#### MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

#### REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE UNION – DISCIPLINE – TRAVAIL



N°1976/18

Année: 2017 – 2018

**THESE** 

Présentée en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

#### **BROU ETTIEN YVONNE EMMA**

COMPARAISON DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF ET LA METHODE DE CANDIDA CHROMATIC POUR L'IDENTIFICATION DES LEVURES DU GENRE CANDIDA A L'INSTITUT PASTEUR DE CÔTE D'IVOIRE

Soutenue publiquement le 03 Décembre 2018

#### **COMPOSITION DU JURY:**

Président : Monsieur YAVO WILLIAM, Professeur Titulaire

Directeur de thèse : Monsieur **MENAN EBY IGNACE HERVE**, Professeur Titulaire

Assesseurs : Monsieur **BONY FRANCOIS NICAISE**, Maître de Conférences Agrégé

Madame SANGARE TIGORI BEATRICE, Maître de Conférences Agrégé

# ADMINISTRATION ET PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

#### I. HONORARIAT

Directeurs/Doyens Honoraires : Professeur RAMBAUD André

Professeur FOURASTE Isabelle

Professeur BAMBA Moriféré

Professeur YAPO Abbé †

Professeur MALAN Kla Anglade

Professeur KONE Moussa †

Professeur ATINDEHOU Eugène

#### II. ADMINISTRATION

Directeur Professeur KONE-BAMBA Diénéba

Sous-Directeur Chargé de la Pédagogie Professeur Ag. IRIE-N'GUESSAN A.G.

Sous-Directeur Chargé de la Recherche Professeur Ag. DEMBELE Bamory

Secrétaire Principal Madame NADO-AKPRO Marie Josette

Documentaliste Monsieur N'GNIMMIEN Koffi Lambert

Intendant Monsieur GAHE Alphonse

Responsable de la Scolarité Madame DJEDJE Yolande

#### III. PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT

#### 1- PROFESSEURS TITULAIRES

M. ABROGOUA Danho Pascal Pharmacie Clinique

Mmes AKE Michèle Chimie Analytique, Bromatologie

ATTOUNGBRE HAUHOUOT M.L. Biochimie et Biologie Moléculaire

MM. DANO Djédjé Sébastien Toxicologie

GBASSI K. Gildas Chimie Physique Générale

INWOLEY Kokou André Immunologie

Mme KONE BAMBA Diéneba Pharmacognosie

M. KOUADIO Kouakou Luc Hydrologie, Santé Publique

Mme KOUAKOU-SIRANSY Gisèle Pharmacologie

MM. MALAN Kla Anglade Chimie Ana., contrôle de qualité

MENAN Eby Ignace Parasitologie - Mycologie

MONNET Dagui Biochimie et Biologie Moléculaire

Mme SAWADOGO Duni Hématologie

M. YAVO William Parasitologie - Mycologie

#### 2- MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. AHIBOH Hugues Biochimie et Biologie moléculaire

Mme AKE-EDJEME N'guessan Angèle Biochimie et Biologie moléculaire

MM. AMARI Antoine Serge G. Législation

AMIN N'Cho Christophe Chimie analytique

BONY François Nicaise Chimie Analytique

DALLY Laba Ismael Pharmacie Galénique

DEMBELE Bamory Immunologie

DJOHAN Vincent Parasitologie -Mycologie

Mme IRIE-N'GUESSAN Geneviève Pharmacologie

M. KOFFI Angely Armand Pharmacie Galénique

Mme KOUAKOU-SACKOU Julie Santé Publique

MM. KOUASSI Dinard Hématologie

LOUKOU Yao Guillaume Bactériologie-Virologie

OGA Agbaya Stéphane Santé publique et Economie de la santé

OUASSA Timothée Bactériologie-Virologie

OUATTARA Mahama Chimie organique, Chimie thérapeutique

SANGARE TIGORI Béatrice Toxicologie

MM. YAPI Ange Désiré Chimie organique, chimie thérapeutique

ZINZENDORF Nanga Yessé Bactériologie-Virologie

#### 3- MAITRES-ASSISTANTS

MM. ADJAMBRI Adia Eusebé Hématologie

ADJOUNGOUA Attoli Léopold Pharmacognosie

Mmes ABOLI-AFFI Mihessé Roseline Immunologie

AKA ANY-GRAH Armelle Adjoua S. Pharmacie Galénique

ALLA-HOUNSA Annita Emeline Santé Publique

M. ANGORA Kpongbo Etienne Parasitologie - Mycologie

Mmes AYE-YAYO Mireille Hématologie

BAMBA-SANGARE Mahawa Biologie Générale

BARRO-KIKI Pulchérie Parasitologie - Mycologie

MM. CABLAN Mian N'Dedey Asher Bactériologie-Virologie

CLAON Jean Stéphane Santé Publique

Mmes BLAO-N'GUESSAN Amoin Rebecca J. Hématologie

DIAKITE Aïssata Toxicologie

DONOU-N'DRAMAN Aha Emma Hématologie

M. EFFO Kouakou Etienne Pharmacologie

Mme FOFIE N'Guessan Bra Yvette Pharmacognosie

MM. KABRAN Tano Kouadio Mathieu Immunologie

KASSI Kondo Fulgence Parasitologie-Mycologie

Mme KONAN-ATTIA Akissi Régine Santé publique

M. KONAN Konan Jean Louis Biochimie et Biologie moléculaire

Mme KONATE Abibatou Parasitologie-Mycologie

M. KOUAME Dénis Rodrigue Immunologie

Mme KOUASSI-AGBESSI Thérèse Bactériologie-Virologie

MM. KPAIBE Sawa André Philippe Chimie Analytique

MANDA Pierre Toxicologie

N'GUESSAN Alain Pharmacie Galénique

Mme VANGA-BOSSON Henriette Parasitologie-Mycologie

M. YAYO Sagou Eric Biochimie et Biologie moléculaire

#### 4- ASSISTANTS

MM. ADIKO Aimé Cézaire Immunologie

AMICHIA Attoumou Magloire Pharmacologie

Mmes AKOUBET-OUAYOGODE Aminata Pharmacognosie

ALLOUKOU-BOKA Paule-Mireille Législation

TAHOU-APETE Sandrine Bactériologie-Virologie

BEDIAKON-GOKPEYA Mariette Santé publique

MM. BROU Amani Germain Chimie Analytique

BROU N'Guessan Aimé Pharmacie clinique et thérapeutique

COULIBALY Songuigama Chimie organique, chimie thérapeutique

DJADJI Ayoman Thierry Lenoir Pharmacologie

DJATCHI Richmond Anderson Bactériologie-Virologie

Mmes DOTIA Tiepordan Agathe Bactériologie-Virologie

KABLAN-KASSI Hermance Hématologie

MM. KACOU Alain Chimie organique, chimie thérapeutique

KAMENAN Boua Alexis Thierry Pharmacie clinique et thérapeutique

KOFFI Kouamé Santé publique

KONAN Jean Fréjus Biophysique

Mme KONE Fatoumata Biochimie et Biologie moléculaire

MM. KOUAHO Avi Kadio Tanguy Chimie organique, chimie thérapeutique

KOUAKOU Sylvain Landry Pharmacologie

KOUAME Jérôme Santé publique

Mme KRIZO Gouhonon Anne-Aymonde Bactériologie-Virologie

MM. LATHRO Joseph Serge Bactériologie-Virologie

MIEZAN Jean Sébastien Parasitologie-Mycologie

N'GBE Jean Verdier Toxicologie

N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul Chimie organique, chimie thérapeutique

Mmes N'GUESSAN Kakwokpo Clémence Pharmacie Galénique

N'GUESSAN-AMONKOU Anne Cynthia Législation

ODOH Alida Edwige Pharmacognosie

SIBLI-KOFFI Akissi Joëlle Biochimie et Biologie moléculaire

SICA-DIAKITE Amelanh Chimie organique, chimie thérapeutique

TANOH-BEDIA Valérie Parasitologie-Mycologie

M. TRE Eric Serge Chimie Analytique

Mme KOUASSI-TUO Awa Pharmacie Galénique

M. YAPO Assi Vincent De Paul Biologie Générale

Mme YAPO-YAO Carine Mireille Biochimie

#### 5- CHARGES DE RECHERCHE

Mmes ADIKO N'dri Marcelline Pharmacognosie

OUATTARA N'gnôh Djénéb Santé publique

#### 6- ATTACHE DE RECHERCHE

M. LIA Gnahoré José Arthur Pharmacie Galénique

#### 7- IN MEMORIUM

Feu KONE Moussa Professeur Titulaire

Feu YAPO Abbé Etienne Professeur Titulaire

Feu COMOE Léopold Maître de Conférences Agrégé

Feu POLNEAU-VALLEE Sandrine Maître de Conférences Agrégé

Feu GUEU Kaman Maître Assistant

Feu ALLADOUM Nambelbaye Assistant

Feu COULIBALY Sabali Assistant

Feu TRAORE Moussa Assistant

Feu YAPO Achou Pascal Assistant

#### IV. ENSEIGNANTS VACATAIRES

#### 1- PROFESSEURS

M. DIAINE Charles Biophysique

OYETOLA Samuel Chimie Minérale

#### 2- MAITRES DE CONFERENCES

M. KOUAKOU Tanoh Hilaire Botanique et Cryptogamie

YAO N'Dri Athanase Pathologie Médicale

#### 3- MAITRE-ASSISTANT

M. KONKON N'Dri Gilles Botanique, Cryptogamie

#### 4- NON UNIVERSITAIRES

MM. AHOUSSI Daniel Ferdinand Secourisme

COULIBALY Gon Activité sportive

DEMPAH Anoh Joseph Zoologie

GOUEPO Evariste Techniques officinales

Mme KEI-BOGUINARD Isabelle Gestion-Comptabilité

MM KOFFI Alexis Anglais

KOUA Amian Hygiène

KOUASSI Ambroise Management

AHOUSSI Ferdinand Secourisme

KONAN Kouacou Diététique

Mme PAYNE Marie Santé Publique

# COMPOSITION DES DEPARTEMENTS DE L'UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

#### I. <u>BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE</u>

Professeurs LOUKOU Yao Guillaume Maître de Conférences Agrégé

Chef de département

OUASSA Timothée Maître de Conférences Agrégé

ZINZENDORF Nanga Yessé Maître de Conférences Agrégé

Docteurs CABLAN Mian N'Dédey Asher Maître-Assistant

KOUASSI-AGBESSI Thérèse Maître-Assistante

TAHOU-APETE Sandrine Assistante

DJATCHI Richmond Anderson Assistant

DOTIA Tiepordan Agathe Assistante

KRIZO Gouhonon Anne-Aymonde Assistante

LATHRO Joseph Serge Assistant

#### II. <u>BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION</u> <u>ET PATHOLOGIE MEDICALE</u>

Professeurs MONNET Dagui Professeur Titulaire

Chef de Département

HAUHOUOT-ATTOUNGBRE M.L. Professeur Titulaire

AHIBOH Hugues Maître de Conférences Agrégé

AKE-EDJEME N'Guessan Angèle Maître de Conférences Agrégé

Docteurs KONAN Konan Jean Louis Maître-Assistant

YAYO Sagou Eric Maître-Assistant

KONE Fatoumata Assistante

SIBLI-KOFFI Akissi Joëlle Assistante

YAPO-YAO Carine Mireille Assistante

#### III. BIOLOGIE GENERALE, HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Professeurs SAWADOGO Duni Professeur Titulaire

Chef du Département

INWOLEY Kokou André Professeur Titulaire

DEMBELE Bamory Maître de Conférences Agrégé

KOUASSI Dinard Maître de Conférences Agrégé

Docteurs ABOLI-AFFI Mihessé Roseline Maître-Assistante

ADJAMBRI Adia Eusebé Maître-Assistant

AYE-YAYO Mireille Maître-Assistante

BAMBA-SANGARE Mahawa Maître-Assistante

DONOU-N'DRAMAN Aha Emma Maître-Assistante

KABRAN Tano K. Mathieu Maître-Assistant

KOUAME Dénis Rodrigue Maître-Assistant

BLAO-N'GUESSAN A. Rebecca S. Maître-Assistante

ADIKO Aimé Cézaire Assistant

KABLAN-KASSI Hermance Assistante

YAPO Assi Vincent De Paul Assistant

# IV. CHIMIE ANALYTIQUE, CHIMIE MINERALE ET GENERALE, TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

Professeurs MALAN Kla Anglade Professeur Titulaire

Chef de Département

AKE Michèle Professeur Titulaire

GBASSI Komenan Gildas Professeur Titulaire

AMIN N'Cho Christophe Maître de Conférences Agrégé

BONY Nicaise François Maître de Conférences Agrégé

Docteurs KPAIBE Sawa André Philippe Maître-Assistant

BROU Amani Germain Assistant

TRE Eric Serge Assistant

#### V. <u>CHIMIE ORGANIQUE ET CHIMIE THERAPEUTIQUE</u>

Professeurs OUATTARA Mahama Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département

YAPI Ange Désiré Maître de Conférences Agrégé

Docteur COULIBALY Songuigama Assistant

KACOU Alain Assistant

KOUAHO Avi Kadio Tanguy Assistant

N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul Assistant

SICA-DIAKITE Amelanh Assistante

#### VI. PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE, BIOLOGIE ANIMALE ET ZOOLOGIE

Professeurs MENAN Eby Ignace H. Professeur Titulaire

Chef de Département

YAVO William Professeur Titulaire

DJOHAN Vincent Maître de Conférences Agrégé

Docteurs ANGORA Kpongbo Etienne Maître-Assistant

BARRO-KIKI Pulchérie Maître-Assistante

KASSI Kondo Fulgence Maître-Assistant

KONATE Abibatou Maître-Assistant

VANGA-BOSSON Henriette Maître-Assistante

MIEZAN Jean Sébastien Assistant

TANOH-BEDIA Valérie Assistante

# VII. PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE, COSMETOLOGIE, GESTION ET LEGISLATION PHARMACEUTIQUE

Professeurs KOFFI Armand Angelly Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département

AMARI Antoine Serge G. Maître de Conférences Agrégé

DALLY Laba Ismaël Maître de Conférences Agrégé

Docteurs AKA ANY-GRAH Armelle A.S. Maître-Assistante

N'GUESSAN Alain Maître-Assistant

ALLOUKOU-BOKA P. Mireille Assistante

LIA Gnahoré José Arthur Attaché de recherche

N'GUESSAN Kakwokpo Clémence Assistante

N'GUESSAN-AMONKOU A. Cynthia Assistante

KOUASSI-TUO Awa Assistante

# VIII. PHARMACOGNOSIE, BOTANIQUE, BIOLOGIE VEGETALE, CRYPTOGAMIE

Professeur KONE-BAMBA Diénéba Professeur Titulaire

Chef de Département

Docteurs ADJOUGOUA Attoli Léopold Maître-Assistant

FOFIE N'Guessan Bra Yvette Maître-Assistante

ADIKO N'dri Marcelline Chargée de recherche

AKOUBET-OUAYOGODE Aminata Assistante

ODOH Alida Edwige Assistante

# IX. PHARMACOLOGIE, PHARMACIE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE ET PHYSIOLOGIE HUMAINE

Professeurs ABROGOUA Danho Pascal Professeur Titulaire

Chef de Département

KOUAKOU-SIRANSY N'doua G. Professeur Titulaire

IRIE-N'GUESSAN Amenan G. Maître de Conférences Agrégé

Docteurs EFFO Kouakou Etienne Maître-Assistant

AMICHIA Attoumou M Assistant

BROU N'Guessan Aimé Assistant

DJADJI Ayoman Thierry Lenoir Assistant

KAMENAN Boua Alexis Assistant

KOUAKOU Sylvain Landry Assistant

# X. PHYSIQUE, BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, STATISTIQUES <u>ET INFORMATIQUE</u>

Professeur GBASSI Komenan Gildas Professeur titulaire

Chef de Département

Docteur KONAN Jean-Fréjus Assistant

#### XI. SANTE PUBLIQUE, HYDROLOGIE ET TOXICOLOGIE

Professeurs KOUADIO Kouakou Luc Professeur Titulaire

Chef de département

DANO Djédjé Sébastien Professeur Titulaire

OGA Agbaya Stéphane Maître de Conférences Agrégé

KOUAKOU-SACKOU Julie Maître de Conférences Agrégé

SANGARE-TIGORI Béatrice Maître de Conférences Agrégé

Docteurs CLAON Jean Stéphane Maître-Assistant

# COMPARAISON DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF ET LA METHODE DE CANDIDA CHROMATIC POUR L'IDENTIFICATION DES LEVURES DU GENRE CANDIDA A L'INSTITUT PASTEUR DE CÔTE D'IVOIRE

MANDA Pierre Maître-Assistant

DIAKITE Aissata Maître-Assistante

HOUNSA-ALLA Annita Emeline Maître-Assistante

KONAN-ATTIA Akissi Régine Maître-Assistante

OUATTARA N'gnôh Djénéba Chargée de Recherche

BEDIAKON-GOKPEYA Mariette Assistante

KOFFI Kouamé Assistant

KOUAME Jérôme Assistant

N'GBE Jean Verdier Assistant



Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, je dédie ce travail :

#### A DIEU Tout-Puissant

Mon Créateur, mon DIEU, je ne saurais te remercier pour tous tes bienfaits dans ma vie. A toi toute la gloire! Tu as toujours été présent dans les moments difficiles, tu m'as apporté ton réconfort. Merci d'avoir été mon soutien tout au long de ma formation au sein de cette faculté. Que ta bénédiction ne cesse de m'accompagner tout au long de ma vie. Merci mon Dieu!

#### A Mon Très Cher Père BROU KOFFI

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi, ainsi que ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ton amour, ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le Tout-Puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

#### A Ma Très Chère Mère NEPKEHI AIMEE

Affable, honorable, aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le Tout-Puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur afin que je puisse te combler à mon tour.

#### A Ma Très Chère Mère AKASSI MARIE EPSE BROU KOFFI

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de consentir à mon égard depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Tu m'as comblé avec ta tendresse et ton affection tout au long de mon parcours. En ce jour mémorable pour moi, reçois ce travail en signe de ma vive reconnaissance et de ma profonde estime. Puisse le Tout-Puissant te donner santé, bonheur et longue vie.

#### A Mes Très Cher (e) s Frères et Sœurs

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je vous porte. Je vous remercie pour votre affection si sincère. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

#### A Mon Très Cher Oncle Docteur BROU AKA NOEL et sa famille

Vous avez toujours été là pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie professionnelle et personnelle. Veuillez trouver, dans ce modeste travail, ma reconnaissance pour tous vos efforts.

# A Mes Très Chers Oncles N'GADI DOMINIQUE et AHONDJON VINCENT

Je vous dis merci pour votre affection et votre soutien. Recevez ici ma profonde reconnaissance.

### A Tout Les Membres De Ma Famille, Petits Et Grands

Veuillez trouver, dans ce modeste travail, l'expression de mon affection.

#### A Mon Bébé KRYS KYLIAN

Je bénis le nom du Seigneur pour ta vie et pour la grâce qu'il m'a faite d'être ta mère. Tu es ma source de motivation et ma force. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

Je t'exprime, à travers ce travail, tout mon amour et mon affection.

