UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

ANNEE 2007 N° :

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE - ARDENNE

MENTION : SCIENCES POUR L'INGENIEUR

Spécialité : Biophysique

Soutenue publiquement le 12 novembre 2007

Par

Mohammed ESSENDOUBI

Identification et typage par (micro)spectroscopie IRTF des levures du genre *Candida* d'origine clinique

JURY

Pr. Philippe DANIEL	Rapporteur
Dr. Laurence MARIEY	Rapporteur
Pr. Claude GUIGUEN	Examinateur
Dr. Dominique TOUBAS	Examinateur
Dr. Ganesh SOCKALINGUM	Directeur de thèse
Pr. Michel MANFAIT	Président

A mes parents,

à toute ma famille et mes amis,

à toi…..

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement Monsieur le professeur Michel Manfait de m'avoir accueilli au sein de l'unité MéDIAN et de m'avoir donné tous les moyens pour réaliser ce travail. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse et de m'avoir permis de présenter mon travail dans beaucoup de congrès internationaux.
Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur le professeur Philippe Daniel et à Madame Laurence Mariey qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être Rapporteurs de ce travail.
Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Claude Guiguen,
Je vous suis très reconnaissant de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie le Dr. Ganesh Sockalingum et Dr. Dominique Toubas d'avoir co-dirigé ces travaux pendant ces quatre années, je vous remercie également pour vos conseils lors de la rédaction des publications et de ce manuscrit. Vous resterez toujours pour moi un symbole exemplaire de l'intégrité scientifique et de la bonne collaboration.
Veuillez croire en l'expression de ma gratitude.

Par la même occasion, je remercie les autres personnes avec qui j'ai collaboré durant ces dernières années. Je pense tout particulièrement au personnel du laboratoire de Parasitologie-Mycologie, du CHU de Reims, merci pour votre contribution dans ce travail.
Un grand merci à Magalie, Pascale et Francine

Un grand Merci à tous le personnel de L'unité MéDIAN, merci pour votre gentillesse et pour votre accueil chaleureux pendant toute la période de ma thèse. Un grand merci pour Abdel Illah et Olivier.
Merci à vous tous pour votre sympathie toujours renouvelée.

Un grand MERCI à mes amis et mes collègues :
Ali, Céline, Cyril, Elodie, Florence, Franck, Julien, Karine, Linda, Nadia, Nicolas, Valérie... et à tous les étudiants, stagiaires et chercheurs de l'unité MéDIAN avec qui j'ai passé d'agréables moments. Un grand merci à vous tous.

Je voudrais saluer tous mes ami(e)s et mes proches ici à Reims. (Aziz, Hassan (chbanate ☺ jarri), Hicham, Jawad (fréro), Karima, Loubna, Mourad, Nadia, Nassima, Souad, Youssef.... Vous avez toujours été présents et je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance (CHOUKRANEEEEEE BAZAFE)

Un grand merci à Madame Pisani pour sa gentillesse, son amabilité et sa disponibilité.

Je dédie ce travail à mes très chers parents pour leur soutien sans faille, leur patience sans limite et tous les sacrifices qu'ils n'ont cessé de consentir pour moi, ainsi que pour toutes mes chères sœurs, ma famille et mes amis.

Choukrane ya …..da

ABREVIATIONS

ACP : Analyse en Composantes Principales

ATR : Réflexion Totale Atténué

Asym : Antisymétrique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

C. : *Candida*

CP : Composante Principale

DTGS : Deuterated Tri-Glycine Sulfate

DO : Densité Optique

Eq : Equation

HCA : Analyse en Classification Hiérarchique

IR : Infrarouge

IRTF : Infrarouge à Transformée de Fourier

MCT : Mercure Cadmium Telluride

MLST : Multilocus Sequence Typing

MEE : Multilocus Enzyme Electrophoresis

MIR : Moyen Infrarouge

PCB : Pomme de terre Carotte Bile

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RAT : Riz Agar Tween

RAPD : Ramdomly Amplified Polymorphic DNA

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RTT : Rapid Tréhalose Test

SAB : Sabouraud

SGC : Sabouraud -Gentamycine-Chloramphénicol

S/B : Signal sur Bruit

TF : Transformée de Fourier

T/A : Transmission /absorption

ZnSe : Séléniure de Zinc

h : heure

u.a : unité arbitraire

µm : micrométre

SOMMAIRE

I. PREAMBULE 9
II. GENERALITES 14
1. La spectroscopie 14
2. La spectroscopie infrarouge. 15
2.1 Le rayonnement infrarouge 15
2.2 L'interaction rayonnement-matière 16
2.3 Principe de la spectroscopie infrarouge 17
2.4 Loi de Beer-Lambert 19
2.5 La théorie vibrationnelle 19
2.6 Le spectre infrarouge 23
3. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) 24
3.1 Le spectromètre IRTF 24
3.2 L'interférométrie : l'interféromètre de Michelson 26
3.3 La résolution spectrale 27
3.4 Les facteurs correctifs appliqués à l'interférogramme (opérations Pré-Frourier) 28
3.5 Génération du spectre IRTF 29
3.6 Méthodes de mesure en spectroscopie IRTF 31
3.7 L'Analyse des données IR 37
4. Applications de la spectroscopie IRTF 38
4.1 Les biomolécules et l'attribution spectrale en spectroscopie infrarouge 38
4.2 Les spectres d'origine biologique 42
4.3 La spectroscopie IRTF et ses applications dans les domaines de la biologie et du biomédical 45
5. Applications de la spectroscopie IRTF en Microbiologie 48
5.1 Généralités sur *Candida* 48
5.2 L'identification et typage 53
5.3 Classification des microorganismes 58
5.4 Identification et typage par spectroscopie IRTF 61
5.5 Le spectre IRTF des échantillons microbiens 64
5.6 Modes de mesures et applications en microbiologie 69

III. MATERIEL ET MÉTHODES 74
1. La collection des microorganismes 74
1.1 Souches de levures : collection interne du CHU de reims 74
1.2 Souches de références 76
2. Conservation des souches et conditions de culture 76
2.1 Mode de conservation 76
2.2 Milieux et conditions de culture 76
3. Méthodes d'analyse en spectroscopie IRTF 79
3.1 Préparation des levures pour la spectroscopie IRTF : Mesures sur suspensions déshydratées 79
3.2 Préparation des microcolonies pour la microspectroscopie IRTF 80
4. Spectroscopie Infrarouge (IRTF) 81
4.1 Appareillage 81
4.2 Modes et paramètres d'acquisitions 85
5. Traitement des spectres Infrarouge (IRTF) 86
5.1 Test de qualité spectrale 87
5.2 Prétraitement des données spectrales 88
5.3 Tests de la répétabilité et de la reproductibilité spectrale 91
5.4 Méthodes statistiques pour le traitement des données spectrales 91

IV. RESULTATS ET DISCUSSION 97

Chapitre 1 : Identification des espèces de levures du genre *Candida* d'origine clinique : Etude comparative entre la spectroscopie conventionnelle et la microspectroscopie.

1. Introduction 99
2. Mise au point de différentes approches méthodologiques en mycologie médicale 100
2.1 Spectroscopie conventionnelle : Analyse des suspensions déshydratées……....100
2.2 La microspectroscopie IRTF : Analyse des microcolonies…….....108
3. Différenciation des espèces et des souches de *Candida*……....111
3.1 Différenciation d'espèces à partir de mesures en suspension…….....111
3.2 Typage à partir de mesures en suspension……...116
3.3 Différenciation des espèces par microspectroscopie à partir des microcolonies….117
3.4 Typage à partir de mesures en microcolonies……..122
4. Comparaison entre la spectroscopie conventionnelle et la microspectroscopie IR…...122

5.Conclusion……..124

Publication : 1……..125

Chapitre 2 : Application de la spectroscopie IRTF à l'identification intraspécifique de 3 espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*) : Evaluation de l'intérêt de la spectroscopie IRTF comme un outil de typage.

Publication : 2……128

Chapitre 3 : Utilisation de la spectroscopie IRTF comme une méthode d'investigation épidémiologique : Suivi épidémiologique de souches de *C. glabrata* chez 4 patients hospitalisés en réanimation.

Publication: 3……..135

Chapitre 4 : Mise en place et standardisation d'une base de données spectrales pour l'identification de 6 espèces du genre *Candida*.

1. Introduction……142
2. Constitution de la base de données……142
3. Résultats……..144
    3.1 La constitution de la base de données……...144
    3.2 Test de l'identification à l'aide de la base de données……..145
4. Conclusion……..147

V. CONCLUSION GENERALE 150
VI. BIBLIOGRAPHIE 154
VII. ANNEXES..... 171

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le spectre électromagnétique 14
Figure 2 : Le rayonnement électromagnétique 15
Figure 3 : Exemples de vibrations fondamentales des groupements fonctionnels et leurs gammes de fréquence 17
Figure 4 : Le diagramme de Jablonski 18
Figure 5 : Modèle simple d'une molécule diatomique hétéronucléaire 20
Figure 6 : Exemple de vibrations atomiques : la chaîne hydrocarbonée 22
Figure 7 : Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier 25
Figure 8 : L'interféromètre de Michelson 26
Figure 9 : Deux signaux spectraux espacés de d (gauche) et leur interférogramme (droite) ... 28
Figure 10 : Génération du spectre IRTF 30
Figure 11 : Principe de la transmission 32
Figure 12 : Principe de la réflexion totale atténuée (ATR) sur diamant 33
Figure 13 : Spectre IRTF représentatif d'une protéine (Albumine) 40
Figure 14 : Exemple de spectre IRTF d'un microorganisme avec la position des pics d'absorption 43
Figure 15 : Spectres IRTF représentatif d'un microorganisme (*Candida albicans*) avec l'attribution des principaux pics d'absorption 65
Figure 16 : Comparaison entre spectre IRTF de bactéries et de levures. 67
Figure 17 : Plaque multi-puits 70
Figure 18 : Morphologie de *Candida* non-*albicans* en milieu PCB 75
Figure 19 : Passeur d'échantillons en ZnSe 79
Figure 20 A. Fenêtre de ZnSe (1) et de CaF2 (2) B. Presse 80
Figure 21 : Microscopie optique montrant des exemples d'empreinte de microcolonies de *C. glabrata* (A) *C. albicans* (B) et *C. krusei* (C) cultivée sur milieu SGC. 81
Figure 22 : Interféromètre Rocksolid ™ utilisé dans l'Equinox 55 (Bruker) 82
Figure 23 : Spectromètre IRTF Equinox 55 83
Figure 24 : Microscope IRSCOPE II 84
Figure 25 : Les critères utilisés pour le test de qualité spectrale 88
Figure 26 : Principales étapes de l'ACP 93
Figure 27 : Dérivées secondes des spectres infrarouge de la souche *C. albicans* 1712 cultivée à 37°C sur deux milieux de culture différents 101

Figure 28 : Influence des milieux de culture SAB et SGC sur la classification des spectres IRTF des souches de référence de *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata* 102
Figure 29 : Les variations spectrales inter-espèces pour les souches de référence de *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata*. 103
Figure 30 : Influence de la durée de culture sur les spectres IRTF de la souche de référence *C. albicans* 1712 : 8h, 12h, 18h et 24h de culture 104
Figure 31 : Influence de la durée de culture sur la classification des spectres IRTF des 3 souches de référence de *C. albicans* (1712, 1914 et 1837) 105
Figure 32 : Comparaison des spectres IRTF de la souche de référence *C. albicans* 1712 après 24 et 48 h de culture. 106
Figure 33 : Influence de la concentration cellulaire (DO) sur la variabilité spectrale. 107
Figure 34 : Evolution de la taille des microcolonies de six espèces de *Candida* en fonction du temps de culture (12-24h). 109
Figure 35 : Des exemples des spectres IRTF en fonction de la qualité des empreintes des microclonies. 111
Figure 36 : Dérivées secondes de la moyenne des spectres de 4 espèces de *Candida*..... 113
Figure 37 : Classification hiérarchique des spectres de 4 espèces de *Candida* en dérivée seconde……114
Figure 38 : Classification hiérarchique des spectres de 4 espèces de *Candida* en dérivée seconde et en utilisant la région des polysaccharides 900-1200 cm^{-1} 115
Figure 39 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur la région 900-1200cm^{-1} en utilisant la dérivée seconde des spectres moyens de 4 espèces de *Candida***.** 116
Figure 40 : ACP réalisée en utilisant la région 900-1200 cm^{-1} des dérivées seconde des spectres moyens de 9 souches de *C. glabrata*. 117
Figure 41 : Dérivées secondes des moyennes des spectres de microcolonies de 4 espèces de *Candida* 119
Figure 42 : Classification hiérarchique des spectres de microcolonies de 4 espèces de *Candida* 3 régions spéctrales 120
Figure 43 : Classification hiérarchique des spectres de microcolonies de 4 espèces de *Candida* la région 900-1200 cm^{-1} 121
Figure 44 : Analyse en composantes principales réalisée sur la région 900-1200 cm^{-1} en utilisant la dérivée seconde des spectres moyennés de microcolonies de 4 espèces de *Candida* 122

Figure 45 : Comparaison des spectres de la souche *C. albicans* 1712 obtenus à partir d'une microcolonie de 12h et d'une suspension cellulaire de 24h sur milieu SGC. 124
Figure 46 : Classification hiérarchique des dérivées secondes des spectres de 9 isolats de *C. albicans* sur la région spectrale discriminante 900-1200 cm^{-1}. 132
Figure 47 : Dérivée seconde des spectres de *C. albicans* montrant les variations spectrales entre les 9 isolats dans les régions 900-1200 cm^{-1}. 133
Figure 48 : Dérivée seconde des spectres de *C. parapsilosis* montrant les variations spectrales entre les 14 isolats dans les régions (1090-1110, 1120-1140, 1170-1190 cm^{-1}) 134
Figure 49 : Classification hiérarchique des dérivées secondes des spectres de 14 isolats de *C. parapsilosis* sur les régions spectrales discriminantes. 135
Figure 50 : Dérivée seconde des spectres de *C. glabrata* dans la région spectrale 900-1200 cm^{-1}, montrant les variations spectrales entre les cinq isolats du même patient et les deux souches de référence..... 139
Figure 51 : Classification hiérarchique des dérivées secondes des spectres des cinq isolats d'un même patient et de deux souches références (9082 et S3599) de *C. glabrata* en combinant les régions spectrales 900-1200, 1540-1800, et 2800- 3000 cm^{-1}. 140
Figure 52 : Profils d'amplification de cinq isolats du même patient et de 2 souches de référence (9082 et S3599) de *C. glabrata*. 141
Figure 53 : Rapport de validation montrant les critères et les paramètres de la base de données spectrales 145
Figure 54 : Exemples de rapport obtenus..... 146

