé,

- les aspergilloses invasives sont dites prouvées si :
  - o A l'examen direct d'une aspiration bronchique ou d'une biopsie respiratoire on observe des filaments ainsi que d'éventuels dommages tissulaires
  - o Et/ou que la culture d'un prélèvement provenant d'un site réputé stérile, hors LBA, urine ou liquide crânien, aboutit à la pousse d'*Aspergillus sp.*, et que la clinique et/ou l'imagerie est en faveur de ce diagnostic
- les candidémies sont dites prouvées lorsqu'une hémoculture est positive à *Candida sp.* et/ou des levures du genre *Candida* ont été mises en évidence à l'examen direct ou en culture à partir d'un prélèvement issu d'un site normalement stérile et que les signes cliniques ou radiologiques sont en faveur d'une infection.

Les MFI sont classées dans la catégorie probable sur la base d'au moins une proposition vérifiée dans chacun des trois critères mentionnés dans le tableau 4 :

Facteurs liés à l'hôte	Facteurs cliniques	Facteurs mycologiques
<b>Neutropénie récente</b> (<500 PNN/mm <sup>3</sup> durant plus de 10 jours)	<b>Infection respiratoire basse</b> avec à l'imagerie soit une condensation, soit un signe du croissant soit une cavité pulmonaire	<b>Diagnostic direct</b> (examen direct caractéristique, cytologie, culture positive de sites potentiellement colonisés)
<b>Greffe</b> de moelle osseuse ou d'organe solide	<b>Trachéobronchite</b>	<b>Diagnostic indirect</b> (galactomannanes, BDG)
<b>Traitement immunosuppresseur à long terme</b> (glucocorticoïdes à haute dose pendant plus de 3 semaines ou traitement immunosuppresseur autre dans les 3 mois)	<b>Infection sinusale</b>	
<b>Déficit immunitaire congénital sévère</b>	<b>Candidose disséminée</b> (présence radiologique de multiples petits abcès au niveau de la rate et/ou du foie ou images typiques d'infection fongique lors de l'examen de la rétine au fond d'œil)	

**Tableau 4 :** Critères de classification des épisodes infectieux selon l'EORTC-MSG

La présence de facteur de susceptibilité et de critère clinique ou radiologique sans preuve mycologique fera classer l'infection dans la catégorie possible. Dans notre étude, le critère de sélection des patients sur un test mycologique exclu la possibilité d'avoir des patients avec une MFI catégorisée « possible ».

#### **d) Logiciels informatiques utilisés**

Dans le but de rassembler les données et de créer les graphiques les exploitant, plusieurs outils informatiques sont été utilisés : les logiciels Word, Excel, Medcalc et Sigmaplot.

### 3. Le test Fungitell®

#### a) Principe

Le test Fungitell® contient un extrait de cellules de limule (lysât d'amœbocytes de *Limulus polyphemus*) permettant le déroulement d'une cascade de coagulation servant au dosage quantitatif de BDG.

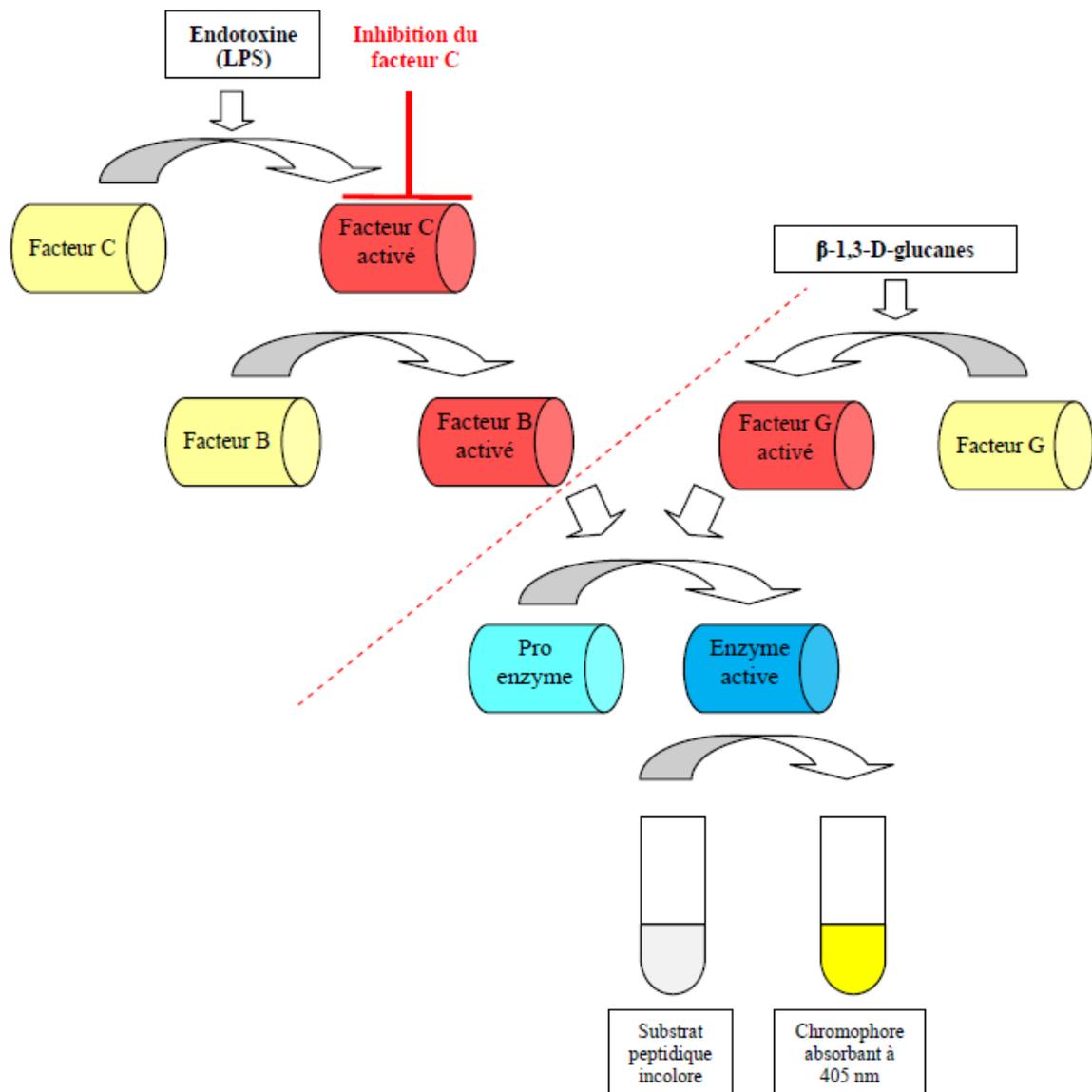


Figure 12 : Principe du test Fungitell®

Deux voies sont possibles pour activer l'enzyme de procoagulation, l'une par l'intermédiaire du facteur G activé par les BDG, l'autre via le facteur C activé par le lipopolysaccharide bactérien (LPS).

La voie dépendante du LPS est rendue inactive par l'inhibition du facteur C présent dans le lysat fourni afin d'éviter les réactions faussement positives dues à la présence de bactéries à gram négatif.

L'enzyme de coagulation activée peut alors agir sur un substrat chromogénique qui induit la libération de para-nitroaniline dont la concentration est mesurée par colorimétrie à la longueur d'onde de 405 nm.

Le taux de BDG n'augmente pas ou peu lors d'infections invasives à zygomycètes ou à cryptocoque [95, 219]

Fungitell<sup>®</sup> est commercialisé par CapeCod aux Etats-Unis depuis 2004.

Cependant d'autres kits sont disponibles et utilisés dans certains pays, notamment au Japon : le test Wako<sup>®</sup>, le Fungitec G test MK<sup>®</sup> et le test Muraka<sup>®</sup>. Les résultats obtenus sont différents, possiblement du fait de l'utilisation de divers standards, des méthodes de traitement de l'échantillon qui varient ainsi que l'extrait de cellules activant la cascade de coagulation de natures différentes. D'après une étude japonaise, la meilleure sensibilité est obtenue avec le Fungitell<sup>®</sup>. Cependant une meilleure spécificité a été observée pour les tests Wako<sup>®</sup> et Maruka<sup>®</sup> [220].

## **b) Mode opératoire**

Le test a été réalisé conformément aux recommandations du fabricant.

Tous les échantillons ont été analysés en duplicate, et chaque test nécessite 5 µL de sérum.

Pour chaque série, une gamme étalon variant de 6,25 à 100 pg/mL est réalisée, ce qui permet d'obtenir des valeurs standards de 31 à 500 pg/mL. En effet, les échantillons, contrairement aux standards de la gamme étalon, sont dilués au 1/5<sup>e</sup> dans une solution de potasse (KOH + NaCl).

Une incubation de 10 minutes à 37°C est alors nécessaire, à la fin de laquelle 100 µL de lysat de limule est ajouté dans chaque puits pour permettre la réaction.

Une lecture de la densité optique à 405 nm est réalisée de manière cinétique pendant 40 minutes.

Chaque série comporte un témoin négatif.

## **c) Modalités d'interprétation préconisées par le fabricant**

### **(1) Faux positifs**

Le fabricant mentionne, dans son mode opératoire, différentes causes possibles de réactions faussement positives. Certaines de ces interférences (hémolyse, lipémie, bilirubine) ont été confirmées par des observations en laboratoire et étayées par le dossier clinique des patients.

Tout d'abord, les BDG étant ubiquitaires, il ne faut pas négliger la contamination possible de l'environnement, notamment lors de la réalisation de l'examen, de la décantation et l'aliquotage des tubes primaires, mais aussi la qualité des consommables utilisés. Ces derniers doivent être certifiés dépourvus de glucanes (« glucan free ») [221].

De même, les patients qui ont régulièrement une hémodialyse sur membrane de cellulose présentent un taux non négligeable de BDG sans rapport avec une infection fongique invasive concomitante [222]. Ces réactions croisées peuvent être liées à la présence de nombreux résidus glucose (liés en  $\beta$ -1,4) qui constituent ces membranes.

On note une autre source d'interférence potentielle durant les 3 jours qui suivent une chirurgie, puisque les gazes utilisées contiennent une quantité importante de BDG dans leur composition et peuvent donc être relargués dans le sang lors du geste opératoire.

Il en est de même pour le lentinane et le schizophyllane, deux traitements immunomodulateurs, qui ont été rapportés comme source de faux positif [223, 224].

Les immunoglobulines intraveineuses ou encore l'albumine peuvent être obtenues par filtration et l'interférence peut en partie s'expliquer en supposant qu'une partie des BDG présents dans les filtres utilisés passent dans le filtrat médicamenteux.

La part des infections bactériennes dans la proportion des faux positifs reste controversée. Certains auteurs ont montré que la voie du lipopolysaccharide bactérien était bien inhibée, alors que d'autres travaux mettent en avant une interférence possible par activation résiduelle du facteur C [225].

### **(2) Limites du test**

Les zygomycètes (*Absidia spp.*, *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*) ainsi que les champignons du genre *Cryptococcus* n'entraînent pas ou peu d'augmentation des BDG circulants [219, 222]. L'hypothèse la plus probable est que la paroi de ces champignons soit pauvre en BDG. Il apparaît donc nécessaire de faire appel à d'autres stratégies diagnostiques (culture, biologie moléculaire, histologie) pour documenter ce type d'infection.

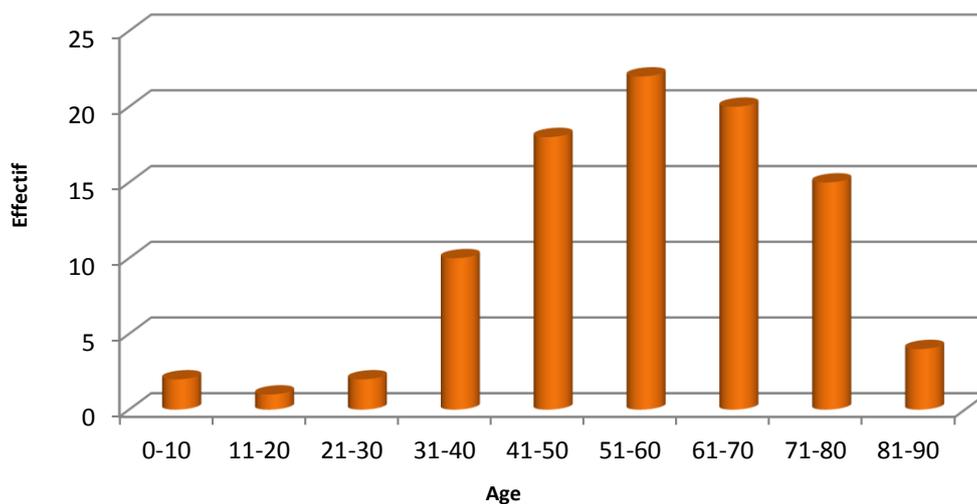
## C. Résultats

### 1. Caractéristiques de la population étudiée

Durant la période octobre 2008 – février 2010, 95 patients ont été sélectionnés sur la base de résultats positifs de BDG, avec une étendue d'âge de 4 à 87 ans (moyenne : 55 ans); 36 % de femmes et 64 % d'hommes (soit un sex-ratio de 1,8).

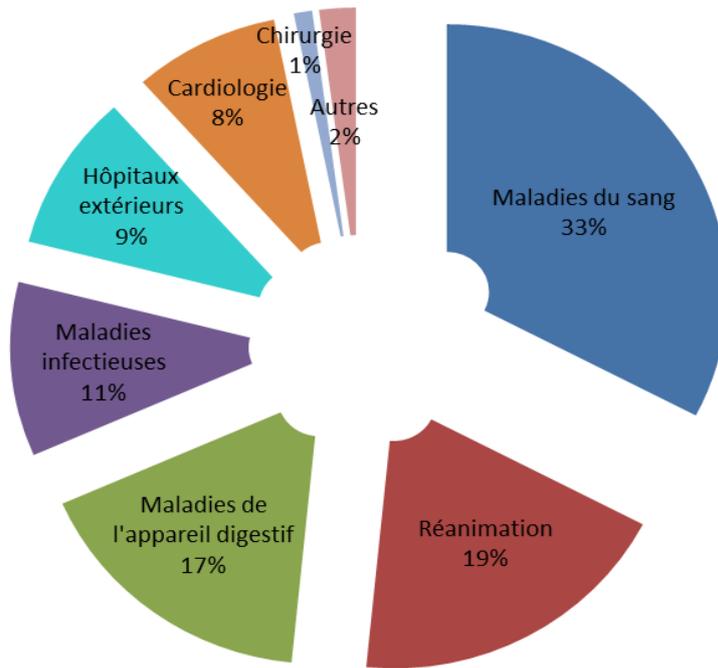
Pour ces patients, un certain nombre de prélèvements sériques ont été collectés en supplément des demandes émanant des services, à la fois dans la sérothèque de Parasitologie-Mycologie et de Virologie, soit un total de 389 sérums.

Le tableau en annexe 3 regroupe l'ensemble des dosages effectués pour chacun des patients inclus dans l'étude ainsi que la nature et le niveau de preuve de l'infection, ces dernières informations étant rassemblées et étudiées dans les paragraphes ci-après.



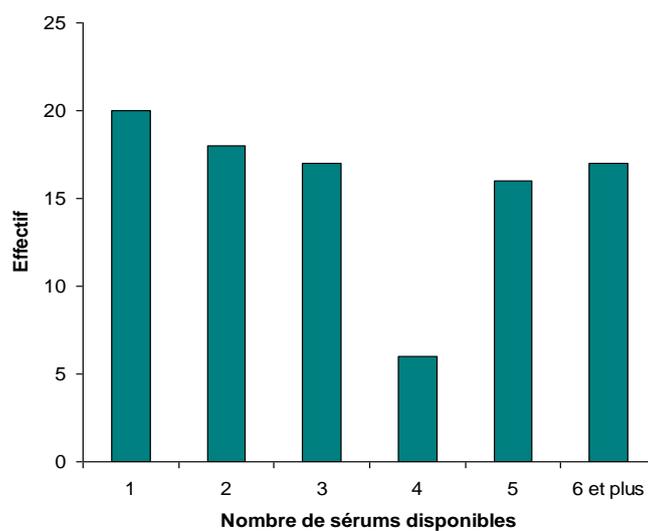
**Figure 13** : Répartition des patients par tranches d'âge

Des personnes de tout âge sont susceptibles d'être touchées par une MFI. Cependant notre population comporte essentiellement des personnes d'âge adulte (figure 13). Les patients présentent les facteurs de risque décrits dans la littérature : neutropénie, greffe, antibiothérapie à large spectre, chirurgie.



**Figure 14** : Répartition des services prescripteurs

Les services d'onco-hématologie et de réanimation représentent environ 50 % des prescriptions (figure 14). Les unités d'où est issue l'autre moitié des demandes émanent majoritairement des services de gastro-entérologie et des maladies infectieuses.



**Figure 15** : Répartition des patients selon le nombre de sérums disponibles

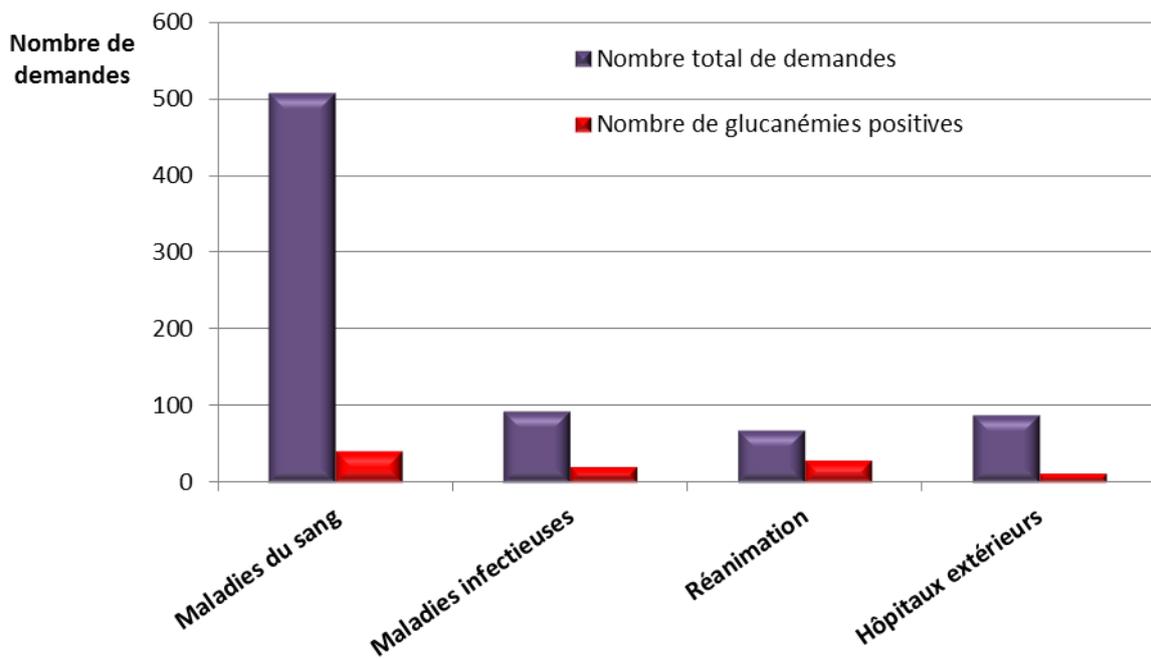
La figure 15 représente la répartition des patients de l'étude en fonction du nombre total de sérums ayant pu être récolté soit par demande directe du service soit dans les différentes sérothèques du laboratoire.

Ce nombre varie en général de un seul sérum (dans plus de 20 % des cas) à 5 sérums dosés (81 % des patients pour lesquels nous disposons de 1 à 5 valeurs de BDG), mais pour certains sujets l'étude cinétique a pu être menée à long terme puisque l'on a récolté jusqu'à 19 valeurs de suivi du paramètre.