#### A Mon Très Cher Fiancé JEAN CYRIL ODJAPO

Ma vie à tes côtés est remplie de belles surprises.

Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réaliser ce travail. Merci pour tes conseils et tes encouragements. Que Dieu réunisse nos chemins pour un long engagement commun heureux et serein, et que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère.

## A mes Cher (e) s Ami (e) s

BONY Nelly, N'DIAYE Ali, KAMARA Adjara, DJONWAN Franck ACKAH Maryse, KOUADIO Awa, DOUBOUYOU Ingrid

### A Tous mes Ami (e) s de la 33º Promotion (La P7E), ma seconde famille

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unie et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.



## A mon Maître, mon Directeur de thèse, Le Professeur MENAN EBY IGNACE,

La valeur n'attend vraiment point le nombre des années, Vous avez su vous imposer dans cette UFR tant par votre caractère que par votre dévouement au travail.

Travailler avec vous sur cette thèse m'a permis de connaître encore une autre de vos facettes.

Rigoureux et attentif au moindre détail, vous n'avez fait que confirmer l'estime que j'avais pour vous.

Merci d'avoir dirigé ces travaux. J'espère avoir répondu à vos attentes.

Aux Docteurs ANGORA ETIENNE et MIEZAN SEBASTIEN

Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, vos conseils pour l'élaboration de ce travail. N'eût été votre apport tant dans la forme que dans le contenu, ce travail, qui est aussi le vôtre, n'aurait pas vu le jour. Merci pour tout.

Que DIEU vous le rende au centuple.

## A tous les enseignants de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Merci à vous de nous avoir transmis vos connaissances.

#### Aux Docteurs BONOUMAN-IRA Valérie, AKA Edwige et CISSE

Grand merci à vous pour votre contribution à l'élaboration de cette œuvre.

Dieu vous bénisse!

# A Tout le personnel de l'unité de Mycologie de l'IPCI de Cocody et d'Adiopodoumé

Merci pour votre contribution à l'élaboration de ce travail. Que DIEU vous bénisse!

# A Madame la directrice de l'IPCI, le professeur DOSSO Mireille

Pour votre autorisation et votre accueil chaleureux qui ont facilité ce travail, je vous dis infiniment merci.

A Dr YORO Cyrille, enseignant chercheur à l'UFR Criminologie de l'Université Félix Houphouët Boigny, à Mr N'GNIMMIEN Koffi Lambert, documentaliste à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, à Mr Gueu Emmanuel

Grand merci à vous pour votre contribution à l'élaboration de ce travail.

Dieu vous bénisse!

#### A tous

Mes infinis remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à ma formation depuis la maternelle jusqu'à ce jour. Je pense aussi à tous les autres membres de ma famille. Je vous témoigne ma gratitude car ce travail est en partie le fruit de votre soutien.

# A NOS MAÎTRES ET JUGES

# A notre Maître, notre Président de jury Monsieur le professeur YAVO WILLIAM

- ➤ Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan au Département de Parasitologie-Mycologie
- Docteur en pharmacie diplômé de l'université de Cocody
- > Titulaire d'une maîtrise en Santé Publique
- > Titulaire d'un Doctorat unique de Biologie Humaine et Tropicale, option Parasitologie
- ➤ Biologiste des hôpitaux (CES de Parasitologie-Mycologie, de Biochimie clinique et Hématologie)
- Pharmacien-biologiste au laboratoire de Microbiologie de l'INSP d'Adjamé
- Chef du Centre de Recherche et de Lutte contre le Paludisme de l'INSP
- Sous-directeur de la formation et de la recherche à l'INSP
- ➤ Ancien interne des hôpitaux de Côte d'Ivoire (Lauréat du Concours d'Internat de 1997),
- Membre titulaire de la Société de Pathologie Exotique (France)
- ➤ Vice Président de la Société Africaine de Recherche et de Contrôle de la résistance aux antimicrobiens
- Membre de la Société Africaine de Parasitologie
- Vice Président de la Société Ivoirienne de Parasitologie et de Mycologie.

#### Cher maître

Nous ne saurions vous exprimer toute notre reconnaissance au grand honneur que vous nous faites en acceptant la présidence de ce jury de thèse. Votre simplicité, votre disponibilité et votre rigueur sont autant de qualités que nous avons admirées. Nous sommes fiers de vous voir rehausser de votre présence notre jury de thèse.

Nous vous remercions très sincèrement et nous vous assurons notre profond respect.

Que Dieu vous bénisse.

# A notre maître et Directeur de thèse Monsieur le Professeur MENAN EBY IGNACE HERVE

- ➤ Professeur Titulaire de Parasitologie et Mycologie à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan
- ➤ Chef du Département de Parasitologie Mycologie Zoologie Biologie Animale de l'UFR SPB
- ➤ Docteur en Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Montpellier I (Thèse unique, PhD)
- ➤ Directeur du Centre de Diagnostic et de recherche sur le SIDA et les autres maladies infectieuses (CeDReS)
- Directeur Général de CESAM, laboratoire du Fonds de Prévoyance Militaire
- Officier supérieur (Colonel) du Service de Santé des Armées de la RCI
- Ancien Interne des Hôpitaux d'Abidjan (Lauréat du concours 1993)
- Lauréat du prix PASRES-CSRS des 3 meilleurs chercheurs ivoiriens en 2011
- Membre du Conseil Scientifique de l'Université FHB
- ➤ Membre du Comité National des Experts Indépendants pour la vaccination et les vaccins de Côte d'Ivoire
- Vice-Président du Groupe scientifique d'Appui au PNLP
- Ex-Président de la Société Ivoirienne de Parasitologie (SIPAM)
- ➤ Vice-Président de la Société Africaine de Parasitologie (SOAP)
- Membre de la Société Française de Parasitologie
- Membre de la Société Française de Mycologie médicale

#### Cher Maître,

Vous avez bien voulu accepter de diriger ce travail; nous en sommes honorés. La qualité et la clarté de votre enseignement nous ont séduits. Nous sommes fiers de nous compter parmi vos élèves. Votre abord facile, votre esprit d'ouverture, votre rigueur scientifique et votre abnégation, associés à votre qualité de Maître formateur font de vous un modèle à suivre.

Veuillez accepter, cher Maître, nos remerciements pour la qualité de l'enseignement tout au long de ce travail.

Que Dieu vous garde encore longtemps.

# A notre maître et juge Monsieur le Professeur BONY FRANCOIS NICAISE

- Maitre de conférences agrégé en Chimie Analytique Bromatologie
- > Doctorat de l'Université Paris-Sud, France, option Chimie Analytique
- > Docteur en Pharmacie
- ➤ Pharmacien analyse (DESS en contrôle qualité médicaments, aliments et produits cosmétiques)
- ➤ Chef du laboratoire de contrôle des médicaments au laboratoire National de la santé publique (LNSP) de Côte d'Ivoire
- Ancien interne des hôpitaux de Côte d'Ivoire
- ➤ Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM)
- ➤ Membre de la société Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI)

Cher Maître,

Nous avons été sensibles à vos qualités d'enseignant doublé de qualités humaines.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre reconnaissance pour le grand honneur que vous nous faites de compter parmi nos juges.

Permettez-nous de vous témoigner notre profonde gratitude et l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

Que Dieu vous bénisse.

# A notre maître et juge Madame le Professeur SANGARE TIGORI BEATRICE

- ➤ Professeur en Toxicologie (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- > Docteur en pharmacie
- ➤ Titulaire d'un Doctorat (PhD) en Toxicologie
- Experte en Toxicologie et Produits Pharmaceutiques près les Tribunaux de Côte d'Ivoire
- ➤ Pharmacien analyste au Laboratoire National de Santé Publique (LNSP)
- ➤ Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de Valorisation de la Pharmacopée Africaine (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- ➤ Titulaire du DESS de Toxicologie (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- ➤ Membre de la Société Savante Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI).
- ➤ Membre de la Société Ivoirienne de Toxicologie (SITOX)
- ➤ Membre de la Société Française de Toxicologie (SFI)
- ➤ Membre du Bureau National d'Ordre des Pharmaciens de Côte d'Ivoire(Conseil central 3)

#### Cher maître

Vous avez accepté avec courtoisie ainsi qu'avec beaucoup de sympathie de juger ce travail. Nous somme sûr d'avoir fait le bon choix lorsque nous vous avons approché. Merci pour votre disponibilité et votre humilité.

Veuillez trouver ici, le témoignage de notre profond respect.

#### Que Dieu vous bénisse

#### **SOMMAIRE**

LISTE DES ABREVIATIONS	XXX
LISTE DES TABLEAUX	XXXI
LISTE DES FIGURES	XXXII
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	5
CHAPITRE I : IDENTIFICATION FONGIQUE	6
I-DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES CANDIDOSES AU LABORAT	OIRE6
II- IDENTIFICATION DES LEVURES	19
CHAPITRE II : LA SPECTROMETRIE DE MASSE DE TYPE MAL	
I-HISTORIQUE ET PRINCIPE GENERAL D'UN SPECTROMETRE MASSE	
II-LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF	26
DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE	36
CHAPITRE I: MATERIEL ET METHODES	
I.MATERIEL	38
II-METHODES	42
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	53
I.RESULTATS ET COMMENTAIRES	54
I.1 CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES	54
I.2 CARACTERISTIQUES CLINIQUES	56
I.3 RESUTATS DES ANALYSES MYCOLOGIQUES ET SPECTROMETRIQUES	58
II- DISCUSSION	
CONCLUSION	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIOUES	
N D D D D D D D D D D D D D D D D D D D	(0.)

#### **LISTE DES ABREVIATIONS**

- **ED**: Examen Direct
- **KOH**: Hydroxyde de Potassium
- **IPCI**: Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
- MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
- IC: Identification Conventionnelle
- **SM**: Spectrométrie de Masse
- MGG: May-Grunwald-Giemsa
- LBA: Lavage Broncho-Alvéolaire
- **PAS**: Acide Périodique de Schiff
- **HES**: Hématéine Eosine Safran
- **RAT**: Riz-Agar-Tween 80
- **pH**: Potentiel Hydrogène
- **PCB**: Pomme de terre-Carotte-Bile
- **ITS**: Internal Transcribed Spacer
- **IGS**: InterGenic Spacer
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- **PCR**: Polymerase Chain Reaction
- **NCBI**: National Center for Biotechnology Information
- **CBS:** Commission des Systèmes de Bases
- **kDa**: Kilo Dalton
- m/z: masse / charge
- SIL : Système Informatique du Laboratoire
- **ID**: Identifiant
- SPSS: Statistical Package for the Social Science

#### LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Modalités des prélévements selon la localisation superficielle
ou profonde de la candidose9
Tableau II: Caractéristiques des différentes galeries d'identification
Commercialisées23
Tableau III: Répartition des sujets en fonction motis d'analyses57
Tableau IV: Répartition des espèces par la méthode de Candida Chromatic 58
Tableau V: Répartition des espèces par la méthode MALDI-TOF MS59
Tableau VI: Répartition des espèces non identifiées par la méthode
Chromatique mais identifiées par le MALDI-TOF60
Tableau VII: Corrélation méthode Chromatique et méthode MALDI-
TOF62
Tableau VIII: Biais, intervalles de confiance (IC) à 95%, limites de
concordance des biais observésentre le MALDI-TOF MS
et la méthode chromatic62
Tableau IX: Coefficient de corrélation de Pearson et son intervalle
de confiance à 95%64

#### LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Démarche diagnostique pour l'identification d'une levure au
laboratoire7
Figure 2 : Levures ou blastospores
Figure 3 : Levures et filaments (mycélium)
Figure 4 : Examen direct des prélèvements
Figure 5 : Culture sur milieu chromogénique : Mise en évidence d'une
association de différentes espèces de Candida (C. albicans, C.
glabrata, C. krusei, C. parapsilosis et C. tropicalis) sur milieu
Candida ID®216
Figure 6: Milieux fluorogéniques
Figure 7 : Flacon type BacT /ALERT18
Figure 8: Etapes préalables à l'identification de micro-organismes par
MALDI-TOF MS29
Figure 9 : Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF30
Figure 10 : Analyse par le MALDITOF
Figure 11: Exemple de spectre MALDITOF ( <i>E.coli</i> )
Figure 12: Schématisation du MALDITOF
Figure 13: Spectromètre de masse VITEK MS® et son unité informatique 40
Figure 14 : Fonctionnement du VITEK ms
Figure 15 : Dépôt du contrôle de qualité
Figure 16: Interface de création MYLA®Prep station
Figure 17: Lame DS
Figure 18: Porte-lames
Figure 19: Insertion du support de plaque dans l'automate VITEK MS® 50
Figure 20: Tableau interprétatif du score d'identification
Figure 21: Tableau interprétatif du niveau de confiance d'identification 51
Figure 22: Répartition de la population étudiée selon le sexe
Figure 23: Répartition de la population en fonction du lieu de provenance 55

Figure 24: Répartition de la population selon le type de prélèvement 56
Figure 25 : Position des nuages de points par rapport à la droite d'égalité
y=ax+b (en noir) et la droite de régression linéaire (en rouge) de
la méthode MALDI-TOF par rapport à la méthode Chromatique61
Figure 26 : Biais du nombre de parasites entre la méthode MALDI-TOF
et laméthode Candida chromatique en fonction des vraies
valeurs estimées de la moyenne (Méthode MALDITOF +
Méthode Chromatique) / 263

# INTRODUCTION

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires omniprésents à la surface du sol et des plantes, en particulier sur des substrats riches en sucres [1,2]. Parmi les plus connues, le genre *Candida* recouvre **plus de 200 espèces** dont une vingtaine possède un pouvoir pathogène chez l'homme, responsable des mycoses de types Candidoses [3].

Les *Candida* sont des levures, dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisants locaux ou généraux. Le spectre clinique s'étend des formes localisées (cutanées et/ou muqueuses), d'une grande fréquence en médecine générale, aux atteintes invasives rencontrées chez les patients hospitalisés cumulant de nombreux facteurs de risque et dont le pronostic est souvent réservé [4].

Les études récentes concernant l'épidémiologie des mycoses invasives ont mis en évidence une modification significative du profil d'espèces de *Candida* impliquées en pathologie humaine. Dans la majorité de ces études, y compris une large cohorte de 2019 patients candidémiques enrôlés entre 2004 et 2008, *C. albicans* représente moins de 50 % des isolats [5, 6]. Bien que les isolats de *C. albicans* soient majoritairement sensibles aux antifongiques, d'autres espèces comme *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. bracarensis*, *C. nivariensis*, *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* sont caractérisées par une résistance intrinsèque ou une faible sensibilité aux triazolés, à l'amphotéricine B ou aux échinocandines [6-11]. Il est donc essentiel de tenir compte de ces modifications lors de la prise en charge thérapeutique des patients. Les conférences de consensus recommandent d'ailleurs d'ajuster le traitement antifongique de première ligne, en tenant compte de l'identité de l'espèce et de son profil de sensibilité aux antifongiques [7, 11].

L'identification de l'espèce demeure donc un élément déterminant dans la prédiction de la réponse au traitement antifongique.

Les méthodes conventionnelles mises en œuvre pour l'identification des levures reposent sur les propriétés morphologiques et/ou biochimiques (assimilation et fermentation des sucres) et exigent deux à cinq jours, voire plus en cas d'espèces inhabituelles [12, 13]. Ces méthodes phénotypiques peuvent parfois aboutir à une mauvaise identification ou identification peu précise, en particulier pour certaines espèces phylogénétiquement proches, comme *C. albicans/C. dubliniensis, C. inconspicua/C. norvegensis* ou encore *C. glabrata/C. nivariensis/C. bracarensis* [12, 14, 15]. Ainsi, l'identification de ces espèces nécessite souvent de coupler plusieurs approches phénotypiques ou des techniques moléculaires pour augmenter le niveau de discrimination entre espèces. Cependant, leur mise en œuvre en laboratoire clinique demeure fastidieuse et chronophage.

Le concept d'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) pour l'identification des micro-organismes date des années 1970 [16] et a d'abord été appliquée à l'identification de bactéries [17, 18].

Des études récentes rapportent l'utilisation de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF pour l'identification des levures et de certains champignons filamenteux qui apparaît comme une alternative sérieuse aux méthodes d'identification conventionnelle (IC), avec de hauts rendements de bonne identification [19,20].

L'objectif général de cette étude est d'évaluer la concordance de l'identification des espèces de *Candida* par le MALDI-TOF (VITEK MS) et par la méthode chromogénique (*Candida* Chromatic ou BBLCHROMagar<sup>®</sup> *Candida*).

Les objectifs spécifiques étaient de :

- Identifier les différentes espèces de levures par la technique de BBLCHROMagar®Candida;
- Identifier ces mêmes espèces par le MALDI-TOF (VITEK MS);
- Comparer les résultats des deux techniques.

Pour atteindre ces objectifs, notre travail s'articulera autour du plan suivant :

- La première partie sera consacrée aux généralités sur l'identification fongique et la spectrométrie de masse ;
- La deuxième partie abordera le matériel et la méthodologie utilisée;
- Ensuite les résultats et la discussion qui en découle ;
- Puis une conclusion suivie de recommandations.

PREMIERE PARTIE: GENERALITES

## **CHAPITRE I: IDENTIFICATION FONGIQUE**

#### I- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES CANDIDOSES AU LABORATOIRE

Le diagnostic mycologique d'une candidose s'inscrit dans le cadre de la démarche classique d'identification (figure1) [21]. L'examen direct du prélèvement, que celui-ci soit superficiel ou profond, est suivi d'une mise en culture permettant d'isoler le ou les germes présents. Les colonies de levures isolées peuvent ensuite être identifiées par la mise en œuvre de tests variés qui reposent sur des critères morphologiques, immunologiques, biochimiques, protéomiques voire génotypiques si nécessaire [22,23].

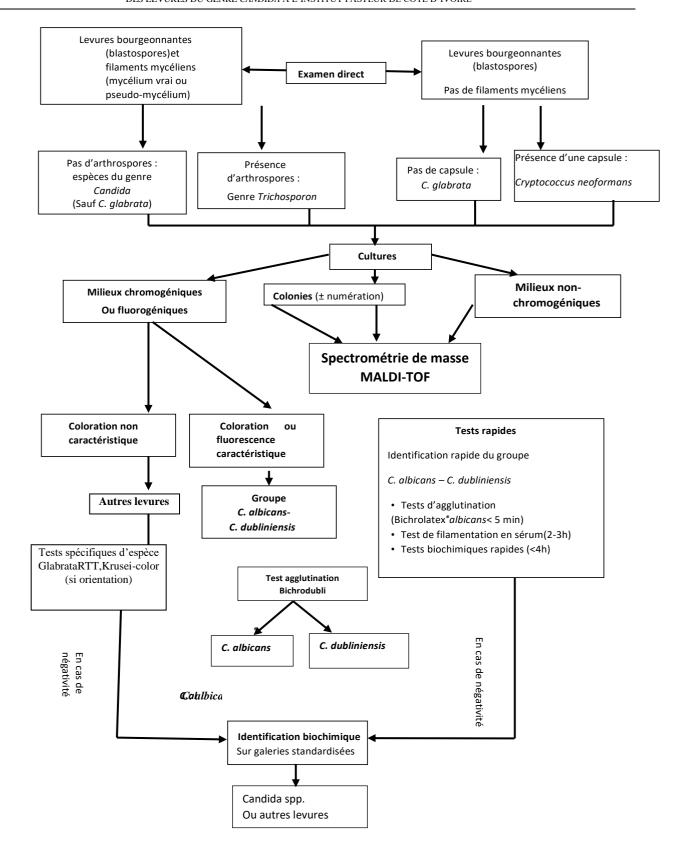


Figure1: Démarche diagnostique pour l'identification d'une levure au laboratoire[21](http://:www.memobio.fr)

## > Prélèvements, acheminement, conservation

Le diagnostic d'une mycose repose sur un prélèvement de qualité, c'est-à-dire adapté à la demande, prélevé en quantité suffisante et recueilli dans un récipient stérile. En raison de la multiplication rapide des levures et de la flore bactérienne, le prélèvement doit être acheminé immédiatement au laboratoire ; à défaut, il est conservé a + 4°C.