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Fréquence des groupes caractéristiques 23
Tableau 2 : Quelques pics d'absorption attribués aux vibrations des protéines..... 39
Tableau 3 : Quelques pics d'absorption attribués à l'ADN 41
Tableau 4 : Quelques pics d'absorption attribués aux polysaccharides 41
Tableau 5 : Quelques pics d'absorption attribués aux phospholipides 42
Tableau 6 : Principales bandes d'absorption caractéristiques des biomolécules dans un échantillon biologique (υ : élongation, δ : déformation)..... 43
Tableau 7 : Table des noms usuels pour les différentes régions du spectre d'un échantillon biologique..... 44
Tableau 8 : Attribution des principaux bandes IRTF des échantillons cellulaires et tissulaires 44
Tableau 9 : Distribution des levures parmi les champignons..... 49
Tableau 10 : Espèces fongiques les plus fréquentes en mycologie clinique 50
Tableau 11 : Espèces fongiques les plus fréquentes, dans une études effectuée sur une population de 2089. 51
Tableau 12 : Attribution des bandes pour les spectres IRTF des échantillons microbiens. Adapté de Naumann 66
Tableau 13 : Souches de levures étudiées 75
Tableau 14 : Souches de levures utilisées comme référence interne 76
Tableau 15 : Les résolutions spatiales disponibles avec l'IRSCOPE II..... 84
Tableau 16 : Temps de culture nécessaire pour l'obtention des microcolonies de *Candida spp.* exploitables pour l'analyse en microspectroscopie IRTF 110
Tableau 17 : Nombre de souches étudiées pour le typage de chaque espèce..... 131
Tableau 18 : Les cinq souches du même patient et leurs sites de prélèvements 138
Tableau 19 : Souches de *Candida* utilisées lors de la validation de la base de données..... 146
Tableau 20 : Résultats du test d'identification de 15 échantillons. 147

I. PREAMBULE

Les techniques d'identification et de typage de microorganismes mises à la disposition des microbiologistes ne cessent de progresser. Il n'existe actuellement pas de méthode unique d'identification qui puisse être appliquée à tous les microorganismes, et aucune des ces méthodes proposées actuellement, qu'elle soit phénotypique, biochimique ou génomique, ne permet à elle seule d'identifier la souche et d'avoir des informations exactes sur sa position taxonomique.

Généralement, les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires de microbiologie sont des méthodes dites conventionnelles et reposent essentiellement sur des tests phénotypiques et/ou biochimiques. Ces méthodes utilisent un nombre relativement faible de caractères considérés comme importants, tels que certains caractères phénotypiques majeurs (coloration, morphologie, mobilité, présence de spores, croissance en aérobiose/anaérobiose….) et biochimiques (assimilation et fermentation des sucres, équipement enzymatique…).

Le pouvoir discriminant des méthodes conventionnelles reste assez limité et présente un délai d'identification d'environ 1 à 3 jours. Ce délai peut retarder le diagnostic et la prescription d'une thérapie adaptée. Ces méthodes sont limitées également par la grande diversité des microorganismes et par leur évolution rapide. De plus, elles donnent seulement une identification au niveau du genre et/ou de l'espèce et elles ne sont pas applicables pour une identification au niveau de la sous-espèce (typage), ce qui peut être important lors de la suspicion de situations épidémiques dans le domaine médical.

Au cours des dix dernières années, des méthodes génotypiques basées sur la détection du polymorphisme de l'acide nucléique (ADN) ont été proposées en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Ces techniques moléculaires sont applicables à la plupart des microorganismes. Leur pouvoir de discrimination est généralement élevé par rapport aux techniques phénotypiques et elles constituent les méthodes actuelles de typage permettant une approche plus fine lors d'enquêtes épidémiologiques.

Cependant, ces méthodes génotypiques ont également leurs limites, à savoir la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire pour maîtriser ces systèmes, le coût des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidique spécifiques à chaque espèce et enfin le délai important nécessaire pour l'identification. Il faut noter également qu'il n'existe pas de méthode moléculaire générale pour tous les microorganismes et pour la majorité de ces

techniques moléculaires, leurs valeur comme outils épidémiologiques n'a été que partiellement établie.

Ces difficultés ont conduit au développement de méthodes alternatives, le plus souvent des méthodes physiques. Les techniques spectroscopiques se sont particulièrement développées telles que la spectroscopie de masse, la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie de fluorescence, ainsi que la spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et la spectroscopie de diffusion Raman.

La spectroscopie IRTF est une méthode d'analyse de la composition moléculaire basée sur l'interaction onde-matière. Les informations issues de la spectroscopie IRTF se présentent sous forme de spectres d'absorption. Cette technique a initialement constitué un outil très puissant dont dispose les chimistes pour identifier et caractériser la structure de nombreux composés organiques et inorganiques.

Actuellement, la spectroscopie IRTF est appliquée à l'étude des échantillons biologiques à l'échelle moléculaire (lipides, protéines, polysaccharides et ADN…), cellulaire (bactéries, levures et cellules…) et tissulaire (peau, aorte, cerveau, sein, colon et divers organes…). Dans le domaine de la microbiologie, les applications ont porté essentiellement sur la taxonomie, l'identification, le typage, l'interaction médicament-cible, l'analyse de biofilms et le suivi de la fermentation.

Au sein de l'unité MéDIAN, CNRS UMR6142, l'IRTF a été particulièrement appliquée à l'identification et la caractérisation des bactéries et des levures (genre *Candida*) d'origine clinique.

En raison de la grande diversité des molécules et des macromolécules présentes dans les cellules, le spectre infrarouge d'une levure est assez complexe. L'analyse à l'œil nu d'un grand nombre de spectres devient presque impossible. De plus, les éléments spectraux discriminants les plus efficaces pour l'analyse sont généralement masqués par la diversité et la variabilité moléculaire de la cellule. Ces contraintes rendent nécessaire l'emploi de nouvelles méthodes d'analyse et d'extraction de ces éléments discriminants basées essentiellement sur des calculs statistiques multivariés. Parmi celles-ci, on peut citer l'analyse discriminante, l'analyse hiérarchique en cluster et l'analyse en composantes principales.

Le travail présenté ici vise à appliquer la spectroscopie IRTF à la résolution de problèmes d'intérêt médical liés à l'identification des microorganismes et s'inscrit dans la

thématique de recherche « Ingénierie Biologique » développée au sein de l'unité MéDIAN, CNRS UMR6142.

Nous avons appliqué la (micro)spectroscopie IRTF à l'identification et au typage des levures du genre *Candida* d'origine clinique. Cette étude se situe dans la continuité du travail déjà réalisé dans l'unité MéDIAN avec les travaux de thèse de W. Verdel-Zeroual qui ont permis d'analyser des bactéries, d'interpréter les informations spectrales et de comprendre l'effet de divers agents sur ces bactéries (Verdel-zeroual 1994), ceux de W. Bouhedja qui ont montré le potentiel de la méthode dans la différenciation des souches bactériennes sensibles et résistantes (Bouhedja 1997) et enfin ceux de C. Sandt qui ont mis en évidence l'application de la méthode au typage de souches de *Candida albicans* lors d'une étude épidémique et à l'identification des principales bactéries impliquées dans les infections nosocomiales (Sandt 2003; Sandt 2004; Sandt 2006).

Ce travail de recherche est articulé en quatre parties :

Le chapitre I (publication 1) : Dans cette partie, nous montrons la capacité de la spectroscopie IRTF à différencier et à identifier diverses espèces de *Candida* isolées en milieu hospitalier. Les aspects de la mise au point et de la standardisation de différentes approches, sont traités avant d'aborder les applications cliniques. Dans une première approche, l'analyse a porté sur des cultures pures de 24 heures (méthode macroscopique pour l'analyse de suspensions déshydratées), pour l'identification des 6 espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr, C. parapsilosis* et *C. krusei*) les plus fréquemment impliquées en mycologie médicale. Dans une deuxième approche, pour un diagnostic précoce (méthode microscopique pour l'analyse de microcolonies), nous avons effectué les mesures à partir de microcolonies âgées de 10 à 18 heures (selon les espèces) en utilisant la microspectroscopie IRTF. Une étude comparative entre les deux modes de mesure a été effectuée (Essendoubi 2005).

Le chapitre II (publication 2) : Après la possibilité de l'identification spécifique (diagnostic d'espèce) des 6 espèces majeures du genre *Candida* par spectroscopie IRTF, nous avons développé dans cette deuxième partie de notre travail l'identification intraspécifique ou le typage (identification de souches au sein de la même espèce). Cette étape qui se situe au-delà de l'identification de l'espèce, requiert la recherche d'éléments spectraux discriminants faiblement visibles dans les spectres. Ce travail consiste à évaluer l'intérêt de la spectroscopie IRTF comme méthode de typage et les applications porteront sur trois des principaux agents

fongiques pathogènes pour l'homme : *Candida albicans, Candida glabrata* et *Candida parapsilosis*, pour lesquels nous possédons des collections de souches bien caractérisées à l'échelle phénotypique (Toubas 2007).

Le chapitre III (publication 3) : Dans ce chapitre, le pouvoir discriminant de la méthode est mis en valeur et nous démontrons son intérêt dans le suivi épidémiologique de souches de *Candida glabrata* isolées chez des patients hospitalisés dans le même service et pendant la même période (Essendoubi 2007).

Le chapitre IV : Dans ce chapitre nous exposons la mise en place d'une bibliothèque de spectres IRTF de six levures du genre *Candida* et nous évaluons la performance de cette base de données dans l'identification au niveau du genre et de l'espèce. La réalisation de cette base de données spectrales a bénéficié des connaissances acquises dans les chapitres précédents telles que celles sur les conditions de culture, sur le pré-traitement et traitement informatiques ou encore sur les éléments spectraux discriminants.

Les résultats prometteurs obtenus lors de ce travail ouvrent des perspectives à la poursuite des applications de cette technologie dans d'autres domaines tels que l'évaluation des mécanismes de résistance, la recherche de facteurs de virulence chez les levures du genre *Candida* ou encore à l'étude de l'organisation de biofilms.

GENERALITES

II. GENERALITES

1. La spectroscopie

La spectroscopie a joué un rôle essentiel dans le développement de la théorie atomique moderne. Les méthodes spectroscopiques ont fourni les outils qui sont les plus utilisés pour l'élucidation de la structure d'espèces moléculaires ainsi que pour l'analyse qualitative et quantitative de composés inorganiques et organiques. La spectroscopie est basée sur l'interaction rayonnement-matière. La figure 1 représente le spectre électromagnétique qui s'étend des ondes radio aux rayons cosmiques.

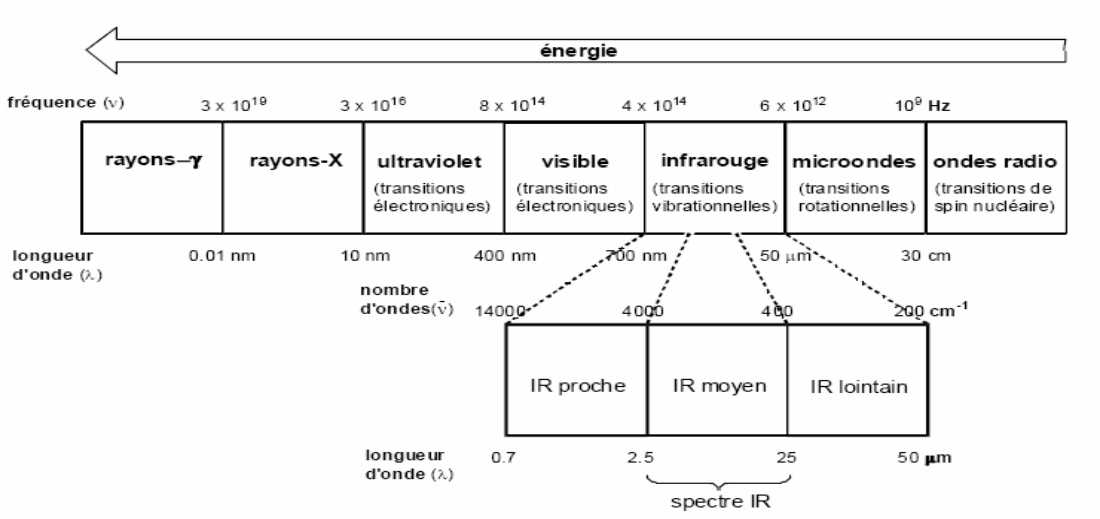


Figure 1 : Le spectre électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique est représenté par un champ électrique et un champ magnétique qui oscillent perpendiculairement l'un à l'autre et à la direction de la propagation (Figure 2). De nombreuses propriétés du rayonnement électromagnétique peuvent être décrites par la théorie des ondes classiques qui utilise des paramètres tels que la longueur d'onde, la fréquence, la vitesse et l'amplitude. Toute onde électromagnétique est caractérisée par deux paramètres, sa fréquence et sa longueur d'onde, qui sont proportionnels à l'énergie E. L'énergie E d'un photon de fréquence ν est donnée par la relation :

$$\mathbf{E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}} \qquad \textbf{Eq. 1}$$

où **h** est la constante de Planck (**h**=6,626 10^{-34} J·s), **c** la vitesse de la lumière ($3 \cdot 10^{8}$ m·s^{-1}) et **λ** la longueur d'onde exprimée en mètres.