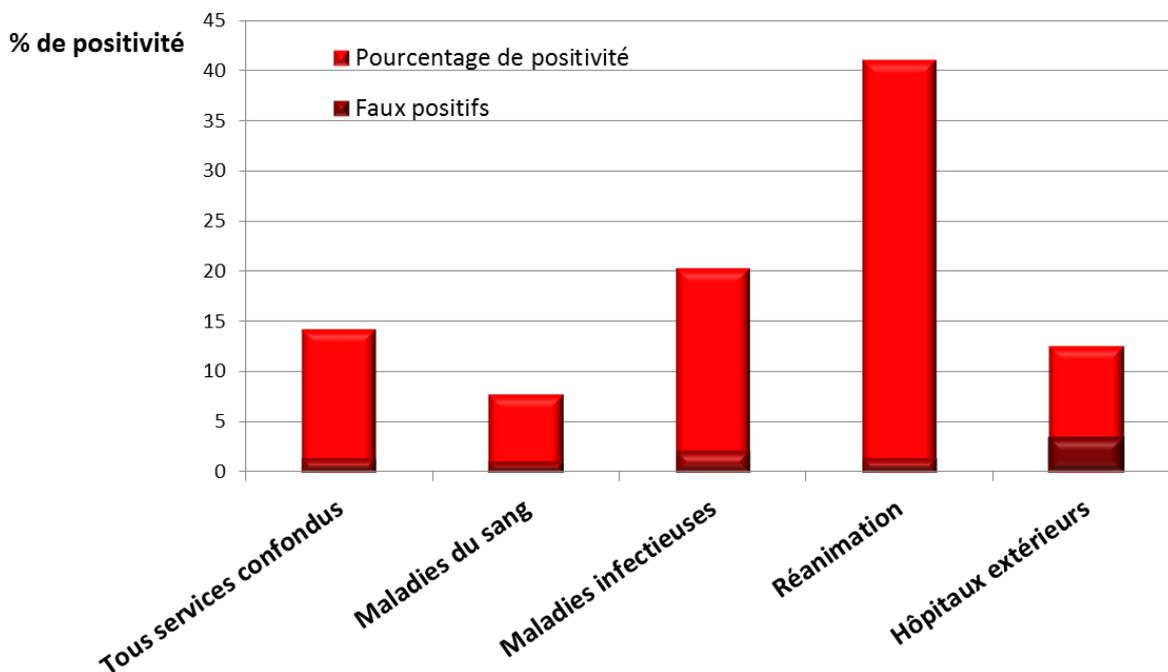
## **2. Place des valeurs positives parmi l'ensemble des demandes de dosage de BDG**

	Nombre total de demandes	Nombre de glucanémies positives	Positivité (%)	Faux positifs : glucanémie isolée et aucune preuve mycologique	Faux positifs / nombre total (%)	Faux positifs / positifs (%)
<b>Tous services confondus</b>	<b>912</b>	<b>131</b>	<b>14,4</b>	<b>13</b>	<b>1,4</b>	<b>9,9</b>
<b>Maladies du sang</b>	<b>509</b>	<b>40</b>	<b>7,9</b>	<b>6</b>	<b>1,2</b>	<b>15,0</b>
<b>Réanimation</b>	<b>68</b>	<b>28</b>	<b>41,2</b>	<b>1</b>	<b>1,5</b>	<b>3,6</b>
<b>Maladies infectieuses</b>	<b>93</b>	<b>19</b>	<b>20,4</b>	<b>2</b>	<b>2,2</b>	<b>10,5</b>
<b>Hôpitaux extérieurs</b>	<b>87</b>	<b>11</b>	<b>12,6</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

**Tableau 5** : Statistiques générales concernant le nombre de demandes totales et les glucanémies positives pour les principaux services demandeurs



**Graphique A**



**Graphique B**

**Figure 16 :** **Graphique A :** Nombre de demandes totales et positives demandées par service durant la période d'étude

**Graphique B :** Proportion de tests BDG positifs par rapport au nombre total de prescriptions par service durant la période d'étude.

Le test étant nouvellement mis en place lors de notre période d'étude, ces statistiques concernant le pourcentage de positivité sont biaisées par le fait que les demandes ne sont pas systématiques de la part des services mais reposent d'emblée sur un faisceau d'arguments cliniques et radiologiques ainsi que sur l'avis d'un infectiologue. Ceci explique la forte proportion de sérums retrouvés présentant un seuil supérieur à 120 pg/mL.

De plus, pour élaborer les graphiques A et B, nous nous sommes basés uniquement sur les valeurs obtenues suite à une demande explicite de dosage du service (les valeurs complémentaires obtenues à partir des sérothèques n'ont pas été incluses) et avec le seuil défini initialement comme critère d'inclusion de patients, c'est-à-dire 120 pg/mL au lieu de 80 pg/mL préconisé par le fabricant.

Ces graphiques reflètent le nombre important de demandes provenant du service d'hématologie clinique (plus de 500 demandes sur les 17 mois de recueil), chacun des 3 autres groupes prescripteurs majeurs, représentés par les maladies infectieuses, la réanimation et les hôpitaux extérieurs, ayant demandé durant cette même période moins d'une centaine de dosages (tableau 5).

On peut également noter l'importante proportion de sérums issus des services de réanimation présentant un dosage de BDG supérieur au seuil (41,2 %), la moyenne pour l'ensemble des demandes étant de 14,4 % (figure 16).

Il est à remarquer que le pourcentage de faux positifs, assez faible, avec en moyenne 1,4 % de l'ensemble des demandes et près de 10 % des résultats positifs, est là encore variable selon les services. Il fluctue de 3,6 % pour la réanimation à 15 % pour les demandes d'hématologie clinique (figure 16).

Pour les hôpitaux extérieurs, l'investigation n'a pas permis de documenter le niveau de certitude des MFI pour l'ensemble des épisodes et les calculs concernant la proportion de sérums faussement positifs n'ont donc pas été effectués.

### **3. Classification des MFI**

La classification des épisodes infectieux en catégorie prouvée ou probable s'est faite selon les critères décrits dans la section Matériel et Méthodes (classification de l'EORTC 2008).

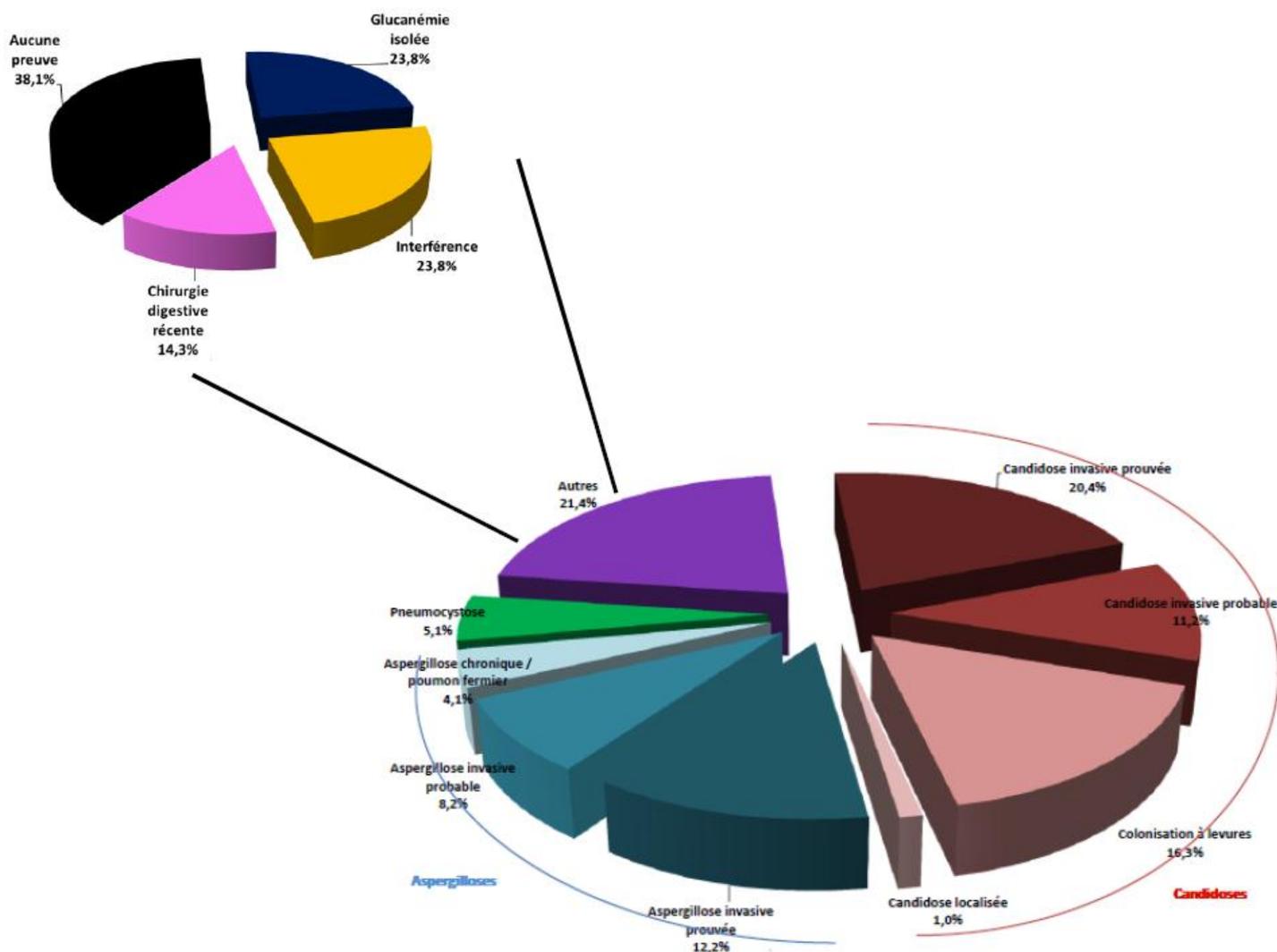
En plus des candidoses, aspergilloses et pneumocystoses prouvées et probables, nous avons identifié deux formes particulières de candidoses : la candidose localisée (candidose muqueuse superficielle) et la colonisation à levures lorsque nous n'avions pas suffisamment d'arguments pour l'étiqueter en candidose probable.

Quatre catégories cliniques ou biologiques ont été également identifiées : glucanémie isolée (cinétique montrant un BDG positif de manière isolée), interférence (source de

réactions faussement positives mentionnées dans la notice du fabricant), patient ayant bénéficié d'une chirurgie digestive récente sans preuve de MFI, ainsi que les épisodes fébriles sans étiologie infectieuse documentée.

<b>Effectif de patient par catégorie</b>	
<b>Candidose invasive prouvée</b>	<b>20</b>
<b>Candidose invasive probable</b>	<b>11</b>
<b>Colonisation à levures</b>	<b>16</b>
<b>Candidose localisée</b>	<b>1</b>
<b>Aspergillose invasive prouvée</b>	<b>12</b>
<b>Aspergillose invasive probable</b>	<b>8</b>
<b>Aspergillose chronique / poumon fermier</b>	<b>4</b>
<b>Pneumocystose</b>	<b>5</b>
<b>Glucanémie isolée</b>	<b>5</b>
<b>Interférence</b>	<b>5</b>
<b>Chirurgie digestive récente</b>	<b>3</b>
<b>Aucune preuve</b>	<b>8</b>

**Tableau 6** : Répartition du nombre de patients selon la nature de l'infection et le niveau de preuve



**Figure 17** : Répartition des patients selon la nature de l'infection et le niveau de preuve de MFI

Les patients classés dans une des trois catégories principales de maladies dues à un champignon représentent près de 80 % de l'ensemble des patients.

La candidose reste la pathologie la plus fréquente avec un épisode retrouvé chez près de 50 % des sujets de l'étude (48 sur 98). L'aspergilliose se situe en deuxième position avec une proportion de 25 % de l'ensemble des pathologies (24 sur 98). La pneumocystose, d'incidence beaucoup plus rare, a été diagnostiquée chez 5 patients dans notre cohorte.

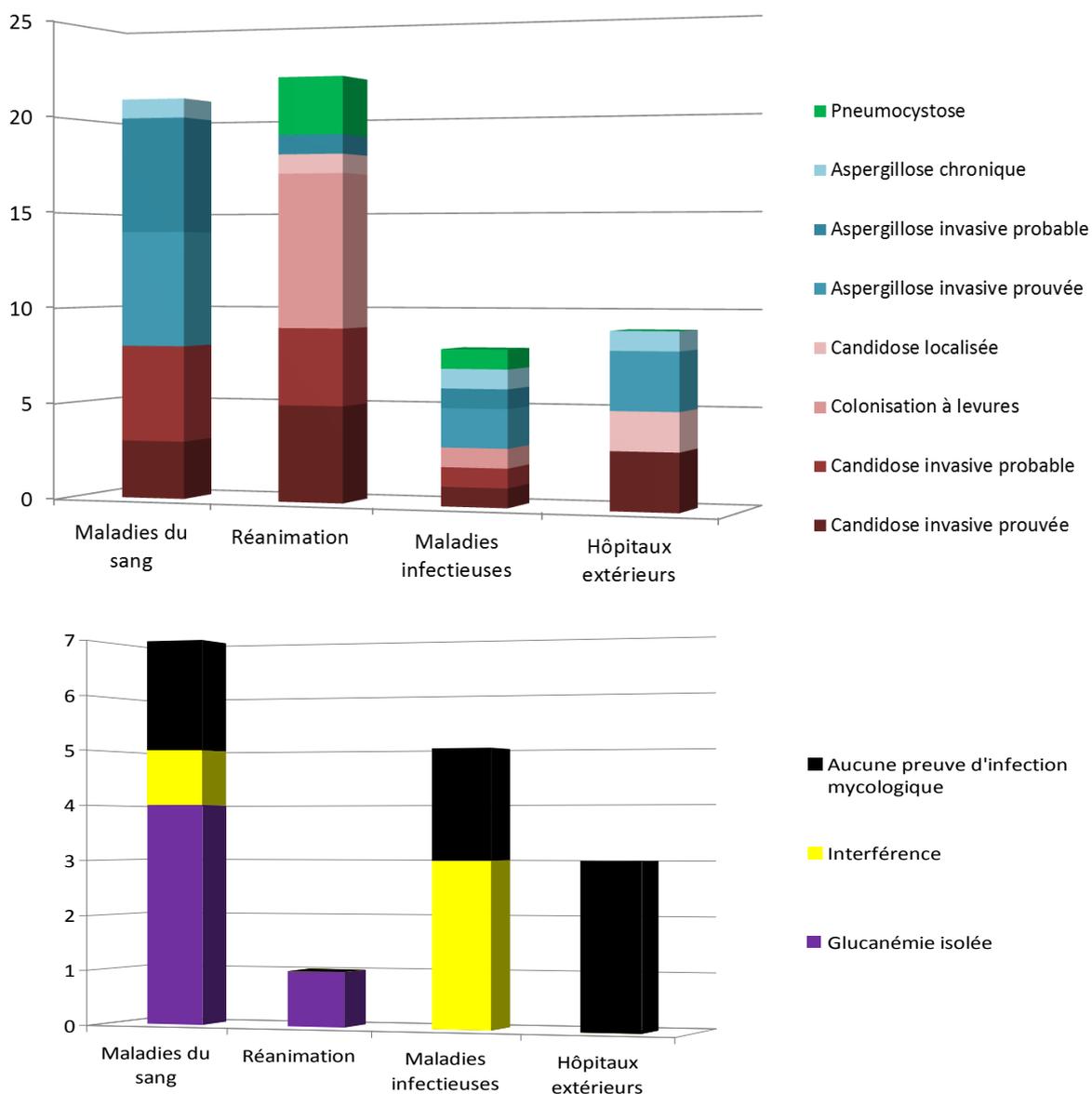
Un peu plus de 21 % (21 épisodes sur 98) ne sont pas attribuables à une pathologie fongique.

Parmi ces 21 cas, on en trouve 5 pour lesquels une interférence connue a été retrouvée, 3 ayant eu une intervention chirurgicale impliquant le tube digestif dans les heures précédant le dosage et chez qui un relargage ou une translocation des levures de la lumière intestinale vers le sang périphérique est possible, 5 cas particuliers pour lesquels une

glucanémie positive a été retrouvée de manière isolée pendant toute la durée du suivi, ainsi qu'un patient qui a présenté une pneumocystose prouvée 18 mois avant le dosage.

Les dossiers médicaux des patients pour lesquels aucune donnée mycologique ou interférence connue n'avait été initialement retrouvée ont été plus particulièrement investigués, notamment via la consultation du dossier papier, afin de recueillir des informations qui ne seraient pas disponibles sur les serveurs informatiques. Cette action a permis de trouver des informations importantes pour certains patients mais 8 épisodes de glucanémies restent inexplicés, tant au niveau mycologique que bactériologique ainsi que vis-à-vis des interférences connues.

Un total de 13 épisodes sur 98, parmi lesquels 5 ont une valeur de glucanémie positive isolée et 8 ne présentent aucun des facteurs reconnus comme faisant potentiellement élever la glucanémie (dont 1 ayant développé une pneumocystose 18 mois auparavant), est donc étiqueté comme « faux positifs ».



**Figure 18 : Pathologies par service**

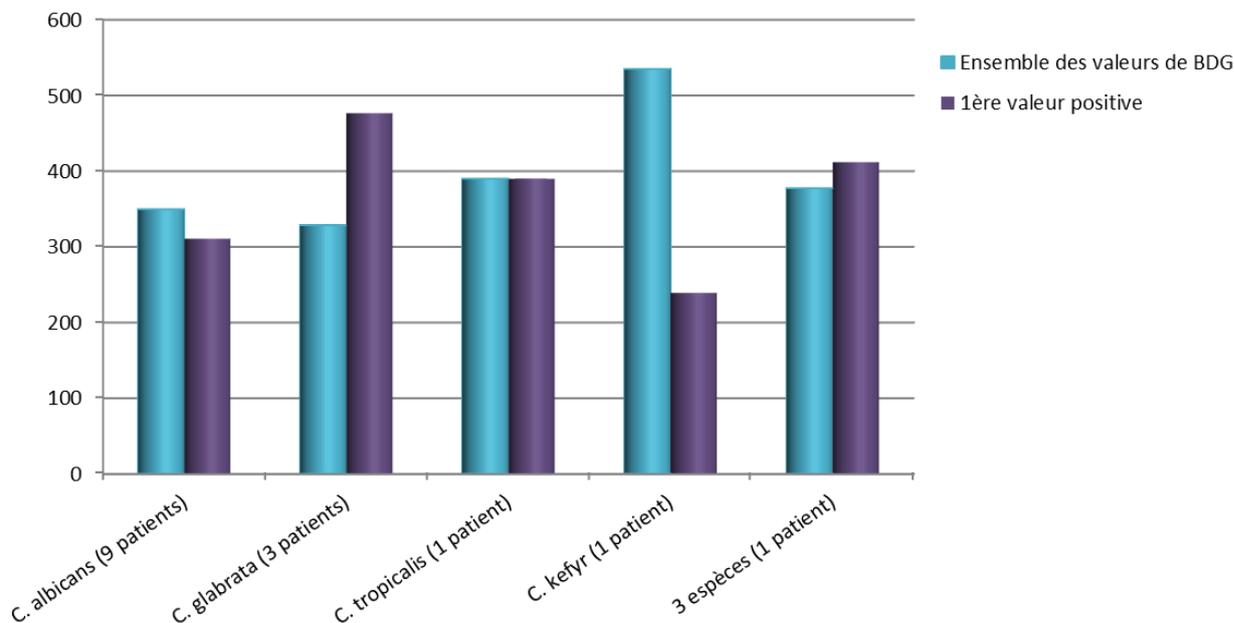
Selon les services cliniques, les pathologies n'ont pas la même répartition.

Ainsi, en réanimation, les 2 MFI principalement retrouvées sont les candidémies et les pneumocystoses alors qu'au niveau des services d'onco-hématologie on observe une grande proportion d'aspergilloses invasives.

On note l'absence de cas de pneumocystoses au sein de notre cohorte dans les services d'hématologie clinique.

On peut également remarquer l'importance du nombre de patients présentant une colonisation à *Candida sp.* au niveau du département de réanimation alors qu'ils sont inexistant dans l'effectif d'hématologie clinique.

Candidoses et aspergilloses se retrouvent en proportions équivalentes au sein des services de Maladies Infectieuses ou des demandes externes au CHRU.



**Figure 19 :** Glucanémies selon l'espèce de levure responsable de la candidémie

Nous avons voulu étudier l'impact éventuel de l'espèce en cause lors de candidémie sur la valeur de BDG. Les moyennes de l'ensemble des glucanémies mesurées ainsi que la moyenne de la première valeur supérieure au seuil défini (ce qui permet de s'affranchir de l'influence d'un traitement antifongique mis en place) pour chaque espèce responsable sont indiquées sur la figure 19.