Les prélèvements cutanéomuqueux seront réalisés de préférence par le biologiste lui-même, et à distance de tout traitement antifongique local ou général. Les modalités de prélèvement sont présentées dans le *tableau I*.

# $\underline{\textbf{Tableau I}}: \textbf{Modalit\'es des pr\'el\`evements selon la localisation superficielle ou profonde de la candidose}$

Clinique et localisation	Prélèvement	Conditionnement (volume minimum)	Conservation en cas d'acheminement différé
Lésions superficielles			
Lésions cutanées sèches et ongles (péri-onyxis secs)	Raclage (curette de Brocq, vaccinostyle,) en périphérie de la lésion (limite ongle sain-ongle malade)	Recueil du produit en flacon stérile	1-3 jours à + 4°C
Lésions suintantes : plis, péri-onyxis avec pus, muqueuses, orifices naturels	Ecouvillonnage	Recueil sur écouvillons stériles (1 pour ED, 1 pour culture)	< 24 h à + 4°C
Pustules, abcès	Grattage à la curette de Brocq et écouvillonnage	Recueil du pus d'abcès en flacon stérile ou sur écouvillons stériles	< 24 h à + 4°C
Lésions sous-cutanées ou profond	les		
Nodules ou autres lésions sous- cutanées	Biopsie	Recueil en flacon stérile	< 24 h à + 4°C
Broncho-pulmonaires	Lavage bronchiolo- alvéolaire (LBA), aspiration bronchique	Recueil en flacon stérile (20 ml)	< 24 h à + 4°C
Pleurales	Liquide de ponction	Recueil en flacon stérile (1 ml)	Traitement immédiat (< 2 h)
Articulaires	Liquide de ponction	Recueil en flacon stérile (1 ml)	Traitement immédiat (< 2 h)
Péritonéales	Liquide de dialyse, redons, drains	Recueil en flacon stérile (1 ml)	Traitement immédiat (< 2 h)
Cérébrales	LCR	Recueil en flacon stérile (1 ml)	Traitement immédiat (< 2 h)
Tissus profonds (foie)	Biopsie	Partage en 2 flacons stériles : 1 pour la mycologie, 1 pour l'anatomopathologie	< 24 h à + 4°C
Septicémies	Sang, catheters	Hémocultures Flacons stériles (5 à 10 ml)	< 24 h à temperature ambiante
Liquides biologiques et produits divers	Urines, selles, expectorations	Recueil en flacon stérile	< 24 h à + 4°C

#### > Examen direct

L'examen direct (ED), première étape au laboratoire, permet d'orienter rapidement le diagnostic et éventuellement la thérapeutique.

Les levures apparaissent sous forme arrondie ou ovalaire, de 4 µm à 8 µm, éventuellement bourgeonnantes. La présence de filaments oriente vers les espèces capables d'en produire (*C. albicans*) et élimine ainsi *C. glabrata*, incapable de filamenter. Les levures sont également visibles sur des frottis colorés au MGG ou au Gram (les levures sont à Gram positif) [21; 24; 25].

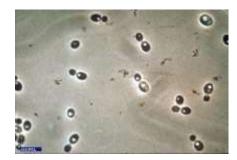


Figure 2: Levures ou blastospores [24]



Figure 3 : Levures et filaments (mycélium)[24]

### - Prélèvements superficiels

L'ED s'effectue soit directement à l'état frais par montage dans un liquide non colore (eau distillée ou sérum physiologique stérile), soit en utilisant un colorant permettant de mieux visualiser les blastoconidies (lugol à 2 %, bleu de toluidine, etc.) L'examen direct des squames et des ongles nécessite un éclaircissement préalable dans la potasse (KOH à 30 %). Par ailleurs, l'utilisation d'agents

clarifiants tels que le blanc de calcofluor (Sigma), le Blankophor® (Bayer) à 0,1 % ou encore le MycetFluo® (sr2b) permet de renforcer la sensibilité de l'examen, à condition de disposer d'un microscope équipé d'une lampe fluorescente et des jeux de filtres adéquats (filtre bleu 400-440 nm). Les échantillons liquides peuvent être concentrés par centrifugation (10 min a 1500 g) ou par filtration sur membrane de porosité 0,45 µm [24].

### - Prélèvements profonds

Les étalements, des appositions sur lames ainsi que des spots de cytocentrifugation sont réalisés à partir des prélèvements de sites profonds (LBA, liquide pleural, articulaire, biopsies tissulaires,...). Les frottis sont fixés à la chaleur ou à l'alcool, puis colorés par le May-Grunwald-Giemsa (MGG), ou traités par imprégnation argentique (techniques de Gomori-Grocott). La mise en évidence de levures bourgeonnantes, avec ou sans filaments, au sein de produits biologiques normalement stériles permet d'affirmer le caractère pathogène du champignon (figure 4), au même titre que l'examen histologique [26].

# - Cas particulier de l'histologie

L'examen anatomopathologique complète l'ED et s'avère indispensable dans l'étude des mycoses profondes. La coloration par l'acide périodique de Schiff (PAS) et l'imprégnation argentique de Gomori-Grocott sont les colorations habituellement utilisées. La première est bien adaptée au diagnostic des lévuroses, tandis que la seconde colore intensément la paroi de tous les champignons. La coloration par l'hématéine-éosine-safran (HES), quant à elle, permet d'apprécier la réaction tissulaire de l'hôte.

L'immuno-histochimie peut aider à préciser la nature du champignon en cause dans les tissus. Elle fait appel à des techniques d'immunofluorescence ou immuno-enzymatiques(Peroxydase) utilisant des immuns sérums polyclonaux ou des anticorps monoclonaux (anti-*Candida*, anti-*Cryptococcus*, anti-Aspergillus).

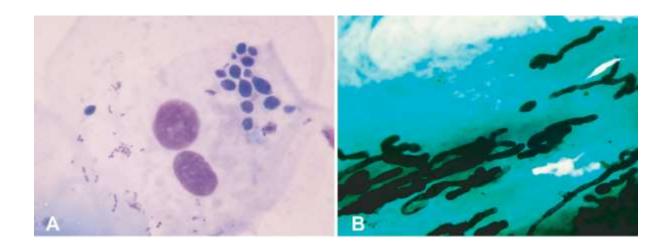


Figure 4 : Examen direct des prélèvements [26]

- **A**. Coloration de May-Grunwald-Giemsa (MGG) sur une expectoration, mettant en évidence un amas de blastospores.
- **B**. Imprégnation argentique de Gomori-Grocott sur un liquide péritonéal, montrant des filaments mycéliens septes associes a des blastospores.

#### Cultures

Les levures du genre *Candida* sont peu exigeantes, et un grand nombre de milieux de culture sont utilisés dans un laboratoire de microbiologie (géloses ordinaires, géloses au sang, bouillon cœur-cervelle) permettent leur développement [27].

Toutefois, le milieu de Sabouraud est le mieux adapté à la culture des champignons. Les boîtes de Pétri offrent une surface d'ensemencement plus importante que les tubes ; elles permettent un bon isolement des colonies et de visualiser les associations de levures. En revanche, les risques de contamination par des spores de champignons filamenteux aéroportés sont plus importants, et les milieux se dessèchent plus rapidement lors d'une incubation prolongée [24; 28].

#### - Ensemencement

L'ensemencement se fait de façon stérile, par épuisement progressif de l'inoculum (en quadrants, en étoile, par rotation).

La calibration de l'inoculum (par exemple 100 µl pour les urines) permet de dénombrer les levures présentes dans le prélèvement. Les prélèvements visqueux tels qu'un liquide bronchique, gastrique ou synovial sont préalablement fluidifiés à l'aide d'un produit mucolytique tel que digest-EUR® (Eurobio). La mise en culture des biopsies s'effectue soit en frottant directement les fragments sur la gélose, soit en déposant sur la boite 2 à 3 gouttes du produit de broyage en liquide physiologique.

Le sang est ensemencé le plus souvent directement dans des flacons d'hémocultures. Afin de concentrer les éléments infectieux, la technique de lyse-centrifugation par le dispositif Isolator® (Oxoid) est parfois utilisée avant l'ensemencement. Elle permet de libérer les levures par lyse des phagocytes de l'hôte et d'inactiver le complément, ainsi que d'autres agents antimicrobiens qui pourraient freiner la croissance du champignon. Toutefois, la réalisation de cette technique est délicate et expose au risque de contamination par les produits sanguins. En raison de son coût et de sa complexité, elle est utilisée essentiellement lors de la recherche de champignons dimorphiques tels que *Histoplasma capsulatum* [29].

#### - Milieux de culture

#### Les milieux standards

La vitesse de croissance des levures étant moins rapide que celle des bactéries, il est préférable d'adjoindre au milieu d'isolement un antibiotique afin d'inhiber la pousse de la flore bactérienne associée, surtout si le prélèvement est issu d'un site non stérile. Le milieu gélose de Sabouraud additionné de chloramphénicol et/ou de gentamicine est classiquement utilisé. Dans certaines circonstances, il est possible d'y adjoindre de la cycloheximide (Actidione®), qui inhibe la croissance de la plupart des champignons filamenteux susceptibles de contaminer les cultures. Toutefois, cette molécule peut inhiber ou freiner la pousse de certaines espèces de *Candida* telles que *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ou *C. famata*. La plupart des champignons ont une température de croissance comprise entre 25 et

35°C. La température optimale de croissance des *Candida* est de 37°C. Toutefois, ceux-ci pouvant être retrouvés en association avec d'autres micromycètes non thermophiles, plusieurs géloses sont généralement ensemencées ; la première est incubée à 22-25°C et la seconde à 35-37°C. Pour tout prélèvement profond, la culture est réalisée à 37°C. Les durées d'incubation sont adaptées au type de prélèvement. Une durée d'incubation de 24 à 72 heures est généralement suffisante pour isoler la majorité des *Candida*. L'incubation des cultures de prélèvements profonds est plus longue, d'une à quatre semaines.

Les colonies de *Candida* apparues après une incubation de 24 à 48 heures à 37°C mesurent quelques millimètres de diamètre. Plutôt blanchâtre, leur surface est lisse, brillante et luisante, ou plus rarement, crouteuse, terne, sèche, mate, ou ridée. Les associations de différentes espèces sont difficilement décelables par un œil non expérimenté [30].

# Les milieux chromogéniques

Ces milieux, auxquels sont rajoutées des substances chromogènes, confèrent aux colonies qui s'y développent une coloration particulière, variable en fonction de l'espèce. Cette coloration est dans la plupart des cas basée sur la mise en évidence d'une activité enzymatique de type hexosaminidase (N-acétyl-α-D-galactosaminidase). La multiplication des bactéries y est également inhibée.

Tous ces milieux permettent au moins d'identifier directement *C. albicans*, les colonies se colorant en **bleu** (Candida ID® 2, bioMerieux, Candichrom®, ELITechMicrobioChromID®, bioMerieux), **en vert** (BBLCHROMagar®*Candida* ou Candida chromatic, Becton- Dickinson; OCCA®, Oxoid) ou en **rose-violet** (CandiSelect® 4, Bio-Rad). Les colonies de *C. dubliniensis* développent une coloration très proche de *C. albicans* sur ces différents milieux. La différenciation entre ces deux espèces nécessite ensuite la mise en œuvre de tests spécifiques. Ces milieux permettent par ailleurs l'identification présomptive d'autres espèces. Ainsi, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. krusei* forment des colonies bleues d'aspects

différents sur le milieu CandiSelect® 4 ; *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* et *C. kefyr* forment des colonies roses sur Candida ID®2 ; sur le milieu OCCA®, *C. tropicalis* forme des colonies bleutées et *C. krusei* des colonies roses irrégulières ; sur BBLCHROMagar®Candida, *C. tropicalis* forme des colonies bleu verdâtre à bleu métallique et *C. krusei* des colonies rose pâle plutôt rugueuses.

Le milieu BBLCHROMagar®Candida présente donc le spectre le plus large pour l'identification directe des colonies [31]. Les espèces non-albicans devront être confirmées dans un second temps par des tests complémentaires.

L'apparition des colorations spécifiques est conditionnée par le respect des précautions stipulées par le fabricant (obscurité, température). La vitesse de croissance est un peu plus lente que sur un milieu standard de type Sabouraud, les colonies sont généralement de plus petite taille, et la coloration définitive n'est le plus souvent obtenue qu'après 48 heures d'incubation. Plus onéreux que les traditionnels milieux de Sabouraud, ces milieux apportent néanmoins un gain de temps de 24 à 48 heures, puisque l'identification des levures peut être rendue dans bon nombre de cas dès l'isolement et sans repiquage ultérieur, compte tenu de la forte prévalence des espèces concernées. Ils sont en outre particulièrement intéressants pour les sites susceptibles d'héberger plusieurs espèces, notamment dans le suivi de la colonisation de patients à risque de développer une candidose profonde, puisqu'ils permettent de visualiser directement les associations de levures (figure 5) [32,33].



Figure 5 : Culture sur milieu chromogénique : Mise en évidence d'une association de différentes espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis et C. tropicalis*) sur le milieu *Candida ID*®2. [32,33]

# • Les milieux fluorogéniques

Cultivées sur le milieu Fluoroplate® *Candida*, les colonies de *C. albicans* présentent une fluorescence bleutée sans diffusion du pigment dans la gélose, lorsqu'elles sont observées sous lumière ultraviolette à 366 nm. La nécessité d'un équipement spécifique limite l'utilisation de ce milieu [34].



Figure 6 : Milieux fluorogéniques

# • Les milieux pour hémoculture

Pour les hémocultures, il est préférable d'utiliser un milieu spécifique favorisant la croissance fongique (Bactec® IC/F Mycosis, Becton-Dickinson), ainsi qu'un système de lecture automatisée basée sur la mesure du CO2 libéré au cours de la croissance de la levure (automates Bactec®, Becton-Dickinson; BacT/ALERT®, bioMerieux). La détection de la croissance fongique repose sur des mesures colorimétriques (BacT/ALERT®) ou fluor métriques (Bactec®) automatiques ; les flacons sont maintenus dans l'appareil au minimum deux semaines. A défaut de milieu spécifique, les flacons destinés à la détection des bactéries aérobies seront préférés aux flacons mis en anaérobiose, car mieux adaptés à la croissance des levures, notamment pour C. glabrata. L'utilisation au préalable du système Isolator® (lyse-centrifugation) de raccourcir 1es délais permet l'ensemencement et la détection de la croissance fongique [35]. Il est en effet nécessaire de réaliser un repiquage sur milieux standards et/ou chromogéniques. Apres une incubation minimale de 24 heures, l'obtention de colonies isolées permettra de réaliser l'identification du champignon et de déterminer sa sensibilité aux antifongiques.



 $\label{Figure 7:Flacon type BacT / ALERT } \textbf{Figure 7: Flacon type BacT / ALERT }$ 

#### II- IDENTIFICATION DES LEVURES

La réalisation des tests d'identification ne peut être envisagée qu'en présence de colonies bien individualisées. En pratique courante, l'identification des différentes espèces de *Candida* fait appel à la détermination de caractères morphologiques, physiologiques et plus récemment immunologiques, grâce à des tests basés sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps monoclonaux [36]. La spectrométrie de masse et la biologie moléculaire, bien que prometteuses, ne concernent à l'heure actuelle que les centres spécialisés et les équipes de recherche.

#### II.1. Candida albicans

Candida albicans étant l'espèce la plus fréquemment isolée et considérée comme la plus virulente. La démarche diagnostique consiste dans un premier temps à l'identifier. Un certain nombre de tests, plus ou moins rapides et spécifiquement adaptés à son identification, ont donc été développés.

Historiquement, plusieurs tests ont vu le jour dans les années1960-1970 et ont représenté en leur temps des méthodes de référence [37, 38]. Il s'agit du test de blastèse (ou de germination) réalisé par incubation de l'isolat pendant 2 à 4h en sérum à 35-37°C et le test de chlamydosporulation reposant sur une subculture de 24 à 48h à 25-28°C de l'isolat en strie profonde dans un milieu PCB (pomme de terre, carotte, bile) ou RAT (riz, agar, tween 80).

C. albicans est alors identifié respectivement par la production d'un mince tube germinatif de diamètre homogène sans constriction à sa base émergeant de la cellule mère ou par la production de chlamydospores, structures arrondies de 10 à 15 µm de diamètre à paroi épaisse (aspect de double contour) produites isolement ou en grappe à l'extrémité du pseudo mycélium. De nombreux paramètres (expérience de l'observateur, charge de l'inoculum, pH) pouvant affecter le résultat du test de blastèse et le risque lié à la manipulation de sérum font que ce test est progressivement abandonné. Parallèlement, le délai nécessaire pour le rendu de

résultat du test de chlamydosporulation en réduit l'utilisation. D'autre part, ces deux tests ne permettent pas de différencier véritablement *C. dubliniensis* de *C. albicans* et ont été avantageusement remplacés par des tests plus rapides et/ou spécifiques de l'espèce.

# II.1.1. Test immunologique

Le dispositif Bichrolatex® albicans (Fumouze Diagnostics) repose sur le principe de la Co-agglutination sur lame. Le réactif est constitué de particules de latex colorées en rouge, en suspension dans un contre-colorant vert, sensibilisées par un anticorps monoclonal reconnaissant un antigène pariétal de *C. albicans* [39]. Devant l'apparition d'agglutinats rouges sur fond vert, les colonies fraichement isolées sont identifiées en quelques minutes comme étant *C. albicans* ou *C. dubliniensis*. La différenciation entre ces deux espèces repose ensuite sur un second dispositif, le bichrodubli® (Fumouze Diagnostics) [40].

# II.1.2. Test métabolique

Des tests biochimiques, utilisables sur les colonies isolées, peuvent également être réalisés afin d'identifier *C. albicans*.

Trois dispositifs sont actuellement commercialises: Murex *C.albicans*® (Murex Diagnostics), Albicans-Sure® (ClinicalStandardsLaboratories) et BactiCard Candida® (Remel CO).

Les trois tests consistent en la recherche d'une double activité  $\beta$ -galactosaminidase et L-proline aminopeptidase, positive pour les seules colonies de *C. albicans*. Les autres espèces peuvent présenter l'une ou l'autre des deux activités, mais pas les deux associées [41]. Le premier dispositif dont le résultat est obtenu en 30 minutes repose sur un principe de colorimétrie, alors que pour les deux autres tests, la révélation de l'activité  $\beta$ -galactosaminidase observable en quelques minutes utilise un substrat couplé à un dérivé de l'umbelliferone et nécessite un dispositif de lecture de la fluorescence émise (lampe de Wood).