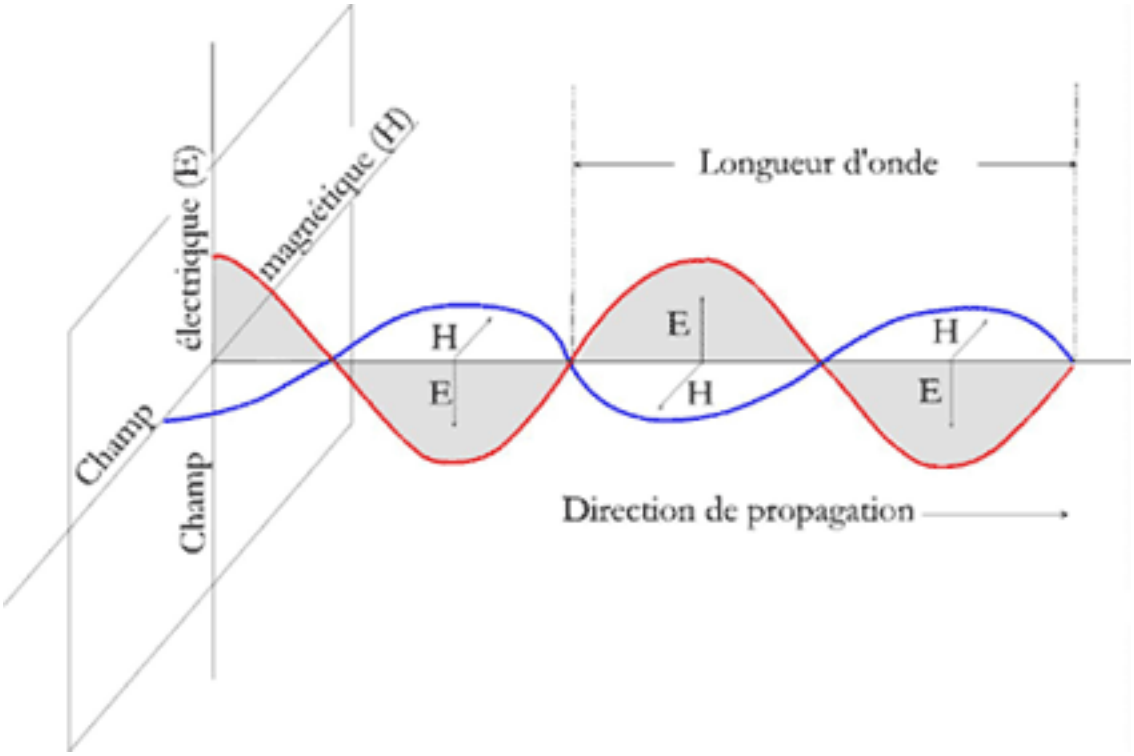


Figure 2 : **Le rayonnement électromagnétique**

2. La spectroscopie infrarouge.

2.1 Le rayonnement infrarouge

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel. Ces radiations localisées au-delà des longeurs d'onde dans le rouge, sont situées entre la région du spectre visible (400 à 900 nm) et des ondes hertziennes (10^{10} à 10^{11} nm). Le domaine infrarouge s'étend de 0,7 µm à 50 µm. Il est arbitrairement divisé en 3 catégories, le proche infrarouge (0,7 à 2,5 µm), le moyen infrarouge (2,5 à 25 µm) et le lointain infrarouge (25 à 50 µm) (Figure 1). Dès 1924, on s'est aperçu que l'énergie du rayonnement moyen infrarouge coïncidait avec celle des mouvements internes de la molécule. Ainsi, la relation entre l'absorption d'un rayonnement moyen-IR par une molécule et sa structure moléculaire sont mises en évidence. Même si les régions du proche IR et de l'IR lointain ont suscité un certain intérêt, l'utilisation de la spectroscopie moyen-IR reste la plus adaptée pour l'élucidation de la composition moléculaire d'un composé.

2.2 L'interaction rayonnement-matière

L'interaction entre une molécule et un rayonnement infrarouge (IR) peut avoir lieu seulement dans le cas où la molécule forme un dipôle, c'est-à-dire la présence au niveau de la molécule des liaisons chimiques entre différents atomes de charges opposées. Dans ce cas on parle d'un dipôle permanent et d'une liaison chimique polaire. Le moment dipolaire μ est donné par la formule

$$\vec{\mu} = q.\vec{d} \qquad \textbf{Eq. 2}$$

où **q** est la charge absolue portée par chacun des deux atomes et **d** la distance entre les atomes.

Pour comprendre une grande partie des interactions entre le rayonnement infrarouge et la matière en général, prenons le cas du chlorure d'hydrogéne (HCl), une molécule polaire, diatomique et hétéronucléaire. L'électronégativité de l'atome de chlore se traduit par un excès de charges négatives tandis que l'atome d'hydrogène présente un excès de charges positives. Si cette molécule vibre, l'espacement des charges et leur répartition changent et elle peut réagir avec le champ électrique du rayonnement infrarouge. Pour certaines fréquences, un photon peut être absorbé et augmente ainsi l'énergie de vibration de la molécule. De ce fait, l'énergie du rayonnement IR diminue après l'interaction, ce qui conduit à l'apparition des bandes d'absorptions. On dit que la molécule est active lorsqu'il y a une variation de son moment dipolaire. Pour des molécules homonucléaires, comme l'azote ou l'hydrogène, les charges électriques sont parfaitement symétriques puisque les deux atomes sont identiques. Les centres de gravité des charges positives et négatives sont confondus. Le moment dipolaire est égal à zéro et reste nul quand la molécule vibre. En conséquence, une telle molécule est inactive en infrarouge.

La majorité des vibrations fondamentales des molécules organiques se trouve dans le moyen IR et les deux principaux types de vibrations sont l'élongation (stretching) et la déformation (bending). Généralement, les élongations sont situées dans une gamme de nombres d'onde supérieure à celle des déformations. La figure 3 présente des exemples de vibrations fondamentales des groupements fonctionnels

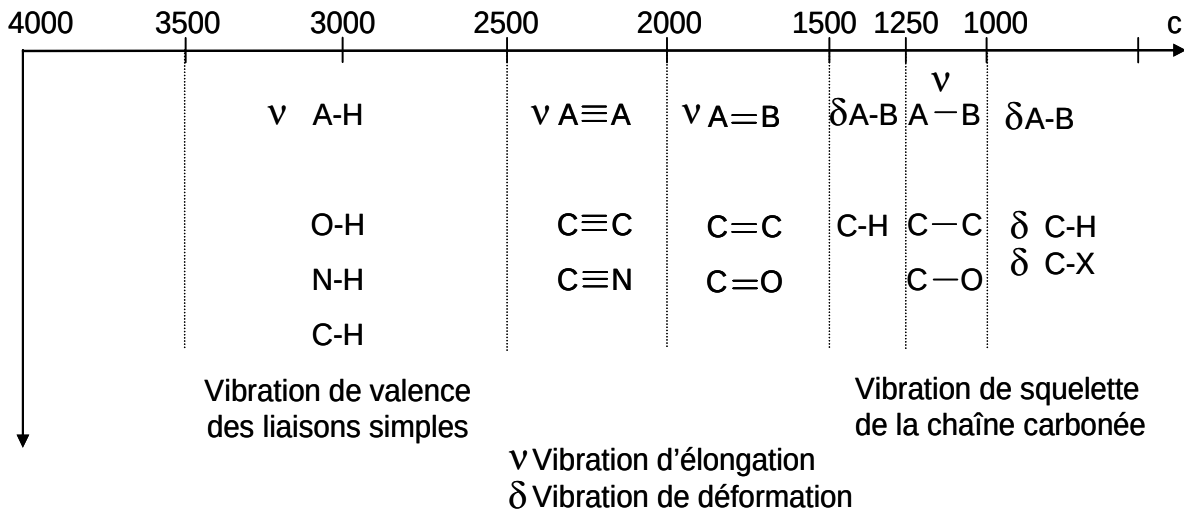


Figure 3 : Exemples de vibrations fondamentales des groupements fonctionnels et leurs gammes de fréquence.

Même si l'attribution des fréquences de vibration dépend fortement de μ (la masse réduite de la molécule) et k (la constante de force de liaison), de nombreux facteurs internes ou externes à la molécule ont une influence sur la fréquence de vibration. C'est le cas par exemple des changements de phase, de la taille et de l'électronégativité des atomes environnants, des liaisons d'hydrogène. Dans les grosses molécules, les effets stériques et la conformation jouent également un rôle sur la fréquence de la vibration.

2.3 Principe de la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie IR est basée sur l'interaction de la lumière IR avec le nuage électronique des liaisons chimiques. Généralement dans la majorité des spectroscopies optiques comme la spectroscopie de fluorescence, l'absorption d'énergie permet à un électron d'une liaison chimique de passer d'un état fondamental à un état excité. Dans le cas de la spectroscopie d'absorption IR, le rayonnement émis par la source polychromatique n'est généralement pas assez énergétique pour provoquer des transitions électroniques, mais il induit des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle. La transition vibrationnelle est également observée lors de la diffusion Raman qui est une spectroscopie de diffusion inélastique utilisant une radiation monochromatique (laser) pour exciter les électrons d'une liaison chimique. Lors de cette interaction il y a émission de radiations à des longueurs d'onde différentes de celle de la radiation incidente. Le concept des niveaux vibrationnels et des

niveaux d'énergie concernant les différentes spectroscopies optiques est schématisé par le diagramme de Jablonski (Figure 4).

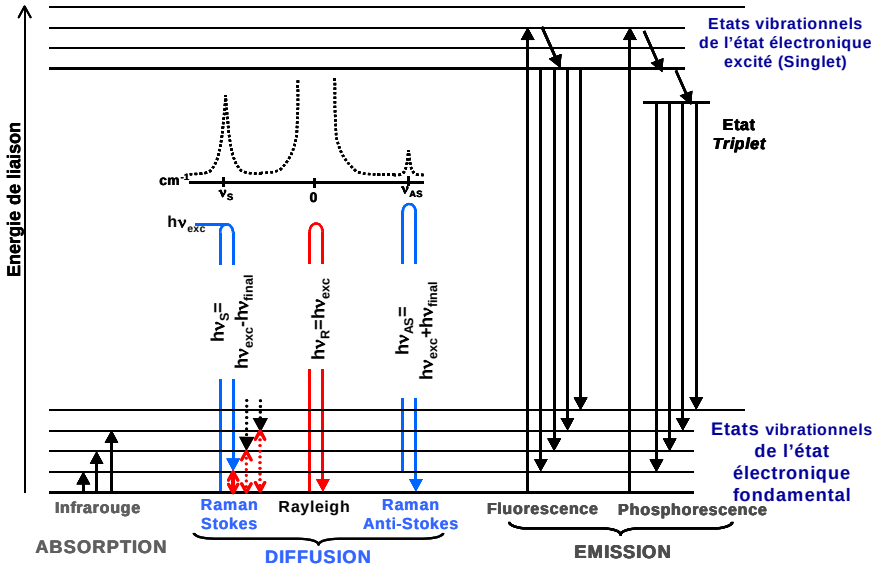


Figure 4 : Le diagramme de Jablonski

La spectroscopie infrarouge est basée donc sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau infrarouge est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le rayonnement infrarouge fournit des *quanta* d'énergie pouvant provoquer la transition des électrons entre les niveaux de rotation et de vibration des liaisons atomiques (4-40 kJ·mol^{-1}) mais ne peut pas provoquer des transitions entre les niveaux électroniques (400 kJ·mol^{-1}).

Généralement le domaine infrarouge (moyen infrarouge) situé entre 2,5 – 25 µm (4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1}) correspond au domaine d'énergie de vibration de la majorité des molécules organiques et inorganiques.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption. Cela va dépendre de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée on peut déterminer seulement les modes de vibration actifs en infrarouge. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse.

Par conséquent, un matériau de composition chimique et de structure donnée, va correspondre à un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques (spectre infrarouge) permettant d'identifier et de caractériser le matériau.

2.4 Loi de Beer-Lambert

L'analyse quantitative par spectrométrie d'absorption dans le domaine de l'infrarouge comme dans ceux de l'ultraviolet et du visible repose sur la loi de Beer-Lambert. Cette loi exprime la relation de proportionnalité existant entre l'absorbance A et les trois paramètres qui sont l'absorptivité (**ε**) de l'analyte absorbant la lumière, l'épaisseur de la cellule de mesure (**l**) et la concentration (**c**) de l'analyte. L'équation (3) est la forme mathématique sous laquelle est habituellement présentée cette loi.

$$A = \varepsilon\, l\, c \qquad \textbf{Eq. 3}$$

Lorsqu'une radiation monochromatique traverse un milieu, une partie de son énergie peut être absorbée. La loi de Beer-Lambert donne l'intensité résultante **I** en fonction de l'intensité initiale $\mathbf{I_0}$, de la concentration **c** du milieu en substance absorbante, de la longueur **l** du trajet optique dans le milieu absorbant et du coefficient d'extinction moléculaire **ε** dépendant de la substance absorbante et de la longueur d'onde.

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon c l} \qquad \textbf{Eq. 4}$$

De cette relation on déduit la transmittance : $T = \frac{I}{I_o}$ **Eq. 5**

et l'absorbance : $A = -\log T = -\log \frac{I}{I_o} = \varepsilon c l$ **Eq. 6**

La proportionnalité entre l'absorbance et la concentration permet d'utiliser la spectroscopie d'absorption IR comme méthode de dosage et d'analyse quantitative, du moins dans la limite de linéarité de la loi de Beer-Lambert (pour des absorbances comprises entre 0,3 et 2).