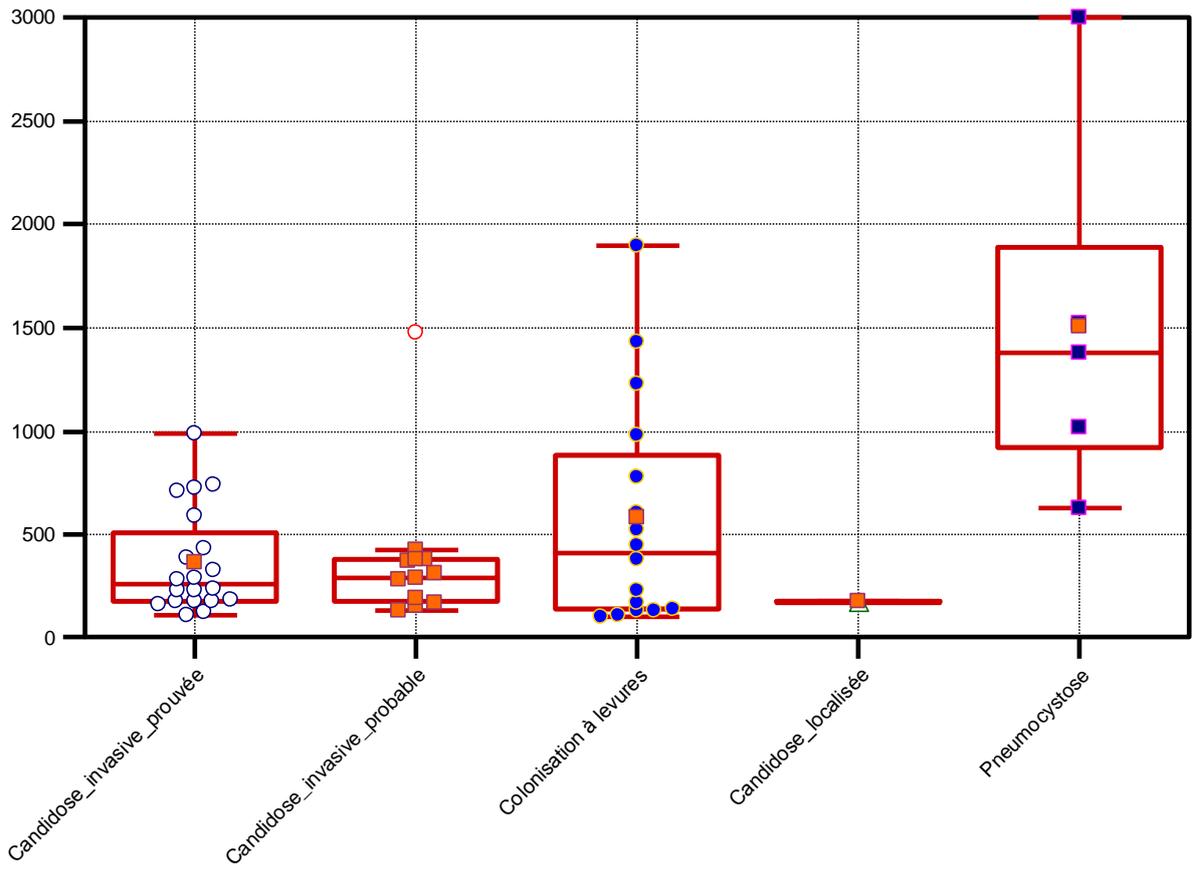
Les effectifs sont trop peu nombreux pour effectuer des statistiques significatives. On remarque cependant que les valeurs obtenues ne diffèrent que peu d'une espèce à l'autre et que *C. albicans* reste l'espèce majoritairement responsable des candidémies (9 patients sur les 15 pour lesquels l'espèce a été identifiée).

#### 4. Diagrammes de Tukey

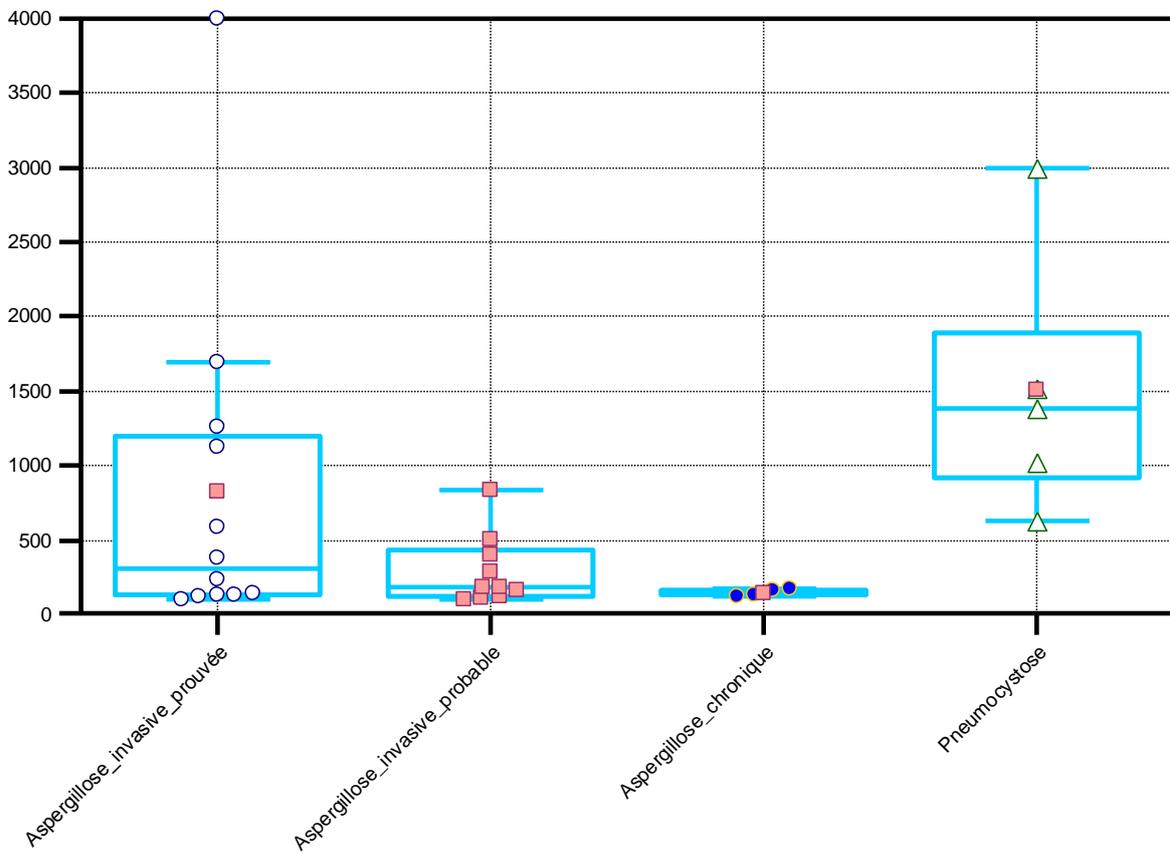
Les trois graphiques présentés sur la figure 20 représentent différentes données statistiques calculées pour les 12 catégories définies précédemment.

Ils ont été symbolisés sous forme de « diagramme en boîte » ou diagramme de Tukey ou encore plus familièrement dénommé « boîte à moustaches ».

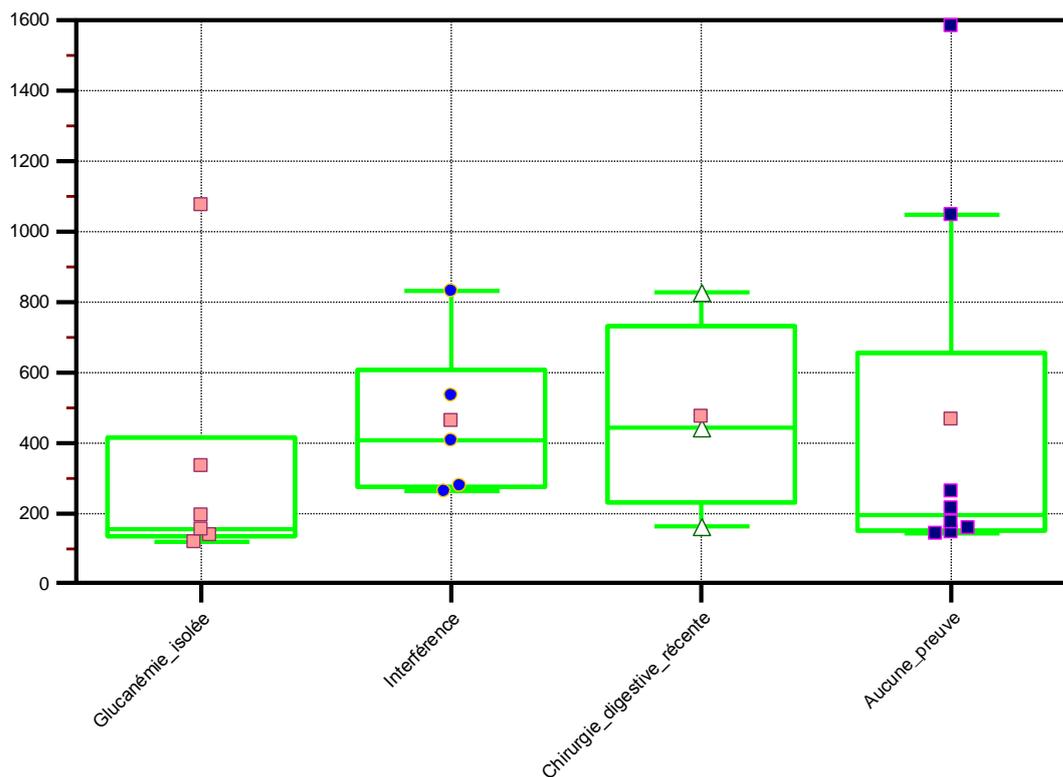
Les valeurs représentées sont, du bas vers le haut, la valeur minimale, le 1<sup>er</sup> décile, le 1<sup>er</sup> quartile, la médiane et la moyenne, le 3<sup>e</sup> quartile, le 9<sup>e</sup> décile et la valeur maximale. Les valeurs non comprises entre les 1<sup>er</sup> et 9<sup>e</sup> décile sont souvent qualifiées d'aberrantes.



Graphique A



**Graphique B**



**Graphique C**

**Figure 20 :** Diagrammes de Tukey pour l'ensemble des catégories définies dans l'étude

D'après l'étude des graphiques réalisés à partir des données statistiques (moyenne, médiane, écart-type, étendue), on observe que les valeurs de BDG mesurées lors d'infections fongiques prouvées sont croissantes entre les candidémies, aspergilloses et pneumocystoses.

De plus, de par l'étude des patients présentant une aspergillose, on remarque que plus l'infection a un niveau de certitude élevé, plus le taux moyen du paramètre étudié est important.

Cette constatation est également mise en évidence pour les infections à *Candida spp.*, mis à part des patients présentant une colonisation à *Candida sp.* pour lesquels les résultats sont en faveur d'une valeur élevée de BDG circulants. En cas de colonisation importante, une possible candidose doit être envisagée et ne peut pas être totalement exclue.

Il est à noter que les patients de cette étude ayant développé une pneumocystose pulmonaire ont des taux de BDG circulants très élevés, toujours supérieurs à 500 pg/mL, et la plupart du temps supérieurs à 1000 pg/mL.

Les patients chez lesquels une interférence connue a été retrouvée ou chez qui une intervention récente impliquant le tube digestif a été réalisée présentent des taux significativement plus élevés que les sujets ayant présenté une gluconémie positive isolément.

Globalement, dans les catégories interférence, gluconémie isolée ou chirurgie digestive récente, le taux moyen de BDG est inférieur à 500 pg/mL.

### **5. Influence du traitement antifongique sur la cinétique de circulation des BDG**

Le suivi de la gluconémie chez des patients ayant bénéficié de plusieurs sérums et qui ont reçu des traitements antifongiques a été étudié.

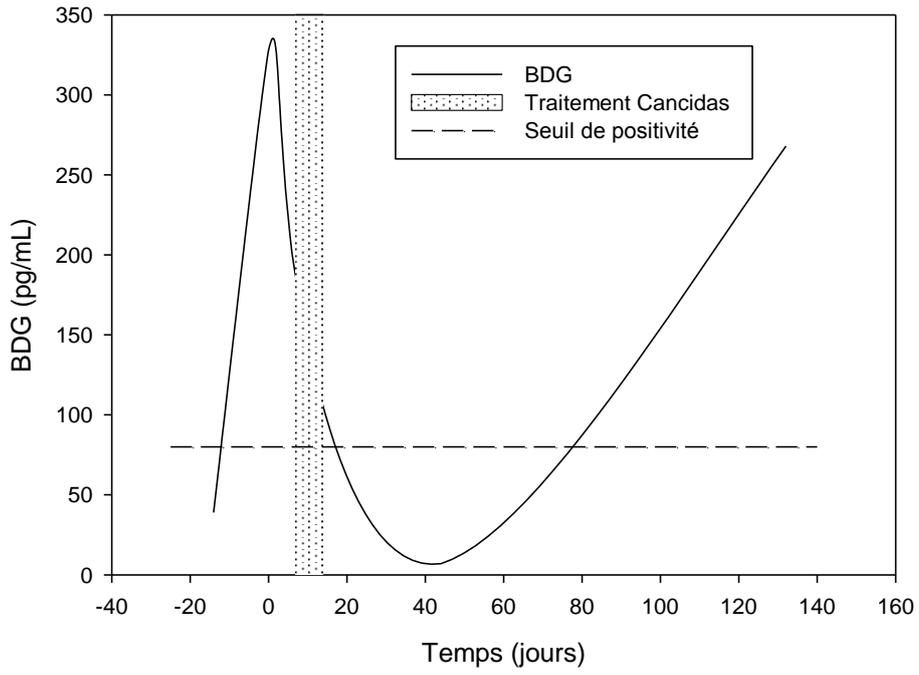
A titre d'exemple, les patients 18 et 48, atteints de candidose prouvée cliniquement et mycologiquement (isolement d'espèce *Candida* d'une hémoculture), voient leur gluconémie chuter rapidement suite à l'initiation du traitement mais ce taux réaugmente quelques semaines après son arrêt.

Il en est de même avec les patients 44 et 88, touchés par une API. Cette observation est notamment marquée chez le patient 44 pour lequel 2 cures de traitement distinctes dans le temps ont été initiées.

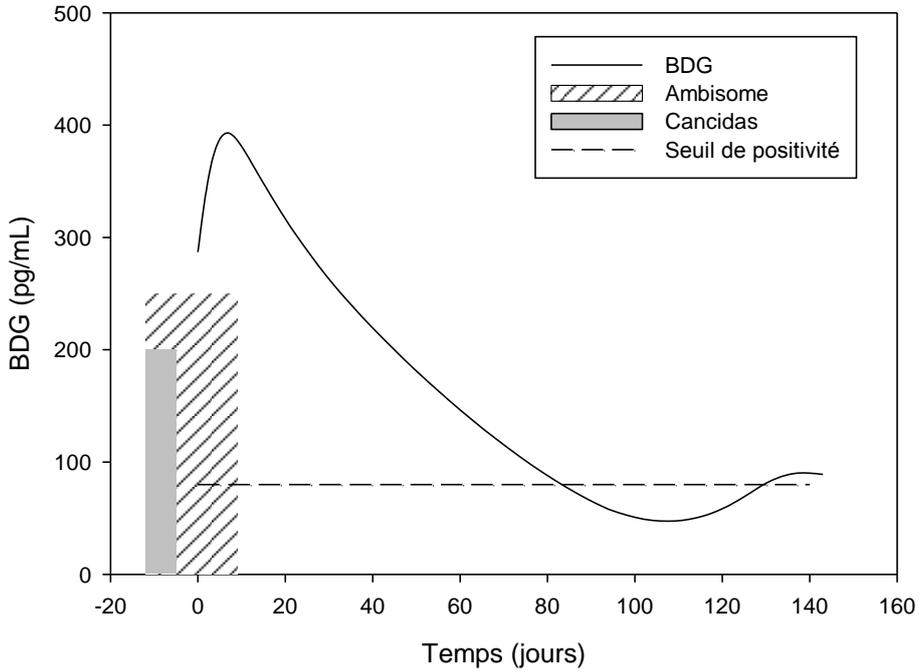
Malgré la mise en place d'un traitement efficace qui fait initialement chuter le taux de BDG sérique durant 30 à 100 jours, les composants de la paroi persistent donc régulièrement plusieurs mois dans le compartiment sanguin.

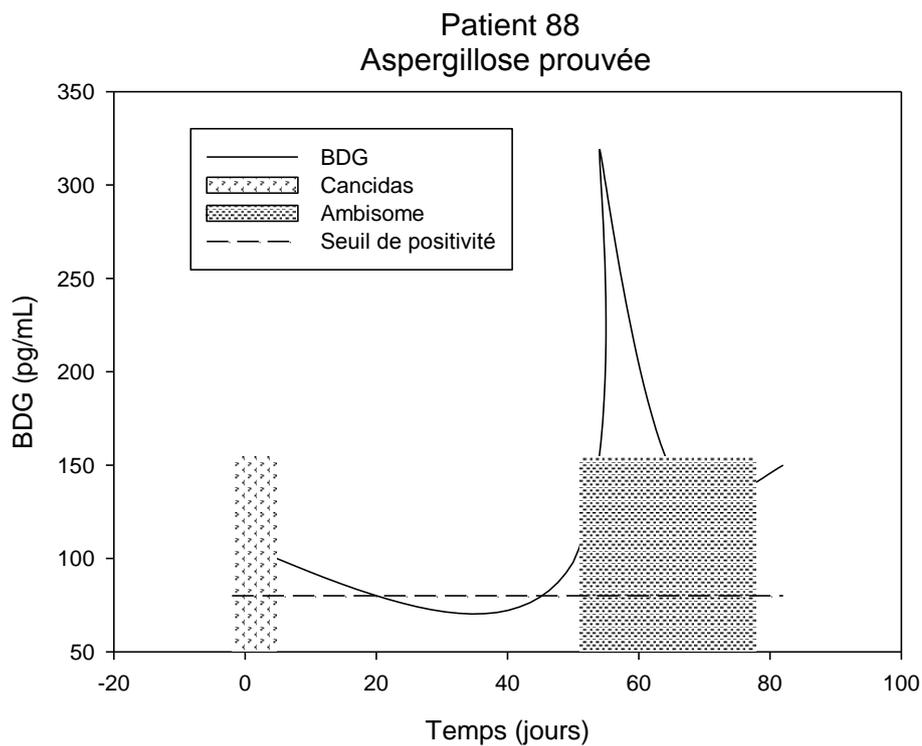
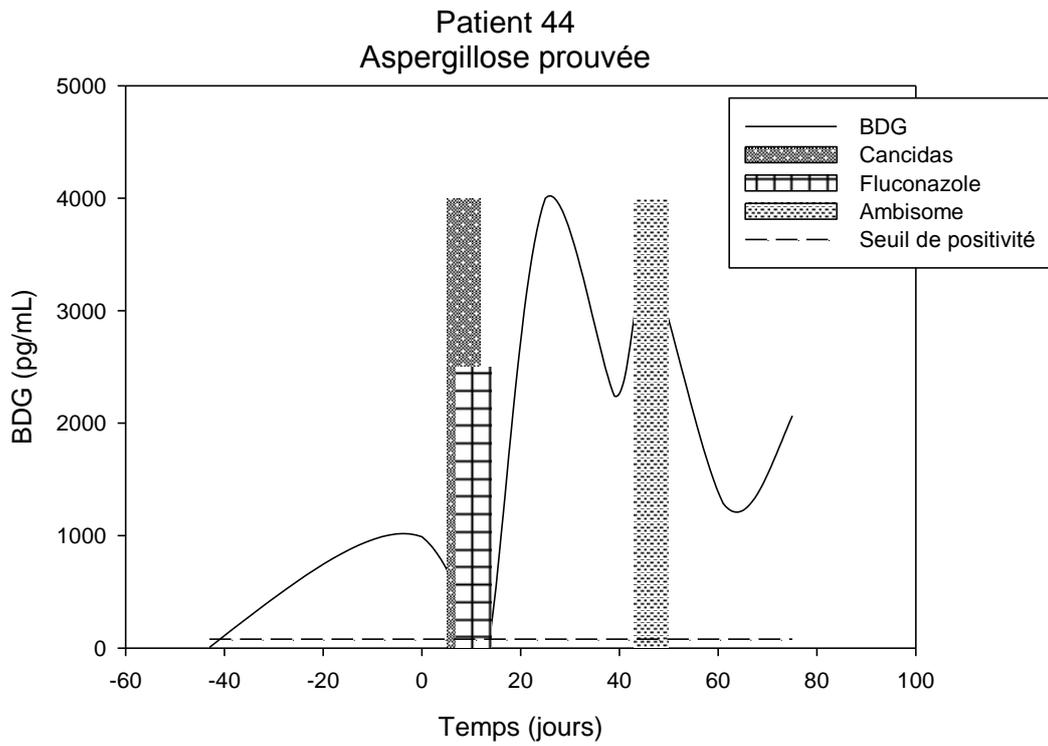
Malheureusement le nombre de valeurs de gluconémies est insuffisant chez les patients ayant présenté une pneumocystose pour établir des cinétiques significatives d'évolution du marqueur en fonction du traitement reçu.