#### II.2. Espèces non-albicans

## II.2.1. Tests immunologiques

Des tests spécifiquement orientés vers une espèce ont également vu le jour au cours des deux dernières décennies.

Contrairement aux galeries d'identification qui seront développées plus loin, ces tests qui sont réalisés à partir de colonies isolées, donnent un résultat en quelques minutes.

Il s'agit encore de réactifs d'agglutination de particules de latex, tels le Kruseicolor® pour *C. krusei* et le Bichrodubli® pour *C. Dubliniensis* (FumouzeDiagnostics) [40; 42]. Le Candida Check® (IatronLaboratories) commercialisé depuis plusieurs décennies est un dispositif pour agglutination sur lame [43]. Le réactif est constitué de plusieurs sérums de lapin rendus spécifiques, par un ensemble d'adsorptions, vis-à-vis de 10 facteurs antigéniques portés par certaines espèces de *Candida*. L'identification des neuf principales espèces de *Candida* est obtenue après 2 à 3 minutes d'agitation.

#### II.2.2. Tests enzymatiques

Les colonies de *C. glabrata* sont spécifiquement identifiées grâce au test Glabrata RTT® (Fumouze Diagnostics) [44]. Ce dispositif, de réalisation simple, repose sur la capacité de *C. glabrata* à hydrolyser le tréhalose et pas le maltose.

Il utilise une glucose-oxydase pour la mise en évidence du glucose forme à partir de chacun de ces deux carbohydrates.

Un témoin permet d'éviter les faux positifs liés au transfert concomitant du glucose contenu dans le milieu de culture des colonies prélevées. Le résultat est obtenu en 15 minutes.

D'autres tests reposant sur le même principe mais de réalisation plus longue sont également commercialisés : RemelRapidTrehaloseAssimilationBroth et

RemelYeastFermentationBroth (RemelLaboratories), le GlabrataQuick®kit et le Trehalose Fermentation Broth (Hardy Diagnostics).

#### II.2.3. Tests biochimiques

Dans l'éventualité où l'aspect et la coloration de la colonie ne permettent pas une identification précise de l'espèce, ou encore lorsque les tests rapides spécifiques s'avèrent négatifs, l'identification de la levure repose alors sur l'utilisation de galeries [45]. Un large panel de dispositifs miniaturisés et standardisés est commercialisé. La grande majorité de ces dispositifs repose sur l'étude l'assimilation des carbohydrates (auxanogramme) et de leur fermentation (zymogramme). Les différentes caractéristiques des dispositifs commercialisés sont regroupées dans le *tableau II*.

L'auxanogramme des sucres est complété dans certains dispositifs par l'étude de l'assimilation de substrats chromogéniques, ou par la détection d'enzymes. Dans tous les cas, la densité de l'inoculum doit être standardisée pour permettre la bonne réalisation du test et faciliter sa lecture. Le nombre d'espèces identifiées augmente avec le nombre de tests incorporés dans la galerie, mais il reste limité avec les galeries rapides qui ont, par ailleurs, des performances moyennes. Certaines galeries identifient largement au-delà du genre *Candida*, d'autres encore associent à l'identification une évaluation de la résistance à divers antifongiques.

Les caractères physiologiques obtenus avec certaines galeries peuvent parfois être identiques pour deux espèces différentes, c'est pourquoi l'identification du germe nécessite de prendre en compte également les caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques.

Tableau II : Caractéristiques des différentes galeries d'identification commercialisées

Paramètres	API®20C AUX (bioMérieu x)	Auxacolor ®2 (Bio- Rad)	Candifas® (ElitechGr oup)	Fungichro m® (ElitechGr oup)	Fungifast® (ElitechGr oup)	ID®32C(bio Mérieux)	Vitek®YBC(b ioMérieux)
Nombre de taxons	43	33	10	24	10	63	50
Nombre de tests	19	20	9	15	20	31	20
Sensibilité au cycloheximide	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Non
Recherche d'uréase	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Recherche de la phénol- oxydase	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Inoculum	2 McF	1,5 McF	ND	2 McF	2 McF	2 McF	1,8-2,2 McF
Durée	48-72 h	24-72 h	24-72 h	24-48 h	24-72 h	48-72 h	18 h
Caractères morphologiques	Obligatoires	Obligatoires	Non obligatoires	Non obligatoires	Obligatoires	Non demandés	Obligatoires
Antifongigramme inclus	Non	Non	7 ATF testés: AmB, Nyst, 5-FC, Eco, Kéto, Mico, Fluco	Non	5 ATF testés: 2 concentratio ns pour AmB, 5-FC, Itra, Fluco; 1 concentratio n pour Vori	Non	4 ATF testés: AmB, 5-FC, Fluco, Vori
Commentaires	Manipulation simple, mais test peu discriminant	Manipulation simple, mais test peu discriminant	Manipulation simple, mais test peu discriminant	Manipulation simple, mais test peu discriminant	Manipulation simple, mais nombre limité de taxon	Manipulation simple et test performant	Manipulation simple et test performant

#### II.3. Méthodes de recours : la biologie moléculaire

Les méthodes de biologie moléculaire basées sur le séquençage de régions spécifiques de l'ADN ribosomal fongique comme l'Internal Transcribed Spacer (ITS), InterGenic Spacer (IGS) ou de séquençages multi-locus (bêta tubuline, calmoduline, actine) sont une aide précieuse pour l'identification au niveau de l'espèce des isolats cliniques.

Cependant, ces techniques nécessitent de nombreuses étapes. Tout d'abord, il est impératif d'obtenir l'isolement du microorganisme en culture puis d'en extraire l'ADN. Il faut ensuite réaliser la réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction)

d'identification et sa purification, la réaction de séquence et son analyse sur électrophorèse capillaire. Ces étapes nécessitent ensuite une expertise particulière pour l'utilisation d'outils bioinformatiques permettant la comparaison des séquences nucléotidiques obtenues aux bases de données ADN disponibles actuellement (NCBI, CBS...) [46-48].

# II.4. Approche protéomique

L'approche protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF est une alternative très séduisante qui tend à se généraliser aujourd'hui. Appliquée sur des colonies isolées, cette nouvelle technologie permet en effet une identification rapide et à moindre coût directement à partir des cultures [49]. Les systèmes Vitek® MS (bioMerieux), Microflex (Bruker) et Andromas (Siemens) sont actuellement disponibles.

L'investissement initial reste important et limite actuellement son utilisation aux laboratoires hospitaliers et/ou de recherche. Toutefois, la réduction importante des temps de manipulation ainsi que le faible coût des réactifs et consommables laissent envisager une extension aux laboratoires de taille plus modeste.

# CHAPITRE II: LA SPECTROMETRIE DE MASSE DE TYPE MALDI-TOF

Depuis quelques années, l'identification des microorganismes subit un changement important avec l'arrivée de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight), en particulier à partir de « cellules intactes », c'est-à-dire sans extraction préalable [50-53]. Cette technique permet de quantifier avec précision et en quelques secondes la masse et l'abondance des protéines comprises entre 2000 et 15 000 Da présentes dans l'échantillon. Les protéines détectées correspondent aux protéines les plus représentées dans la cellule fongique, à savoir les protéines ribosomales mais aussi différents types de protéines dites « structurales » [54]. Les observations qui ont permis son application en microbiologie à partir de 1975 sont simples et basées sur le postulat qu'il existe une empreinte (spectre) protéique spécifique pour chaque espèce de microorganisme [55]. Ainsi, en comparant le spectre de l'échantillon à une base de données réalisée avec soin, il est possible d'identifier l'espèce fongique de l'isolat clinique.

# I-HISTORIQUE ET PRINCIPE GENERAL D'UN SPECTROMETRE DE MASSE

Apparue au début du XXe siècle, la spectrométrie de masse a apporté des éléments clés dans la compréhension du noyau atomique. Elle est issue de la découverte par Euge Goldstein en 1886, des rayons canaux dus aux ions positifs et de leur analyse par un champ magnétique, par Wilhelm Wien en 1898. En 1912, Joseph John Thomson obtient des spectres de masses de plusieurs composés gazeux : N2, O2, CO, CO2, etc. Il met en évidence les ions négatifs et les ions multichargés. L'année suivante, il découvre les isotopes A (nombre de masse) = 20 et A = 22 du néon [56]. Les innovations qui suivent tentent principalement d'augmenter la sensibilité du dispositif. En 1918, A. J. Dempster construit un spectromètre à focalisation en direction. L'année suivante, Francis William Aston introduit le tri des ions en fonction de leur vitesse, ce qui lui permet de déterminer les abondances isotopiques du néon et de mettre en évidence les écarts entre les masses atomiques

réelles et les nombres entiers. En 1932, K. T. Bainbridge, en associant au dispositif un filtre de vitesse de Wien, vérifie expérimentalement l'équivalence entre masse et énergie. Il propose alors la double focalisation en direction et en vitesse, principe qui sera mis en œuvre par E. B. Jordan, J. M. Mattauch et L. F. Herzog. En 1936, F. M. Penning propose de combiner un champ électrique et un champ magnétique pour piéger les ions dans un très faible volume : c'est le piège de Penning. En 1940, A. O. Nier perfectionne la source d'ions à impact électronique. Ensuite, en 1948, A. E. Cameron invente le spectromètre de masse à temps de vol. Puis, entre 1953 et 1960, W. Paul et H. S. Steinwedel mettent au point l'analyseur quadripolaire, puis le piège ionique quadripolaire qui diffère de celui de Penning par l'absence de champ magnétique. Le piège quadripolaire aura un tel retentissement en physique fondamentale que le prix Nobel sera attribué en 1989 à Wolfgang Paul et à Hans Dehmelt. Pendant les années 1960, L. G. Smith met au point le spectromètre de masse à radiofréquence. Pour ce qui est des applications, depuis 1950, les techniques d'ionisation se diversifient de façon à s'adapter à la diversité des échantillons à analyser, particulièrement pour la chimie organique. Cette technique d'analyse bénéficie alors du couplage avec un chromatographe en phase gazeuse puis liquide. Les progrès de l'informatique ont permis l'automatisation des réglages de l'appareil ainsi que la mise en œuvre des analyseurs à quadripôle et des pièges ioniques dans de nombreuses applications de la spectrométrie de masse [57, 58].

#### II-LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF

# II.1- Ionisation douce : principe de la technique MALDI

L'ionisation douce est une étape importante de l'identification puisqu'elle permet l'analyse de macromolécules telles que les protéines, dont les tailles peuvent aller jusqu'à 100 kilo Dalton (kDa).Les principales techniques d'ionisation douce utilisées dans l'identification des micro-organismes sont l'Electrospray Ionization (ESI) et le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation), basées soit sur

l'analyse des spectres protéiques, soit sur l'amplification de matériel génétique [59,60]. La méthode MALDI, introduite en 1987 par Karas, a fait l'objet d'un prix Nobel en 2002 [61]. La technique MALDI consiste à mélanger une solution organique spécifique saturée de cristaux, appelée matrice avec un échantillon, le mélange étant déposé sur un support (plaque de métal ou plaque jetable). En microbiologie, cet échantillon est le plus souvent une colonie bactérienne ou fongique, déposée sur la plaque (Figure 8) [62]. Les deux composés co-cristallisent sous l'effet de l'évaporation. L'échantillon se présente alors sous la forme d'un dépôt solide pris dans la matrice. La plaque est insérée dans le spectromètre de masse et le mélange matrice-échantillon cristallisé est irradié brièvement par un faisceau laser (en général un laser à azote de longueur d'onde 337 nm dans les instruments MALDI-TOF commercialisés pour le diagnostic bactérien). Pour obtenir un spectre correct, des centaines de tirs laser sont impulsés sur la cible pour maximiser le processus d'ionisation. La matrice est essentielle au succès de l'ionisation de l'échantillon : en effet, l'absorption de l'énergie du laser par les molécules de la matrice entraîne la désorption (passage en phase gazeuse) des ions du mélange matrice-échantillon (Figure 9) [62]. Lors de ce passage en phase gazeuse, un transfert d'ions se fait entre les molécules de la matrice et celles de l'échantillon pour former des ions mono- ou multichargés. Les ions produits par la technique MALDI sont majoritairement mono-chargés. Les particules à l'origine de l'ionisation sont issues de groupements carboxyliques ou hydroxyliques de la matrice, du solvant ou des molécules de l'échantillon elles-mêmes. Ainsi, les différentes protéines vont se charger positivement ou négativement en fonction de leurs structures peptidiques.

# II.2- Principe de la technologie TOF et description du MALDI-TOF

La technique d'ionisation MALDI peut être associée à la technologie TOF (Time Of Flight) ou « temps de vol ».La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technique qui révolutionne la microbiologie. En effet, les ions produits par

le mélange matrice-échantillon sont introduits simultanément dans un tube de vol et retenus dans la région libre avant d'être accélérés par une impulsion électrique pouvant aller jusqu'à 20 kilo électron Volt, grâce à l'application d'une différence de potentiel. Cette différence de potentiel est utilisée de manière à extraire les fragments positifs ou les fragments négatifs.

En microbiologie, ce sont les ions positifs qui sont le plus souvent étudiés.

Les protéines ionisées passent ensuite dans le tube de vol maintenu sous vide et « volent » jusqu'au détecteur situé à l'autre extrémité, en fonction de leur vitesse et donc de leur masse. Le temps de vol des ions est inversement proportionnel à leur masse. Ainsi les ions ayant une masse élevée atteindront le détecteur plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. Leur arrivée au bout du tube de vol est enregistrée par un multiplicateur d'électrons, puis le signal obtenu est traité informatiquement.

Les protéines de l'échantillon sont analysées par un analyseur de masse, donnant un rapport m/z. Cette mesure électrodynamique des rapports m/z permet de générer un spectre (**Figure 10**) [62].

Ce système de TOF linéaire peut détecter les molécules à des concentrations de l'ordre du fentomole (10<sup>-15</sup>mol/L) et de l'attomole (10<sup>-18</sup>mol/L), mais sa limitation est une mauvaise résolution, à l'origine de l'élargissement de certains pics dans les hauts poids moléculaires. Des ions de cinétique différente peuvent ainsi avoir le même m/z.

Le résultat obtenu est un ensemble de pics ou spectre de masse (**figure 11**) représentant les rapports m/z des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'intensité relative de ces ions selon l'axe des ordonnées. Ce spectre de masse peut alors être comparé aux milliers de spectres de référence contenus dans la base de données de l'appareil et est spécifique de l'espèce.

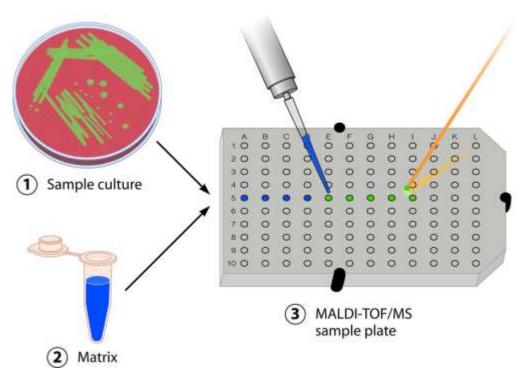


Figure 8 : Etapes préalables à l'identification de micro-organismes par MALDI-TOF MS Les colonies bactériennes ou fongiques isolées sur milieu solide (ou concentrées à partir de milieu liquide) sont déposées directement sur la plaque MALDI, puis recouvertes par la matrice. Après séchage, la plaque est introduite dans le spectromètre de masse. [62]

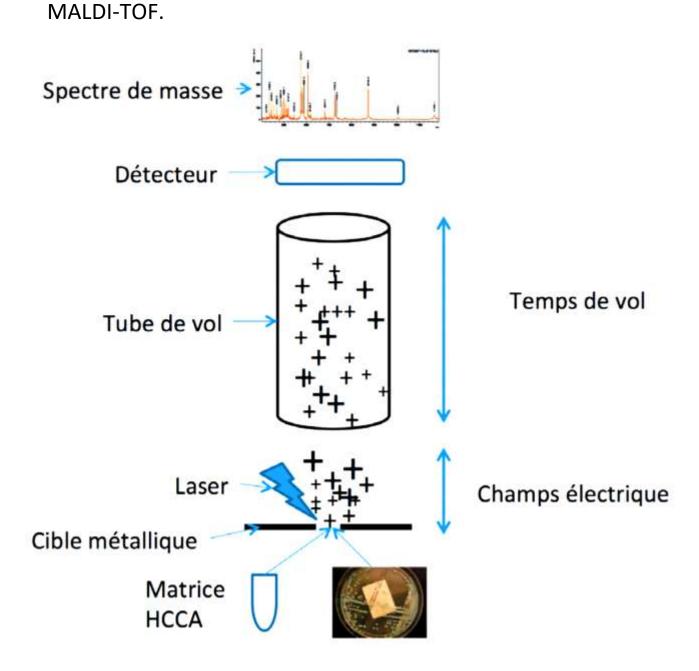


Figure 9 : Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF [62]

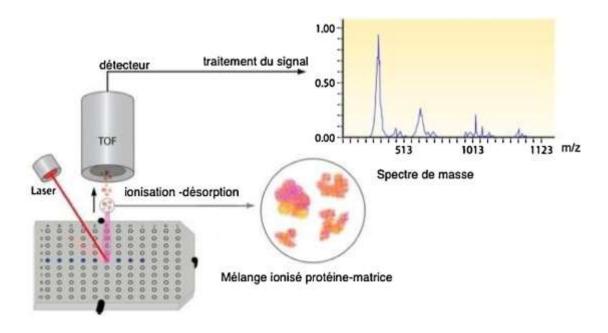


Figure 10: Analyse par le MALDI-TOF

Le mélange échantillon/matrice co-cristallisé est bombardé par un faisceau laser, permettant ainsi l'ionisation et la désorption des molécules du mélange matrice/échantillon. Les molécules ionisées passent alors dans un tube de vol et sont séparées selon leur ratio masse/charge (m/z) en fonction de leur temps de vol (TOF). Les ions arrivent sur un détecteur qui amplifie le signal. Le résultat est traduit sous la forme d'un spectre de masse [62].

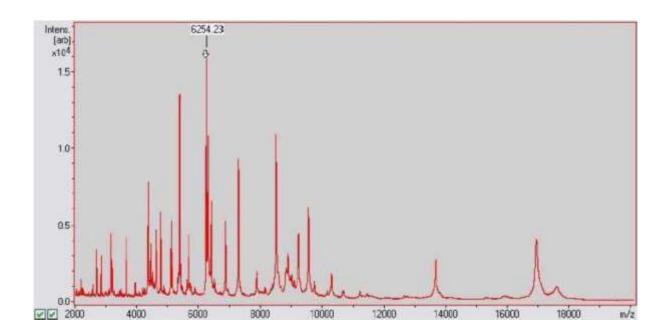


Figure 11: Exemple de spectre MALDI-TOF (E.coli)

# II.3- Appareillage : spectromètre de masse MALDI-TOF

L'appareillage est constitué schématiquement de 4 parties (figure 12):

Une chambre d'ionisation associée à une source de type laser à azote, permettant de générer des ions en phase gazeuse.