2.5 La théorie vibrationnelle

Le spectre IR d'un échantillon est constitué d'une série de pics vibrationnels. Le nombre de modes de vibration d'une molécule dépend du nombre d'atomes qui la constituent. La manière la plus simple de présenter la théorie vibrationnelle est de commencer par le

modèle le plus élémentaire qui consiste en une molécule diatomique en vibration et ensuite de considérer le modèle polyatomique.

La molécule diatomique

L'approche classique de la théorie vibrationnelle consiste dans un premier temps à étudier le cas du vibrateur harmonique pour une molécule diatomique (Figure 5). Dans ce cas un seul type de vibration est possible. Si on fait l'approximation dans ce modèle, l'énergie des transitions entre les niveaux de vibration peut prendre la valeur **E** présentée par l'équation suivante :

$$\mathbf{E} = \frac{h}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\mu}}(V+\frac{1}{2}) \qquad \textbf{Eq. 7}$$

avec **V** est le nombre quantique de vibration (**V**= 0, 1, 2,…), **k** la constante de force de la liaison ($N.m^{-1}$) et **μ** est la masse réduite exprimée en Kg.

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \qquad \textbf{Eq. 8}$$

m_1 et m_2 les masses des 2 atomes composant la liaison.

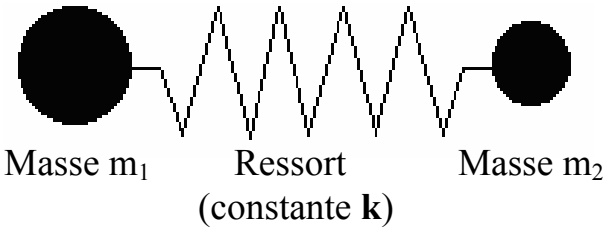


Figure 5 : **Modèle simple d'une molécule diatomique hétéronucléaire : les deux masses m1 et m2 sont liées par un ressort caractérisé par la constante de force k**

Le modèle harmonique est très simple et son application est limitée aux très faibles déplacements des atomes. De plus, dans ce modèle il est admis que les liaisons sont parfaitement élastiques. Or ces liaisons peuvent se briser quand l'amplitude des vibrations devient importante. La forme d'énergie **E** est donc plus compliquée que la relation donnée par l'équation (7).

La molécule polyatomique

Dans le cas de molécules polyatomiques, le nombre de liaisons augmente et la géométrie des liaisons se complexifie. D'après la théorie vibrationnelle, une molécule contenant **N** atomes a **3N-6** degrés de liberté de vibration et **3N-5** pour les molécules linéaires. Cependant, toutes les liaisons inter-atomiques ne sont pas capables d'absorber de l'énergie lumineuse infrarouge, même dans le cas où la fréquence de la lumière est la même que la fréquence propre de la liaison. Seules les liaisons qui présentent un moment électrique dipolaire oscillant sont actives dans l'infrarouge.

La figure 6 montre des exemples de quelques modes vibratoires typiques. A chaque mode correspond une fréquence propre fondamentale et plusieurs autres fréquences associées aux harmoniques. De plus, on observe souvent des interactions entre les modes d'une liaison particulière et ceux d'autres liaisons. Ces interactions se traduisent par l'apparition de bandes de combinaison. De telles bandes apparaissent à des fréquences qui sont elles-mêmes des combinaisons linéaires des fréquences des bandes fondamentales. Par exemple, si les fréquences de deux modes formant une combinaison sont représentées par ν_1 et ν_2, la fréquence de la bande de combinaison ν_{comb} est donnée par :

$$\nu_{comb} = \alpha\, \nu_1 + \beta\, \nu_2 \qquad \textbf{Eq. 9}$$

où α et β sont des nombres entiers (généralement 1, 2 ou 3).

Ainsi, comme pour les harmoniques, les bandes de combinaison apparaissent à des fréquences plus élevées (c'est-à-dire à des longueurs d'onde inférieures) que les bandes fondamentales.

Par exemple pour une molécule non-linéaire à 3 atomes, on a 3 degrés de liberté de vibration :

- Vibration de valence : élongation symétrique ν_s
- Vibration de valence : élongation antisymétrique ν_{as}
- Vibration de valence : déformation dans le plan δ

Pour une molécule à 4 atomes, il y a 6 degrés de liberté de vibration:

- Vibration de valence : élongation
- Vibration de valence : déformation dans le plan δ
- Balancement (rocking)
- Cisaillement (scissoring)

- Hochement (wagging)
- Torsion (twisting)

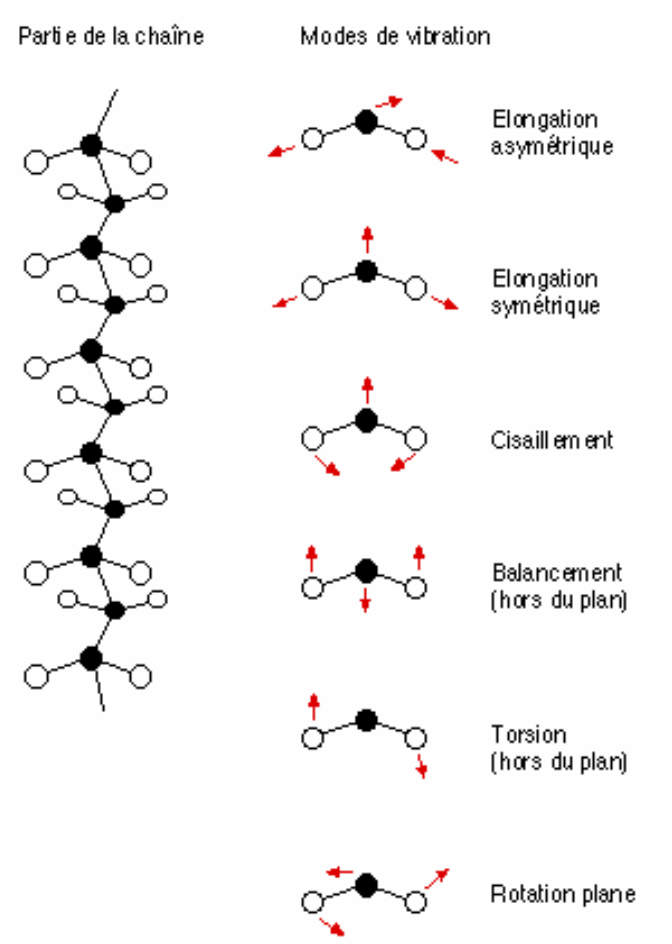


Figure 6 : **Exemple de vibrations atomiques : la chaîne hydrocarbonée**

Le spectre moyen infrarouge peut être grossièrement divisé en 3 régions : de 4000 cm^{-1} à 1500 cm^{-1} se trouvent les bandes d'absorption des vibrations d'élongation ν de liaisons principales (O-H, N-H, C-H, C=O, C=C), de 1500 à 1000 cm^{-1} les bandes de déformations δ (C-H) ainsi que quelques vibrations d'élongation (C-O, P=O) et pour les nombres d'onde inférieurs à 1000 cm^{-1} les vibrations complexes (« respiration » des structures cycliques) et des systèmes éthyléniques ou aromatiques (tableau 1).

Nombre d'ondes (cm^{-1})	Intensité	Liaison	Type de composé
3600	Fine	O-H en phase vapeur	Alcools, phénols
3400-3200	Forte, large	O-H lié	Alcools, phénols
3550-3000	Moyenne	N-H	Amines I et II
3200-2900	Forte, large	O-H lié	Acides carboxyliques
3300	Forte, fine	C-H de C≡H	Alcynes
3100-3000	Moyenne, fine	C-H de C=C-H	Alcènes, arènes
2800-2700	Moyenne, fine	C-H de COH	Aldéhydes
3000-2850	2 bandes	C-H	Alkyles CH_3, CH_2,CH
1720-1700	Très forte	C=O	Acides carboxyliques
1745-1725	Très forte	C=O	Esters
1735-1715	Très forte	C=O	Aldéhydes
1720-1710	Très forte	C=O	Cétones
1670-1615	Variable	C=C	Alcènes
1600-1450	Variable	C=C	Arènes

Tableau 1 : Fréquence des groupes caractéristiques

2.6 Le spectre infrarouge

Un spectre infrarouge peut être défini comme étant la mesure de l'absorption lumineuse en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence ou de l'énergie de la lumière incidente. Les spectres sont par principe continus mais ils ne peuvent être enregistrés et stockés que sous la forme d'une succession de mesures effectuées en un nombre limité de points.

Le spectre infrarouge présente l'absorbance A (ou la transmittance T) en fonction de la longueur d'onde qui est traditionnellement exprimée sous la forme du nombre d'onde $\bar{\nu}$ ou $\boldsymbol{\sigma}$ avec :

$$\sigma = \frac{1}{\lambda(cm)} \text{ en cm}^{-1} \qquad \textbf{Eq. 10}$$

Les spectres IR sont acquis à l'aide d'un spectromètre qui est composé d'une source, d'un intérféromètre et d'un détecteur. On éclaire l'échantillon avec un rayonnement infrarouge et on mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités d'absorption correspondantes.

3. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie moyen infrarouge est beaucoup utilisée pour l'élucidation de structure des molécules pour des applications chimiques. La technique était limitée essentiellement par la lenteur d'acquisition des spectres car la séparation des longueurs d'onde était réalisée séquentiellement par un monochromateur dispersif (prisme ou réseau).
Depuis près de vingt ans, grâce à l'utilisation de l'interférométrie et la transformée de Fourier (TF), l'application de la spectroscopie IR s'est généralisée dans tous les domaines d'investigation. Les spectromètres IR à transformée de Fourier (IRTF) peuvent de nos jours concurrencer les techniques utilisées en routine dans les laboratoires.
Les spectromètres IRTF ne contiennent aucun élément dispersif, toutes les longueurs d'onde sont détectées et mesurées simultanément grâce à l'intégration de l'interféromètre. Cet instrument de haute sensibilité génère des interférences constructives et destructives dans le rayonnement IR polychromatique, ce qui permet de recalculer précisément l'intensité de chacune des longueurs d'onde du rayonnement total.
Pour séparer les longueurs d'onde, le signal de la source est modulé de manière à ce qu'il puisse ensuite être décodé par une transformée de Fourier. L'intégration de l'interférométrie à la spectroscopie IR a été rendue possible par le développement de la transformée de Fourier rapide qui a permis la résolution en temps réel de l'interférogramme, par le perfectionnement des lasers améliorant la précision en fréquence de la mesure et par le couplage spectromètre-microordinateur.
Les spectromètres IRTF ont comme avantages une meilleure sensibilité, une résolution et une vitesse d'acquisition des données particulièrement élevées (un spectre complet peut être relevé en quelques secondes). Ces avantages sont dus essentiellement à l'application de la transformée de Fourier et la génération des interférences qui sont dévolues à l'interféromètre dont le modèle initial est l'interféromètre de Michelson (1891).

3.1 Le spectromètre IRTF

Description d'un spectromètre IRTF

Un spectromètre IRTF comporte essentiellement cinq parties (figure 7) (Griffiths 1986; Bellon-maurel 1992) :

- Une source lumineuse : pour notre cas, le Globar est utilisé pour le moyen IR. Il est constitué d'un bâtonnet en carbure de silicium (SiC) et fonctionne à des températures de l'ordre de 1500°C. Il rayonne un spectre continu entre 10000 et 250 cm^{-1}.
- Un dispositif permettant de générer les interférences : l'interféromètre (voir description ci-après).
- Un compartiment échantillon qui permet d'accueillir plusieurs types d'accessoires (porte-échantillon) dépendant de la technique spectroscopique employée et le mode de mesures utilisé (réflexion ou transmission).
- Un détecteur ou capteur photosensible : le spectromètre IRTF peut comporter un ou plusieurs détecteurs, qui peut être du type pyroélectrique (générant un courant proportionnel au différentiel de température entre les 2 faces du détecteur) comme les détecteurs DTGS (Deuterated Tri-glycine Sulfate) ou photoélectrique (générant une différence de potentiel par l'absorption de photons) comme les détecteurs MCT (Mercure Cadmium Tellure) qui sont constitués d'un monocristal en alliage de mercure cadmium tellure déposé sur un support inerte. Pour une plus grande sensibilité, les détecteurs de type MCT sont refroidis à l'azote liquide (77 K).
- Enfin, le convertisseur analogique numérique qui interroge le détecteur à des intervalles réguliers et transforme le signal analogique en un signal numérique manipulable par le système informatique.

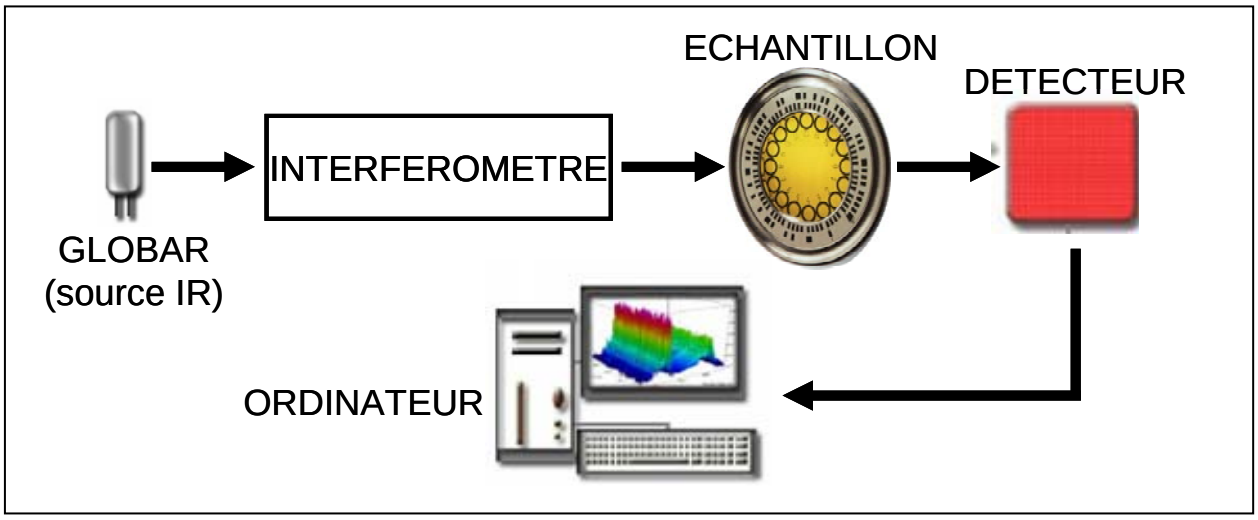


Figure 7 : Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier

Fonctionnement du spectromètre IRTF

Pour résumer, dans tous les spectromètres IRTF, le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Le faisceau modulé est ensuite réfléchi vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme, c'est une signature de l'intensité en fonction du déplacement du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par l'opération mathématique de transformée de Fourier.