Patient 18  
Candidose prouvée



Patient 48  
Candidose prouvée





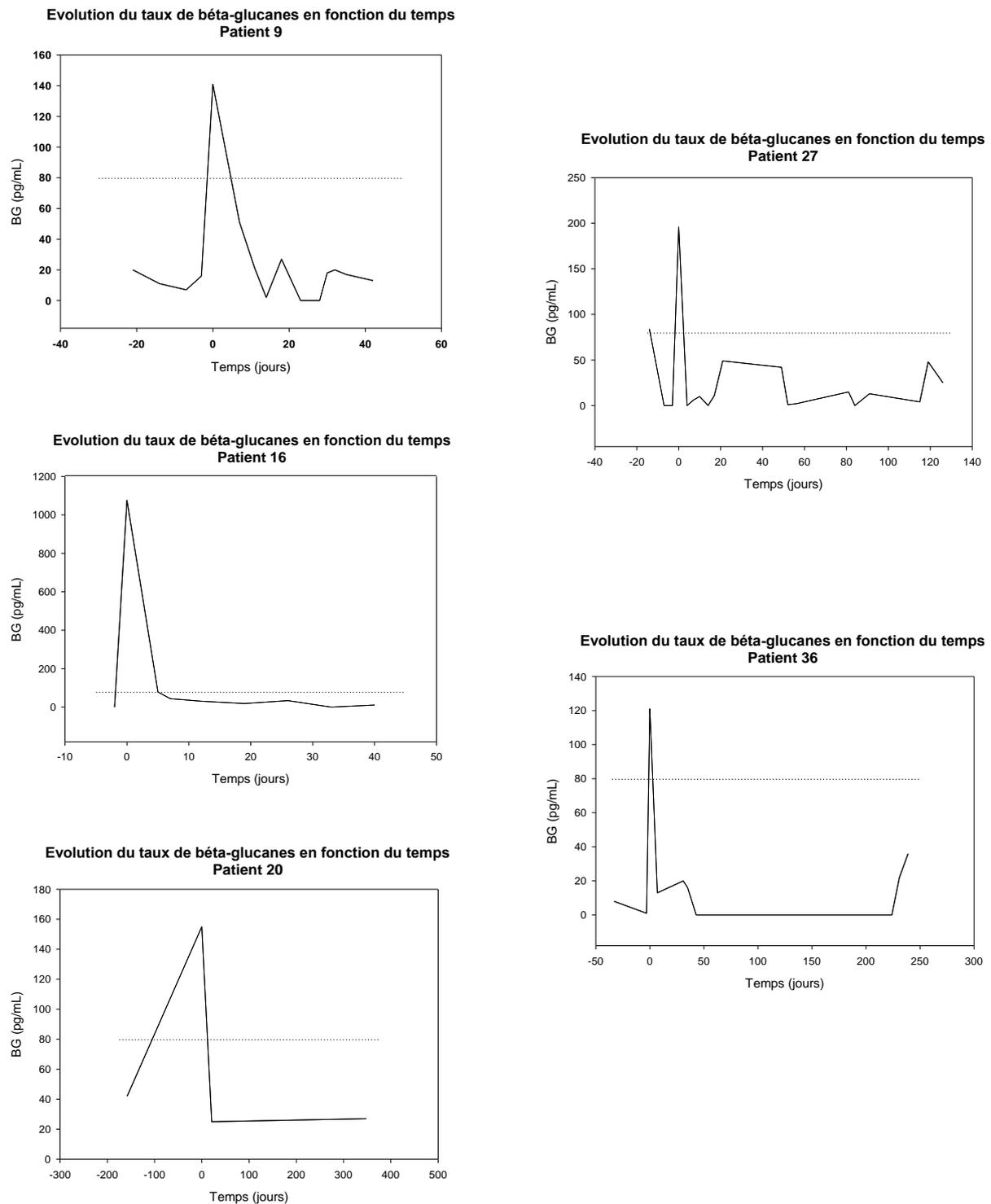
**Figure 21** : Cinétique de circulation des BDG chez 4 patients atteints de maladie fongique prouvée et traités par antifongique

*J0 correspond à la première glucanémie positive.*

*La ligne horizontale hachurée indique le seuil significatif de la méthode.*

*L'histogramme indique la durée du traitement antifongique.*

## 6. Cinq cinétiques de glucanémies isolées



**Figure 22** : Représentation graphique de l'évolution des cinétiques comportant une valeur positive isolée de BDG sans preuve de MFI

*J0* correspond à la première glucanémie positive.

La ligne horizontale hachurée indique le seuil significatif de la méthode.

Sont représentés au niveau de la figure 22 les graphiques des 5 patients pour lesquels au moins 4 sérums rapprochés dans le temps ont pu être obtenus, un seul présentant une valeur de BDG supérieure au seuil de positivité, et pour lesquels aucune preuve d'infection fongique invasive, qu'elle soit d'ordre biologique, clinique ou radiologique, n'a pu être obtenue. Ces patients ont donc une valeur de BDG positive isolée, probablement des faux positifs, encadrée par plusieurs valeurs rapprochées inférieures au seuil du fabricant. De plus, via l'examen du dossier médical, nous n'avons trouvé aucune preuve écrite d'une quelconque infection mycologique.

Ces études cinétiques ont pu être menées durant une période de temps importante allant de 40 jours à près d'un an. En effet, l'origine de ces patients est surtout représentée par les services de réanimation, où les durées de séjour sont généralement longues, et d'onco-hématologie, où les patients reviennent la plupart du temps régulièrement durant plusieurs mois. Les sérums obtenus sont donc nombreux et l'évolution du marqueur dans le temps plus facile à suivre.

## **7. Synthèse des résultats obtenus**

Les BDG peuvent être des marqueurs diagnostiques pour les candidoses, aspergilloses et pneumocystoses. Ce marqueur a été d'ailleurs inclus comme critère mycologique dans la classification des MFI.

Nous avons identifié, en plus des interférences mentionnées par le fabricant, une source majeure de réaction faussement positive chez les patients de réanimation présentant une forte colonisation muqueuse par des levures avec toutefois des taux supérieurs à ceux observés chez le patient ayant une candidose invasive cliniquement et mycologiquement confirmée.

Un point à souligner de cette étude est le fait que le taux de BDG peut être corrélé au niveau de certitude d'une MFI, en particulier pour les aspergilloses et les candidoses.

Une autre observation est que le taux de BDG varie de manière importante durant le suivi thérapeutique des MFI (candidoses et aspergilloses) avec une baisse dans les jours qui suivent la mise en route d'un traitement par caspofongine. Cependant ces taux persistent à des valeurs nettement supérieures au seuil significatif et pendant plusieurs semaines, ce qui limite l'intérêt de ce marqueur pour vérifier l'efficacité thérapeutique.

Enfin nous avons montré qu'un taux de BDG positif de manière isolée n'a aucune valeur diagnostique.

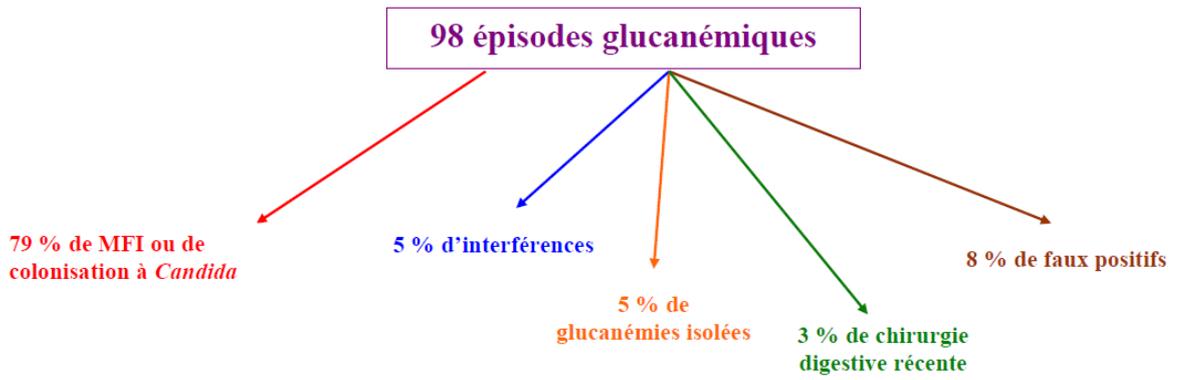
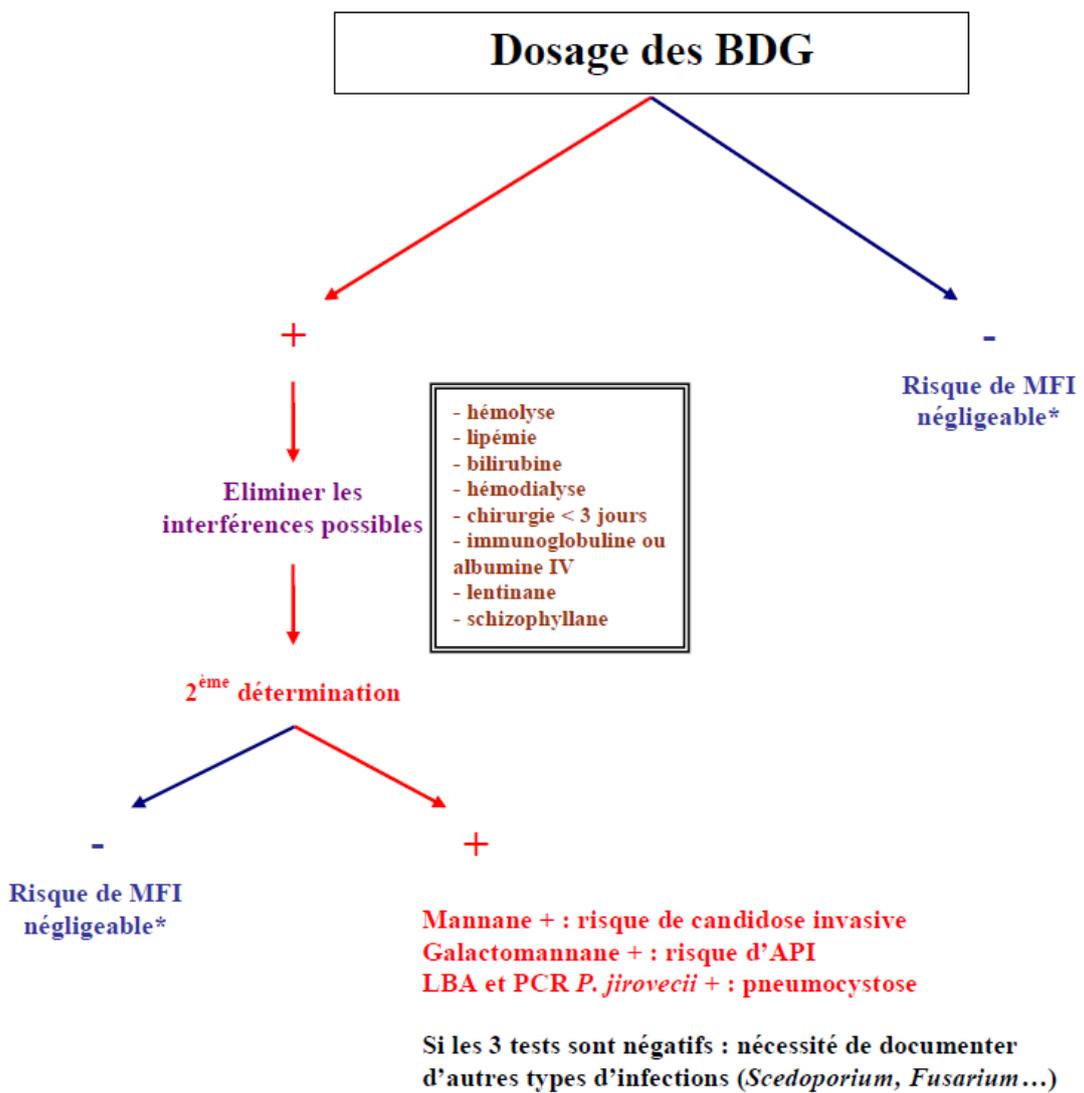


Figure 23 : Synthèse des causes de glucanémie positive dans notre étude



\*Nécessité d'exclure une infection à zygomycètes ou à cryptocoque si la clinique est en faveur.

Figure 24 : Arbre décisionnel d'interprétation du dosage des BDG

## **D. Discussion**

Les MFI sont des infections fréquentes et difficiles à diagnostiquer avec les méthodes actuelles. Les méthodes basées sur la culture sont peu sensibles, en particulier si le patient a bénéficié d'un traitement empirique préalable. Cependant leur réalisation demeure indispensable pour isoler/identifier l'agent pathogène et déterminer sa sensibilité aux antifongiques. L'hémoculture est inutile en cas d'API et ne se positive que dans 50 % des candidémies. L'histologie représente un diagnostic de certitude mais est rarement réalisée en raison de son caractère invasif. La disponibilité des techniques de tomodensitométrie et d'imagerie par résonance magnétique constitue un progrès décisif dans le diagnostic des mycoses invasives, cependant leur contribution est souvent tardive.

Dans ce contexte, des techniques alternatives à la culture ont été développées. Elles sont basées sur deux grands principes : le dosage de molécules circulantes (les polysaccharides et l'ADN), couplé ou non à la détection d'anticorps dirigés contre des composants fongiques spécifiques.

La détection d'ADN fongique par PCR a fait l'objet d'une littérature abondante, cependant son manque de standardisation a freiné considérablement sa généralisation. En dépit des progrès récents [226, 227], aucun consensus n'a pu être obtenu quant aux indications précises de cette méthode pour le diagnostic biologique des MFI. Pour l'aspergillose spécifiquement, deux kits de dosage sont principalement utilisés : MycAssay Aspergillus PCR<sup>®</sup>, commercialisé par la société Myconostica, et les kits « maison » mis en place par les laboratoires. L'EAPCRI (European Aspergillus PCR initiative) a été créée pour tenter d'uniformiser les pratiques. Elle a coordonné une méta-analyse où des performances comparables ont été retrouvées entre les deux méthodes [228].

Pour la candidémie, une méta-analyse dirigée par T. Avni, rassemblant les données de 54 études avec un total de 4694 patients, a révélé que la PCR avait des performances élevées dans la détection de *Candida sp.* au niveau sanguin avec une sensibilité de 85 % contre 38 % seulement pour les hémocultures [102]. Le rapport coût-bénéfice doit être évalué pour trouver la place de ce marqueur dans le diagnostic de candidémie.

Pour la pneumocystose, plusieurs protocoles ont été publiés avec des performances variables mais demeurent réservés aux laboratoires spécialisés.

La tendance actuelle est de développer des systèmes de détection multiplexes pour réduire les coûts. Par exemple le kit Septifast<sup>®</sup> (Laboratoire Roche) utilise une PCR multiplex en temps réel, impliquant plusieurs paires d'amorces, visant la détection de 25 microorganismes responsables de septicémies, dont 5 espèces de levures et *Aspergillus fumigatus*. Sa réalisation exige moins de 6 heures avec cependant un coût excessif qui rend difficile son utilisation en première ligne [137, 229].

Outre l'ADN, les molécules dérivant du métabolisme ou du catabolisme des champignons constituent une cible de choix pour le développement de nouveaux outils diagnostiques. La détection sérique des polysaccharides pariétaux tels que le galactomannane, le mannane et les BDG constitue une alternative fiable pour le diagnostic indirect des MFI.

En ce qui concerne la détection des BDG, plusieurs kits ont été commercialisés initialement par des firmes japonaises avec des seuils de significativité variables rendant difficile la comparaison de leurs performances diagnostiques notamment en terme de spécificité [220]. Par conséquent, le suivi des patients doit être réalisé de préférence avec le même kit et avec le même protocole d'extraction. Les seuls kits qui ont fait l'objet d'évaluations cliniques larges et rigoureuses sont le test Fungitell® (Laboratoires Cape-Code Associates, USA) et le Béta-Glucan Wako Test® (Wako, Japan) [222, 230].

Ces études ont permis également de montrer que l'apport de ce biomarqueur était variable selon les populations à risque de MFI.

En onco-hématologie, les MFI, et plus particulièrement les API, sont des complications fréquentes et graves souvent en rapport avec la durée et la profondeur de la neutropénie. Le pronostic de ces infections est souvent conditionné par la précocité du diagnostic clinique et biologique. L'issue est d'autant plus favorable que le traitement antifongique est institué de manière précoce [110]. Une méta-analyse coordonnée par F. Lamoth en 2012 dans le cadre de la 3<sup>e</sup> Conférence de l'European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3), évalue plus particulièrement les performances des BDG dans le diagnostic de MFI, à partir de 6 études majeures (1771 patients comprenant 414 MFI dont 215 prouvées ou probables). La spécificité globale du test pour deux valeurs consécutives supérieures à 80 pg/mL est estimée à 98,9 %. En revanche, la sensibilité du test dans ces conditions est nettement inférieure à celle rapportée dans l'étude princeps [222]. Cette conférence recommande par ailleurs l'utilisation de plusieurs marqueurs sérologiques (mannane, galactomannane...) pour augmenter la sensibilité du diagnostic [231, 232].

En réanimation, 5 à 10 patients sur 1000 admissions sont atteints de candidémies, avec une mortalité comparable à celle d'un sepsis sévère ou d'un choc septique [233]. La gravité de ces infections justifie la mise en place de stratégies diagnostiques fiables en vue d'identifier les patients justifiant d'un traitement antifongique approprié et précoce. Compte tenu de sa valeur prédictive négative élevée, le Fungitell® a été rapidement intégré dans le suivi des patients de réanimation. Une étude menée par le réseau suisse des candidémies (Funginos) a permis de montrer que le taux de BDG permet de différencier les candidoses abdominales de la simple colonisation chez le sujet de réanimation chirurgicale avec des perforations/anastomoses gastro-intestinales récurrentes [234], cette entité clinique

demeurant par ailleurs difficile à diagnostiquer. Cependant, plusieurs études récentes montrent l'existence d'un pourcentage non-négligeable de faux positifs en unité de soins intensifs [235, 236]. On peut donc supposer que les soins divers et répétés dont bénéficient les patients de réanimation médicale constituent une source d'interférence pour le dosage des BDG.

Dans les services de néonatalogie, les enfants ayant un poids de naissance inférieur à 1500 grammes présentent une incidence de MFI significativement plus élevée que ceux pesant plus de 2500 grammes. En raison de l'immaturation de leur système immunitaire, ces patients présentent un risque élevé de candidose systémique [237]. La disponibilité d'un test non invasif, panfongique et nécessitant moins de 20 microlitres de sérum constitue un progrès non négligeable pour la documentation des épisodes fébriles chez ces patients. Ceci est d'autant plus appréciable que le rendement des hémocultures est souvent faible faute de volume sanguin suffisant. De plus, les données publiées par Montagna *et al.* permettent de montrer que le seuil significatif de 80 pg/mL était également utilisable pour les prématurés [238].

En transplantation d'organes, l'étude de N. Akamatsu *et al.* portant sur une cohorte de 24 patients ayant bénéficié d'une transplantation hépatique et atteints d'une MFI prouvée, a montré que les performances diagnostiques du BDG étaient comparables à celles du patient neutropénique d'onco-hématologie [239]. Bien que la sensibilité du BDG dans cette population soit controversée [240], il est largement reconnu que l'identification précoce des patients ayant une MFI permet de réduire de manière notable la mortalité post-greffe.

Notre étude a consisté notamment à évaluer la contribution des BDG au diagnostic des MFI et de fournir aux cliniciens les informations pertinentes pour la prescription et l'interprétation de cet examen. Notre travail a concerné l'analyse des prescriptions effectuées au cours de la période 2008 - 2010. Cette prescription a été effectuée par un infectiologue chargé d'évaluer la pertinence des traitements anti-infectieux dans les différents services de soins. Elle est souvent motivée par la persistance d'un syndrome fébrile d'origine inconnue.

Sur 912 analyses, 131 (14,4 %), réparties sur 95 patients, avaient un taux de BDG supérieur à 120 pg/mL. La documentation mycologique des épisodes infectieux selon les recommandations de l'EORTC [217] a permis de retrouver 31 candidoses prouvées ou probables (dont 9 en hématologie clinique, 7 en réanimation, 7 dans le service de maladies de l'appareil digestif), 21 aspergilloses prouvées ou probables (dont 13 en hématologie clinique, aucune en réanimation) et 5 pneumocystoses prouvées par la mise en évidence de kystes dans le LBA et par la détection d'ADN par PCR (2 en réanimation, 1 en hématologie clinique, 1 greffé cardiaque et 1 en maladies de l'appareil digestif).

Au total, 79 % des patients ayant présenté une glucanémie positive étaient porteurs d'une candidose, d'une aspergillose ou d'une pneumocystose. Ces résultats sont conformes à ceux déjà publiés dans la méta-analyse de Lamoth *et al.* qui rapportent une spécificité de 98,9 % pour 2 valeurs positives consécutives [231] contre une spécificité de 85 à 95 % pour une valeur isolée de glucanémie [171, 220]. Ces données confirment la spécificité élevée de cet examen. Par ailleurs, l'expérience acquise au laboratoire concernant la reprise des sérums de patients atteints de MFI n'a, à ce jour, pas permis d'identifier de faux négatifs, confirmant l'excellente valeur prédictive négative de ce marqueur [173, 241].