Un analyseur de type « TOF » (Time Of Flight) constitué d'un tube libre de tout champ magnétique, permettant la séparation des ions après une phase d'accélération. Selon le rapport m/z, les molécules les plus petites sont les premières à arriver au détecteur. Les molécules qui ont le même rapport m/z sont séparées grâce à un miroir électrostatique.

Un détecteur de particules permettant la réception et la transformation du courant ionique en un courant électrique, puis sa représentation sous forme d'un spectre de masse.

Une unité informatique comportant les logiciels d'acquisition, de traitement et de comparaison des spectres obtenus à sa base de données [63].

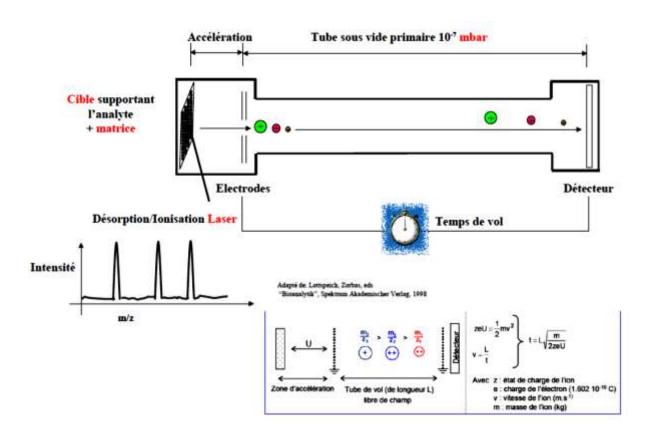


Figure 12 : Schématisation du MALDI-TOF

# II-4 Processus analytique

Le processus peut se résumer en 3 étapes : [63]

# -l'ionisation/désorption de l'échantillon :

L'échantillon et la matrice sont déposés sur un support métallique (cible) ou ils vont cocristalliser après l'évaporation des solvants. L'ensemble est soumis au tir d'un faisceau laser UV. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser, ce qui provoque la vaporisation (étape de désorption) de l'échantillon puis l'ionisation, permettant ainsi la formation d'ions de masses différentes.

#### -la séparation des ions :

L'énergie absorbée par la matrice provoque sa dissociation et sa désorption.

Les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge à l'échantillon.

L'expansion de la matrice entraîne l'échantillon au sein de la phase gazeuse dense où il finira de s'ioniser. Les composés ionisés issus des protéines bactériennes vont être accélérés par un champ électrique dans une colonne, avant de pénétrer dans un tube de vol, libre de tout champ permettant de séparer les molécules selon leur rapport m/z.

#### -la détection :

Celle-ci est réalisée grâce à un multiplicateur d'électrons. Le signal est amplifié par la formation d'électrons secondaires à l'aide de tubes en verre dopés au plomb (dynode).

Lorsqu'un composé ionisé entre dans un canal et percute sa paroi, il provoque l'émission de plusieurs électrons qui sont accélérés par la tension de polarisation. Les électrons émis vont à leur tour frapper la paroi et provoquer l'émission d'autres électrons.

Ainsi, plus la quantité d'ions de rapport m/z est importante, plus le nombre d'électrons secondaires est important et plus l'intensité du pic de même rapport m/z est important. Les pics enregistrés sont représentés sous la forme d'un spectre, spécifique d'espèces.

# DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE

	GENRE CANDIDA A I	INSTITUT PASTEUI	DE COTE D IVOIRE		
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	
CHAPIT	TRE I: MA	ATERIEI	ET MET	THODES	

#### I. MATERIEL

#### I.1 Type d'étude

Notre étude est une étude transversale, initiée par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny d'Abidjan (Cocody). Elle s'est déroulée dans la période de Juillet à Octobre 2017.

# I.2Lieu d'étude

Nos travaux se sont déroulés à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). L'unité de mycologie de l'IPCI située dans l'enceinte du CHU de Cocody a servi de cadre pour le recensement des échantillons et leur identification par la méthode chromogénique Candida chromatique. Ensuite l'identification par le MALDI-TOF (VITEK MS) s'est déroulée à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire site d'Adioupodoumé route de Dabou dans la commune de Yopougon.

# I.3 Souchotèque

Les isolats analysés en prospectif dans ce travail sont des prélèvements cliniques recueillis chez des professionnels du sexe et des homosexuels d'octobre 2016 à Mars 2017 au cours d'une enquête sur terrain réalisée par le projet HEARTLAND et des prélèvements de routine du laboratoire de parasitologie-mycologie de l'IPCI de Cocody au cours de la période allant de Juillet à Septembre 2017. Ces isolats provenaient de prélèvements cliniques variés incluant des prélèvements génitaux (anal, exocol, sperme), des prélèvements oropharyngés, et autres, tels que prélèvements de pus divers,.... Sur chaque échantillon, a été effectué un examen direct et une culture, permettant l'identification présomptive de trois espèces d'intérêt médical (*C. albicans, C. tropicalis et C. krusei*).

Les souches isolées sont été aussi passées au MALDI-TOF (VITEK MS) après avoir subi le test par la méthode chromogénique.

# I.4<u>VITEK MS (BIOMERIEUX)</u>:

#### I.4.1. Présentation de l'instrument

Le spectromètre de masse VITEK MS® se présente en deux éléments : une partie automate et une partie informatique (figure 13).

L'automate est volumineux et doit être posé directement au sol. L'accès à ses côtés latéraux doit rester disponible afin de pouvoir y accéder lors des interventions de maintenance. Il se compose d'une chambre d'ionisation, d'une source d'ionisation (laser à azote), d'un tube de vol et d'un détecteur de type TOF.

L'unité informatique adjointe permet le traitement des données. La comparaison du spectre obtenu aux spectres de références de la base de données est effectuée par le logiciel MYLA®.



Figure 13: Spectromètre de masse VITEK MS® et son unité informatique [64]

#### I.4.2. Fonctionnement du VITEK MS



Figure 14: Fonctionnement du VITEK ms

#### I.5 Matériel technique et réactifs

- BBLCHROMagar<sup>®</sup> Candida Medium (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produits contrôlés microbiologiquement
- Gélose Sabouraud + chloramphénicol
- Etuve de séchage
- Pipettes (0.1-3  $\mu$ l) et embouts (0.1-10  $\mu$ l)
- Anses jetables de 1µl
- Lames DS 48 puits (cibles)
- ECAL: Escherichia coli ATCC 8739 pour la calibration
- Acide formique 25%
- Matrice : CHCA (Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique)

- Isolats à tester
- -le spectromètre VITEK MS et son unité informatique

#### **II-METHODES**

#### II.1. Méthodes d'identification utilisées

Les techniques utilisées pour notre étude sont l'identification par les tests classiques notamment le milieu chromogène BBLCHROMAGAR Candida et par le MALDITOF MS.

Notre travail s'est effectué en deux temps :

- d'abord l'isolement des souches sur milieu Candida chromatique suivie de leur incubation pendant 24 à 48h à l'étuve. La lecture a été faite le lendemain.
- ensuite les souches isolées sont emmenées à l'IPCI d'Adiopodoumé pour être testés par le VITEK MS.

# II.1.1.Identification conventionnelle des levures par la méthode chromogénique BBLCHROMagar<sup>®</sup> Candida ou Candida chromatic

Dans ce au travail, nous nous sommes arrêtés à l'identification présomptive des différentes souches de levures par la méthode chromogénique Candida Chromatic. Ainsi, cette identification était fondée sur l'aspect macroscopique des colonies sur milieu chromogénique (BBLCHROMagar®Candida ou Candida Chromatic et Sabouraud-chloramphénicol). Il s'agissait pour nous d'apprécier la couleur des colonies (vert clair, bleu verdâtre, rose pâle et mauve)

#### II.1.1.1 Principe de la méthode

Le *Candida* chromatic ou BBLCHROMagar® *Candida* est un milieu sélectif et différentiel pour l'isolement des champignons. Du fait qu'il comporte des substrats chromogènes, les colonies de *C. albicans*, de *C. tropicalis* et de *C. krusei* y produisent des couleurs distinctes, permettant ainsi de détecter directement ces

espèces de levures sur la boîte de Pétri d'isolement **[65-70]**. Les colonies de *C. Albicans* sont d'un vert clair à moyen, celles de *C. tropicalis* sont bleu verdâtre à bleu métallisé, et celles de *C. krusei* sont rose pâle, blanchâtre en périphérie. D'autres espèces de levures peuvent prendre leur couleur naturelle (crème) ou un aspect rose ou mauve clair à foncé [*Candida glabrata* et autres].

Ce milieu présente l'avantage supplémentaire de faciliter la détection des cultures de levure mélangées, puisque leurs colonies présentent des couleurs différentes [65, 69,70]. Des peptones spécialement sélectionnées apportent les nutriments nécessaires au milieu *Candida* chromatic.

Ce mélange chromogène spécialement mis au point se compose de substrats artificiels (chromogènes) qui libèrent des composés de diverses couleurs lorsqu'ils sont dégradés par des enzymes spécifiques. Cela permet de différencier certaines espèces ou de détecter certains groupes de microorganismes à l'aide d'un nombre minimum de tests de confirmation. Le chloramphénicol inhibe la plupart des contaminants bactériens.

#### II.1.1.2.Mode opératoire du test

Strier l'échantillon sur la surface du milieu afin de créer l'isolement. Si l'échantillon est cultivé à partir d'un écouvillon, rouler délicatement ce dernier sur une petite zone de la surface près du bord, puis strier à partir de cette zone à l'aide d'un ensemenceur à anse. Incuber les boîtes en position retournée et en conditions aérobies à 35 +/-2°C pendant 20 à 48 h. Une période d'incubation de 42 h est nécessaire pour que les colonies de *Candida* atteignent leur coloration complète. Maintenir à l'abri de la lumière avant et pendant l'incubation [70].

Il peut arriver que certains isolats, tels que *Cryptococcus neoformans* et les champignons filamenteux, nécessitent une durée plus longue et parfois une température d'incubation plus basse pour atteindre une croissance optimale. Par conséquent, lorsque la présence de champignons autres que des *Candida spp* est

suspectée, une boîte de Pétri contenant un second milieu adapté à la culture des champignons, par exemple un milieu Sabouraud-Chloramphénicol, doit aussi être ensemencée et incubée entre 20 et 25°C.

Nous avons donc ensemencé par précaution dans notre étude, les milieux Candida chromatic et Sabouraud-Chloramphénicol.

#### II.1.1.3.Résultats attendus

Après incubation, les boîtes d'échantillons contenant des champignons présentent une croissance. Il est recommandé d'examiner les boîtes de Pétri sur un fond blanc. En présence de *Candida spp*, les colonies ont un aspect vert clair à vert moyen (*C. albicans*), rose clair à rose, blanchâtre en périphérie (*C. krusei*), ou bleu verdâtre à bleu métallisé, avec ou sans une auréole violette (*C. tropicalis*). Les autres *Candida spp* et les autres levures ont une couleur mauve clair à foncé ou, si aucun substrat chromogène n'est utilisé, présentent leur couleur naturelle (crème à blanc).

Diverses études indiquent qu'aucun test d'identification complémentaire n'est nécessaire pour *Candida albicans*, *C. tropicalis* et *C. krusei* [65-67].

## II.1.2.Identification par la spectrométrie de masse MALDI-TOF

#### II.1.2.1. Mode opératoire

#### > Calibration

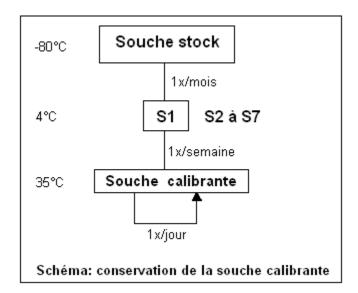
La calibration se fait à l'aide d'une souche d'*Escherichia coli* ATCC 8739. Cette souche est stockée au congélateur à une température de -80°C. Une subculture S1 est effectuée sur gélose au sang et conservée au réfrigérateur durant quatre semaines. La souche calibrante est obtenue en repiquant la souche S1 sur gélose au sang. Celle-ci est repiquée tous les jours afin d'avoir une souche fraîche pour la calibration. Une fois par semaine, la souche calibrante est repiquée à partir de la souche S1 conservée au réfrigérateur.

Après quatre semaines, la souche S1 est repiquée sur gélose au sang pour obtenir la souche S2, conservée également à son tour au réfrigérateur pendant quatre semaines et repiquée 1 fois par semaine pour la souche calibrante.

On procède ainsi de suite jusqu'à la souche S7, après laquelle, on repart à partir de la souche stockée au congélateur.

En pratique, on a constaté qu'il n'y a pas besoin de changer la souche du réfrigérateur tous les mois. Ainsi, la souche congelée est repiquée seulement s'il y a des problèmes de calibration (on ne s'arrête pas à la souche S7).

Le dépôt de la souche calibrante se fait sur la lame DS, sur un puits prévu à cet effet. Le puits est légèrement plus petit que les autres et est situé au milieu de chaque série de 16 échantillons (**Figure 15**). Le calibreur est lu avant et après chaque série, et le résultat doit être bon pour pouvoir valider les résultats des échantillons. Si le spectromètre de masse n'arrive pas à intégrer les pics et à identifier la souche calibrante, il n'analyse pas les échantillons.



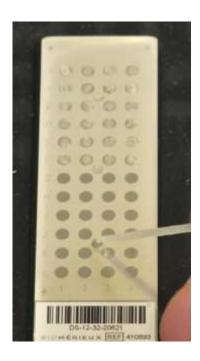


Figure 15: Dépôt du contrôle de qualité

## > Préparation des échantillons

La préparation des échantillons se fait à partir de la **Prep Station** (**Figure 16**). C'est un module constitué d'un ordinateur et d'un scanner optique servant à introduire les différentes données des échantillons (NLAB, bactérie, levure) et leur emplacement sur la lame. La Prep Station est reliée au programme Myla qui intègre et gère les résultats du Vitek MS avant leur transfert au SIL (système informatique du laboratoire).



Figure 16 : Interface de création MYLA® Prep station

Les lames utilisées pour le VITEK MS® BioMerieux sont des lames en acier de 48 puits. La société bioMérieux commercialise des plaques à usage unique, jetable et identifiable par un code barre.

Avant de procéder au dépôt des différentes souches sur la plaque, une fiche d'identification comportant la date, le nom du technicien, le code barre de la plaque et les différentes références des souches à identifier, est obligatoirement remplie. Cette fiche va permettre l'enregistrement dans le logiciel MYLA.

Pour chaque plaque utilisée, une fiche d'identification est remplie.

La préparation des échantillons de levures se fait de la manière suivante :

- Pour la calibration, faire un dépôt avec la souche *E. coli* 8739 dans le puits prévu à cet effet, puis déposer 1µl de matrice ;
- À l'aide d'une anse calibrée de 1 μl, prélever une colonie à tester et la déposer sur les puits cibles. Tester l'échantillon en double ;

-Sur les 2 dépôts, ajouter 0.5 μl d'acide formique. Laisser sécher, puis ajouter 1μl de matrice ;

-Laisser sécher avant la lecture au spectromètre.

#### **Enregistrement et mesure**

Après séchage complète de la lame, l'on procède à l'enregistrement à partir de l'interface de création MYLA® de bioMérieux. Dans la partie « ID de la cible », il faut scanner le code barre de la lame de dépôt. Le logiciel affiche alors la représentation de la lame avec les emplacements disponibles pour analyse (**figure 16**).

Il faut ensuite inscrire l'identification de l'échantillon à tester dans la zone « ID Echantillon » et préciser d'emblée s'il s'agit de l'analyse d'une souche bactérienne ou bien d'une souche mycologique. En effet, le spectre obtenu n'est pas comparé à la même base de données selon qu'il s'agit d'une bactérie ou d'une levure.

Une fois le dépôt terminé, transférer les données de la Prep Station vers le Vitek MS, placer la lame (**Figure 17**) sur le porte-lame (**Figure 18**), l'introduire dans le Vitek MS et lancer l'analyse. (**Figure 19**).



Figure 17 : Lame DS

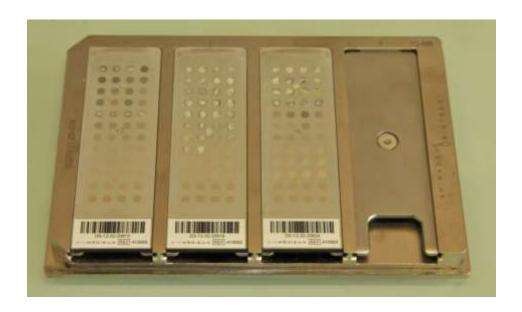


Figure 18 : Porte-lames



Figure 19: Insertion du support de plaque dans l'automate VITEK MS®.

#### II.1.2.2.Lecture et interprétation des résultats

Le logiciel MYLA® compare le spectre obtenu avec sa base de données et calcule un score de corrélation sur la réalisation de 100 profils. 30 profils constituent le minimum acceptable pour réaliser la comparaison du profil obtenu avec ceux de la base de données.

Une fois l'analyse terminée le spectromètre de masse affiche les résultats dans le programme « Myla» et indique le pourcentage d'identification. Les résultats sont classés dans un tableau Excel afin de déterminer le pourcentage d'identification pour les différents germes.

Les résultats font intervenir deux paramètres, le degré de confiance ou score en pourcentage (**figure 20**) et le niveau de confiance affiché par des icônes de formes et de couleurs différentes (**figure 21**).

score	degré de confiance
99,9 à 60 %	bonne identification
<60 %	faible probabilité d'identification
absence de pourcentage	nombre de profils ou de pics insuffisants

Figure 20: Tableau interprétatif du score d'identification

niveau de confiance	
bonne	
à résoudre	
absence	

Figure 21: Tableau interprétatif du niveau de confiance d'identification

Le degré de confiance, correspond au degré de similitude du spectre obtenu avec le spectre typique de chaque microorganisme. Une correspondance parfaite donne un degré de confiance de 99,9 %. Quand cette correspondance n'est pas parfaite, dans le cas d'un choix unique, le degré de confiance est compris entre 60 et 99 %. Le micro-organisme est considéré comme non identifié par le système, si le degré de confiance est inférieur à 60.

# II.2.Analyse statistique

Elle a été réalisée grâce aux logiciels Excel 2012, Epi Data 3.1 et SPSS 22
(statistical package for the social science)
Elle a été organisée en deux étapes :
□ la première étape a eu pour objectif de caractériser la population d'étude avec les
variables (l'âge, le sexe, le lieu de provenance);
□la seconde étape a permis de mettre en évidence les différents paramètres
mycologiques et spectrométriques permettant de comparer les deux techniques.

HAPITRE	E II : RESU	ULTATS I	ET DISC	USSION	
HAPITRE	II : RESU	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	II: RESU	ULTATS I	ET DISC	<u>USSION</u>	
HAPITRE	II: RES	ULTATS I	ET DISC	<u>USSION</u>	
HAPITRE	II: RES	ULTATS I	ET DISC	<u>USSION</u>	
HAPITRE	II: RES	ULTATS A	ET DISC	<u>USSION</u>	
HAPITRE	E II : RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	E II : RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	II: RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	II: RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	E II : RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	E II : RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	E II : RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	E II : RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	E II : RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	E II : RES	ULTATS A	ET DISC	USSION	
HAPITRE	EII: RES	ULTATS	ET DISC	USSION	

#### I. RESULTATS ET COMMENTAIRES

#### I.1 CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES

Les souches utilisées proviennent de sujets dont nous décrivons les caractéristiques sociodémographiques.