3.2 L'interférométrie : l'interféromètre de Michelson

L'interférométrie est l'utilisation des phénomènes d'interférence pour la mesure. Ces interférences sont générées par l'interféromètre de Michelson. Cet instrument est formé d'une lame séparatrice semi-transparente qui divise le faisceau issu de la source en deux faisceaux, l'un réfléchi vers un miroir fixe, l'autre transmis vers un miroir mobile. Le miroir mobile, perpendiculaire au miroir fixe, bouge à une vitesse constante le long de son axe. Le schéma de l'interféromètre de Michelson est décrit dans la figure 8.

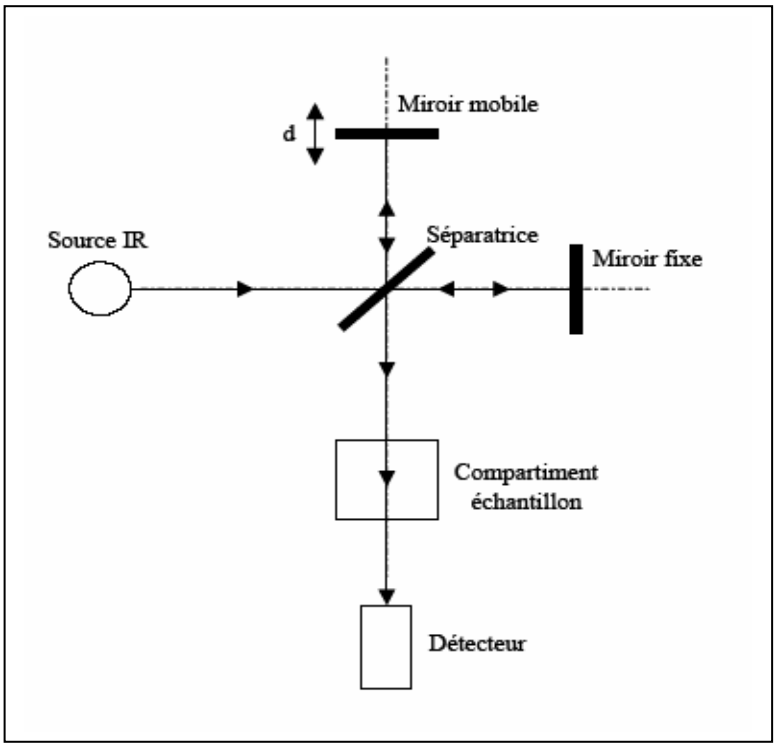


Figure 8 : L'interféromètre de Michelson

Dans ce système, le rayon lumineux prend deux trajets optiques différents, ce qui crée une interférence. Le rayon infrarouge provenant de la source frappe un miroir semi transparent (séparatrice). Ce rayon est passé au préalable par un système de miroirs afin d'entrer dans l'interféromètre sous la forme d'un rayon parallèle. Sous l'action de la séparatrice, le rayon est scindé en deux parties égale, une réfléchie et l'autre transmise.
Chacun de ces rayons effectue un aller-retour miroir-séparatrice. La particularité réside dans la différence de parcours optique de ces deux rayons. Le rayon transmis frappe un miroir fixe et a donc un parcours optique fixe alors que le rayon réfléchi frappe un miroir mobile qui peut se déplacer dans les directions indiquées sur la figure 8 et a donc un parcours optique dépendant du déplacement **d** de celui-ci. Au niveau de la séparatrice, ces deux rayons se combinent à nouveau et sont focalisés vers le compartiment échantillon puis le détecteur.
Le déplacement du miroir mobile permet de changer la longueur du trajet optique transmis. Quand le miroir mobile est dans une position telle que les deux parcours optiques soient de longueurs égales, l'interférence est constructive. Pour chaque autre position, des interférences positives ou destructives sont générées.

Pour résumer, dans l'interféromètre de Michelson l'intensité du rayon lumineux en sortie de la source dépend de la longueur d'onde et on ne peut mesurer qu'une intensité globale S(λ). En sortie de l'interféromètre, suite aux recombinaisons en raison du déplacement du miroir mobile, on a artificiellement fait dépendre l'intensité globale du faisceau infrarouge en fonction cette fois ci du déplacement de ce miroir. On exprime généralement cette intensité par I(x) où cette longueur d'onde x est définie comme le retard, c'est-à-dire la différence des parcours optiques de la partie réfléchie et la partie transmise.
Donc, avant d'atteindre l'échantillon, l'intensité du rayonnement IR émis par la source subit la transformation **S (λ) —> I (x)** au travers l'interféromètre. Mathématiquement, la relation entre S (λ) et I (x) est une transformation de Fourier(Griffiths 1986).

3.3 La résolution spectrale

La notion est illustrée sur la figure (9). Un écart **d** entre deux bandes sur l'échelle des nombres d'onde est observable lorsqu'une modulation périodique de **1/d** est constatée sur l'interférogramme.

Cela illustre ce que l'on appelle le critère de Rayleigh où pour obtenir une séparation correcte de **d** entre deux bandes dans le domaine des nombres d'onde, il faut au minimum mesurer l'interférogramme sur une distance **1/d.**

Par exemple, une résolution spectrale de 4 cm^{-1} demandera au minimum un retard x de 0,25 cm. En conclusion, plus on augmente le parcours du miroir mobile, plus on augmente la résolution spectrale.

Figure 9 : Deux signaux spectraux espacés de d (gauche) et leur interférogramme (droite)

3.4 Les facteurs correctifs appliqués à l'interférogramme (opérations Pré-Frourier)

Fonctions d'apodisation

Comme spécifié précédemment, l'obtention d'un spectre s'effectue par transformée de Fourier (TF) inverse de l'interférogramme qui subit une coupure nette quand la valeur absolue de x est au maximum. On appelle cette coupure, coupure de type boxcar et cela a pour conséquence, lorsque l'on a une bande d'absorption, l'apparition de bandes additionnelles (side lobes ou feet). Cela signifie donc que l'on n'obtient pas nécessairement la forme naturelle de la bande en raison de l'influence liée à l'instrument (Griffiths 1986).

Les solutions à ce problème sont soit d'acquérir l'interférogramme avec une grande résolution ou tronquer l'interférogramme de manière moins abrupte que la coupure de type boxcar. On appelle ce procédé apodisation. Avant la TF inverse, l'interférogramme est multiplié par une fonction d'apodisation afin d'atténuer ces bandes additionnelles. En contrepartie, l'apodisation affecte la largeur de bande dans le sens où la suppression de ces bandes additionnelles implique toujours un élargissement de la bande principale.

Correction de phase

Des corrections supplémentaires doivent être apportées pour tenir compte des décalages en phase introduits par l'appareillage. Ils ont deux origines principales. Tout d'abord, le déplacement rapide du miroir mobile entraîne une imprécision de la mesure de la position x=0. La deuxième source de décalage en phase du signal est introduite par les filtres électroniques utilisés pour diminuer le bruit de haute fréquence.
La convolution de l'interférogramme par les fonctions de correction Mertz ou Power spectrum est d'usage courant pour corriger la phase du signal.

***Zero filling factor* (ZZF)**

Pour une résolution donnée, même très faible, on peut obtenir une information imprécise au sujet de la position d'un maximum d'une bande d'absorption. On utilise le ZZF pour augmenter artificiellement la résolution d'un spectre par ajout de points supplémentaires sans introduire des facteurs d'erreur dans l'interférogramme de départ. Par exemple, un ZZF égal à 2 signifie que l'on double le nombre de points dans l'interférogramme par ajout de zéros. Enfin, il est important de souligner que l'ajout de zéros dans l'interférogmme ne fait qu'améliorer l'interpolation du spectre et on peut donc uniquement parler d'amélioration artificielle de résolution mais cet effet et la vrai résolution ne sont en aucun cas liés par une quelconque relation.
Suivant l'utilisation et le degré d'interprétation voulus pour un spectre, il convient donc de choisir la résolution et le ZZF adaptés à la manipulation. En effet, le choix d'une résolution très précise et d'un ZZF élevé n'est pas obligatoirement le plus intéressant car d'une part, cela engendre une quantité importante de points dans l'interférogramme et par conséquent des temps de calcul de TF longs, et d'autre part, cela demande des capacités de stockage considérables. Il convient de réduire ces facteurs jusqu'au niveau voulu.

3.5 Génération du spectre IRTF

L'interférogramme est peu utile au spectroscopiste qui utilise généralement le tracé des valeurs d'absorbance ou de transmittance en fonction des fréquences (ou nombres d'onde). Le processus de génération du spectre (figure 10) de l'échantillon comporte 4 étapes (Griffiths 1986) :

- enregistrement d'un interférogramme simple-faisceau de référence sur le support porte-échantillon
- enregistrement d'un interférogramme simple-faisceau échantillon

- transformation de Fourier inverse des interférogrammes et opérations post-Fourier
- calcul du spectre d'absorbance (ou transmittance) à partir des spectres simple faisceau

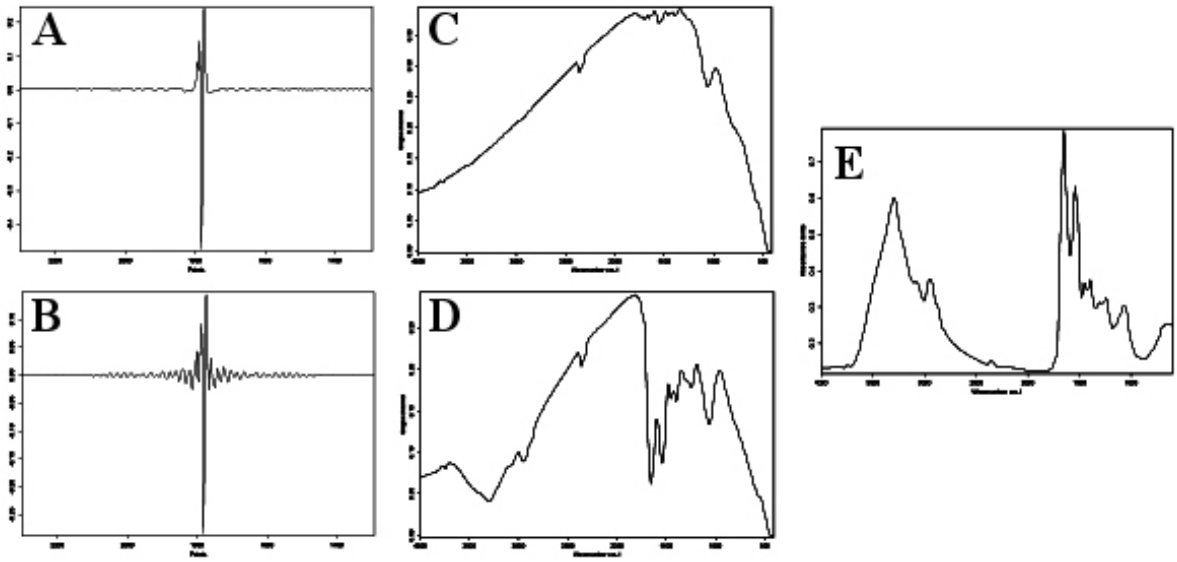


Figure 10 : Génération du spectre IRTF. Interférogramme de référence (A); interférogramme échantillon (B) ; spectre simple faisceau de référence (C); spectre simple faisceau échantillon (D); spectre en absorbance (E)).

Les informations obtenues à partir des spectres IRTF sont de deux sortes, qualitatives et quantitatives.

Informations qualitatives : un spectre d'absorption infrarouge, même d'une molécule simple, comporte un certain nombre de pics. Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe sont caractéristiques des groupements chimiques présents dans le matériau analysé.

Informations quantitatives : L'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupement chimique à l'origine de cette absorption.

En mesurant l'aire du pic caractéristique, on peut comparer la proportion d'un groupement chimique présent dans plusieurs échantillons. Ce type d'analyse offre la possibilité de doser un nombre particulièrement élevé de substances car presque toutes les espèces moléculaires absorbent dans le moyen infrarouge. De plus, le caractère unique d'un spectre infrarouge permet un degré de spécificité que relativement peu d'autres méthodes possèdent. Cette spécificité est particulièrement mise à profit pour le dosage de mélanges de composés

organiques présentant une grande similitude. Depuis les dix dernières années, divers travaux ont montré l'application de la méthode au dosage de nombreuses molécules plus complexes comme les protéines, le cholestérol et les sucres, dans des solutions de nature biologique comme le sang, le sérum et le plasma.

La spectroscopie IRTF est une méthode d'analyse simple à mettre en oeuvre et non destructrice. Elle permet d'analyser aussi bien les matériaux organiques que les matériaux inorganiques. La grande diversité des montages expérimentaux permet la caractérisation de pratiquement tout type d'échantillon, quel que soit leur état physique ou de surface :

- Couches déposées sur un substrat transparent en infrarouge : montage en transmission/absorption.

- Couches déposées sur un substrat non-transparent en infrarouge : montage de Réflexion Totale Atténuée (ATR).

- Films polymères : montage en transmission (si épaisseur faible <10µm), montage de Réflexion Totale Atténuée (ATR).