D'autre part, les courbes ROC rapportées dans l'étude de Yoshida *et al.* ont montré une AUC (aire sous la courbe) supérieure à 0,9 reflétant ainsi les performances analytiques de ce test [220]. Cet examen est donc très informatif devant une suspicion de MFI. Le mode d'inclusion des patients dans notre étude ne permet pas d'évaluer la sensibilité et les valeurs prédictives positive et négative.

Dans le cas de la pneumocystose, il a été démontré qu'un seuil de glucanémie de 500 pg/mL était susceptible de différencier une colonisation d'une atteinte pulmonaire à *P. jirovecii* [170, 242]. Cette observation a été confirmée dans notre série puisque le taux moyen de BDG pour les 5 cas de pneumocystose était de 1510 pg/mL.

En ce qui concerne les autres MFI, le taux de glucanémie était corrélé au niveau de certitude de l'infection ; ainsi les taux moyens de glucanémie chez les patients atteints d'aspergillose invasive prouvée ou d'aspergillose probable étaient respectivement de 830 et 293 pg/mL. Les taux sont comparables chez les patients atteints de candidémie/candidose invasive (366 pg/mL) versus candidose probable (383 pg/mL), avec cependant une augmentation significative des taux moyens de BDG chez les sujets ayant une colonisation fongique à levures mais sans preuve formelle d'infection (582 pg/mL). Cette observation pose une réelle difficulté en pratique clinique, notamment dans les services de réanimation, suggérant une combinaison BDG - mannane pour augmenter la spécificité du diagnostic biologique (aucun patient colonisé n'a de mannanémie positive).

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer la proportion de faux positifs pour le dosage de BDG et de tenter d'identifier les sources possibles d'interférences (voir schéma de synthèse, figure 23). Ce problème de faux positifs a été soulevé très rapidement par les auteurs en raison de la forte sensibilité analytique du test (détection de l'ordre du picogramme/mL) et de l'impact financier engendré par un traitement antifongique prescrit par excès [171, 172].

Sur les 21 % de patients ayant présenté une glucanémie positive sans rapport avec une MFI documentée ou une forte colonisation digestive à levures, 5 % avaient une source d'interférence déjà recensée par le fabricant de Fungitell® (bilirubine, hémolyse) [225] ou liée

au patient (hémodialyse, injection d'albumine ou d'immunoglobulines, exposition récente à certaines gazes chirurgicales) [243-245] ; 3 % avaient un antécédent récent de chirurgie digestive pouvant être à l'origine d'une translocation transitoire de levures dans la circulation sanguine ; 5 % de patients ont bénéficié d'un dosage itératif et régulier de BDG et pour lesquels une seule glucanémie positive a été retrouvée mais considérée sans valeur diagnostique par la majorité des auteurs [246-248]. Cette procédure s'est révélée particulièrement nécessaire pour éliminer également les réactions faussement positives liées à des contaminations ponctuelles par des moisissures de l'environnement au moment de la réalisation du test. Le suivi régulier du sujet glucanémique est donc indispensable.

Au total, la proportion réelle de faux positifs identifiée dans cette étude est de 8 %, résultat comparable à celui de Pazos *et al.* [248]. Pour une partie de ces patients, séjournant en dehors du CHRU de Lille, il n'a pas été possible d'obtenir les renseignements cliniques (existence de traitements empiriques ou prophylactiques) et radiologiques nécessaires à la documentation de l'épisode infectieux pour pouvoir documenter le diagnostic de MFI.

La répartition de ces faux positifs était hétérogène entre les différents services à risque de MFI. D'une manière générale, la proportion la plus élevée de faux positifs par rapport à l'ensemble des positifs a été retrouvée en onco-hématologie (15 %), contre 3,6 % en réanimation médicale. La proportion de faux positifs rapportée dans l'étude de Mohr était beaucoup plus importante (25 %) probablement en raison de l'impact de la colonisation fongique sur le dosage de BDG qui n'a pas été exploré de manière spécifique et de l'inclusion de patients ayant une histoire récente de chirurgie digestive [235].

Il est important de souligner l'existence d'autres interférences non retrouvées dans notre étude en particulier l'utilisation de certains suppléments nutritionnels glycaniques (lentinane et schizophyllane) comme stimulants du système immunitaire chez le patient cancéreux sous chimiothérapie [223]. Certains antibiotiques (céfépime) ont été rapportés comme source potentielle de faux positifs [249, 250]. Le rôle de l'association pipéracilline-tazobactam est également étudié par Metan G *et al.* sans conclusion ferme quant à l'implication de cette association dans les BDG faussement positifs. L'implication éventuelle de l'association ampicilline-sulbactam a été également écartée lors d'une étude portant sur 15 patients sans MFI présentant une infection bactérienne [251]. Enfin Marty *et al.* ont analysé l'impact de l'administration intraveineuse de 44 antibiotiques dont l'association amoxicilline-acide clavulanique, aucune interférence significative n'a été relevée [249]. Les interférences retrouvées à ce jour suggèrent une possible contamination par des champignons de l'environnement soit lors des processus de synthèse chimique soit au moment de la reconstitution de certains produits avant l'administration intraveineuse. L'influence de la colonisation digestive par des levures saprophytes sur la glucanémie a été

également suggérée par certains auteurs ; cependant ces résultats restent encore très controversés [247, 248, 252]. Il est à noter que la population de patients colonisés étudiés dans notre série a révélé une proportion importante de glucanémies positives, parfois comparables à celles observées chez le patient atteint de MFI. Ces patients ont été sélectionnés dans une unité de réanimation médicale avec un syndrome fébrile résistant aux antibiotiques mais ne présentant aucun signe biologique d'infection fongique. La majorité d'entre eux avait plus de deux sites corporels colonisés par des levures.

Un autre objectif de notre travail était d'étudier la cinétique de circulation sérique des BDG au cours des MFI et d'évaluer son intérêt pour le suivi thérapeutique. Cet aspect, n'a pas été beaucoup étudié. Yasuoka *et al.* ont étudié l'évolution des BDG chez 5 patients atteints de pneumocystoses. Une baisse significative des taux a été observée parallèlement au traitement [253]. Ce résultat est à interpréter avec précaution compte tenu de la taille réduite de l'effectif.

Dans notre étude, 60 % des patients avaient bénéficié d'au moins 3 sérums prélevés de manière séquentielle au décours d'une MFI. Ce matériel nous a permis de suivre plusieurs cinétiques de circulation de BDG au cours de candidose invasive (ex. patient 18 et 48), ou d'aspergillose invasive (ex. patient 44 et 88). Quelle que soit la pathologie considérée, la glucanémie subit une baisse significative durant les premiers jours de traitement antifongique puis, dans plus de 60% des cas, une réascension des taux dans les semaines suivantes. Deux hypothèses avaient été formulées pour expliquer ces résultats :

1) une rechute possible de l'infection, cependant, aucune preuve clinique ni biologique n'a permis de documenter cette hypothèse ;

2) un retard de métabolisation de ces polysaccharides en raison de l'absence de glucanases dans le sérum humain. Ce phénomène a été rapporté également dans une étude récente au cours des endocardites fongiques [254].

Compte tenu de l'effectif réduit de patients candidémiques et de la diversité des espèces isolées, il n'a pas été possible dans ce travail de comparer le taux moyen de glucanémie en fonction de l'espèce. La variation des taux circulants de BDG en fonction de l'espèce a été rapportée par plusieurs auteurs, avec un avantage pour *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. guilliermondii* [254].

Compte tenu du caractère rétrospectif de notre étude, il est difficile de tirer des conclusions définitives sur la place réelle de ce marqueur dans la décision thérapeutique. La synthèse des travaux actuels permet de proposer ce marqueur comme outil de screening des patients à haut risque de MFI (cf. arbre décisionnel, figure 24). L'utilisation des BDG est fortement recommandée par les sociétés savantes (IDSA, ECIL-3) avec un accent particulier sur la nécessité d'y associer les sérologies candidosiques (antigène mannane, anticorps anti-mannane) ou aspergillaires (antigène galactomannane) en vue d'améliorer la sensibilité

et la spécificité de l'examen et de permettre de s'affranchir des faux positifs et des faux négatifs retrouvés dans chacun des tests réalisés isolément [231, 252]. Compte tenu des interférences déjà citées, il est fortement recommandé de réserver ce test aux patients à haut risque de MFI. Son application devrait permettre de réduire la morbi-mortalité des MFI, notamment par l'identification des patients justifiant une prise en charge thérapeutique et précoce, et de réduire la proportion de traitements empiriques.

Enfin deux améliorations sont actuellement en cours de développement pour réduire la proportion de faux positifs :

- ✓ l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour la détection spécifique des BDG par ELISA,
- ✓ le développement de nouvelles procédures physico-chimiques pour la purification des BDG sériques.

## CONCLUSION

Le dosage de BDG est un outil diagnostique particulièrement utile pour le dépistage des infections fongiques invasives. Rapide, non invasif et d'un coût accessible à la majorité des structures (23€ / test), sa positivité précède celle des hémocultures de 4 à 5 jours lors des candidoses invasives. Au cours des aspergilloses invasives, il permet un complément utile au galactomannane, car la cinétique de circulation de ce dernier est légèrement différente de celle des BDG. Enfin, il permet également une meilleure identification des patients atteints de pneumocystose lorsque les taux sériques sont supérieurs à 500 pg/mL.

Associé aux autres stratégies diagnostiques de MFI (sérologie, antigénémie, PCR), le BDG permet d'améliorer de manière significative la sensibilité du diagnostic biologique de MFI. L'identification des interférences et leur impact sur le dosage de BDG permet une meilleure interprétation des résultats et une prescription rationnelle des examens. Pour une prise en charge diagnostique de qualité supérieure, la gluconémie doit être réalisée de manière régulière en vue de déterminer les cas de faux positifs et d'identifier les cinétiques les plus significatives. Un minimum de deux gluconémies positives successives est nécessaire pour envisager un diagnostic de MFI. Enfin, l'excellente valeur prédictive négative de ce marqueur permet une meilleure rationalisation des traitements antifongiques en identifiant précocement les patients à haut risque de MFI et en réduisant le coût excessif des traitements empiriques.

# ANNEXES

## Annexe 1

Species	Fluconazole	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	Flucytosine	Amphotericin B	Candins
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S to R <sup>a</sup>
<i>Candida glabrata</i>	S-DD to R	S-DD to R	S-DD to R	S-DD to R	S	S to I	S
<i>Candida krusei</i>	R	S-DD to R	S	S	I to R	S to I	S
<i>Candida lusitanae</i>	S	S	S	S	S	S to R	S

I : susceptibilité intermédiaire, R : résistant, S : sensible, S-DD : sensible dose-dépendant

\* la résistance de *C. parapsilosis* vis-à-vis des échinocandines est rare

**Tableau 7** : Résistance aux principaux antifongiques des espèces les plus fréquemment isolées en clinique humaine [188]

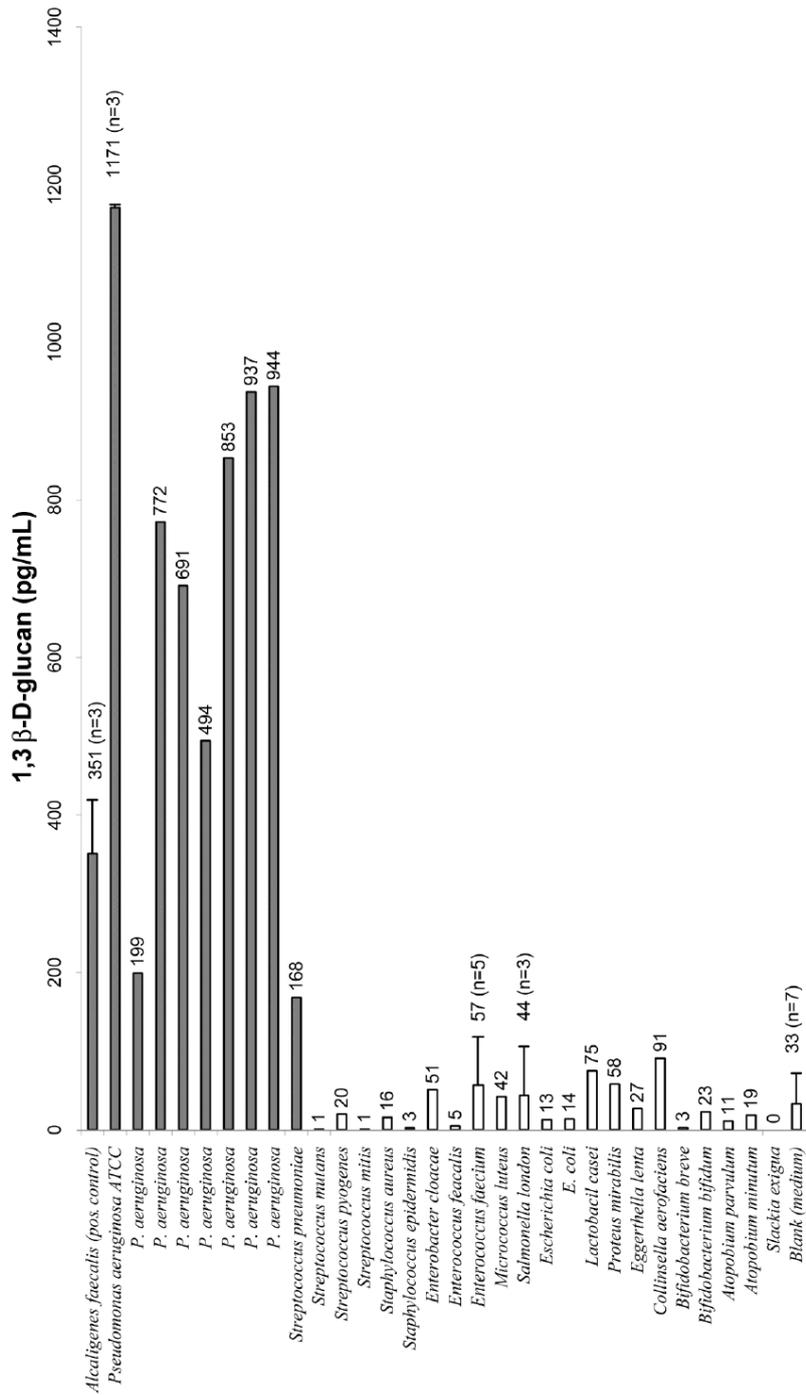


Figure 25 : Réactivité de diverses souches microbiologiques sur le dosage des BDG par le kit Fungitell® [255]

### Annexe 3

**Tableau 8** : Résultats de l'ensemble des dosages de BDG pour chaque sérum de patients inclus dans l'étude et triés par pathologie et niveau de preuve

N° du patient	Date	Taux de BDG (pg/mL)	Nature de l'infection	Niveau de preuve
1	03-févr-10	180	candidose	prouvée
	19-févr-10	495	candidose	prouvée
2	17-févr-10	162	candidose	prouvée
4	21-nov-09	390	candidose	prouvée
5	23-févr-09	294	candidose	prouvée
15	30-oct-08	94	candidose	prouvée
	02-déc-08	231	candidose	prouvée
18	23-juin-09	39	candidose	prouvée
	07-juil-09	328	candidose	prouvée
	13-juil-09	201	candidose	prouvée
	20-août-09	<7	candidose	prouvée
	16-nov-09	268	candidose	prouvée
30	16-févr-10	239	candidose	prouvée
	15-mars-10	146	candidose	prouvée
	19-avr-10	1220	candidose	prouvée
38	28-mai-09	179	candidose	prouvée
	30-sept-09	<7	candidose	prouvée
44	10-juin-09	<7	candidose	prouvée
	23-juil-09	990	candidose	prouvée
	06-août-09	181	candidose	prouvée
45	13-nov-09	234	candidose	prouvée
	03-janv-10	848	candidose	prouvée
48	18-mai-09	287	candidose	prouvée
	25-mai-09	393	candidose	prouvée
	18-juin-09	258	candidose	prouvée
	20-août-09	58	candidose	prouvée
	24-sept-09	79	candidose	prouvée
	08-oct-09	89	candidose	prouvée
61	09-nov-09	729	candidose	prouvée
	23-nov-09	1791	candidose	prouvée
	07-déc-09	>4000	candidose	prouvée
65	03-août-09	64	candidose	prouvée
	07-août-09	28	candidose	prouvée
	10-août-09	180	candidose	prouvée
	17-août-09	47	candidose	prouvée
	24-août-09	20	candidose	prouvée
70	09-juil-09	709	candidose	prouvée
	20-juil-09	636	candidose	prouvée
	27-juil-09	345	candidose	prouvée
73	19-janv-10	110	candidose	prouvée
	19-févr-10	120	candidose	prouvée
75	02-oct-09	740	candidose	prouvée
	23-oct-09	758	candidose	prouvée
78	19-juil.-10	433	candidose	prouvée
87	22-juin-09	43	candidose	prouvée
	15-juil-09	186	candidose	prouvée
	20-juil-09	254	candidose	prouvée
	27-juil-09	133	candidose	prouvée
	03-août-09	42	candidose	prouvée
	24-août-09	30	candidose	prouvée
91	20-août-09	128	candidose	prouvée
	28-août-09	145	candidose	prouvée

N° du patient	Date	Taux de BDG (pg/mL)	Nature de l'infection	Niveau de preuve
11	05-janv-10	<7	candidose	probable
	03-févr-10	196	candidose	probable
	11-févr-10	171	candidose	probable
	15-mars-10	61	candidose	probable
	18-mars-10	54	candidose	probable
14	24-avr-09	287	candidose	probable
	28-mai-09	2	candidose	probable
	10-juil-09	161	candidose	probable
	31-juil-09	288	candidose	probable
	03-août-09	313	candidose	probable
	14-août-09	178	candidose	probable
	17-août-09	129	candidose	probable
	21-août-09	119	candidose	probable
	24-août-09	135	candidose	probable
23	31-juil-09	314	candidose	probable
	10-août-09	268	candidose	probable
55	13-juin-08	1477	candidose	probable
	07-août-08	73	candidose	probable
56	26-juin-09	11	candidose	probable
	02-juil-09	173	candidose	probable
	13-juil-09	0	candidose	probable
	10-août-09	1	candidose	probable
	17-août-09	0	candidose	probable
	21-août-09	15	candidose	probable
	24-août-09	0	candidose	probable
	28-août-09	0	candidose	probable
	31-août-09	29	candidose	probable
	07-sept-09	20	candidose	probable
	14-sept-09	29	candidose	probable
	18-sept-09	23	candidose	probable
	21-sept-09	37	candidose	probable
	25-sept-09	14	candidose	probable
60	02-mai-09	292	candidose	probable
	18-mai-09	235	candidose	probable
	07-déc-09	17	candidose	probable
	21-déc-09	39	candidose	probable
	08-janv-10	9	candidose	probable
63	30-mars-09	37	candidose	probable
	03-avr-09	136	candidose	probable
	15-avr-09	127	candidose	probable
	16-avr-09	177	candidose	probable
	28-avr-09	302	candidose	probable
	15-mai-09	626	candidose	probable
	05-juin-09	706	candidose	probable
	02-juil-09	<7	candidose	probable
64	27-juil-09	384	candidose	probable
	11-août-09	1150	candidose	probable
	31-août-09	490	candidose	probable
	14-sept-09	190	candidose	probable
83	21-août-09	372	candidose	probable
89	08-avr-09	425	candidose	probable
95	13-nov-09	155	candidose	probable
	21-nov-09	209	candidose	probable
13	09-déc-09	21	candidose	colonisée
	14-déc-09	35	candidose	colonisée
	21-déc-09	985	candidose	colonisée
	28-déc-09	494	candidose	colonisée
17	23-mars-09	448	candidose	colonisée
	04-mai-09	997	candidose	colonisée