# I.1.1 Répartition selon le sexe

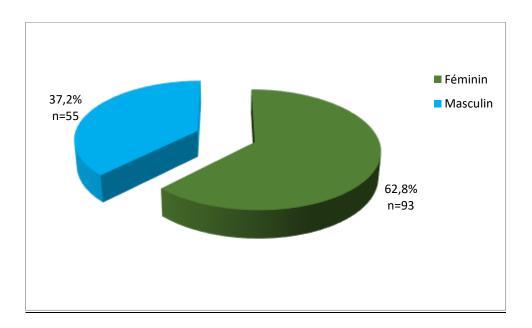


Figure 22: Répartition de la population étudiée selon le sexe

Les sujets de sexe masculin étaient les moins nombreux (55 sujets soit 37,2%), avec un Sex-ratio (M/F) = 0,59.

#### I.1.2 Répartition selon l'âge

L'âge moyen des patients de notre étude est de  $31,06\pm8,40$  ans.

L'âge médian est de 30,50 ans.

# I.1.3 Répartition selon lieu de provenance

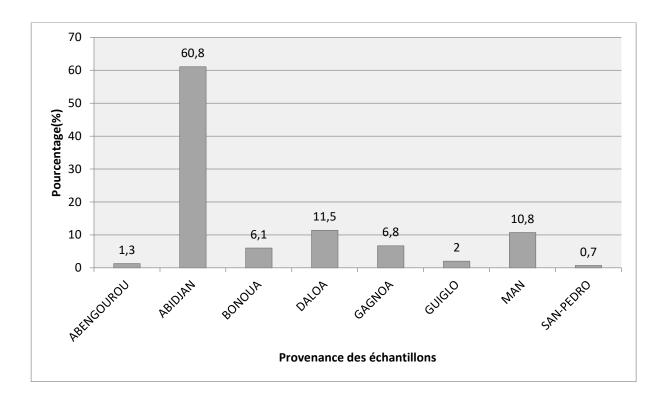


Figure 23: Répartition de la population en fonction du lieu de provenance

La ville d'Abidjan abritait la plus grande partie de la population (60,8%).

## I.2 CARACTERISTIQUES CLINIQUES

# I.2.1 Type de Prélèvement

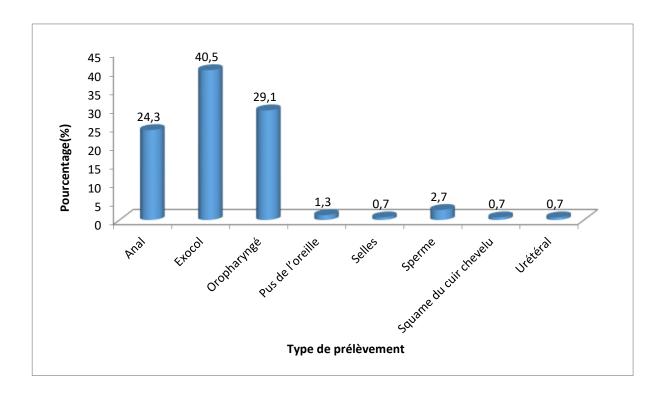


Figure 24: Répartition de la population selon le type de prélèvement

La majorité des échantillons (40,5%) provenait de prélèvements vaginaux.

## I.2.2 Renseignements cliniques

Tableau III: Répartition des sujets en fonction des motifs d'analyses

	Effectifs	Pourcentage (%)
Chute des cheveux	1	0,7
Contrôle	12	8,1
Désir de maternité	1	0,7
Diarrhée chronique	1	0,7
Ecoulement urétral	1	0,7
Enquête	100	67, 5
Infection du conjoint	1	0,7
Infection génitale récidivantes	4	2,7
Otite moyenne suppurée	1	0,7
Prurit de l'oreille gauche	1	0,7
Vulvo-vaginites+ leucorrhées pathologiques	25	16,8

Le motif principal de demande d'analyse mycologique au cours de notre étude est la présence de leucorrhées associée à une vulvo-vaginite (16,8 %).

# I.3 RESUTATS DES ANALYSES MYCOLOGIQUES ET SPECTROMETRIQUES

# I.3.1 Espèces identifiées selon la méthode d'identification

## I.3.1.1 Méthode Chromogénique (Candida Chromatic)

Tableau IV : Répartition des espèces par la méthode de Candida Chromatic

Espèces	Effectifs	Pourcentage %
C. albicans	44	29,7
C. krusei	19	12,8
C. tropicalis	21	14,2
C. sp	64	43, 2
Total	148	100

Candida albicans représente l'espèce la plus identifiée (29,7%).

#### I.3.1.2 Méthode MALDI-TOF

Tableau V: Répartition des espèces par la méthode MALDI-TOF MS

	Effectifs	Pourcentage %
C. albicans	46	31,1
C. krusei	14	9,5
C. tropicalis	43	29
C. parapsilosis	24	16,2
C. dubliniensis	1	0,7
C. glabrata	14	9,5
C. guillermondii	2	1,3
C. holmii	1	0,7
C. rugosa	3	2
Total	148	100

Candida albicans représente l'espèce dominante (31,1%).

# I.3.2 Répartition des espèces Candida sp

<u>Tableau VI</u>: Répartition des espèces non identifiées par la méthode Chromatique mais identifiées par le MALDI-TOF

	MALDI-TOF		
Souches	Effectifs (n)	Pourcentage (%)	
C. albicans	11	17,19	
C. krusei	4	6,25	
C. parapsilosis	12	18,75	
C. dubliniensis	1	1,56	
C. glabrata	14	21,87	
C. guillermondii	2	3,13	
C. rugosa	2	3,13	
C. tropicalis	18	26,56	
Total	64	100	

Candida tropicalis est l'espèce Candida sp la plus identifiée avec un pourcentage de 26,56 %

#### I.3.3 Mesure de concordance des techniques et méthodes de calcul (Candida sp inclus)

#### I.3.3.1 Droite de régression et coefficient de corrélation

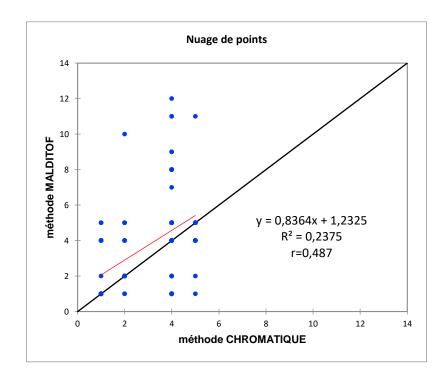


Figure 25 : Position des nuages de points par rapport à la droite d'égalité y=ax+b (en noir) et la droite de régression linéaire (en Rouge) de la méthode MALDI-TOF par rapport à la méthode Chromatique.

La droite de régression est située au-dessus de la bissectrice ; le biais est positif. Cette droite de régression n'est pas liée à la bissectrice.

Nous n'avons donc pas une bonne relation entre la méthode MALDI-TOF et la méthode Chromatique avec un coefficient de corrélation estimé à 0.48. La différence entre les deux méthodes est significative.

**Tableau VII:** Corrélation méthode Chromatique et méthode MALDI-TOF

SOUCHES	METHODES D'IDENTIFICATION			CORRELATION AU NIVEAU DU			RRELATION NIVEAU DE	
	CONVENTIONNELLE		MALDI-TOF		GENRE			SPECE
	Eff (n)	pourc (%)	Eff (n)	pourc (%)				
C. albicans	44	29 ,7	46	31,1	46	(100 %)	32	(70%)
C. tropicalis	21	14 ,2	43	29	43	(100%)	11	(26%)
C. krusei	19	12,8	14	9,5	14	(100%)	8	(57%)
C. parapsilosis	0	0	24	16,2	24	(100 %)	0	(0%)
C. glabrata	0	0	14	9,5	14	(100%)	0	(0%)
C. rugosa	0	0	3	2	3	(100%)	0	(0%)
C. guillermondii	0	0	2	1,3	2	(100%)	0	(0%)
C. dubliniensis	0	0	1	0,7	1	(100%)	0	(0%)
C. holmii	0	0	1	0,7	1	(100%)	0	(0%)
C. sp (non identifiées)	64	43,2	0	0	0		0	(0%)
TOTAL	148	100	148	100	148	(100%)	51	(34,5%)

La corrélation dans l'identification des levures par les deux méthodes est très élevée au niveau du genre (100%) et très faible au niveau de l'espèce (34,5%).

#### I.3.3.2 Mesure de l'accord par la méthode de Bland Altman

<u>Tableau VIII</u>: Biais, intervalles de confiance (IC) à 95%, limites de concordance des biais observés entre le MALDI-TOF et la méthode chromatique.

Biais	0,745
Erreur standard	2,308
IC Biais (95%)	] 0,371; 1,119 [

Intervalle de confiance (Différences):

] -3,778; 5,268 [

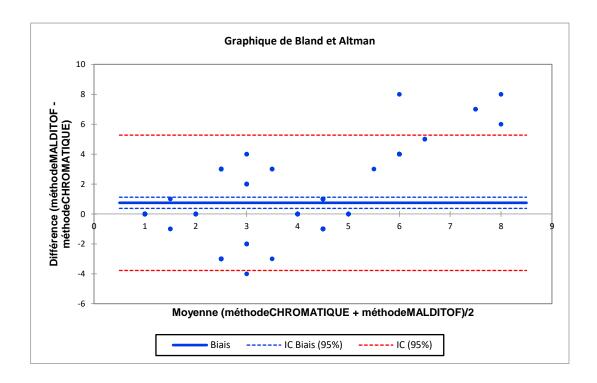


Figure 26 : Biais du nombre de parasites entre la méthode MALDI-TOF et la méthode de Candida chromatic en fonction des vraies valeurs estimées de la moyenne (Méthode MALDI-TOF + Méthode Chromatique) / 2

Le biais est positif. Il est proche de la ligne d'égalité, et cette ligne n'est pas comprise dans l'intervalle de confiance du biais.

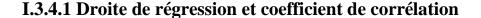
Le biais est statistiquement significatif.

La différence entre les deux méthodes est significative.

I.3.3.3 Coefficient de corrélation de Pearson (Moyenne (méthode CHROMATIQUE + méthode MALDI-TOF)/2 x Différence (méthode MALDITOF – méthode CHROMATIQUE))

Variable	Coeff. de	IC à 95%		
	corrélation			
Méthode MALDI-TOF/méthode	0,544	]0,420-0,648 [		
CHROMATIQUE				

#### I.3.4 Mesure de concordance des techniques et méthodes de calcul (Candida sp exclus)



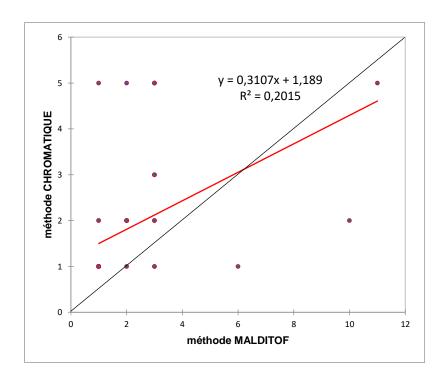


Figure 27 : Position des nuages de points par rapport à la droite d'égalité y=ax+b (en noir) et la droite de régression linéaire (en Rouge) de la méthode MALDI-TOF par rapport à la méthode Chromatique.

Le biais est positif. La droite de régression est située au-dessus de la bissectrice et cette droite n'est pas liée à la bissectrice.

Nous n'avons donc pas une bonne relation entre la méthode MALDI-TOF et la méthode Chromatique avec un coefficient de corrélation estimé à 0,44.

La différence entre les deux méthodes est significative.

I.3.4.2 Mesure de l'accord par la méthode de Bland Altman

Biais	0,241
Erreur standard	0,308
IC Biais (95%)	] 0,871; 2,01 [

Intervalle de confiance (Différences) :

] 0,157; 0.299[

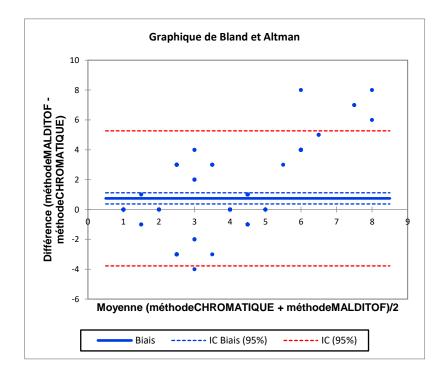


Figure 28 : Biais du nombre de parasites entre la méthode MALDI-TOF et la méthode de Candida chromatic en fonction des vraies valeurs estimées de la moyenne (Méthode MALDI-TOF + Méthode Chromatique) / 2

Le biais est toujours positif. Il est proche de la ligne d'égalité, et cette ligne n'est pas comprise dans l'intervalle de confiance du biais. Le biais est statistiquement significatif.

La différence entre les deux méthodes est significative.

Au terme de notre analyse (**Mesure de concordance des techniques et méthodes de calcul (avec et sans** *Candida sp*), nous constatons que la différence entre les deux méthodes (MALDI-TOF et *Candida* Chromatic) est statistiquement significative.

#### II- DISCUSSION

L'objectif principal des techniques de diagnostic microbiologique est d'obtenir des résultats précis et cliniquement utiles dans les meilleurs délais. En mycologie, certaines techniques, pour la plupart microscopiques, permettent un diagnostic présomptif rapide. Cependant, un diagnostic définitif nécessite la croissance des champignons sur les milieux de culture et l'identification biochimique ou morphologique.

Cette méthodologie peut retarder considérablement le diagnostic. Les techniques moléculaires ont montré leur efficacité et leur spécificité dans l'identification fongique. Cependant, elles sont, pour la plupart des techniques, difficiles à réaliser et restreintes en grande partie aux laboratoires de recherche ou de référence.

De nos jours, le développement de techniques d'identification rapides et fiables est un objectif essentiel en mycologie. Cela pourrait réduire de plusieurs jours le délai nécessaire au diagnostic et, de plus, une identification fiable est cruciale pour prendre les décisions thérapeutiques, lorsque des espèces appartenant au même genre sont susceptibles d'avoir des profils différents vis-à-vis des antifongiques.

De cette manière, l'identification fiable des espèces de *Candida sp* devient de plus en plus importante, en raison de l'émergence des espèces de Candida autres que *C. albicans* en pathologie humaine, et l'hétérogénéité de leur sensibilité aux antifongiques [71].

La spectrométrie de masse a été récemment décrite comme utile et une méthode fiable pour l'identification bactérienne, à la fois directement à partir des colonies qui poussent sur des milieux de culture[72-75], ou même directement à partir de certains échantillons (sang, urine) [76-79]. Bien que l'expérience du MALDI-TOF MS en mycologie ne soit pas assez documentée, certaines études, principalement sur les levures, suggèrent que son utilité pour l'identification des champignons serait similaire à l'identification bactérienne, au moins en ce qui

concerne le fait de travailler avec des colonies qui poussent sur des milieux solides (plaques d'agar chromogéniques) [80-81].

Cette étude confirme l'utilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF comme une bonne alternative aux méthodes conventionnelles d'identification des espèces de levures les plus fréquemment isolées, y compris *C. albicans* et différentes espèces de Candida non *albicans*.

Ainsi dans le but d'argumenter cette affirmation, nous discuterons de chaque résultat obtenu au cours de notre étude.

#### II.1 CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES

#### II.1.1 Répartition des patients en fonction du sexe

Au cours de notre étude, nous avons eu 93 patients de sexe féminin et 55 patients de sexe masculin ; soit un sex-ratio de 0,6. Il semblerait donc que le sexe féminin soit le plus touché par les candidoses. Cela a été confirmé par **NEKKACHE** et al. [82] lors d'une étude sur les mycoses avec un sex-ratio de 0,5.**Ce résultat s'explique par le fait qu'il y avait, au cours de notre étude, plus de prélèvements de femmes que d'hommes.** 

#### II.1.2 Répartition en fonction de l'âge

En ce qui concerne l'âge, on n'a pas établi une répartition en intervalles ou tranches d'âge vu que nous disposons des données sur l'âge de seulement 48 souches sur 148. Les 100 autres souches proviennent des professionnelles de sexe, et nous n'avons pas eu accès dans notre étude à certaines données notamment l'âge des personnes examinées.

Cependant, selon les données disponibles, l'âge moyen des patients de notre étude est de  $31,06 \pm 8,40$  ans et l'âge médian est de 30,50 ans. Ces résultats montrent que la population la plus touchée par les candidoses est la population jeune. En effet, certains auteurs tels qu'**Anane et al. (2010)** en Tunisie lors d'une étude évaluant les

facteurs de risque et les particularités cliniques et mycologiques des candidoses et **Benchellal et al. (2011)** au Maroc, ont respectivement montré dans leurs études que la tranche d'âge la plus touchée était celle entre 20 et 39 ans et celle entre 25 et 35 ans [83-84].

Cette grande fréquence des candidoses dans la population jeune pourrait s'expliquer d'une part, par le fait que l'activité sexuelle est maximale durant cette période et d'autre part, par une augmentation de l'activité oestrogénique [augmentation de la production d'œstrogène, une hormone sexuelle qui influence la libido (désir sexuel)] [85-87].

#### II.1.3 Répartition selon le lieu de provenance

La ville d'Abidjan abritait la plus grande partie de la population d'étude avec un pourcentage de 60,8%.

#### II.2 CARACTERISTIQUES CLINIQUES

#### II.2.1 Type de prélèvement

Les *Candida* ont été isolés à partir d'une grande variété de prélèvements cliniques. Cependant, la majorité de nos souches sont issues du prélèvement vaginal avec un pourcentage de 40,5%.

Le prélèvement oropharyngé vient en second avec une fréquence de 29,5 %, suivi du prélèvement anal (24,3 %).

Cliniquement parlant, ces résultats démontrent la nette prédominance des candidoses vaginales 40,5%. **Djohan et al.**, lors d'une étude sur le profil épidémiologique des mycoses vaginales au CHU de Cocody avaient trouvé une prévalence de 30,7% [88]. Toujours en Côte d'Ivoire, **Faye et al.** ont montré une prévalence de 25% des candidoses vaginales. [89]

#### II.2.2 Renseignements cliniques

Dans notre étude, en ce qui concerne les motifs d'analyse pour lesquels les patients ont été adressés au laboratoire, les vulvo-vaginites associées à des leucorrhées avaient un taux plus élevé (16,8%), signifiant que la plupart des patients étaient de sexe féminin, et la prédominance des leucorrhées comme principale manifestation des candidoses vaginales a été décrite dans d'autres études. L'étude faite au Benin avait montré que les leucorrhées représentaient le maître symptôme avec 74,8% [90]. Cela a été confirmé par les données des études réalisées par Anane et al. et Benchellal et al. [83,84].