- Poudres (dispersées dans une pastille de KBr) : montage en transmission

Cependant, dans le cas de couches inférieures à 500 Å d'épaisseur, la spectroscopie IRTF conventionnelle atteint ses limites de sensibilité et de détection.

Les avantages du spectromètre IRTF

Les spectrométres IRTF présentent plusieurs avantages comparés aux spectromètres dispersifs :

- Rapidité : un spectre de 800-8000 cm^{-1} de résolution de 2 cm^{-1}, mesuré en 30 minutes sur un spectromètre dispersif, serait collecté en 1 seconde au même rapport signal-bruit sur un spectromètre IRTF
- Reproductibilité de l'échelle des fréquences
- Haute résolution spectrale
- Fiabilité

3.6 Méthodes de mesure en spectroscopie IRTF

Le choix de la technique d'échantillonnage dépend fortement de la nature de l'échantillon. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour la caractérisation d'échantillons d'état physique différents par spectroscopie infrarouge avec l'emploi d'accessoires spécifiques.

Transmission /absorption

Le principe de transmission/absorption est détaillé sur la figure (11). On définit $I_{source}(x)$, l'intensité globale émise par la source en fonction du retard et I(x) est l'intensité transmise après passage à travers l'échantillon. Enfin, $I_0(x)$ est défini comme l'intensité transmise au détecteur après passage dans le spectromètre sans l'échantillon (souvent défini comme la référence).

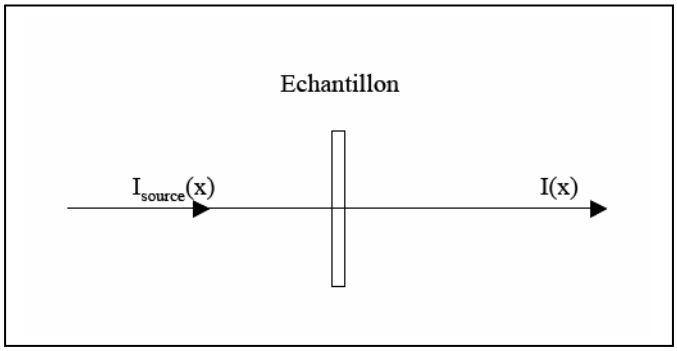


Figure 11 :
Principe de la transmission

Suite à la mesure enregistrée par le détecteur et après conversion de l'intensité par transformée de Fourier inverse (passage de I (x) en S (λ)), on définit le spectre soit en transmittance T, soit en absorbance A de la manière suivante :

$$T(\lambda) = S(\lambda)/S_0(\lambda) \text{ et } A(\lambda) = \log(S_0(\lambda)/S(\lambda)) = \log(1/T) \qquad \textbf{Eq. 11}$$

Ce mode de mesure nécessite absolument l'utilisation de supports transparents en infrarouge. Parmi ceux-ci, on trouve de nombreux sels de métaux alcalins tels que le bromure de potassium (KBr), qui pressé à 1000N, peut emprisonner une poudre dans un cristal transparent, ou encore le séléniure de zinc (ZnSe), le fluorure de calcium (CaF_2), le fluorure de baryum (BaF_2) et le germanium (Ge).

Contrairement au KBr, les supports ZnSe, CaF_2 et BaF_2, possèdent des qualités de résistance à l'hygrométrie qui les qualifient pour l'étude des matériaux biologiques et en général de tous les échantillons en solution.

Réflexion totale atténuée (ATR)

Le deuxième mode de mesure en spectroscopie IRTF est la réflexion totale atténuée, communément appelée ATR (attenuated total reflection). Le principe de l'ATR est détaillé sur la figure (12).

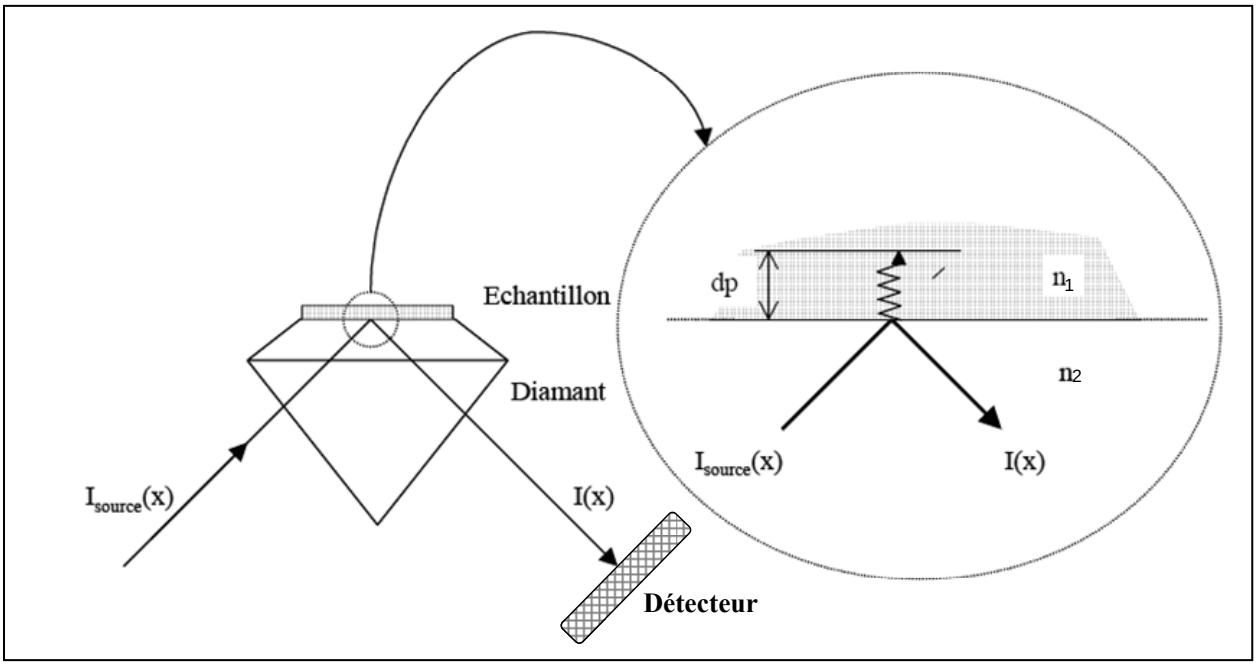


Figure 12 : Principe de la réflexion totale atténuée (ATR) sur diamant

L'échantillon est placé sur un cristal transparent en infrarouge mais d'indice de réfraction élevé (ZnSe, diamant, germanium) appelé élément à réflexion interne. $I_{source}(x)$ est l'intensité globale émise par la source en fonction du retard et I (x) est l'intensité après réflexion sur l'échantillon. En première approximation, d'après la loi de Descartes, le faisceau IR initial traverse le cristal (diamant dans l'exemple) et subit une réflexion totale à l'interface cristal-échantillon puis est dirigé vers le détecteur(Griffiths 1986).

En effet, la particularité du cristal, outre sa haute résistance, est qu'il possède un indice de réfraction généralement élevé (n_2=2,43 pour le diamant par exemple) et dans la plupart des cas supérieur à celui de l'échantillon (n_1). En réalité, le phénomène peut être perturbé par l'existence d'une onde progressive appelée évanescente. Celle-ci pénètre de quelques micromètres dans l'échantillon se trouvant en contact direct avec le cristal. De ce fait, une partie de l'énergie lumineuse est retenue et la réflexion totale est dite atténuée (Griffiths 1986).

Il est établi que la profondeur de pénétration (dp) des ondes évanescente dans l'échantillon dépend de la longueur d'onde λ, de l'angle α d'incidence du faisceau par rapport à la normale à l'intérieur du cristal et des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon, nommés respectivement n_2 et n_1 selon la formule de Harrick (1979) :

$$dp = \frac{\lambda}{2\pi n_2 \sqrt{\sin^2\alpha - (\frac{n_2}{n_1})^2}} \qquad \textbf{Eq. 12}$$

La pénétration dépendant de la longueur d'onde, une correction doit être apportée pour calculer l'absorbance réelle. Pour des échantillons ayant le même indice de réfraction la profondeur de pénétration est la même, ce qui permet de comparer aisément des matériaux de même nature. La pénétration étant faible (1-4µm), l'absorbance reste dans les limites de linéarité de la loi de Beer-Lambert. Ces deux avantages contribuent à rendre une opération de correction de ligne de base plus facile, voire inutile.

Réflexion diffuse

La technique de réflexion diffuse est employée très largement pour des analyses qualitatives de produits. Dans cette partie, nous rappellerons les principes de cette méthode. La réflexion diffuse peut être considérée comme la résultante de multiples réflexions, réfractions et diffractions sur des particules orientées de façon aléatoire. Dans la pratique, on a deux types de réflexion :

La réflexion spéculaire : avec la loi de Descartes (rayon incident, rayon réfléchi) dans le plan de l'échantillon. L'absorption du rayonnement est obtenue à partir des équations de **Kramers-Krönig**

La réflexion diffuse **:** qui suit la loi d'approximation de Lambert. Cette réflexion est délocalisée et le phénomène d'absorption peut être traduit par une loi approximative : la formule de **Kubelka Munk**

$$F(R_o) = (1- R_o)^2 / 2 R_o = K / S \qquad \textbf{Eq. 13}$$

Avec :

R_o : réflectance relative (R échantillon / R référence)

K : coefficient d'absorption

S : coefficient de diffusion

Les spectres de réflexion-diffuse sont complexes car ils contiennent à la fois des éléments dus à la réflectance, à la diffusion et à l'absorbance de l'échantillon.

Microspectroscopie IRTF

La microspectroscopie infrarouge est le couplage entre un spectromètre IR et un microscope. Au début**,** les microscopes infrarouge étaient réalisés à partir de petits microscopes conçus pour le visible auxquels on avait substitué les lentilles classiques par une optique en KBr. Ces systèmes étaient peu performants surtout à cause des problèmes d'aberrations chromatiques car il est pratiquement impossible de les corriger sur une gamme spectrale très étendue. Finalement, ce type de microscope était surtout utilisé pour examiner des petites pastilles de KBr de 0,5 à 2 mm de diamètre.

L'utilisation d'un condenseur de faisceau permettait à moindre frais l'examen de petits échantillons tout en donnant de bons résultats. Avec les appareils IRTF il a fallu attendre la commercialisation de détecteurs sensibles et rapides, du type MCT (mercure, cadmium, tellure), pour avoir des performances acceptables étant donné la faible quantité d'énergie qui atteint le détecteur après le passage à travers le cache du microscope.

Un net regain d'intérêt pour la microscopie infrarouge est apparu dans les années 80 avec la commercialisation de microscopes dédiés à l'infrarouge qui utilisaient enfin une optique purement réfléchissante du type Cassegrain. Puis, l'amélioration constante du matériel s'est poursuivie assez régulièrement autant dans le domaine infrarouge que dans celui du visible.

Cette technique permet d'utiliser les potentialités de la spectroscopie IRTF à l'échelle microscopique pour l'étude de micro-échantillons de taille de l'ordre de 10 µm.

Actuellement, la microspectroscopie IRTF est largement utilisée dans de nombreux domaines grâce aux avantages apportés par l'interférométrie et l'usage de détecteurs MCT ultrasensibles refroidit à l'azote liquide. Ceci a permis l'application de cette technique à des échantillons biologiques.

Le rôle du microscope est de conduire le rayon infrarouge de l'interféromètre à l'échantillon de manière colinéaire au chemin optique visible. L'échantillon mesuré correspond à l'échantillon observé. Les lentilles en verre étant opaques aux radiations infrarouges, le microscope infrarouge utilise des optiques réfléchissantes (miroirs dorés ou argentés, objectifs de type Cassegrain).

En microspectroscopie IRTF, les modes d'enregistrement sont la transmission si l'épaisseur de l'échantillon est compatible avec une absorbance raisonnable (de l'ordre d'une unité

d'absorbance). Sinon, le mode de réflexion s'applique à des échantillons plus épais ou à des dépôts sur des supports réfléchissants.

Le microscope infrarouge est relié à un spectromètre IRTF et est muni d'une platine (porte-échantillon) motorisée, d'un détecteur MCT, d'une source d'IR (de globar) et des objectifs à angle d'incidence rasante (type Cassegrain). L'imagerie spectrale a été rendue possible grâce à ces systèmes. Le mouvement de la platine est contrôlé à l'aide d'un logiciel et peut être réglé avec une précision sub-micrométrique. La plupart des objectifs de microscopes IR ont des ouvertures numériques comprises entre 0,5 et 0,7 donnant des résolutions spatiales de l'ordre de quelques microns à plusieurs dixaines de microns suivant l'ouverture utilisée. La résolution spatiale peut être définie comme la capacité à mesurer le spectre d'un objet sans contamination par les informations provenant d'objets placés hors du champ délimité par l'ouverture (Messerschmidt 1988).

De nombreuses aberrations optiques (aberrations sphériques et chromatiques, diffraction) sont susceptibles de se produire lors de l'interruption d'un faisceau par une ouverture et peuvent limiter la précision de la mesure. La diffraction limite la résolution spatiale à une valeur proche de la longueur d'onde utilisée. La résolution spatiale effective est limitée à $0{,}61\lambda/ON$ (ON : ouverture numérique de l'objectif et λ : longueur d'onde).

Généralement les microscopes infrarouge sont munis d'un jeu d'objectifs comprenant : un objectif pour le visible 4X, deux objectifs infrarouge de 15X et de 32X et parfois un objectif ATR de 20X et un cristal de Ge-ATR. Dans certains cas, le microscope IR peut être placé dans une enceinte de purge (azote gazeux ou air sec) pour assurer une protection efficace contre les influences atmosphériques (vapeur d'eau et gaz carbonique).

L'échantillon à analyser est placé sur la platine motorisée et amené au centre du champ de vision du microscope et la zone à étudier est circonscrite par une ouverture placée dans le plan image de l'échantillon. L'ouverture peut être de dimensions différentes de façon à restreindre la mesure aux contours exacts de la partie de l'objet à étudier.