N° du patient	Date	Taux de BDG (pg/mL)	Nature de l'infection	Niveau de preuve
22	22-déc-09	524	candidose	colonisée
	11-janv-10	26	candidose	colonisée
	25-janv-10	37	candidose	colonisée
28	28-juil-09	12	candidose	colonisée
	21-sept-09	27	candidose	colonisée
	15-oct-09	383	candidose	colonisée
	29-oct-09	515	candidose	colonisée
	18-nov-09	575	candidose	colonisée
	30-nov-09	288	candidose	colonisée
	05-déc-09	350	candidose	colonisée
	12-déc-09	166	candidose	colonisée
29	06-févr-10	134	candidose	colonisée
	19-févr-10	116	candidose	colonisée
	20-févr-10	123	candidose	colonisée
32	12-mai-09	172	candidose	colonisée
34	09-avr-09	234	candidose	colonisée
	29-avr-09	1384	candidose	colonisée
35	03-févr-10	140	candidose	colonisée
	08-mars-10	47	candidose	colonisée
	19-mars-10	440	candidose	colonisée
40	25-mai-09	106	candidose	colonisée
	02-juin-09	36	candidose	colonisée
	15-juin-09	1487	candidose	colonisée
	29-juin-09	2416	candidose	colonisée
43	09-févr-10	604	candidose	colonisée
50	03-févr-10	138	candidose	colonisée
	08-févr-10	70	candidose	colonisée
	15-févr-10	58	candidose	colonisée
	22-févr-10	27	candidose	colonisée
52	24-sept-09	<7	candidose	colonisée
	12-oct-09	35	candidose	colonisée
	05-nov-09	112	candidose	colonisée
	23-nov-09	131	candidose	colonisée
	26-févr-10	199	candidose	colonisée
57	09-nov-09	1896	candidose	colonisée
68	05-févr-09	1432	candidose	colonisée
	18-févr-09	424	candidose	colonisée
	23-févr-09	372	candidose	colonisée
74	24-nov-09	780	candidose	colonisée
	07-déc-09	2400	candidose	colonisée
	21-déc-09	1082	candidose	colonisée
	04-janv-10	770	candidose	colonisée
	11-janv-10	2800	candidose	colonisée
76	28-déc-09	1230	candidose	colonisée
	11-janv-10	1730	candidose	colonisée
	27-janv-10	906	candidose	colonisée
25	21-sept-09	75	candidose	localisée
	12-oct-09	82	candidose	localisée
	26-oct-09	97	candidose	localisée
	10-nov-09	183	candidose	localisée
	16-nov-09	27	candidose	localisée
7	13-févr-09	16	aspergillose	prouvée
	23-févr-09	240	aspergillose	prouvée
	24-févr-09	423	aspergillose	prouvée
	26-févr-09	546	aspergillose	prouvée
	09-mars-09	4	aspergillose	prouvée
19	31-oct-08	1266	aspergillose	prouvée
	30-janv-09	91	aspergillose	prouvée

N° du patient	Date	Taux de BDG (pg/mL)	Nature de l'infection	Niveau de preuve
	04-févr-09	0	aspergillose	prouvée
42	21-sept-09	70	aspergillose	prouvée
	16-oct-09	1129	aspergillose	prouvée
	22-oct-09	780	aspergillose	prouvée
	04-nov-09	550	aspergillose	prouvée
	24-nov-09	208	aspergillose	prouvée
	29-déc-09	118	aspergillose	prouvée
44	17-août-09	>4000	aspergillose	prouvée
	31-août-09	2240	aspergillose	prouvée
	07-sept-09	3410	aspergillose	prouvée
	22-sept-09	1287	aspergillose	prouvée
	06-oct-09	2065	aspergillose	prouvée
49	26-nov-09	386	aspergillose	prouvée
	02-déc-09	177	aspergillose	prouvée
	11-déc-09	126	aspergillose	prouvée
	18-déc-09	368	aspergillose	prouvée
59	08-oct-09	70	aspergillose	prouvée
	21-oct-09	1700	aspergillose	prouvée
	13-nov-09	2499	aspergillose	prouvée
	18-nov-09	1938	aspergillose	prouvée
	23-nov-09	3500	aspergillose	prouvée
67	15-sept-08	143	aspergillose	prouvée
78	12-janv-10	38	aspergillose	prouvée
	15-févr-10	126	aspergillose	prouvée
	03-mars-10	188	aspergillose	prouvée
	10-avr-10	49	aspergillose	prouvée
81	29-janv-10	20	aspergillose	prouvée
	15-févr-10	94	aspergillose	prouvée
	22-févr-10	56	aspergillose	prouvée
	01-mai-10	139	aspergillose	prouvée
	18-mai-10	83	aspergillose	prouvée
88	14-janv-09	107	aspergillose	prouvée
	05-mars-09	98	aspergillose	prouvée
	09-mars-09	319	aspergillose	prouvée
	19-mars-09	155	aspergillose	prouvée
	06-avr-09	150	aspergillose	prouvée
90	10-mars-09	59	aspergillose	prouvée
	11-mars-09	18	aspergillose	prouvée
	13-mars-09	14	aspergillose	prouvée
	23-mars-09	131	aspergillose	prouvée
	22-avr-09	88	aspergillose	prouvée
41	31-oct-08	836	aspergillose	probable
	18-sept-09	7	aspergillose	probable
	21-sept-09	10	aspergillose	probable
	08-oct-09	0	aspergillose	probable
	20-oct-09	0	aspergillose	probable
47	18-janv-10	10	aspergillose	probable
	25-janv-10	44	aspergillose	probable
	01-févr-10	62	aspergillose	probable
	08-févr-10	80	aspergillose	probable
	15-févr-10	126	aspergillose	probable
	17-avr-10	494	aspergillose	probable
53	29-janv-09	71	aspergillose	probable
	12-mars-09	51	aspergillose	probable
	16-mars-09	70	aspergillose	probable
	18-mars-09	72	aspergillose	probable
	01-avr-09	78	aspergillose	probable
	06-avr-09	63	aspergillose	probable
	08-avr-09	76	aspergillose	probable

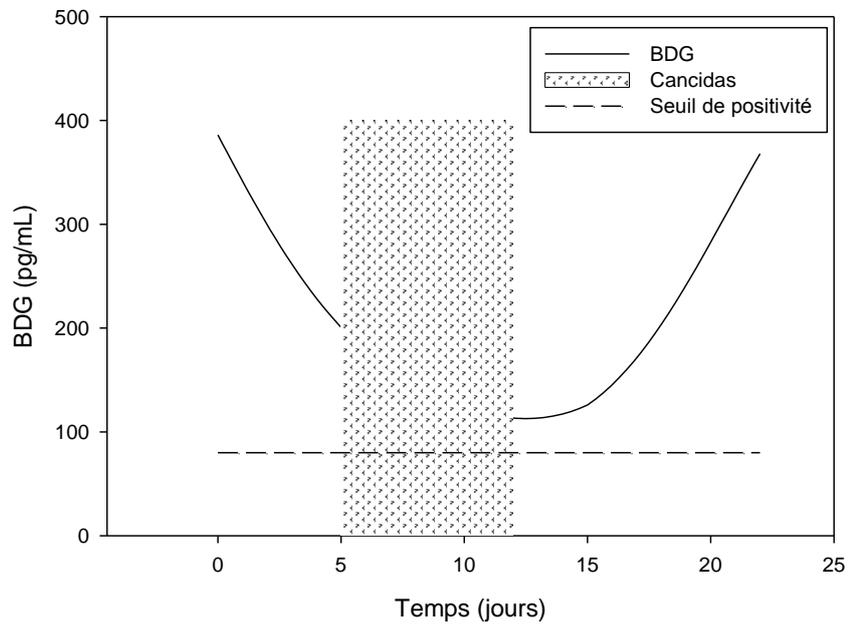
N° du patient	Date	Taux de BDG (pg/mL)	Nature de l'infection	Niveau de preuve
	18-avr-09	186	aspergillose	probable
	20-avr-09	293	aspergillose	probable
54	17-août-09	<70	aspergillose	probable
	24-août-09	189	aspergillose	probable
	31-août-09	820	aspergillose	probable
	07-sept-09	1980	aspergillose	probable
	14-sept-09	878	aspergillose	probable
62	06-févr-09	52	aspergillose	probable
	16-févr-09	75	aspergillose	probable
	25-févr-09	166	aspergillose	probable
	11-mars-09	83	aspergillose	probable
	13-mars-09	81	aspergillose	probable
	16-mars-09	65	aspergillose	probable
	19-mars-09	49	aspergillose	probable
84	06-juil-09	51	aspergillose	probable
	25-juil-09	113	aspergillose	probable
	10-août-09	1890	aspergillose	probable
	24-août-09	1220	aspergillose	probable
	13-oct-09	1370	aspergillose	probable
85	19-févr-10	108	aspergillose	probable
	22-févr-10	52	aspergillose	probable
	24-févr-10	73	aspergillose	probable
	01-mars-10	89	aspergillose	probable
	08-mars-10	87	aspergillose	probable
	10-mars-10	100	aspergillose	probable
	12-mars-10	104	aspergillose	probable
	15-mars-10	75	aspergillose	probable
	07-avr-10	259	aspergillose	probable
89	18-févr-10	510	aspergillose	probable
31	22-juil-08	0	aspergillose	chronique
	26-août-08	139	aspergillose	chronique
46	05-déc-08	56	aspergillose	chronique
	09-févr-09	173	aspergillose	chronique
	22-juin-09	0	aspergillose	chronique
94	16-sept-09	0	aspergillose	chronique
	21-sept-09	27	aspergillose	chronique
	24-sept-09	1	aspergillose	chronique
	28-sept-09	10	aspergillose	chronique
	05-oct-09	0	aspergillose	chronique
	02-nov-09	0	aspergillose	chronique
	09-nov-09	8	aspergillose	chronique
	16-nov-09	0	aspergillose	chronique
	07-déc-09	46	aspergillose	chronique
	14-déc-09	71	aspergillose	chronique
	18-déc-09	120	aspergillose	chronique
	21-déc-09	114	aspergillose	chronique
	18-janv-10	116	aspergillose	chronique
	25-janv-10	180	aspergillose	chronique
58	23-déc-08	164	poumon du fermier	prouvée
8	08-févr-10	589	aspergillose + candidose	prouvée
	10-févr-10	618	aspergillose + candidose	prouvée
12	22-avr-09	1522	pneumocystose	prouvée
	25-avr-09	3230	pneumocystose	prouvée
26	21-janv-09	1023	pneumocystose	prouvée
66	18-avr-09	56	pneumocystose	prouvée
	12-mai-09	630	pneumocystose	prouvée
77	08-mars-09	70	pneumocystose	prouvée
	21-mars-09	2997	pneumocystose	prouvée

N° du patient	Date	Taux de BDG (pg/mL)	Nature de l'infection	Niveau de preuve
	23-juin-09	141	pneumocystose	prouvée
92	19-févr-09	1380	pneumocystose	prouvée
	27-févr-09	371	pneumocystose	prouvée
9	20-juil-09	20	glucanémie isolée	
	27-juil-09	11	glucanémie isolée	
	03-août-09	7	glucanémie isolée	
	07-août-09	16	glucanémie isolée	
	10-août-09	141	glucanémie isolée	
	17-août-09	51	glucanémie isolée	
	21-août-09	21	glucanémie isolée	
	24-août-09	2	glucanémie isolée	
	28-août-09	27	glucanémie isolée	
	02-sept-09	0	glucanémie isolée	
	07-sept-09	0	glucanémie isolée	
	09-sept-09	18	glucanémie isolée	
	11-sept-09	20	glucanémie isolée	
	14-sept-09	17	glucanémie isolée	
	21-sept-09	13	glucanémie isolée	
16	26-oct-09	0	glucanémie isolée	
	28-oct-09	1076	glucanémie isolée	
	02-nov-09	79	glucanémie isolée	
	04-nov-09	44	glucanémie isolée	
	09-nov-09	31	glucanémie isolée	
	16-nov-09	19	glucanémie isolée	
	23-nov-09	34	glucanémie isolée	
	30-nov-09	0	glucanémie isolée	
	07-déc-09	11	glucanémie isolée	
20	23-juin-08	42	glucanémie isolée	
	28-nov-08	155	glucanémie isolée	
	19-déc-08	25	glucanémie isolée	
	11-nov-09	27	glucanémie isolée	
27	27-juil-09	84	glucanémie isolée	
	03-août-09	0	glucanémie isolée	
	07-août-09	0	glucanémie isolée	
	10-août-09	196	glucanémie isolée	
	14-août-09	0	glucanémie isolée	
	17-août-09	6	glucanémie isolée	
	20-août-09	10	glucanémie isolée	
	24-août-09	0	glucanémie isolée	
	27-août-09	11	glucanémie isolée	
	31-août-09	49	glucanémie isolée	
	28-sept-09	42	glucanémie isolée	
	01-oct-09	1	glucanémie isolée	
	05-oct-09	2	glucanémie isolée	
	30-oct-09	15	glucanémie isolée	
	02-nov-09	0	glucanémie isolée	
	09-nov-09	13	glucanémie isolée	
	03-déc-09	4	glucanémie isolée	
	07-déc-09	48	glucanémie isolée	
	14-déc-09	25	glucanémie isolée	
36	08-juil-09	8	glucanémie isolée	
	07-août-09	1	glucanémie isolée	
	10-août-09	121	glucanémie isolée	
	17-août-09	13	glucanémie isolée	
	10-sept-09	20	glucanémie isolée	
	14-sept-09	16	glucanémie isolée	
	22-sept-09	0	glucanémie isolée	
	28-sept-09	0	glucanémie isolée	
	16-oct-09	0	glucanémie isolée	

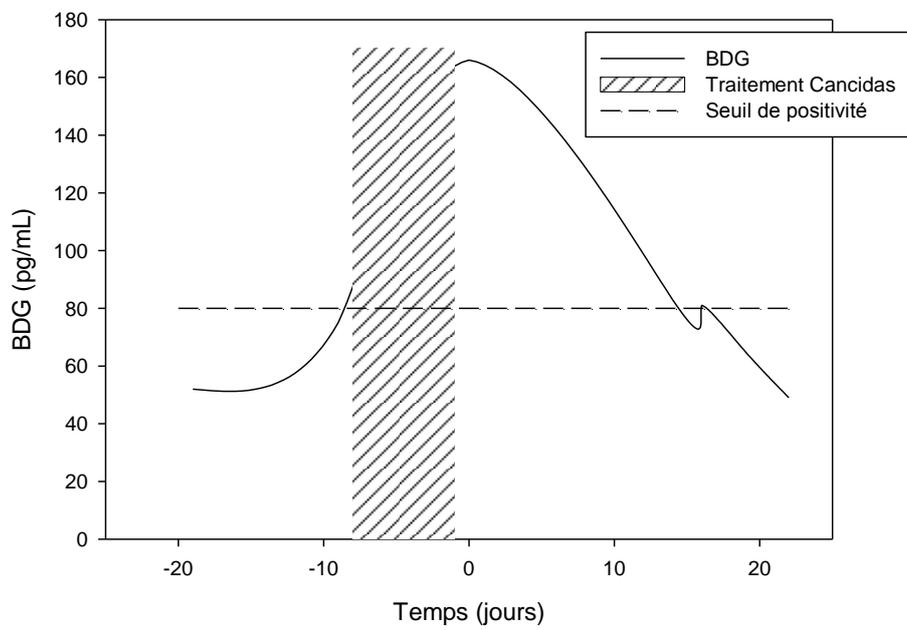
N° du patient	Date	Taux de BDG (pg/mL)	Nature de l'infection	Niveau de preuve
	26-oct-09	0	glucanémie isolée	
	01-mars-10	0	glucanémie isolée	
	08-mars-10	0	glucanémie isolée	
	16-mars-10	0	glucanémie isolée	
	22-mars-10	0	glucanémie isolée	
	29-mars-10	22	glucanémie isolée	
	06-avr-10	36	glucanémie isolée	
24	19-févr-10	278	interférence	
	09-mars-10	145	interférence	
	23-mars-10	237	interférence	
37	09-déc-08	263	interférence	
51	15-sept-08	534	interférence	
71	01-oct-08	832	interférence	
86	10-août-09	31	interférence	
	17-août-09	35	interférence	
	21-août-09	6	interférence	
	24-août-09	0	interférence	
	27-août-09	0	interférence	
	31-août-09	0	interférence	
	21-sept-09	406	interférence	
	05-oct-09	98	interférence	
	07-oct-09	93	interférence	
	28-déc-09	12	interférence	
39	09-juin-09	827	chirurgie digestive récente	probable
	18-juin-09	66	chirurgie digestive récente	probable
69	17-juin-09	163	chirurgie digestive récente	probable
	29-juin-09	21	chirurgie digestive récente	probable
	06-juil-09	58	chirurgie digestive récente	probable
82	11-août-09	442	chirurgie digestive récente	probable
3	19-oct-09	70	aucune preuve d'infection mycologique	
	27-oct-09	1047	aucune preuve d'infection mycologique	
	17-mai-10	179	aucune preuve d'infection mycologique	
10	19-janv-09	262	aucune preuve d'infection mycologique	
	27-avr-09	375	aucune preuve d'infection mycologique	
21	28-oct-08	146	aucune preuve d'infection mycologique	
33	20-nov-09	160	aucune preuve d'infection mycologique	
	24-nov-09	42	aucune preuve d'infection mycologique	
	30-nov-09	55	aucune preuve d'infection mycologique	
72	07-oct-09	216	aucune preuve d'infection mycologique	
79	04-nov-09	144	aucune preuve d'infection mycologique	
80	13-juin-08	176	aucune preuve d'infection mycologique	
93	21-déc-09	1583	aucune preuve d'infection mycologique	

**Annexe 4**

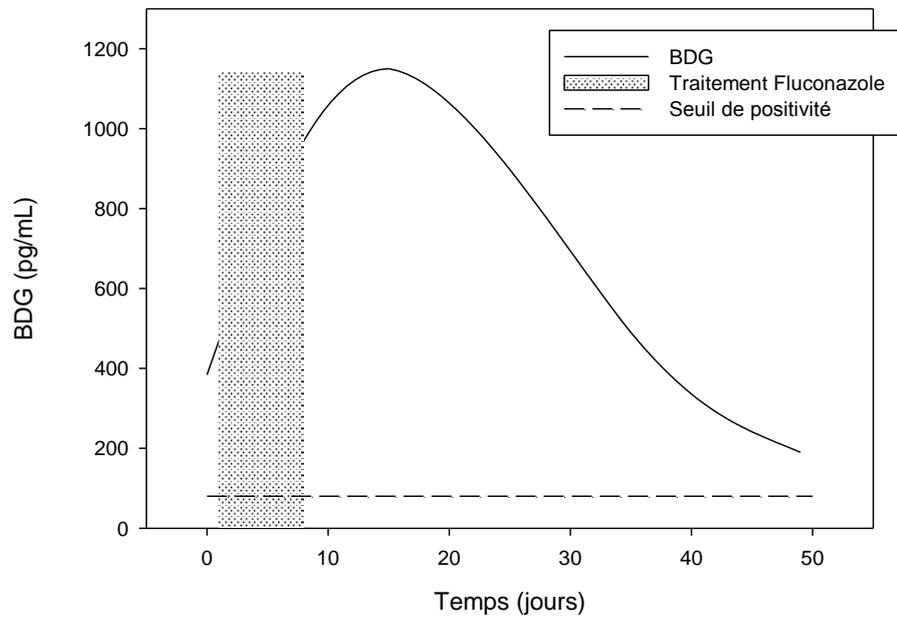
Patient 49  
Aspergillose prouvée



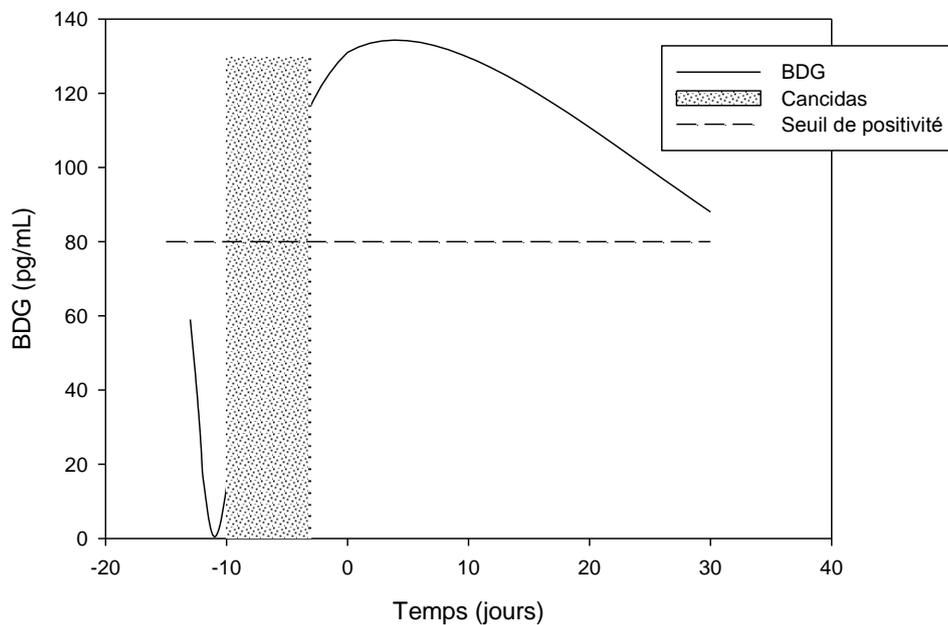
Patient 62  
Aspergillose probable



Patient 64  
Candidose probable



Patient 90  
Aspergillose prouvée



**Figure 26 :** Cinétique de circulation des BDG chez 4 patients présentant une infection fongique et traités par antifongique.