# II.3 RESULTATS DES ANALYSES MYCOLOGIQUES ET SPECTROMETRIQUES

#### II.3.1 Répartition des espèces selon la méthode d'identification

Les résultats de notre étude montrent que l'espèce *C. albicans* est prédominante aussi bien au niveau de la méthode chromogénique (BBLCHROMAGAR®*Candida*) (29,7%) que de la méthode MALDI-TOF conformément à ce qui est classiquement retrouvé chez l'homme où *C. albicans* est la levure la plus souvent isolée, soit 66,5 % de toutes les levures (**Nsabimana et coll. (2007)**; **Richter et al. (2005) [91,92].** Ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'elle est **l'espèce de levure qui est retrouvée en grand nombre de façon commensale chez l'homme.** 

L'on a constaté aussi que seulement 56,8 % des isolats repartis en 03 espèces de Candida (*C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. krusei*) ont été correctement identifiées par la méthode chromogénique. En effet, 64 isolats, n'ont pu être identifiés qu'au rang du genre par le *Candida* Chromatic (42,3 %). On les regroupe sous le nom de *Candida sp*. L'identification correcte de ces espèces nécessite d'autres analyses plus poussées telles que l'utilisation de systèmes d'identification biochimiques(PCR, galeries...) car selon les données de la littérature, la méthode chromogénique

BBLCHROMagar<sup>®</sup> Candida ne permet l'identification présomptive claire que de ces 03 espèces de Candida, distinctives grâce aux couleurs qu'elles produisent sur ce milieu.

Cependant, ces espèces non identifiées par la méthode Chromogénique ont été correctement identifiées par la méthode MALDI-TOF. Cette méthode a donc permis d'identifier correctement 100 % des isolats qui ont été répartis en 09 espèces (*C. albicans, C. tropicalis, C. krusei, C. glabrata, C. parapsilosis, C. dubliniensis, C. holmii, C. rugosa* et *C. guillermondi*), avec *C. tropicalis* représentant l'espèce la plus identifiée.

#### II.3.2 Mesure de concordance des techniques et méthodes de calcul

#### II.3.2.1 Droite de régression et coefficient de corrélation

Pour cette analyse, la droite de régression est au-dessus de la bissectrice, ce qui fait évoquer un biais positif.

La droite de régression entre les deux techniques MALDI-TOF et Candida Chromatic n'est pas proche de la bissectrice (droite d'égalité y = ax+b).

Cela signifie que les deux techniques ne sont pas proches l'une de l'autre.

Peu précise, cette approche ne fournit aucune information sur la valeur statistique des biais et sur les limites de l'intervalle de confiance à 95% dans lesquelles ils sont contenus.

Le coefficient de corrélation n'est pas proche de 1 (r = 0,48), prouvant qu'il n'existe pas réellement de lien entre les deux techniques.

Cette information est cependant d'une portée limite. En effet, le coefficient de corrélation ne constitue pas un indicateur de l'accord car la corrélation entre deux mesures peut être parfaite, même si les valeurs de l'une représentent le double de celles de l'autre [93].

Evaluer la concordance entre deux séries d'observations impose d'utiliser d'autres méthodes statistiques.

Cependant, les résultats de la comparaison des identifications obtenues par le spectromètre de masse, avec les identifications obtenues par la méthode traditionnelle, ont révélé une bonne corrélation au rang de genre (100 %) et une faible corrélation (34,5%) au rang de l'espèce.

L'obtention d'une faible corrélation au rang de l'espèce s'explique par la mise en défaut de la base de données de la méthode traditionnelle, face à une **plus grande** exhaustivité de la base de données disponible avec la spectrométrie de masse MALDI-TOF. En effet, selon les données de la littérature la base de données du VITEK MS est constituée de plus de 15.000 souches distinctes de bactéries, levures et moisissures [94].

#### II.3.2.2 Mesure de l'accord par la méthode de Bland Altman

Bland et Altman [93], ayant constaté l'inadaptation des méthodes de régression linéaires pour comparer deux méthodes différentes de mesure d'une même grandeur, ont proposé une méthode d'étude de la concordance ou de l'agrément entre deux mesures de la même grandeur reposant sur l'analyse des biais et de la représentation graphique.

Cette représentation permet l'observation précise des différences de détection d'un éventuel lien entre le biais et la valeur du paramètre considéré. La détermination de l'intervalle de confiance du biais à 95 % permet de juger si les différences sont cliniquement acceptables [95].

Dans notre étude, pour la comparaison de la technique MALDI-TOF et la technique de *Candida* Chromatic, le biais est estimé à 0,745 espèces identifiées par méthode. L'intervalle de confiance du biais à 95 % s'étend de 0,371 à 1,119 et ne comprend pas la droite d'égalité, ce qui signifie que les deux techniques sont statistiquement différentes.

#### II.3.2.3 Le coefficient de corrélation de Pearson

Le coefficient de corrélation de Pearson est calculé avec un intervalle de confiance, afin de vérifier si la corrélation entre la différence et la moyenne des paramètres étudiés est différente de 0 ou non. Cette corrélation sera d'autant plus proche de zéro que les méthodes seraient proches.

Notre étude donne un coefficient de corrélation pour la comparaison entre le MALDI-TOF et le Candida chromatique d'une valeur de 0,544, avec un intervalle de confiance ne comprenant pas zéro (0,420 à 0,648). Cela signifierait que la méthode MALDI-TOF et la méthode de *Candida* Chromatic sont statistiquement différentes.

Les différents tests de régression linéaire et coefficient de corrélation, Bland et Altman et le coefficient de corrélation de Pearson permettent de conclure que les deux techniques d'identification sont statistiquement différentes. De ce fait, l'on peut dire qu'il n'y a pas de concordance entre la Méthode chromogénique BBLCHROMAGAR Candida et le MALDI-TOF.

Nous devrions remarquer cependant la fiabilité de l'identification obtenue par le MALDI-TOF MS. Dans tous les cas où MALDI-TOF a donné une identification fiable au moins au niveau du genre, l'identification coïncidait avec l'identification du genre obtenue par la méthode Chromogénique. Cela signifie que, alors qu'il y a une certaine probabilité de ne pas obtenir de résultat fiable en utilisant les méthodes conventionnelles, le MALDI-TOF MS, quand il est obtenu, le niveau de fiabilité est élevé.

Dans l'ensemble, l'identification des champignons en utilisant le MALDI-TOF MS a des avantages potentiels par rapport à l'identification conventionnelle.

# III. INTERET DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF VITEK MS

#### III.1 AVANTAGES

La spectrométrie de masse MALDITOF VITEK MS est très prometteuse pour les laboratoires de Mycologie. En effet elle présente plusieurs avantages:

- Rapidité de l'identification: Le VITEK MS est la technique d'identification la plus rapide. Alors qu'il faut entre 4 et 8 heures pour les identifications sur le VITEK 2 et entre 4 et 18 heures sur les galeries de tests biochimiques, avec le VITEK MS, une demi-heure suffit pour lire une lame contenant 24 échantillons.

Ce gain de temps améliore le service rendu au patient en permettant une prise en charge rapide et une adaptation plus précoce du traitement antifongique ;

- Petit volume d'échantillon nécessaire : Il faut très peu de matériel pour effectuer le dépôt. En général, une colonie bien isolée suffit, parfois plusieurs si elles sont très petites ;
- Fiabilité des identifications et grande précision ; la spectrométrie de masse permet en particulier de détecter et d'identifier des pathogènes classiquement difficiles à mettre en évidence avec les techniques conventionnelles ;
- Son faible coût d'analyse (des milieux de culture pour faire pousser les levures, une petite quantité d'acide formique et une petite quantité de matrice suffisent) et sa maintenance réduite [96];
- Simplicité d'utilisation au quotidien : La préparation de l'échantillon est simple à réaliser, avec des manipulations limitées des échantillons (sécurité du personnel) et une réduction considérable des déchets.

#### III.2 LIMITES ET PERSPECTIVES

- Une limite de la spectrométrie de masse MALDITOF en termes de coût reste l'achat du matériel et du logiciel d'analyse avec la base de données de l'ordre de 200000 € [97] (180.000.000 FCFA pour le VITEK MS dont dispose l'IPCI d'Adiopodoumé). Ce prix d'achat limite son acquisition par tous les laboratoires. Les principales bases de données disponibles sont proposées par les sociétés Becton Dickinson et BioMérieux.
- Plusieurs études récentes [98-100] montrent que la spectrométrie de masse MALDI-TOF identifie correctement les levures du genre Candida tant que le spectre de l'espèce à identifier est dans la banque de données. Une des limites de

cette technique est donc l'exhaustivité de la banque de données. Une mise à jour régulière de ces bases de données permettra d'accroître encore plus l'intérêt de cette méthode pour l'identification en mycologie ;

- L'identification par la spectrométrie de masse MALDI-TOF offre donc des perspectives séduisantes pour l'identification à partir des cultures mycologiques. Toutefois, cette méthode implique l'obtention de la souche en culture et donc nécessairement un retard de prise en charge dû au délai de culture. Ces 24 ou 48 heures supplémentaires nécessaires à l'identification, donc à une éventuelle adaptation du traitement antifongique, peuvent être dommageables dans les candidémies où la rapidité de l'institution d'un traitement efficace constitue un facteur pronostic important. [101]

Partant de ce principe un grand nombre de développements ont été effectués récemment (surtout au niveau bactériologique) pour améliorer les limites de détection de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cet appareil peut maintenant être utilisé pour :

- La détection de la résistance : Récemment certains marqueurs de résistance à un ou plusieurs antibiotiques ont été détectés par MALDITOF MS. [102-104] Toutefois cette approche doit encore être validée en routine pour remplacer les techniques traditionnelles. Néanmoins, cette détection des mécanismes de résistance par la spectrométrie de masse est un élément clé d'avenir qui révolutionnera alors complètement la microbiologie ;
- La détection des facteurs de virulence : Les différences de profils de virulence des microorganismes pathogènes peuvent être basées sur la détermination de la présence/absence de pics spécifiques (m/z). Cette approche permet non seulement d'identifier les espèces mais aussi de détecter la présence de certaines protéines spécifiques comme les molécules de surface ou certains facteurs de virulence connus.

- La détection directement à partir du prélèvement : L'utilisation du MALDITOF MS pour identifier les micro-organismes à partir des prélèvements est l'un des développements les plus intéressants dans l'avenir [105]. Certaines publications ont montré la possibilité de détecter les microorganismes directement à partir d'une hémoculture ou d'urines [106-119].

Vlek et al. ont d'ailleurs démontré que l'utilisation du MALDI-TOF MS à partir de flacons d'hémocultures positifs réduisait le temps d'identification des bactéries de 28,8 h et était associée à une proportion accrue de patients ayant reçu une antibiothérapie adaptée dans les 24 h [120]. Martiny et al ont également noté l'intérêt de cette technique dans la prise en charge des patients permettant un diagnostic anticipé de l'infection dans 71 % des cas et une adaptation thérapeutique efficace [121]. Cette technique reste encore à évaluer en routine.

L'identification directe de pathogènes dans les urines a également été évaluée. Les résultats ne sont pas encore satisfaisants car cela nécessite d'éliminer les globules blancs et les cellules épithéliales et nombreux d'autres éléments qui interfèrent avec l'analyse.

Toutes ces évolutions sont très intéressantes pour l'avenir mais des améliorations semblent donc encore nécessaires.



Les candidoses représentent les infections fongiques les plus fréquentes en pathologie humaine. Le diagnostic d'une candidose est une préoccupation quotidienne pour le biologiste notamment en raison de ces manifestations diverses ainsi que des conséquences néfastes qu'elle peut avoir sur la santé selon le type de candidose et l'espèce mise en cause. De ce fait, l'identité de l'espèce et de son profil de sensibilité aux antifongiques demeure l'élément le plus important dans la prise en charge thérapeutique d'une candidose.

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est une technique d'identification qui s'impose progressivement et massivement dans les laboratoires de microbiologie. Pour évaluer les performances d'identification fongique de ce nouvel outil, nous avons entrepris une étude mycologique à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire qui s'est doté un appareil VITEK MS (bioMérieux) dont l'objectif principal était d'évaluer la concordance de l'identification des espèces de *Candida* par le MALDI-TOF MS et les méthodes conventionnelles notamment la méthode chromogénique *Candida* Chromatic. Ainsi, 148 isolats issus de prélèvements divers ont été retenus. La moyenne d'âge était de 31,06± 8,40 ans et le sexe féminin dominait avec un sex-ratio de 0,6.

Les espèces de *Candida* les plus rencontrées étaient *Candida albicans* (31,1%) et *Candida tropicalis* (29%) suivi de *Candida parapsilosis* (16,2%) et *Candida glabrata* (9,5%). La ville Abidjan abritait la majorité de notre population d'étude. Nous avons eu une concordance très élevée (100%) au niveau du genre et une faible concordance en ce qui concerne l'espèce (34,5%). En effet 64 espèces n'ont pu être identifiées par la méthode BBLCHROMAGAR Candida.

Il faut noter que les atouts du VITEK MS sont nombreux : rapidité et précision d'identification, prise en main et utilisation aisées, faible coût par échantillon. Certes l'achat et l'entretien d'un tel système peuvent apparaître onéreux, mais la balance à long terme est très en faveur du MALDI-TOF.

En effet, une identification rapide et précise permet une optimisation de la prise en charge du patient. Ceci se traduit par une réduction de la prescription empirique d'antifongiques à large spectre dont les avantages sont multiples :lutte contre l'émergence des résistances, diminution du coût des traitements, diminution des journées d'hospitalisation. Par ailleurs, les tests phénotypiques, les galeries d'identification et autres kits d'agglutination sont remplacés, diminuant d'autant plus les dépenses des laboratoires.

À l'heure actuelle, il est impératif d'évaluer et de comparer les différents systèmes disponibles quant à leurs performances techniques, à la précision d'identification, à la maintenance et aux mises à jour des banques de données.

Enfin, le champ d'investigation de cette technologie reste très largement ouvert permettant d'envisager dans un avenir proche de comparer les souches, d'identifier des facteurs de virulence ou encore d'étudier la résistance aux antimicrobiens.

# RECOMMANDATIONS

Nous formulons quelques recommandations à l'issue de cette étude, pour une utilisation optimale du MALDI-TOF pour le diagnostic des candidoses au laboratoire.

# > Aux autorités politiques et administratives

Subventionner l'achat de plusieurs MALDI-TOF afin de permettre la vulgarisation de l'appareil à d'autres laboratoires

### > Aux autorités sanitaires

- Assurer la formation des Agents de santé en ce qui concerne l'utilisation du MALDI-TOF VITEK MS ;
- Assurer le suivi, le contrôle et la maintenance du MALDI-TOF au laboratoire ;
- S'assurer de la disponibilité des différents réactifs et matériels utilisés pour l'identification par le MALDI-TOF.



- [1].Bouix M. Et Leveau J.Y. Les Levures. In : Bourgeois C.M., Leveau J.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, Paris:Tec &Doc-Lavoisier, 1991,2è éd, p : 206-229.
- [2].Bouix M., Leveau J.Y.Contrôle microbiologique. In: SCRIBAN R. Biotechnologie, Paris: Tec &Doc-Lavoisier,1999, p: 86-118.
- [3]. Pol D. Travaux pratiques de biologie des levures.In: Guide de laboratoire, Paris15: ellipses marketing S.A, 1996, p: 20-38, 42-57, 141-151.
- [4].Pfaller Ma, Diekema Dj: Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. ClinMicrobiol(2007) Rev 20: 133-163PubMedCrossRefGoogle Scholar.
- [5]. Patterson TF Advances and challenges in management of invasive mycoses.(2005) Lancet 366: 1013–1025 <a href="PubMedCrossRefGoogle Scholar">PubMedCrossRefGoogle Scholar</a>
- [6]. **Espinel-Ingroff A.**In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazoleposaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature.(2003) Rev IberoamMicol 20: 121–136 PubMedGoogle Scholar
- [7]. Marr KA The changing spectrum of candidemia in oncology patients: therapeutic implications. CurrOpin Infect Dis(2000) 13: 615–620 <a href="https://example.com/PubMedCrossRefGoogle Scholar">PubMedCrossRefGoogle Scholar</a>
- [8]. Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. J Infect Dis(2000) 181: 309–316 PubMedCrossRefGoogle Scholar

- [9]. Fujita S, Senda Y, Okusi T, et al. Catheter-related fungemia due to fluconazole-resistant Candida nivariensis. J ClinMicrobiol(2007) 45: 3459–3461PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [10]. Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, et al. Identification of Candida nivariensis and Candida bracarensis in a large global collection of Candida glabrata isolates: comparison to the literature. J ClinMicrobiol(2009) 47: 1216–1217PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [11]. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infect Dis(2011) 11: 142–151PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [12]. Pincus DH, Orenga S, Chatellier S Yeast identification—past, present, and future methods. Med Mycol (2007) 45: 97–121PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [13]. Loïez C, Wallet F, Sendid B, Courcol RJ Evaluation of VITEK 2 colorimetric cards versus fluorimetric cards for identification of yeasts. DiagnMicrobiol Infect Dis(2006) 56: 455–457<u>PubMedCrossRefGoogle</u> Scholar
- [14]. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, et al. Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology(1995) 141: 1507–1521Google Scholar
- [15]. Borman AM, Petch R, Linton CJ, et al. Candida nivariensis, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. J ClinMicrobiol(2008) 46: 933–938PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [16]. Anhalt JP, Fenselau C Identification of bacteria using mass spectrometry. Analytical Chemistry (1975) 47: 219–225 Cross Ref Google Scholar

- [17]. Haag AM, Taylor SN, Johnston KH, Cole RB Rapid identification and speciation of Haemophilus bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Mass Spectrom (1998) 33: 750–756PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [18]. Krishnamurthy T, Ross PL Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. Rapid Commun Mass Spectrom (1996) 10: 1992–1996PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [19]. Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant Aspergillus species. ClinMicrobiol Infect(2011) 17: 750–755PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [20]. Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J ClinMicrobiol (2010) 48: 1549–1554PubMedCrossRefGoogle Scholar
- [21].Grillot R. Les mycoses humaines: démarche diagnostique. ELSEVIER Paris 1996.
- [22].Mackenzie Dw. Serum tube identification of *Candida albicans*. J Clin Pathol 1962; 15(6):563-5.
- [23]. Kayser F.H, Bottger E.C. Manuel de poche de microbiologie medicale. MEDECINESCIENCES FLAMMARION 2008
- [24]Midgley G. Atlas de poche de mycologie. FLAMMARION 1998

- [25] Beheshti F, Smith AG, Krause GW. Germ tube and chlamydospore formation by *Candida albicans*on a new medium. J Clin Microbiol 1975; 2(4):345-8.
- [26]http://www.doctorfungus.orgh consulté en Décembre 2008
- [27]. Chabasse D., Guigen CI., Contet-audonneau N. Mycologie medicale MASSON, Paris, 1999.
- [28]. Chabasse D., Robert R., Marot A., Pithet M. Les *Candida* pathogenes. LAVOISIER Edition TEC et DOC Mars 2006.
- [29].Quindos G, San Millan R, Robert R, et al. Evaluation of bichrolatex albicans, a new method for rapid identification of Candida albicans. J ClinMicrobiol 1997; 35(5):1263-5.
- [30].Pihet M. And Marot A. « Diagnostic Biologique Des Candidoses »Revue Francophones Des Laboratoire 2013(450);47-61
- [31]. Marot-Leblond A, Beucher B, David S, et al. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody toIdentify*Candida dubliniensis*colonies. J Clin Microbiol 2006; 44(1):138-42.
- [32]. http://www.bi omerieux.com consulte en Novembre 2008
- [33].Crist AE, Jr, Dietz TJ, Kampschroer K. Comparison of the MUREX *C. albicans*, *Albicans*-Sure, and BactiCard*Candida* test kits with thegerm tube test for presumptive identification of *Candida* albicans. J Clin Microbiol 1996;34(10):2616-8.
- [34].Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, et al.Rapid identification of Candida albicansby using Albicans ID and fluoroplate agar plates. J Clin Microbiol 1994; 32(12):3034-6

- [35].Fuller DD, Davis TE, Jr., Denys GA, et al. Evaluation of BACTEC MYCO/F Lytic medium for recovery of mycobacteria, fungi, and bacteria from blood. J Clin Microbiol2001;39(8):2933-40
- [36]. Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Med Mycol2001;39(1):9-33
- [37]. Mackenzie DW. Serum tube identification of Candida albicans. J ClinPathol1962;15(6):563-5.
- [38].Beheshti F, Smith AG, Krause GW. Germ tube and chlamydospore formation by Candida albicanson a new medium. J Clin Microbiol1975;2(4):345
- [39].Quindos G, San Millan R, Robert R, et al. Evaluation of bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of Candida albicans. J Clin Microbiol 1997;35(5):1263-5.
- [40].Marot-Leblond A, Beucher B, David S, et al. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify Candida dubliniensiscolonies. J Clin Microbiol2006;44(1):138-42.
- [41].Crist AE, Jr, Dietz TJ, Kampschroer K. Comparison of the MUREX C. albicans, Albicans-Sure, and BactiCard Candida test kits with the germ tube test for presumptive identification of Candidaalbicans. J Clin Microbiol1996;34(10):2616-8.
- [42].Freydière AM, Buchaille L, Guinet R, et al. Evaluation of latex reagents for rapid identification of Candida albicans and Candida kruseicolonies. J Clin Microbiol1997;35(4):877-80.