L'imagerie IRTF

L'imagerie IRTF s'est assez largement développée grâce à la microspectroscopie IRTF et aux progrès en micro-informatique. L'utilisation de détecteurs MCT monocanaux (en général $100x100\mu m^2$ ou $50x50\mu m^2$) en microspectroscopie a permis de développer l'imagerie IR qui jusqu'à 1994, se faisait de façon séquentielle avec acquisition de l'image en mode point par point. Une carte spectrale pourrait être ensuite construite sur la base de spectres acquis en

chaque point. La cartographie point par point souffre de la lenteur de la méthode (plusieurs heures pour une image) et est dépendante de l'autonomie du détecteur MCT refroidi.
Depuis une dixaine d'années, l'accès aux détecteurs multi-canaux, barettes en ligne ou matrice à plan focal, ont révolutionné l'imagerie IR. Ces détecteurs ont réduit le temps d'acquisition de plusieurs nombres de grandeur avec une résolution en pixel pouvant atteindre 4-6,5 µm.

La carte spectrale ou l'image spectrale exprime une information multiparamétrique de composition chimique associée à une information spatiale. Donc, le jeu de données résultant de l'acquisition de centaines de spectres comprend des informations sur les coordonnées (x, y) et sur l'absorbance pour chaque longueur d'onde (882 variables par spectre entre 400 et 4000 cm^{-1} à une résolution de 6 cm^{-1}). Il constitue un ensemble multidimensionnel qu'il est convenu d'appeler un hypercube de données. L'exploitation de ce hypercube de données peut se faire selon plusieurs stratégies (analyse univariée ou analyse multivariée).
L'imagerie IRTF a encore un impact assez limité en raison de son prix élevé. L'amélioration constante des détecteurs (vitesse et sensibilité alliées à une baisse des prix) devrait permettre à cette technique une plus large diffusion. La versatilité de la microspectroscopie IRTF ainsi que la qualité des renseignements qu'elle fournit ont permis de démontrer ses potentialités dans de nombreux domaines d'application tels que ceux du médical (microbiologie, biologie cellulaire et tissulaire…) et industriel (agroalimentaire, chimie, électronique…)

3.7 L'analyse des données IR

Les spectres IR contiennent des informations pertinentes sur les caractéristiques physiques et biochimiques des échantillons analysés. Cependant, ces informations peuvent être parfois difficiles à extraire. L'utilisation des méthodes mathématiques, informatiques et d'analyse statistique multivariée forment une autre approche qui permet d'améliorer l'extraction et l'exploitation des informations spectrales sous-jacentes. Parmi ces méthodes, la classification hiérarchique, l'analyse en composantes principales ou encore l'analyse discriminante linéaire, sont les plus utilisées.
La classification hiérarchique ascendante est une méthode d'analyse statistique qui regroupe les spectres en fonction de leur ressemblance sur le domaine spectral désiré. La classification hiérarchique est réalisée en utilisant un calcul qui permet de déterminer les distances euclidiennes entre les groupes de spectres suivant leurs ressemblances. L'algorithme de Ward est souvent utilisé pour ce calcul.

Une carte exploitant la totalité de l'information spectrale peut être créée en associant à chaque point un code de couleur dépendant de la classification du spectre enregistré à cette position. Il est possible de construire plusieurs cartes à partir du même jeu de spectre en faisant varier les paramètres de l'analyse hiérarchique (nombre de groupes formés, nombre, limites et contributions relatives des domaines spectraux utilisés).

Pour l'imagerie IR, parmi les méthodes d'analyse multivariée, l'analyse en composantes principales est applicable au traitement de l'information. Elle permet de décomposer un jeu de données en une série de composantes principales qui expriment l'essentiel de la variance. Si l'on associe un gradient de couleur à chacune des composantes principales, il est alors possible de générer des cartes spectrales qui tiennent compte de leur contribution en chaque point de la carte. Des cartes peuvent également être réalisées en combinant les scores de plusieurs composantes.

L'imagerie spectrale permet de mettre en évidence des variations de la répartition des espèces composant un échantillon en l'absence de changements de leur composition globale et de détecter des variations locales de compositions.

Les méthodes d'analyse et de traitement des spectres utilisées lors de ce travail seront détaillées dans la partie Matériels et Méthodes.

4. Applications de la spectroscopie IRTF

4.1 Les biomolécules et l'attribution spectrale en spectroscopie infrarouge

Dans une macromolécule biologique, toutes les vibrations de groupes chimiques impliquant une variation du moment dipolaire électrique permanent du groupe absorbent dans le domaine infrarouge. La spectroscopie IRTF mesure directement les vibrations de groupes chimiques et l'énergie de ces vibrations (ou fréquence de vibration ν) dépend de la force des liaisons chimiques ainsi que de la masse des atomes impliqués dans la vibration.

Ainsi, à chaque fonction ou groupe chimique correspond une gamme de fréquences de vibration caractéristique. De plus, la fréquence de vibration est sensible aux interactions fines entre ces groupes et leur environnement : liaison hydrogène (environnement protique ou aprotique), interactions électrostatiques (environnement apolaire ou polaire), transfert de charge avec un système d'électrons délocalisés.

L'intensité d'un signal infrarouge dépend également de l'amplitude de la variation du moment dipolaire engendrée par la vibration. Elle dépend aussi du champ électrostatique environnant

le groupe chimique, par exemple de l'état d'oxydoréduction d'un site métallique dans une protéine.

L'étude des macromolécules biologiques initiée par Blout et Fields en 1949 pour les acides nucléiques, par Elliott et Ambrose en 1950 pour les protéines a montré que de nombreuses informations pouvaient être apportées par cette méthode. La spectroscopie infrarouge s'est révélée particulièrement sensible aux conformations de ces molécules complexes et est considérée comme l'une des méthodes les plus adaptées à l'étude des biopolymères. L'un des avantages majeurs de la technique est de pouvoir étudier les changements de conformation des molécules biologiques en interaction avec leur environnement.

Les protéines

La liaison peptidique caractérisant les protéines, possède de nombreux modes de vibration et donne 9 bandes (notées amide I à amide VII et amide A et B). Les bandes amide I, II et III sont très actives en infrarouge et ont été particulièrement étudiées. L'analyse fine de la position et de la structure de ces bandes donne des informations sur la structure primaire et secondaire de la protéine étudiée ainsi que sur les différentes conformations secondaires de type hélice α, feuillet β, coude β ou pelote statistique. De plus, la spectrométrie IRTF peut également renseigner sur les chaînes latérales des acides aminés et sur l'identité de certains acides aminés impliqués dans la structure des protéines (Tableau 2 et figure 13).

Vibrations de la liaison peptidique		Vibrations des chaînes latérales	
Fréquence (cm^{-1})	Attribution	Fréquence (cm^{-1})	Attribution
3250-3300	Amide A (résonance de Fermi ν (N-H) avec amide II)	1716	ν_{as} (C=O) de COO^- de l'aspartate
3090-3100	Amide B (résonance de Fermi ν (N-H) avec amide II)	1712	ν_{as} (C=O) de COO^- du glutamate
1600-1700	Amide I ν (C=O) couplé avec ν (C-N) et δ (N-H)	1622	δ (CH_2) de l'asparagine
1550	Amide II δ (N-H) couple avec ν (C-N)	1596	Histidine (mouvement du cycle)
1230-1330	Amide III δ (N-H) et ν (C-N)	1516	tyrosine (mouvement du cycle)
625-767	Amide IV δ (0=C-N) et autres modes	2400-2700	Cystéine ν (S-H)
640-800	Amide V δ (0=C-N-H) et autres modes	3486-3491	Tryptophzne ν (N-H du noyau indole)
537-606	Amide VI δ (N-H) hors du plan		
200	Amide VII (torsion du squelette)		

ν vibration d'élongation, ν_{as} élongation antisymétrique, δ vibration de déformation

Tableau 2 : Quelques pics d'absorption attribués aux vibrations des protéines

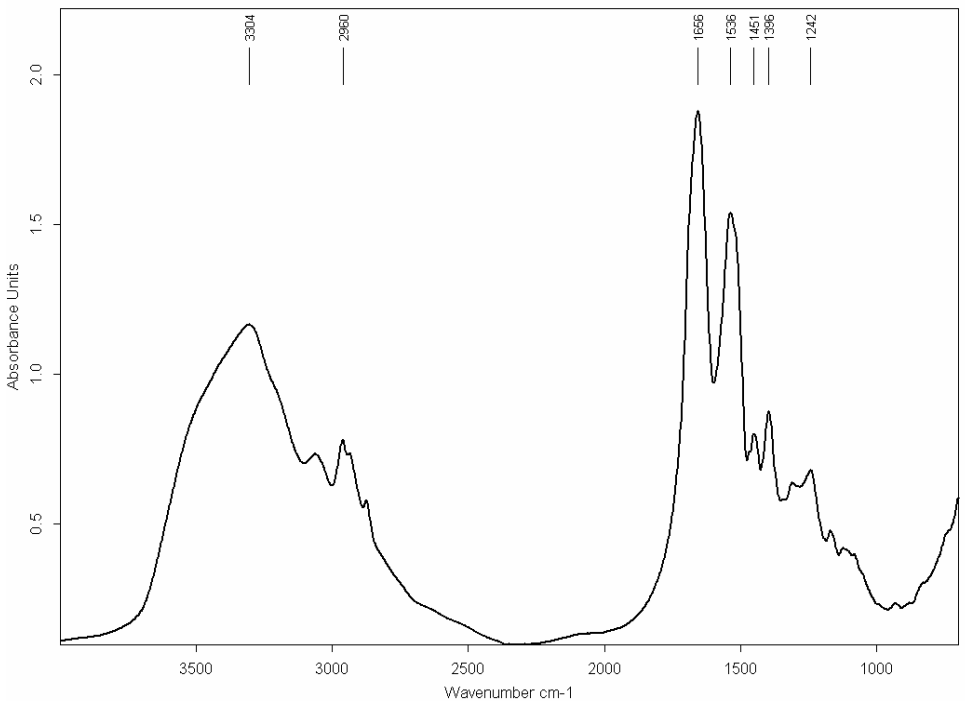


Figure 13 : Spectre IRTF représentatif d'une protéine (Albumine) (64 accumulations à la résolution de 4 cm^{-1}, facteur de zero filling de 2)

Dans des cas plus précis, la spectroscopie IRTF permet de suivre la formation d'intermédiaires réactionnels et leurs conséquences sur la protéine, comme la protonation et la déprotonation consécutives d'acides aminés pendant des mécanismes de transfert d'électrons et la caractérisation du site actif d'enzymes. L'évolution des liaisons chimiques du centre actif au cours des réactions catalytiques ont été décrites par Jung (Jung 2000).
L'aspect dynamique de cette technique ainsi que l'accès à des informations au niveau atomique rend cette spectroscopie indispensable pour l'analyse détaillée de mécanismes impliquant des molécules de nature protéique.

Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont actifs dans l'infrarouge et ce sont les groupes phosphates et les riboses qui présentent les vibrations les plus intenses. La spectroscopie infrarouge permet même d'évaluer les changements de conformation que peuvent présenter les acides nucléiques, la nature et la force des liaisons impliquées dans l'interaction avec un ligand. Des bandes caractéristiques des conformations A, B et Z de l'ADN ont par ailleurs été décrites (tableau 3). Des études par spectroscopie infrarouge de la structure conformationnelle des

doubles et triples hélices d'ADN et d'ARN de séquences contrôlées ont été décrites (Akhebat 1992) et (Fritzsche 1993).

Fréquence (cm^{-1})			Attribution
ADN A	**ADN B**	**ADN Z**	
1710	1717	1692	ν (C=O) carbonyle
1240	1220	1265	ν_{as} (P=O)
1090	1085	1090	ν (P=O)
810-820	820-825		OPO diester
665 - 675	680 – 690	600 - 625	Guanine, respiration du noyau

Tableau 3 : Quelques pics d'absorption attribués à l'ADN

Les polysaccharides

L'étude des sucres en spectrométrie infrarouge a débuté dans les années 50 mais il a fallu attendre les années 90 pour que l'étude des polysaccharides complexes soit réellement possible (Kacurakova 2000). La spectroscopie infrarouge permet une analyse qualitative et quantitative des sucres renseignant sur leur nature et leur état (solution, cristallisation etc…). L'industrie alimentaire est la première activité concernée par ce type d'analyse et a largement participé à l'amélioration des techniques spectroscopiques. Les pics caractéristiques de ces biomolécules sont détaillés dans le tableau 4.

Fréquence (cm^{-1})	Attribution	Fréquence (cm^{-1})	Attribution
1700-1730	ν (C=O) de COOH	1050-1070	
1600-1650	Amide I ν (C=O) + ν (C-N)	1030	
1540-1560	Amide II δ (N-H) + ν (C-N)	1016-1024	α-glucose
1420	$\nu_s(COO^-)$	966	C-C désoxyribose
1160-1170	ν (C-O-C), ν (C-C) β-glucose	930	Vibration du cycle
1120-1150	ν (C-O-C), ν (C-C) α-glucose	830	δ (C-H)
1105		805-812	α et β-mannanes
1080	ν (C-O-C) β-glucose		

Tableau 4 : Quelques pics d'absorption attribués aux polysaccharides

Les lipides

La biochimie des lipides est complétée par la spectroscopie IR grâce à l'activité vibrationnelle de ces molécules dans le moyen infrarouge surtout dans la région des pics attribués en général aux lipides (région 2700-3000 cm^{-1}) et aux triglycérides (1745 et 3011 cm^{-1}).

L'attribution des bandes spectrales pour ces biomolécules a pu être réalisée grâce à des études sur les molécules isolées. Le tableau 5 présente les attributions des bandes obtenues à partir de phospholipides isolés.