*J0 correspond à la première glucanémie positive.*

*La ligne horizontale hachurée indique le seuil significatif de la méthode.*

*L'histogramme indique la durée du traitement antifongique.*

## BIBLIOGRAPHIE

1. Pagano, L., et al., *The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study*. Haematologica, 2006. **91**(8): p. 1068-75.
2. Kauffman, C.A., *Fungal infections*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(1): p. 35-40.
3. Moran, C., et al., *Candida albicans and non-albicans bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs*. Pediatr Infect Dis J, 2009. **28**(5): p. 433-5.
4. Bouza, E. and P. Munoz, *Epidemiology of candidemia in intensive care units*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32 Suppl 2**: p. S87-91.
5. Falagas, M.E., K.E. Apostolou, and V.D. Pappas, *Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006. **25**(7): p. 419-25.
6. Neofytos, D., et al., *Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2010. **12**(3): p. 220-9.
7. Marchetti, O., et al., *ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients*. Bone Marrow Transplant, 2011.
8. Bouchara, J.P., M. Pihet et al, *Les levures et levuroses*. Cahier Bioforma ed2010.
9. Zaoutis, T.E., et al., *Invasive fungal infections in pediatric heart transplant recipients: incidence, risk factors, and outcomes*. Pediatr Transplant, 2011. **15**(5): p. 465-9.
10. Wisplinghoff, H., et al., *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 309-17.
11. Eloy, O., et al., [*Epidemiology of candidemia: results of a one month French hospitals-based surveillance study in 2004*]. Pathol Biol (Paris), 2006. **54**(8-9): p. 523-30.
12. Pappas, P.G., *Invasive candidiasis*. Infect Dis Clin North Am, 2006. **20**(3): p. 485-506.
13. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.
14. Edmond, M.B., et al., *Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(2): p. 239-44.
15. Picazo, J.J., F. Gonzalez-Romo, and F.J. Candel, *Candidemia in the critically ill patient*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32 Suppl 2**: p. S83-5.
16. Bournoux, M.E., et al., *Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome*. Intensive Care Med, 2008. **34**(2): p. 292-9.
17. Leleu, G., P. Aegerter, and B. Guidet, *Systemic candidiasis in intensive care units: a multicenter, matched-cohort study*. J Crit Care, 2002. **17**(3): p. 168-75.
18. Das, I., et al., *Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK*. Int J Infect Dis, 2011. **15**(11): p. e759-63.
19. Gudlaugsson, O., et al., *Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(9): p. 1172-7.
20. Vardakas, K.Z., et al., *Candidaemia: incidence, risk factors, characteristics and outcomes in immunocompetent critically ill patients*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(3): p. 289-92.
21. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(1): p. 133-63.
22. Tortorano, A.M., et al., *Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. **23**(4): p. 317-22.
23. Gomez, J., et al., *Nosocomial candidemia at a general hospital: the change of epidemiological and clinical characteristics. A comparative study of 2 cohorts (1993-1998 versus 2002-2005)*. Rev Iberoam Micol, 2009. **26**(3): p. 184-8.
24. Horn, D.L., et al., *Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(12): p. 1695-703.
25. Leroy, O., et al., *Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006)*. Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1612-8.
26. Arendrup, M.C., *Epidemiology of invasive candidiasis*. Curr Opin Crit Care, 2010. **16**(5): p. 445-52.

27. Yapar, N., et al., *Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: a multicenter case-control study*. *Med Mycol*, 2011. **49**(1): p. 26-31.
28. Falagas, M.E., N. Roussos, and K.Z. Vardakas, *Relative frequency of albicans and the various non-albicans Candida spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review*. *Int J Infect Dis*, 2010. **14**(11): p. e954-66.
29. Miceli, M.H., J.A. Diaz, and S.A. Lee, *Emerging opportunistic yeast infections*. *Lancet Infect Dis*, 2011. **11**(2): p. 142-51.
30. Morace, G. and E. Borghi, *Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics*. *Minerva Anestesiol*, 2010. **76**(11): p. 950-6.
31. Tortorano, A.M., et al., *Candidosis in the intensive care unit: a 20-year survey*. *J Hosp Infect*, 2004. **57**(1): p. 8-13.
32. Fernandez, J., et al., *Time to positive culture and identification for Candida blood stream infections*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009. **64**(4): p. 402-7.
33. Rodloff, C., D. Koch, and R. Schaumann, *Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis*. *Eur J Med Res*, 2011. **16**(4): p. 187-95.
34. Tortorano, A.M., et al., *Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance*. *Int J Antimicrob Agents*, 2006. **27**(5): p. 359-66.
35. Blumberg, H.M., et al., *Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey*. *Clin Infect Dis*, 2001. **33**(2): p. 177-86.
36. Garnacho-Montero, J., et al., *Risk factors for fluconazole-resistant candidemia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(8): p. 3149-54.
37. Pasqualotto, A.C., et al., *Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007. **28**(7): p. 799-804.
38. Zaoutis, T.E., et al., *Risk factors for disseminated candidiasis in children with candidemia*. *Pediatr Infect Dis J*, 2004. **23**(7): p. 635-41.
39. Guery, B.P., et al., *Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis*. *Intensive Care Med*, 2009. **35**(1): p. 55-62.
40. Piazza, O., et al., *Candidemia in Intensive Care patients. Risk factors and mortality*. *Minerva Anestesiol*, 2004. **70**(1-2): p. 63-9.
41. Wu, J.Q., et al., *Epidemiology and risk factors for non-Candida albicans candidemia in non-neutropenic patients at a Chinese teaching hospital*. *Med Mycol*, 2011. **49**(5): p. 552-5.
42. Chow, J.K., et al., *Factors associated with candidemia caused by non-albicans Candida species versus Candida albicans in the intensive care unit*. *Clin Infect Dis*, 2008. **46**(8): p. 1206-13.
43. Playford, E.G., et al., *Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans Candida spp*. *Crit Care Med*, 2008. **36**(7): p. 2034-9.
44. Cohen, Y., et al., *Early prediction of Candida glabrata fungemia in nonneutropenic critically ill patients*. *Crit Care Med*, 2010. **38**(3): p. 826-30.
45. Rupp, S., *Interactions of the fungal pathogen Candida albicans with the host*. *Future Microbiol*, 2007. **2**(2): p. 141-51.
46. Mikulska, M., et al., *Invasive candidiasis in non-hematological patients*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2011. **3**(1): p. e2011007.
47. Silva, S., et al., *Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species*. *Trends Microbiol*, 2011. **19**(5): p. 241-7.
48. Bernhardt, J., et al., *Adherence and invasion studies of Candida albicans strains, using in vitro models of esophageal candidiasis*. *J Infect Dis*, 2001. **184**(9): p. 1170-5.
49. Howlett, J.A. and C.A. Squier, *Candida albicans ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium*. *Infect Immun*, 1980. **29**(1): p. 252-60.
50. Rajasingham, K.C., S.J. Challacombe, and S. Tovey, *Ultrastructure and possible processes involved in the invasion of host epithelial cells by Candida albicans in vaginal candidosis*. *Cytobios*, 1989. **60**(240): p. 11-20.
51. Schaller, M., et al., *Invasion of Candida albicans correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis*. *J Invest Dermatol*, 2000. **114**(4): p. 712-7.
52. Bartie, K.L., et al., *Differential invasion of Candida albicans isolates in an in vitro model of oral candidosis*. *Oral Microbiol Immunol*, 2004. **19**(5): p. 293-6.
53. Zhu, W. and S.G. Filler, *Interactions of Candida albicans with epithelial cells*. *Cell Microbiol*, 2010. **12**(3): p. 273-82.
54. van de Veerdonk, F.L., B.J. Kullberg, and M.G. Netea, *Pathogenesis of invasive candidiasis*. *Curr Opin Crit Care*, 2010. **16**(5): p. 453-9.

55. Casadevall, A. and L.A. Pirofski, *Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 3703-13.
56. Bustamante, J., et al., [*Fungal infections and congenital immune deficiencies*]. Arch Pediatr, 2011. **18 Suppl 1**: p. S8-14.
57. Gauglitz, G.G., et al., *Host Defence Against Candida albicans and the Role of Pattern-recognition Receptors*. Acta Derm Venereol, 2011.
58. Romani, L., *Immunity to fungal infections*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 275-88.
59. Gow, N.A., et al., *Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization*. Nat Rev Microbiol, 2011.
60. Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet, *Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(11): p. 685-702.
61. Koh, A.Y., et al., *Mucosal damage and neutropenia are required for Candida albicans dissemination*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e35.
62. Weissgold, D.J. and D.J. D'Amico, *Rare causes of endophthalmitis*. Int Ophthalmol Clin, 1996. **36**(3): p. 163-77.
63. Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet, *Management of Candida species infections in critically ill patients*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(12): p. 772-85.
64. Karthaus, M., et al., *Long-term survival in patients with acute leukemia and chronic disseminated candidiasis despite minimal antileukemic therapy*. Haematologica, 2006. **91**(10): p. 1422-3.
65. Kontoyiannis, D.P., et al., *Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis*. Infect Dis Clin North Am, 2000. **14**(3): p. 721-39.
66. Anttila, V.J., et al., *Hepatosplenic yeast infection in patients with acute leukemia: a diagnostic problem*. Clin Infect Dis, 1994. **18**(6): p. 979-81.
67. el-Ebiary, M., et al., *Significance of the isolation of Candida species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients. An immediate postmortem histologic study*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 583-90.
68. Rex, J.H., et al., *Practice guidelines for the treatment of candidiasis*. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, 2000. **30**(4): p. 662-78.
69. Hope, W.W., T.J. Walsh, and D.W. Denning, *Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(10): p. 609-22.
70. *Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte : Conférence de consensus*, 2004.
71. Pihet, M., et al., [*Candida albicans meningo-encephalo-myelo-radiculitis at an addict*]. Ann Biol Clin (Paris), 2005. **63**(5): p. 547-52.
72. Cottle, L. and T. Riordan, *Infectious spondylodiscitis*. J Infect, 2008. **56**(6): p. 401-12.
73. Hot, A., et al., *Diagnostic contribution of positron emission tomography with [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose for invasive fungal infections*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(3): p. 409-17.
74. Horvath, L.L., et al., *Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(1): p. 115-8.
75. Horvath, L.L., et al., *Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with plus aerobic/F and anaerobic/F blood culture bottles*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4714-7.
76. Pfeiffer, C.D., et al., *Quantitation of Candida CFU in initial positive blood cultures*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(8): p. 2879-83.
77. Park, B.R., et al., *Comparative analysis of simulated candidemia using two different blood culture systems and the rapid identification of Candida albicans*. Ann Clin Lab Sci, 2011. **41**(3): p. 251-6.
78. Quindos, G., et al., *Evaluation of bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of Candida albicans*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(5): p. 1263-5.
79. Petersen, C.E., N.B. Valentine, and K.L. Wahl, *Characterization of microorganisms by MALDI mass spectrometry*. Methods Mol Biol, 2009. **492**: p. 367-79.
80. Qian, J., et al., *MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers*. Anal Bioanal Chem, 2008. **392**(3): p. 439-49.
81. Risch, M., et al., *Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria*. Swiss Med Wkly, 2010. **140**: p. w13095.
82. Dhiman, N., et al., *Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(4): p. 1614-6.
83. Alanio, A., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant Aspergillus species*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(5): p. 750-5.

84. Croxatto, A., G. Prod'hom, and G. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(2): p. 380-407.
85. Marklein, G., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(9): p. 2912-7.
86. Seyfarth, F., et al., *Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry*. Mycoses, 2011.
87. Zaluzec, E.J., D.A. Gage, and J.T. Watson, *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization*. Protein Expr Purif, 1995. **6**(2): p. 109-23.
88. Henzel, W.J., C. Watanabe, and J.T. Stults, *Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting*. J Am Soc Mass Spectrom, 2003. **14**(9): p. 931-42.
89. Pittet, D., et al., *Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients*. Ann Surg, 1994. **220**(6): p. 751-8.
90. Piarroux, R., et al., *Assessment of preemptive treatment to prevent severe candidiasis in critically ill surgical patients*. Crit Care Med, 2004. **32**(12): p. 2443-9.
91. Munoz, P., A. Burillo, and E. Bouza, *Criteria used when initiating antifungal therapy against Candida spp. in the intensive care unit*. Int J Antimicrob Agents, 2000. **15**(2): p. 83-90.
92. Kratzer, C., et al., *Design and use of Candida scores at the intensive care unit*. Mycoses, 2011. **54**(6): p. 467-74.
93. Gurcuoglu, E., et al., *Colonisation in adult patients with nosocomial candidemia*. Mycoses, 2011.
94. Leon, C., et al., *A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization*. Crit Care Med, 2006. **34**(3): p. 730-7.
95. Kedzierska, A., et al., *Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1->3)-beta-D-glucan antigens*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007. **26**(11): p. 755-66.
96. Sinha, B.K., D.P. Monga, and S. Prasad, *A combination of Gomori-Grocott methenamine silver nitrate and hematoxyline and eosin staining technique for the demonstration of Candida albicans in tissue*. Quad Sclavo Diagn, 1988. **24**(1-4): p. 129-32.
97. Sendid B., J.T., Vitse A., Fradin C., Colombel JF., Poulain D., *Glycannes pariétaux de levures et anticorps spécifiques Biomarqueurs et outils d'analyse physiopathologique des candidoses et de la maladie de Crohn*. Medecine/Science, 2009. **25**: p. 473-481.
98. Sendid, B., et al., *New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating Candida albicans mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(5): p. 1510-7.
99. Quindos, G., M.D. Moragues, and J. Ponton, *Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis?* Rev Iberoam Micol, 2004. **21**(1): p. 10-4.
100. Sendid, B., et al., *Contribution of the Platelia Candida-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic Candida tropicalis infection in neutropenic adults*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4551-8.
101. Sendid, B., et al., *Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic Candida species*. J Med Microbiol, 2002. **51**(5): p. 433-42.
102. Avni, T., L. Leibovici, and M. Paul, *PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(2): p. 665-70.
103. Khlif, M., et al., *Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(7): p. 656-61.
104. Chabasse D., e.a., *Les moisissures d'intérêt médical*. Cahier Bioforma ed2002.
105. Maertens, J., et al., *Advances in the serological diagnosis of invasive Aspergillus infections in patients with haematological disorders*. Mycoses, 2007. **50 Suppl 1**: p. 2-17.
106. Brakhage, A.A., *Systemic fungal infections caused by Aspergillus species: epidemiology, infection process and virulence determinants*. Curr Drug Targets, 2005. **6**(8): p. 875-86.
107. Fridkin, S.K. and W.R. Jarvis, *Epidemiology of nosocomial fungal infections*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(4): p. 499-511.
108. Pfeiffer, C.D., J.P. Fine, and N. Safdar, *Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(10): p. 1417-27.
109. Pagano, L., et al., *Invasive Aspergillosis in patients with acute leukemia: update on morbidity and mortality--SEIFEM-C Report*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(11): p. 1524-5.
110. von Eiff, M., et al., *Pulmonary fungal infections in patients with hematological malignancies--diagnostic approaches*. Ann Hematol, 1995. **70**(3): p. 135-41.

111. Paterson, D.L. and N. Singh, *Invasive aspergillosis in transplant recipients*. Medicine (Baltimore), 1999. **78**(2): p. 123-38.
112. Camps, I.R., *Risk factors for invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplantation*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32 Suppl 2**: p. S119-23.
113. Groll, A.H., et al., *Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital*. J Infect, 1996. **33**(1): p. 23-32.
114. Trof, R.J., et al., *Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients*. Intensive Care Med, 2007. **33**(10): p. 1694-703.
115. Vonberg, R.P. and P. Gastmeier, *Nosocomial aspergillosis in outbreak settings*. J Hosp Infect, 2006. **63**(3): p. 246-54.
116. Dagenais, T.R. and N.P. Keller, *Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(3): p. 447-65.
117. Cary, J.W. and K.C. Ehrlich, *Aflatoxigenicity in Aspergillus: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications*. Mycopathologia, 2006. **162**(3): p. 167-77.
118. Park, D.L., *Effect of processing on aflatoxin*. Adv Exp Med Biol, 2002. **504**: p. 173-9.
119. Pagano, L., et al., *Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66 Suppl 1**: p. i5-14.
120. Schwartz, S. and E. Thiel, *Update on the treatment of cerebral aspergillosis*. Ann Hematol, 2004. **83 Suppl 1**: p. S42-4.
121. Georgiadou, S.P., et al., *The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(9): p. 1144-55.
122. Caillot, D., et al., *Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia*. J Clin Oncol, 2001. **19**(1): p. 253-9.
123. Grillot, R., B. Lebeau, and P. Ambroise-Thomas, *[Invasive aspergillosis: management of mycological diagnosis]*. Pathol Biol (Paris), 1994. **42**(7): p. 675-82.
124. Tarrand, J.J., et al., *Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination*. Am J Clin Pathol, 2003. **119**(6): p. 854-8.
125. Rosa, C., et al., *Detection of Aspergillus species in BACTEC blood cultures*. J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 10): p. 1467-71.
126. Mennink-Kersten, M.A., et al., *In vitro release by Aspergillus fumigatus of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(5): p. 1711-8.
127. Boutboul, F., et al., *Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease*. Clin Infect Dis, 2002. **34**(7): p. 939-43.
128. Gangneux, J.P., et al., *Transient aspergillus antigenaemia: think of milk*. Lancet, 2002. **359**(9313): p. 1251.
129. Sulahian, A., S. Touratier, and P. Ribaud, *False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam*. N Engl J Med, 2003. **349**(24): p. 2366-7.
130. Alhambra, A., et al., *False positive galactomannan results in adult hematological patients treated with piperacillin-tazobactam*. Rev Iberoam Micol, 2007. **24**(2): p. 106-12.
131. Orlopp, K., et al., *False positivity of the Aspergillus galactomannan Platelia ELISA because of piperacillin/tazobactam treatment: does it represent a clinical problem?* J Antimicrob Chemother, 2008. **62**(5): p. 1109-12.
132. Blijlevens, N.M., et al., *Aspergillus galactomannan antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition*. Transpl Infect Dis, 2002. **4**(2): p. 64-5.
133. De Carolis, E., et al., *Species identification of Aspergillus, Fusarium and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clin Microbiol Infect, 2011.
134. Alanio, A., et al., *Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization in immunocompromised patients*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(10): p. 1531-7.
135. White, P.L., et al., *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**(4): p. 479-86.
136. von Lilienfeld-Toal, M., 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**(8): p. 2405-10.

137. Lamothe, F., et al., *Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(10): p. 3510-6.
138. Masur, H., et al., *An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1431-8.
139. Eriksson, O., *Pneumocystis carinii, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (Pneumocystidaceae, Pneumocystidales, Ascomycota)*. System Ascomycetum, 1994: p. 13 p:165-180.
140. Aliouat, E.M., et al., *Pneumocystitis carinii organisms from in vitro culture are highly infectious to the nude rat*. Parasitol Res, 1995. **81**(1): p. 82-5.
141. Medrano, F.J., et al., *Pneumocystis jirovecii in general population*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(2): p. 245-50.
142. Morris, A., et al., *Epidemiology and clinical significance of pneumocystis colonization*. J Infect Dis, 2008. **197**(1): p. 10-7.
143. Calderon, E.J., et al., *Pneumocystis carinii infection in patients with chronic bronchial disease*. Lancet, 1996. **347**(9006): p. 977.
144. Davis, J.L., et al., *Pneumocystis colonisation is common among hospitalised HIV infected patients with non-Pneumocystis pneumonia*. Thorax, 2008. **63**(4): p. 329-34.
145. Maskell, N.A., et al., *Asymptomatic carriage of Pneumocystis jirovecii in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study*. Thorax, 2003. **58**(7): p. 594-7.
146. Orholm, M., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia in AIDS patients: clinical course in relation to the parasite number found in routine specimens obtained by fiberoptic bronchoscopy*. Scand J Infect Dis, 1992. **24**(3): p. 301-7.
147. Pagano, L., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia in patients with malignant haematological diseases: 10 years' experience of infection in GIMEMA centres*. Br J Haematol, 2002. **117**(2): p. 379-86.
148. Sepkowitz, K.A., A.E. Brown, and D. Armstrong, *Pneumocystis carinii pneumonia without acquired immunodeficiency syndrome. More patients, same risk*. Arch Intern Med, 1995. **155**(11): p. 1125-8.
149. van der Lelie, J., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia in HIV-negative patients with haematologic disease*. Infection, 1997. **25**(2): p. 78-81.
150. Varthalitis, I., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia in patients with cancer. An increasing incidence*. Cancer, 1993. **71**(2): p. 481-5.
151. Stansell, J.D., et al., *Predictors of Pneumocystis carinii pneumonia in HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(1): p. 60-6.
152. Aliouat, E.M., et al., *Pneumocystis cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity*. J Eukaryot Microbiol, 1994. **41**(5): p. 71S.
153. Wakefield, A.E., et al., *Infection with Pneumocystis carinii is prevalent in healthy Gambian children*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990. **84**(6): p. 800-2.
154. Lecendre, V., *Risque d'acquisition de pneumocystis jirovecii chez le nourrisson présentant une bronchiolite: analyse rétrospective portant sur 185 nourrissons* 2003.
155. Gutierrez, S., et al., *Pneumocystis jirovecii colonization in chronic pulmonary disease*. Parasite, 2011. **18**(2): p. 121-6.
156. Engelberg, L.A., C.W. Lerner, and M.L. Tapper, *Clinical features of Pneumocystis pneumonia in the acquired immune deficiency syndrome*. Am Rev Respir Dis, 1984. **130**(4): p. 689-94.
157. Kovacs, J.A., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies*. Ann Intern Med, 1984. **100**(5): p. 663-71.
158. Ng, V.L., D.M. Yajko, and W.K. Hadley, *Extrapulmonary pneumocystosis*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 401-18.
159. Vanhems, P. and E. Toma, *Evaluation of a prognostic score. Pneumocystis carinii pneumonia in HIV-infected patients*. Chest, 1995. **107**(1): p. 107-12.
160. Fernandez, P., et al., *Prognostic factors influencing the outcome in pneumocystis carinii pneumonia in patients with AIDS*. Thorax, 1995. **50**(6): p. 668-71.
161. Cushion, M.T., S.P. Keely, and J.R. Stringer, *Molecular and phenotypic description of Pneumocystis wakefieldiae sp. nov., a new species in rats*. Mycologia, 2004. **96**(3): p. 429-38.
162. Yoshida, Y., *Ultrastructural studies of Pneumocystis carinii*. J Protozool, 1989. **36**(1): p. 53-60.
163. Naimy, G.L. and R.B. Wuerker, *Comparison of histologic stains in the diagnosis of Pneumocystis carinii*. Acta Cytol, 1995. **39**(6): p. 1124-7.
164. Procop, G.W., et al., *Detection of Pneumocystis jirovecii in respiratory specimens by four staining methods*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3333-5.