[43].Shinoda T, Kaufman L, Padhye AA. Comparative evaluation of the Iatron serological Candidacheck kit and the API 20C kit for identification of medically important Candidaspecies. J Clin Microbiol 1981;13(3):513-8.

[44].Freydière AM, Robert R, Ploton C, et al. Rapid identification of Candida glabratawith a new commercial test, GLABRATA RTT. J Clin Microbiol2003;41(8):3861-3.

[45].Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, et al. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar Candidaas a source medium with the new card. J Clin Microbiol2006;44(1):227-8.

[46].Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. ProcNatlAcadSci USA 2012;109:6241-6.http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117018109.

[47].Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of Trichosporon species. J Clin Microbiol 2002; 40:1826-30.

[48].Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M. et al.Sequence-based identification of Aspergillus, fusarium,mucorales species in the clinical mycology la boratory: where are we, where should we go from here? J.Clin Microbiol 2009; 47:877—84. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01685-08.

- [49].Sendid B, Ducoroy P, Francois N, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals.Med Mycol 2012; Jun 18 [Epub ahead of print].
- [50].Maier T, Klepel S, Renner U, Kostrzewa M. Fast and reliable MALDITOF MS-based microorganism identification. Nat Methods 2006; 3:2. http://dx.doi.org/10.1038/nmeth870.
- [51].Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapididentification of intact microorganisms using mass spectrometry.Nat Biotechnol 1996; 14:1584-6. http://dx.doi.org/10.1038/nbt1196-1584.
- [52].Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. Mass Spectrom Rev 2001; 20:157-71. http://dx.doi.org/10.1002/mas.10004.
- [53].Amiri-Eliasi B, Fenselau C. Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. Anal Chem 2001;73:5228-31.
- [54].Welker M, Moore ERB. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. SystApplMicrobiol 2011; 34:2-11. http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.013.
- [55].Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem 1975;47:219-25.
- [56]. Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nat Protoc 2009;4:732-42.http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.37.

## [57]. Alanio A, Beretti J-L, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, et al.

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinicallyrelevant Aspergillus species. ClinMicrobiol Infect 2011; 17:750-5. <a href="http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03323.x">http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03323.x</a>.

- [58]. Cassagne C, Cella A-L, Suchon P, Normand A-C, Ranque S, et al.Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. Med Mycol 2012. <a href="http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.720720">http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.720720</a>.
- [59]. Emonet, S., Shah, H.N., Cherkaoui, A., Schrenzel, J., Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010: 16, 1604-1613.
- [60].Kaleta, E.J., Clark, A.E., Johnson, D.R., Gamage, D.C., Wysocki, V.H., Cherkaoui, A., Schrenzel, J., Wolk, D.M., Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. Journal of clinical microbiology.2011: 49, 345-353.
- [61]. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F., Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1987; 78, 53-68.
- [62].Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in

the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 2013;26(3):547–603 [PubMed PMID: 23824373. Pubmed Central PMCID: PMC3719498. Epub 2013/07/05. eng].

- [63]. Goyer M, Lucchi G, Ducoroy P, Vagner O, Bonnin A, et al. Optimization of the preanalytical steps of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. JClin Microbiol 50 (2012), pp. 3066-3068.
- **[64]. Gravet A. Camdessoucens-Miehé.** Application de la spectrométrie de masse à la microbiologie. Rev Fr Lab 2011;437: 55-64.
- **[65]. Odds, F.C., and R. Bernaerts.** 1994. CHROMagar Candida Medium, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 32: 1923-1929.
- [66]Pfaller, M.A., A. Huston, and S. Coffman. 1996. Application of CHROMagar Candida Medium for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans, Candida tropicalis, Candidakrusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J. Clin. Microbiol. 34: 56-61.
- [67].Beighton, D., R. Ludford, D.T. Clark, S.R. Brailsford, C.L. Pankhurst, G.F. Tinsley, J. Fiske, D. Lewis, B. Daly, N. Khalifa, V. Marren, and E, Lynch. 1995. Use of CHROMagar Candida Medium medium for isolation of yeasts from dental samples. J. Clin. Microbiol.

32: 3025-3027.

[68] Jabra-Rizk, M.A. et al. 2001. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida Medium. J. Clin. Microbiol. 30: 2015-2016.

[69]Bauters, T.G., and Nelis, H.J. 2002. Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 40:1838-1839.

[70]. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.).2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.

[71].Mensa J, Pitart C, Marco F. Treatment of critically ill patients with candidemia. Int J Antimicrob Agents 32 Suppl 2008; 2: S93-S97.

[72]Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis 2009; 49:543-51.

[73]Ferreira L, Vega S, Sanchez-Juanes F, Gonzalez M, Herrero A, Muñiz MC, Gonzalez-Buitrago JM, Muñoz JL. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28:492-7.

[74]Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010; 48:1549-54.

[75] Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois

**P, Schrenzel J.** Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. J Clin Microbiol 2010; 48:1169-75.

[76]Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Porras-Guerra I, Garcia-Garcia MI, Garcia-Sanchez JE, Gonzalez-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2011; 17:546-51.

[77] Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, Prevost G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1631-38.

[78] Ferreira L, Vega-Castaño S, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, Gonzalez-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Identification of Brucella by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. PLoS One 2010; 5:e14235.

[79] Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernandez A, Gonzlaez-Buitrago JM, Muñoz- Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2010; 48: 2110-5.

[80] Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG. Matrix-assisted laser

desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J Clin Microbiol 2009; 47:2912-7.

[81]Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ.High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol 2010; 48:900-7.

[82] Nekkache S., Achouri S., Reguig F. et al. Profil épidémiologique des mycoses au CHU de la nouvelle-ville à Constantine (Algérie). 2015;

[83]Anane S, Kaouech, Zouari, Belhadj, Kallel K, Chaker E. Les candidoses vulvovaginales : facteurs de risque et particularités cliniques et mycologiques.

J Mycol Med 2010; 20:36-41

[84]Benchellal M, Guelzim K, Lemkhente, Jamili H, Dehainy M, Rahali Moussaoui D et coll. La candidose vulvo-vaginale à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V (Maroc). J Mycol Med 2011; 21: 106-112

[85]. Nyirjesy P, Sobel JD. Vulvovaginal candidiasis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:671-84.

[86]Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet 2007; 369:1961—71.

[87]Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 203-11.

- [88]. Djohan V, Konate A, Vanga-Bosson AH, Kassi K.F, Angora KE, Kiki Barro PC et coll. Profil épidémiologique des mycoses vaginales chez les femmes enceintes au CHU de Cocody (Côte d'Ivoire). Rencontre Société Ouest Africaine de Parasitologie (SOAP), Dakar 2012.
- [89]. Faye-Kette Y.H, Kouassi A.A, Sylla-Kooko D.F, Kacou- N'Douba A, Akoua-Koffi G, Acho Y.B et al. Prévalence de quatre agents des maladies transmises sexuellement au cours de leucorrhées à Abidjan (Côte-d'Ivoire). Rencontres franco-africaines de pédiatrie, 1993; 86:300-307.
- [90]. Ogouyèmi-Hounto A, Adisso S, Djamal J, Sanni R, Amangbegnon R, Biokou-Bankole B, et al. Place des candidoses vulvo-vaginales au cours des infections génitales basses et facteurs de risque associés chez les femmes au Bénin. J Mycol Med 2014; 24: 100-105
- [91]. Nsabimana JD, Twagirunurnukiza M, Claeys G, Verschraegen G. Détermination de la sensibilité de 45 souches de Candida au fluconazole: Analyse de deux tecniques de référence proposées par NCCLS1 : papier à disque et la macrodilution. Med Afr noire, 2007 ; 5401 : 35-40
- [92]. Richter et al. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and Epidemiology of recurrent cases. J Clin Microbiol, 2005, 43: 2155-2165.
- [93] Bland J.M, Altman D.G. statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet. 1986, 1:307-310
- [94]. <a href="http://www.biomérieux-microbio.com">http://www.biomérieux-microbio.com</a> (février 2017)consulté en septembre 2018

- [95] Ennouchi F., Anselme M.S., Chanteperdrix V. et al. Assessment of the agreement between three heamatology instruments. Ann Clin Biochem. 2002, 60 (3): 351-355
- [96]. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin InfectDis* 2009; 49: 543-51.
- [97] Dhiman N., Hall L., Wohlfiel S.L., Buckwalter S.P. and Wengenack N.L., 2011. Performance and cost analysis of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of yeast. J Clin Microbiol
- [98]. Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G & Prod'hom, G.(mai 2010). Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. Journal Of Clinical Microbiology, 48(5), 1549-1554
- [99].Pinto A, Halliday C, Zahra M, Van Hal S, Olma T, Maszewska K, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Yeasts Is Contingent on Robust Reference Spectra. PLoS ONE. 13 oct 2011;6(10):e25712.
- [100] Marklein G., Josten M., Klanke U., Muller E., Horre R. et al., 2009 MALDITOF Mass spectrometry for fast and reliable identification ofclinical yeast isolates. J. Clin Microbiol 47: 2912-2917
- [101] Morrell M., Fraser V.J. and Kollef M.H. 2005 delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results

are obtained: a potential risk factor for hospital mortality Antimicrob Agents chemother 49: 3640-3645.

[102]. Wang YR, Chen Q, Cui SH, Li FQ.Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens by matrix assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomed Environ Sci* 2013; 26: 430-6.

[103]. Edwards-Jones V, ClaydonMA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, GordonDB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillinresistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000; 49: 295-300.

[104]. Majcherczyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P.The discriminatory power of Maldi-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255: 233-9.

[105].DeMarco ML, Ford BA. Beyond identification: emerging and future uses for Maldi-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Clin Lab Med* 2013; 33: 611-28.

[106].Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, et al. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight (Maldi-TOF) mass spectrometry. *JMol Diagn* 2011; 13: 701-6.

[107]Köhling HL, Bittner A, Müller KD, Buer J, Becker M, Rübben H, et al. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser

desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol* 2012; 61: 339-44.

[108] Klein S, Zimmermann S, Köhler C, Mischnik A, Alle W, Bode KA. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J Med Microbiol* 2012; 61: 323-31.

[109]. Juiz PM, Almela M, Melción C, Campo I, Esteban C, Pitart C, et al. A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using Maldi-TOF MS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 1353-8.

[110]. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization SepsityperTM and time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2011;6: 23285.

[111]. Schmidt V, Jarosch A, März P, Sander C, Vacata V, Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis* 2012;31: 311-7.

[112]. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 546-51.

[113] Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuci<sup>\*</sup>nos D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification

of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*2010; 48: 2110-5.

[114]. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009; 4: e8041.

[115]. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol*2010;48: 1481-3.

[116] Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48: 444-7.

[117]. Foster AG. Rapid Identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3717-9.

[118].Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, Marín M, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight (Maldi-TOF) mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014;20: O421-7.

[119].Chen JH, Yam WC, Ngan AH, Fung AM, Woo WL, Yan MK, et al. Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. *J ClinMicrobiol* 2013;51: 3981-7.

[120].Vlek AL, Bonten MJ, Boel CH. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One* 2012;7: e32589.

[121].Martiny D, Debaugnies F, Gateff D, Gérard M, Aoun M, Martin C, et al. Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry on patient management. Clin Microbiol Infect 2013;19: E568-81.

# TABLE DES MATIERES

OMMAIRE	XXIX
LISTE DES ABREVIATIONS	XXX
LISTE DES TABLEAUX	XXXI
LISTE DES FIGURES	XXXII
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	5
CHAPITRE I : IDENTIFICATION FONGIQUE	6
I- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES CANDIDOSES AU LABORA	TOIRE6
II- IDENTIFICATION DES LEVURES	19
II.1. Candida albicans	19
II.1.1. Test immunologique	20
II.1.2. Test métabolique	20
II.2. Espèces non-albicans	21
II.2.1. Tests immunologiques	21
II.2.2. Tests enzymatiques	21
II.2.3. Tests biochimiques	22
II.3. Méthodes de recours : la biologie moléculaire	23
II.4. Approche protéomique	24
CHAPITRE II : LA SPECTROMETRIE DE MASSE DE TYPE MALD	I-TOF
I-HISTORIQUE ET PRINCIPE GENERAL D'UN SPECTROMETRE	
MASSE	
II-LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF	
II.1- Ionisation douce : principe de la technique MALDI	
II.2- Principe de la technologie TOF et description du MALDI-TOF	
II.3- Appareillage : spectromètre de masse MALDI-TOF	
II-4 Processus analytique	
DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE	36

CHAPITRE I: MATERIEL ET METHODES	37
I. MATERIEL	38
I.1 Type d'étude	38
I.2Lieu d'étude	38
I.3Souchotèque	38
I.4VITEK MS (BIOMERIEUX):	39
I.4.1.Présentation de l'instrument	39
I.4.2. Fonctionnement du VITEK MS	41
I.5 Matériel technique et réactifs	41
II-METHODES	42
II.1. Méthodes d'identification utilisées	42
II.1.1.1- Principe de la méthode	
II.1.1.3.Résultats attendus	44
II.1.2.Identification par la spectrométrie de masse MALDI-TOF	44
II.1.2.1. Mode opératoire	44
II.1.2.2.Lecture et interprétation des résultats	50
II.2.Analyse statistique	52
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	53
I. RESULTATS ET COMMENTAIRES	54
I.1 CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES	54
I.1.1 Répartition selon le sexe	54
I.1.2 Répartition selon l'âge	54
I.1.3 Répartition selon lieu de provenance	55
I.2 CARACTERISTIQUES CLINIQUES	56
I.2.1 Type de Prélèvement	56
I.2.2 Renseignements cliniques	57
I.3 RESUTATS DES ANALYSES MYCOLOGIQUES ET	~~
SPECTROMETRIQUES	
I.3.1 Espèces identifiées selon la méthode d'identification	
I.3.1.1 Méthode Chromogénique ( <i>Candida</i> Chromatic)	
I.3.1.2 Méthode MALDI-TOF	59

I.3.3 Mesure de concordance des techniques et méthodes de calcul (Cana	dida sp
inclus)	61
I.3.3.1 Droite de régression et coefficient de corrélation	61
I.3.3.2 Mesure de l'accord par la méthode de Bland Altman	62
I.3.3.3 Coefficient de corrélation de Pearson (Moyenne (méthode CHROMATIQUE + méthode MALDI-TOF)/2 x Différence (méthode	- 4
MALDITOF – méthode CHROMATIQUE))	
I.3.4.1 Droite de régression et coefficient de corrélation	65
I.3.4.2 Mesure de l'accord par la méthode de Bland Altman	65
II- DISCUSSION	67
II.1 CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES	68
II.1.1 Répartition des patients en fonction du sexe	68
II.1.2 Répartition en fonction de l'âge	68
II.1.3 Répartition selon le lieu de provenance	69
II.2 CARACTERISTIQUES CLINIQUES	69
II.2.1 Type de prélèvement	69
II.2.2 Renseignements cliniques	70
II.3 RESULTATS DES ANALYSES MYCOLOGIQUES ET	
SPECTROMETRIQUES	70
II.3.1 Répartition des espèces selon la méthode d'identification	70
CONCLUSION	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83

#### **RESUME**

Justification: Présentes comme un organisme commensal, les espèces du genre *Candida* et particulièrement *Candida albicans* peuvent passer de l'état commensal à l'état parasitaire. Ceci est à l'origine d'une infection nommée candidose. La prévalence des candidoses est en perpétuelle augmentation, ainsi que le nombre d'espèces de *Candida* en cause. Le défi est de pouvoir diagnostiquer ces pathologies dès le prélèvement afin d'améliorer la prise en charge des patients. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technique qui révolutionne la microbiologie et qui devrait prochainement remplacer la plupart des systèmes d'identification traditionnels.

<u>Objectifs</u>: Evaluer la concordance de l'identification des espèces de *Candida* par le MALDI-TOF MS et par la méthode chromogénique (BBLCHROMagar<sup>®</sup>Candida) et déterminer leur performance diagnostique.

<u>Matériel et méthode</u>: Une étude transversale a été réalisée de Juillet à Octobre 2017 au service de mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire sur 148 prélèvements recueillis chez des professionnels du sexe répartis sur toute la Côte d'Ivoire et des prélèvements de routine.

Chaque échantillon a été examiné, et l'identification des souches a été faite par le milieu chromogénique Candida chromatic (BBLCHROMagar®Candida) et ensuite par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (VITEK MS).

#### **<u>Résultats</u>** : Il ressort de cette étude que :

- Le sexe féminin est le plus touché par les candidoses, et il s'agit majoritairement d'une population jeune (31 +/- 8 ans);
- ➤ Les espèces de Candida les plus rencontrées sont Candida albicans, Candida tropicalis, Candida parapsilosis et Candida glabrata;
- ➤ Tous les isolats marqués sp donc non identifiés par la méthode chromatique ont été correctement identifiés par le MALDI-TOF Vitek Ms (bioMérieux);
- La concordance entre les deux techniques est très élevée (100%) au niveau du genre et très faible (34,5 %) au niveau de l'espèce ;

<u>Conclusion</u>: L'identification correcte des isolats de levures est essentielle pour une prise en charge correcte du patient, car les *Candida non albicans* présentent des résistances élevées aux antifongiques. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique sensible et de référence dont les atouts majeurs sont la fiabilité des résultats, la rapidité et le faible coût de l'analyse.

Mots clés: Candida, Spectrométrie de masse MALDI-TOF, VITEK MS bioMérieux, Côte d'Ivoire