165. Traore, L., et al., *Value of an immunofluorescence assay for the detection of Pneumocystis carinii in Bronchoalveolar lavage*. J Protozool, 1991. **38**(6): p. 198S.
166. Aliouat-Denis, C.M., et al., *The Pneumocystis life cycle*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(3): p. 419-26.
167. Khot, P.D. and D.N. Fredricks, *PCR-based diagnosis of human fungal infections*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009. **7**(10): p. 1201-21.
168. Durand-Joly, I., et al., *Molecular diagnosis of Pneumocystis pneumonia*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. **45**(3): p. 405-10.
169. Huggett, J.F., et al., *Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of Pneumocystis jirovecii DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients*. Thorax, 2008. **63**(2): p. 154-9.
170. Damiani, C., et al., *Serum (1->3) {beta}-D-Glucan levels in primary infection and pulmonary colonization with Pneumocystis jirovecii*. J Clin Microbiol, 2011.
171. Persat, F., et al., *Contribution of the (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(3): p. 1009-13.
172. Desmet, S., et al., *Serum (1-3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(12): p. 3871-4.
173. Held, J., et al., *Serum (1 --> 3)-beta-D-glucan measurement as an early indicator of Pneumocystis jirovecii pneumonia and evaluation of its prognostic value*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(4): p. 595-602.
174. Shimizu, Y., et al., *Serum markers in interstitial pneumonia with and without Pneumocystis jirovecii colonization: a prospective study*. BMC Infect Dis, 2009. **9**: p. 47.
175. Labelle, A.J., et al., *Treatment-related risk factors for hospital mortality in Candida bloodstream infections*. Crit Care Med, 2008. **36**(11): p. 2967-72.
176. Ruhnke, M., K. Hartwig, and G. Kofla, *New options for treatment of candidaemia in critically ill patients*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14 Suppl 4**: p. 46-54.
177. Matsumori, N., et al., *Amphotericin B covalent dimers forming sterol-dependent ion-permeable membrane channels*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(16): p. 4180-1.
178. Maertens J, T.K.a.B.M., *Invasive Aspergillosis: Focus on New Approaches and New Therapeutic Agents*. Curr. Med. Chem. – Anti-Infective Agents, 2002. **1**: p. 65-81.
179. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Epidemiology of invasive mycoses in North America*. Crit Rev Microbiol, 2010. **36**(1): p. 1-53.
180. Sanglard, D., A. Coste, and S. Ferrari, *Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation*. FEMS Yeast Res, 2009. **9**(7): p. 1029-50.
181. Pfaller, M.A., et al., *Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant Candida*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(12): p. 5729-31.
182. Costa-de-Oliveira, S., et al., *FKS2 mutations associated with decreased echinocandin susceptibility of Candida glabrata following anidulafungin therapy*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(3): p. 1312-4.
183. Duran-Valle, M.T., et al., *Recurrent Episodes of Candidemia due to Candida glabrata with a mutation in the hot spot 1 of the FKS2 gene Developed after Prolonged Therapy with Caspofungin*. Antimicrob Agents Chemother, 2012.
184. Pfaller, M.A., et al., *Clinical breakpoints for the echinocandins and Candida revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria*. Drug Resist Updat, 2011. **14**(3): p. 164-76.
185. Dannaoui, E., et al., *Candida spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(1): p. 86-90.
186. Pfaller, M.A., *Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment*. Am J Med, 2012. **125**(1 Suppl): p. S3-13.
187. Playford, E.G. and T.C. Sorrell, *Optimizing therapy for Candida infections*. Semin Respir Crit Care Med, 2007. **28**(6): p. 678-88.
188. Pappas, P.G., et al., *Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(5): p. 503-35.
189. Walsh, T.J., et al., *Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(3): p. 327-60.
190. Playford, E.G., P. Eggimann, and T. Calandra, *Antifungals in the ICU*. Curr Opin Infect Dis, 2008. **21**(6): p. 610-9.
191. Leventakos, K., R.E. Lewis, and D.P. Kontoyiannis, *Fungal infections in leukemia patients: how do we prevent and treat them?* Clin Infect Dis, 2010. **50**(3): p. 405-15.

192. Nolla-Salas, J., et al., *Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy*. Study Group of Fungal Infection in the ICU. Intensive Care Med, 1997. **23**(1): p. 23-30.
193. Fishman, J.A., *Prevention of infection due to Pneumocystis carinii*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(5): p. 995-1004.
194. Hardy, W.D., et al., *A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole or aerosolized pentamidine for secondary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome*. AIDS Clinical Trials Group Protocol 021. N Engl J Med, 1992. **327**(26): p. 1842-8.
195. Fishman, J.A., *Treatment of infection due to Pneumocystis carinii*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(6): p. 1309-14.
196. Matos, O. and F. Esteves, *Epidemiology and clinical relevance of Pneumocystis jirovecii Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations*. Parasite, 2010. **17**(3): p. 219-32.
197. Ioannidis, J.P., et al., *A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of Pneumocystis carinii prophylactic regimens*. Arch Intern Med, 1996. **156**(2): p. 177-88.
198. Rodriguez, M. and J.A. Fishman, *Prevention of infection due to Pneumocystis spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(4): p. 770-82, table of contents.
199. Montaner, J.S., et al., *Corticosteroids prevent early deterioration in patients with moderately severe Pneumocystis carinii pneumonia and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. Ann Intern Med, 1990. **113**(1): p. 14-20.
200. Klis, F.M., et al., *Covalently linked cell wall proteins of Candida albicans and their role in fitness and virulence*. FEMS Yeast Res, 2009. **9**(7): p. 1013-28.
201. Latge, J.P., *The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell*. Mol Microbiol, 2007. **66**(2): p. 279-90.
202. Dijkgraaf, G.J., et al., *Mutations in Fks1p affect the cell wall content of beta-1,3- and beta-1,6-glucan in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2002. **19**(8): p. 671-90.
203. Shematek, E.M., J.A. Braatz, and E. Cabib, *Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of beta-(1 leads to 3)glucan synthetase*. J Biol Chem, 1980. **255**(3): p. 888-94.
204. Douglas, C.M., *Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis*. Med Mycol, 2001. **39 Suppl 1**: p. 55-66.
205. Mazur, P., et al., *Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5671-81.
206. Smith, S.E., et al., *Candida albicans RHO1 is required for cell viability in vitro and in vivo*. FEMS Yeast Res, 2002. **2**(2): p. 103-11.
207. Cabib, E., et al., *Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure*. Microbiol Sci, 1988. **5**(12): p. 370-5.
208. Roncero, C., *The genetic complexity of chitin synthesis in fungi*. Curr Genet, 2002. **41**(6): p. 367-78.
209. Merzendorfer, H., *Insect chitin synthases: a review*. J Comp Physiol B, 2006. **176**(1): p. 1-15.
210. Munro, C.A., et al., *The PKC, HOG and Ca<sup>2+</sup> signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in Candida albicans*. Mol Microbiol, 2007. **63**(5): p. 1399-413.
211. Richard, M.L. and A. Plaine, *Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Candida albicans*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(2): p. 119-33.
212. Kandasamy, R., G. Vedyappan, and W.L. Chaffin, *Evidence for the presence of pir-like proteins in Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **186**(2): p. 239-43.
213. Kanda, H., et al., *Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1-->3)-beta-D-glucan level*. Kidney Int, 2001. **60**(1): p. 319-23.
214. Ogawa, M., et al., *False-positive plasma (1-->3)-beta-D-glucan test following immunoglobulin product replacement in an adult bone marrow recipient*. Int J Hematol, 2004. **80**(1): p. 97-8.
215. Mokaddas, E., et al., *Levels of (1-->3)-beta-D-glucan, Candida mannan and Candida DNA in serum samples of pediatric cancer patients colonized with Candida species*. BMC Infect Dis, 2010. **10**: p. 292.
216. Presterl, E., et al., *Invasive fungal infections and (1,3)-beta-D-glucan serum concentrations in long-term intensive care patients*. Int J Infect Dis, 2009. **13**(6): p. 707-12.
217. 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**(12): p. 1813-21.
218. Ascioğlu, S., 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**(1): p. 7-14.
219. Miyazaki, T., et al., *Plasma (1-->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(12): p. 3115-8.

220. Yoshida, K., et al., *Clinical viability of Fungitell, a new (1->3)-beta-D: -glucan measurement kit, for diagnosis of invasive fungal infection, and comparison with other kits available in Japan.* J Infect Chemother, 2011. **17**(4): p. 473-7.
221. Kelaher, A., *Two non-invasive diagnostic tools for invasive aspergillosis: (1-3)-beta-D-glucan and the galactomannan assay.* Clin Lab Sci, 2006. **19**(4): p. 222-4.
222. Ostrosky-Zeichner, L., et al., *Multicenter clinical evaluation of the (1->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans.* Clin Infect Dis, 2005. **41**(5): p. 654-9.
223. McCormack, E., et al., *Lentian: hematopoietic, immunological, and efficacy studies in a syngeneic model of acute myeloid leukemia.* Nutr Cancer, 2010. **62**(5): p. 574-83.
224. Takesue, Y., et al., *Combined assessment of beta-D-glucan and degree of candida colonization before starting empiric therapy for candidiasis in surgical patients.* World J Surg, 2004. **28**(6): p. 625-30.
225. Pickering, J.W., et al., *Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(12): p. 5957-62.
226. White, P.L., et al., *Evaluation of Aspergillus PCR protocols for testing serum specimens.* J Clin Microbiol, 2011. **49**(11): p. 3842-8.
227. White, P.L., et al., *Critical stages of extracting DNA from Aspergillus fumigatus in whole-blood specimens.* J Clin Microbiol, 2010. **48**(10): p. 3753-5.
228. White, P.L., et al., *Aspergillus PCR: one step closer to standardization.* J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1231-40.
229. Mencacci, A., et al., *Comparison of conventional culture with SeptiFast real-time PCR for microbial pathogen detection in clinical specimens other than blood.* J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 12): p. 1774-8.
230. Senn, L., et al., *1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia.* Clin Infect Dis, 2008. **46**(6): p. 878-85.
231. Lamoth, F., et al., *beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3).* Clin Infect Dis, 2012. **54**(5): p. 633-43.
232. Maertens, J., et al., *European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3--2009 update.* Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(5): p. 709-18.
233. Eggimann, P., J. Bille, and O. Marchetti, *Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU.* Ann Intensive Care, 2011. **1**: p. 37.
234. Tissot, F., F. Lamoth, and P. Eggimann, *Monitoring of 1,3-Beta-D-Glucan in High-Risk Surgical ICU Patients for Early Diagnosis of Invasive Candidiasis : a Prospective Study of the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS).* 50th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 2010.
235. Mohr, J.F., et al., *Prospective survey of (1->3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting.* J Clin Microbiol, 2011. **49**(1): p. 58-61.
236. Digby, J., et al., *Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients.* Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(5): p. 882-5.
237. Montagna, M.T., et al., *Invasive fungal infections in neonatal intensive care units of Southern Italy: a multicentre regional active surveillance (AURORA project).* J Prev Med Hyg, 2010. **51**(3): p. 125-30.
238. Montagna, M.T., et al., *Diagnostic Performance of 1->3-beta-d-Glucan in Neonatal and Pediatric Patients with Candidemia.* Int J Mol Sci, 2011. **12**(9): p. 5871-7.
239. Akamatsu, N., et al., *Preemptive treatment of fungal infection based on plasma (1 --> 3)beta-D-glucan levels after liver transplantation.* Infection, 2007. **35**(5): p. 346-51.
240. Alexander, B.D., et al., *The (1,3){beta}-D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation.* J Clin Microbiol, 2010. **48**(11): p. 4083-8.
241. Sax, P.E., et al., *Blood (1->3)-beta-D-glucan as a diagnostic test for HIV-related Pneumocystis jirovecii pneumonia.* Clin Infect Dis, 2011. **53**(2): p. 197-202.
242. Matsumura, Y., et al., *Quantitative real-time PCR and the (1->3)-beta-d-glucan assay for differentiation between Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization.* Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(6): p. 591-7.
243. Incorporated, A.o.C.C., *Fungitell Mode d'emploi*, 2011.
244. Usami, M., et al., *Positive (1->3)-beta-D-glucan in blood components and release of (1->3)-beta-D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing.* Transfusion, 2002. **42**(9): p. 1189-95.
245. Nagasawa, K., et al., *Experimental proof of contamination of blood components by (1->3)-beta-D-glucan caused by filtration with cellulose filters in the manufacturing process.* J Artif Organs, 2003. **6**(1): p. 49-54.

246. Lu, Y., et al., *Diagnosis of invasive fungal disease using serum (1-->3)-beta-D-glucan: a bivariate meta-analysis*. Intern Med, 2011. **50**(22): p. 2783-91.
247. Odabasi, Z., et al., *Beta-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**(2): p. 199-205.
248. Pazos, C., J. Ponton, and A. Del Palacio, *Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 299-305.
249. Marty, F.M., et al., *Reactivity of (1-->3)-beta-d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3450-3.
250. Racil, Z., et al., *Difficulties in using 1,3- $\beta$ -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 9): p. 1016-22.
251. Metan, G., et al., *Can bacteraemia lead to false positive results in 1,3-beta-d-glucan test? Analysis of 83 bacteraemia episodes in high-risk patients for invasive fungal infections*. Rev Iberoam Micol, 2011.
252. De Vlieger, G., et al., *Beta-D-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(11): p. 3783-7.
253. Yasuoka, A., et al., *(1-->3) beta-D-glucan as a quantitative serological marker for Pneumocystis carinii pneumonia*. Clin Diagn Lab Immunol, 1996. **3**(2): p. 197-9.
254. Lefort, A., et al., *Diagnosis, management and outcome of Candida endocarditis*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(4): p. E99-E109.
255. Mennink-Kersten, M.A., D. Ruegebrink, and P.E. Verweij, *Pseudomonas aeruginosa as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(12): p. 1930-1.



Université Lille 2  
Droit et Santé



## Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE Cedex  
Tél. 03.20.96.40.40 - Fax 03.20.95.90.09

### DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
Vu le Décret n° 88.996 du 19 Octobre 1988 modifié relatif aux études spécialisées du troisième cycle de Pharmacie  
Vu le Décret n° 90810 du 10 Septembre 1990 fixant la réglementation du D.E.S. de Biologie Médicale  
Vu la décision du Président de l'Université en date du 17 décembre 1999 relative aux délégations de signature :

DECIDE

Article 1er : **Mademoiselle DECOOL Vanessa**

Est autorisé(e) à soutenir son mémoire en vue de l'obtention du D.E.S. de BIOLOGIE MEDICALE sur le sujet suivant :

**PLACE DU DOSAGE DES BETA-(1,3)-D-GLUCANES DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES FONGIQUES INVASIVES**

Article 2 : Ce mémoire peut tenir lieu de thèse en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Article 3 : La soutenance aura lieu le  
**Lundi 25 juin 2012 à 18 h 00 – Amphithéâtre Marie Curie**

Article 4 : Le jury est composé ainsi qu'il suit :

Président :

**Monsieur le Professeur ALIOUAT, Faculté de Pharmacie de Lille**

Membres :

**Monsieur le Professeur B. SENDID, Faculté de Médecine de Lille**

**Monsieur le Docteur S. NSEIR, C.H.R.U. de Lille**

**Monsieur le Docteur E. DEHECQ, Hôpital St Philibert, Lomme**

Lille, le 19 avril 2012

Le Doyen

  
L. DUBREUIL

**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2011/2012

**Mlle Vanessa DECOOL**

**Place du dosage des bêta-(1,3)-D-glucanes dans le diagnostic des maladies fongiques invasives**

**Mots-clés** : bêta-(1,3)-D-glucanes sériques, maladies fongiques invasives, candidose, aspergillose, pneumocystose, interférences, diagnostic

---

**Résumé :**

Le dosage des bêta-(1,3)-D-glucanes (BDG) sériques est recommandé depuis 2008 par l'EORTC/MSG en tant que critère diagnostique des maladies fongiques invasives (MFI). Cependant, la pratique quotidienne de ce marqueur a permis de révéler l'existence de plusieurs cas de réactions faussement positives.

L'objectif de notre travail est d'évaluer la place réelle de cet examen en précisant son intérêt dans le diagnostic des MFI et d'identifier ses limites en vue de permettre une interprétation pertinente des résultats et une aide à la décision thérapeutique.

Notre étude a concerné 95 patients (98 épisodes de glucanémie, 389 sérums) sélectionnés de manière rétrospective sur une période de 17 mois (2008-2010). Ces patients étaient inclus sur la base d'une suspicion clinique de MFI et pour lesquels au moins un résultat de glucanémie positive était disponible. La documentation des épisodes infectieux en vue de déterminer le niveau de certitude de MFI a concerné la consultation des dossiers cliniques, la collecte des comptes rendus d'imagerie, la pertinence des données myco-sérologiques. Près de la moitié des patients sont issus des services d'hématologie clinique et de réanimation.

Au total, parmi les patients ayant présenté une ou plusieurs glucanémie(s) positive(s), 37 % avait une preuve formelle de MFI (20 % de candidoses, 12 % d'aspergilloses et 5 % de pneumocystoses). Conformément à la classification de l'EORTC/MSG des MFI, nous avons également retrouvé des glucanémies positives chez 11 % de candidose probable, 9 % d'aspergillose probable, 3 % chez les patients ayant une aspergillose chronique et 16 % chez des patients ayant une colonisation à levures. Parmi les patients ayant présenté une glucanémie positive, 21 % n'avaient aucune preuve de MFI. C'est sur cette dernière catégorie que nous avons concentré nos investigations. Après exclusion des 3 patients ayant bénéficié d'une chirurgie digestive récente et des cas d'interférences déjà publiés, le taux de réactions faussement positives chute à 13 %. Pour 5 de ces patients, la disponibilité de plusieurs sérums prélevés de manière séquentielle a permis de révéler des glucanémies isolées et fugaces sans relation avec une MFI ou une interférence connue. Cette observation suggère la réalisation régulière de la glucanémie et de considérer comme significatives uniquement les glucanémies durables. La persistance des taux de BDG à des niveaux élevés au cours des MFI rend son utilisation inutile pour le suivi thérapeutique.

Ce travail souligne l'intérêt du BDG pour le screening des patients à haut risque de MFI. Sa positivité doit inciter les cliniciens à retenir un diagnostic de MFI et à le documenter. Il est également reconnu que la valeur prédictive négative de ce marqueur est très élevée, ce qui permet d'identifier précocement les patients ne justifiant pas d'un traitement antifongique. Son interprétation nécessite cependant un suivi sérologique régulier et un dialogue clinico-biologique permanent.

---

**Membres du jury :**

**Président :** Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT  
**Assesseur(s) :** Monsieur le Docteur Saad NSEIR  
Monsieur le Docteur Eric DEHECQ  
**Directeur :** Monsieur le Professeur Boualem SENDID