Fréquence (cm^{-1})	Attribution	Fréquence (cm^{-1})	Attribution
2950-2960	ν_{as} (C-H) de CH_3	1470-480	δ (C-H) de CH_2
2920-2930	ν_{as} (C-H) de CH_2	1460	δ (C-H) de CH_3
2865-2880	ν (C-H) de CH_3	1230	ν_{as} (P=O) de PO_2
2840-2860	ν (C-H) de CH_2	1170-1200	ν (C-O-C) des esters
1730-1760	ν (C=O) des esters	1080	ν (P=O) de PO_2

Tableau 5 : Quelques pics d'absorption attribués aux phospholipides

4.2 Les spectres d'origine biologique

La plupart des biomolécules possèdent une signature caractéristique dans le MIR. Les cellules, les fluides biologiques et les tissus contiennent de nombreuses biomolécules (protéines, lipides, glucides et acides nucléiques). Ces molécules ont une formule chimique complexe, se traduisant par une multitude de bandes d'absorption dans le spectre MIR.

Le spectre MIR d'un échantillon biologique consiste donc en l'addition de nombreuses bandes spectrales qui vont se chevaucher et/ou se superposer (figure 14) (Jackson 1996; Naumann 2000). L'analyse des spectres, dans ce cas, n'est pas simple, d'autant plus que l'environnement des molécules influence les fréquences de vibration. Néanmoins, de nombreuses bandes d'absorptions ont pu être attribuées (Tableau 6) (Jackson 1996; Naumann 2000). La spectroscopie MIR est donc une technique intéressante puisqu'elle permet d'obtenir une image globale et complète d'une cellule donnée dans un état particulier.

Une des particularités des échantillons biologiques est de contenir un fort pourcentage d'eau. Le spectre MIR de l'eau pure montre que les bandes d'absorption couvrent des larges domaines de la fenêtre spectrale du MIR. De plus, le spectre de l'eau est dépendant de son environnement et la molécules d'eau interagissent avec les solutés, ce qui a une influence sur les fréquences de vibration (Max 2007a; Max 2007b). La contribution de l'eau sur les spectres IRTF des échantillons biologiques est importante et il faut en tenir compte. Pour résoudre le problème d'eau, les spectres IRTF sont généralement enregistrés directement sur des échantillons desséchés selon un protocole rigoureux et spécifique de chaque type d'échantillon.

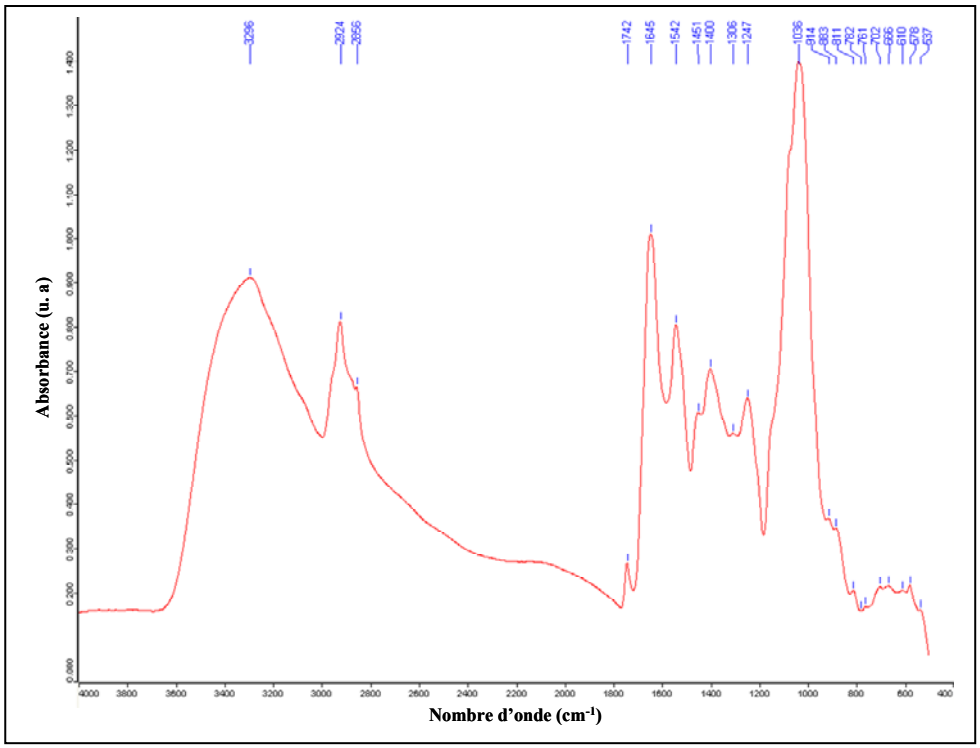


Figure 14 : Exemple de spectre IRTF d'un microorganisme avec la position des pics d'absorption

Nombre d'onde (cm^{-1})	Attribution	Molécule
≈ 3500	υ OH	Groupes Hydroxyles
≈ 3200	υ NH Amide A	Protéines
3010	=C-H	Lipides
2956	υ CH_3 asymétrique	Lipides
2921	υ CH_2 asymétrique	Lipides
2870	υ CH_3 symétrique	Lipides
2850	υ CH_2 symétrique	Lipides
1742	υ C=O	Triglycérides
1738	υ C=O	Phospholipides
1695-1637	Amide I	Protéines
1636	δ OH	H_2O
1550	Amide II	Protéines
1468	CH_2 cisaillement	Lipides
≈1400	υ C=O des fonctions COO^-	Acides Gras Acides Aminés
1310-1240	Amide III	Protéines
1250-1220	υ P=O asymétrique	Phosphodiester
1100-1080	υ PO_2 symétrique	Phospholipides Acides nucléiques
1200-900	C-O-C C-O-P, P-O-P	Oligo- et Poly- saccharides

Tableau 6 : Principales bandes d'absorption caractéristiques des biomolécules dans un échantillon biologique (υ : élongation, δ : déformation)

Le spectre d'un échantillon biologique peut être divisé en plusieurs parties dont la dénomination provient du composant dont l'absorbance est la plus significative dans la région donnée. Le spectre IRTF des échantillons biologiques est dominé entre 1500 et 1800 cm^{-1} par les bandes amide I et II des protéines, respectivement à 1650 et 1550 cm^{-1}, par la bande d'élongation antisymétrique des phosphates à 1240 cm^{-1} et par un massif peu résolu dit région des sucres entre 900 et 1200 cm^{-1}. La région s'étendant de 2800 à 3000 cm^{-1} est dominée par les vibrations d'élongation des liaisons C-H et nommée en conséquence région des lipides (tableau 7 et 8).

L'attribution putative des bandes a pu être réalisée grâce aux données obtenues sur les macromolécules isolées. Il est à noter que la capacité de la spectroscopie IRTF à détecter l'ADN sous forme de chromatine dans les noyaux cellulaires est encore débattue (Diem 2002).

Fréquence (cm^{-1})	Région	Fréquence (cm^{-1})	Région
2800-3000	Lipides	1350-1500	Région mixte
1700-1800	Esters des lipides	1250-1350	Amide III
1500-1700	Protéines	1200-1250	Acides nucléiques
1500-900	Empreinte	900-1200	Sucres

Tableau 7 : Table des noms usuels pour les différentes régions du spectre d'un échantillon biologique

Fréquence (cm^{-1})	Attribution	Fréquence (cm^{-1})	Attribution
3250-3800	ν (O-H)	1380-1430	ν (C-H) de CH des protéines
2950-2960	ν_{as} (C-H) de CH_3	1400	ν_{as} (C=O) de COO^-
2920-2930	ν_{as} (C-H) de CH_2	1230-1330	Amide III
2865-2880	ν (C-H) de CH_3	1240	ν_{as} (P=O) de PO_2
2840-2860	ν (C-H) de CH_2	1150-1170	ν (C-O-C) des esters
1700-1750	ν (C=O) esters des lipides	1120	ν (C-O) des riboses
1625-1695	Amide I	1080-1085	ν (C-O-C), ν (P=O)
1525-1560	Amide II	1050-1070	ν (C-O) glycogène
1515	Tyrosine (en dérivée 2nde)	1024	ν (C-O) glycogène
1460-1470	δ (C-H) de CH_3 épaulement	968	ν (C-C/C-O) des phosphates et des acides nucléiques
1440-1460	δ (C-H) de CH_2		

Tableau 8 : Attribution des principaux bandes IRTF des échantillons cellulaires et tissulaires

4.3 La spectroscopie IRTF et ses applications dans les domaines de la biologie et du biomédical

La spectroscopie IRTF possède un potentiel particulièrement intéressant pour de nombreuses applications médicales. Il est en effet possible de détecter et de caractériser des variations spectrales liées à des modifications des différents constituants moléculaires (lipides, sucres, protéines…) dans un tissu, dans une cellule, ou dans un fluide biologique, en permettant d'orienter le diagnostic ou de détecter certaines pathologies à un stade précoce. Les recherches dans le domaine de la caractérisation des systèmes biologiques peuvent être grossièrement catégorisées en 3 groupes d'applications (Mantsch 2002; Petibois 2006)

- L'analyse des fluides biologiques (biochimie clinique)
- L'analyse des cellules et des tissus (cytologie/pathologie)
- L'analyse des microorganismes (microbiologie)

Biochimie clinique

La biochimie clinique basée sur la spectroscopie IRTF permet essentiellement l'analyse des constituants de liquides biologiques tels que le sang, le sérum, la salive, le liquide amniotique et l'urine. Les analyses ont pour but principal l'évaluation de la concentration de certaines biomolécules dans ces fluides (Petibois 2001; Low Ying 2002). L'objectif est de diagnostiquer certaines pathologies liées une concentration anormale de ces molécules ou tout simplement de faire des dosages de constituants. Dans la majorité des études biochimiques, ces analyses sont réalisées à partir de film déshydratés, ce qui permet de surmonter le problème de la teneur en eau de l'échantillon.

Parmi les exemples d'application récente de la spectroscopie IRTF en biochimie clinique, figurent l'analyse biochimique globale de paramètres sanguins et sériques du surentraînement (Petibois 1999; Petibois 2000) et l'étude de l'effet de l'hormone thyroïdienne sur les cellules ostéoprogénitrices humaines et ses conséquences métaboliques (Latxague 2004; Latxague 2005).

Cytologie/pathologie

Le nombre important de publications relatif à ces applications montre l'intérêt de cette approche dans le diagnostic cellulaire et tissulaire (Moreno 2002; Mourant 2003; Fernandez 2005).

Diagnostic cellulaire

Au niveau cellulaire, la spectroscopie IRTF peut avoir plusieurs applications telles que la détection de composés intracellulaires, le suivi de la production d'exoproduits en réponse à des variations environnementales (Naumann 1996; Naumann 2000) ainsi que l'étude des interactions cellule/médicament (Bouhedja 1997).

Des différences spectrales entre cellules saines et cellules leucémiques ont été observées sur des cellules prélevées chez des patients et des sujets sains, conduisant à un classement des spectres en fonction de l'état pathologique (Benedetti 1984; Benedetti 1985; Schultz 1996; Ramesh 2002). Ainsi, on peut mettre en évidence des marqueurs spectraux caractéristiques du phénotype MDR (Gaigneaux 2002; Krishna 2006) sur des cultures de cellules HL60, K562 et MCF7. Ces études servent à mettre au point des modèles de prédiction en vue de faciliter le diagnostic ou le suivi de pathologies ou encore à prévoir l'efficacité du traitement sur cellules isolées de patients.

Diagnostic tissulaire

Au niveau tissulaire, au cours de ces 10 dernières années, on a assisté à une augmentation rapide du nombre d'études diagnostiques réalisées par spectroscopie IRTF sur les tissus biologiques. Parmi ces applications, on peut citer la détection de corps étrangers dans les tissus (Kidder 1997), l'étude de l'encéphalopathie spongiforme bovine dans le tissu nerveux (Kneipp 2000), l'étude de la biominéralisation du tissu osseux (Bohic 1998) ainsi que des études sur la peau, le cerveau et l'aorte pour la détection de certaines pathologies (Tfayli 2005; Amharref 2006; Bonnier 2006; Chew 2007).

Plusieurs méthodes d'analyse en spectroscopie IRTF ont été employées. Des spectres de tissu mammaire ont été enregistrés en macro (Meurens 1996) et microspectroscopie (Fabian 1995; Jackson 1996) en mode transmission ou en mode ATR (Dukor 1998). Après une période d'optimisme où la séparation du tissu cancéreux mammaire et du tissu sain semblait aisée (Meurens 1996), plusieurs auteurs ont fait le catalogue des écueils liés à cette approche (Fabian 1995; Jackson 1996; Dukor 1998; Dukor 1999; Jackson 1999).

Ces publications mettent en exergue les pièges qui peuvent compliquer ou fausser l'interprétation des données spectrales, comme la présence de collagène dans la matrice sous-jacente aux cellules cancéreuses ou encore la forte hétérogénéité cellulaire des tumeurs.

Pour le diagnostic de certaines pathologies de l'utérus, des applications ont été portées sur des frottis entiers et qui ont été analysés dans leur globalité en macro-spectroscopie (Wong 1991; Morris 1995; Wood 1996; Cohenford 1997). Ces études ont révélé une grande différence entre les spectres de frottis classés comme pathologiques et les spectres de frottis classés comme sains. Cette différence semble due à la présence de glycogène dans les cellules saines (Wong 1991; Cohenford 1997), ce qui est corrélé avec les observations cytologiques.
La différenciation entre tissu ovarien sain et pathologique par spectroscopie IRTF a été également démontrée par Krishna et coll (Krishna 2007).

Ces exemples permettent d'illustrer quelques applications de la spectroscopie IRTF à l'étude des systèmes biologiques cellulaires et tissulaires ainsi que les difficultés rencontrées dans ces approches. En résumé, il est nécessaire de disposer d'un échantillon suffisamment vaste pour être représentatif de la population étudiée et comprenant si possible des spécimens de pathologies proches. Pour mieux mener ce genre d'étude, une collaboration étroite entre biophysiciens et pathologistes est nécessaire.
En raison de l'importance que représentent les applications de la spectroscopie IRTF dans le domaine de la Microbiologie pour ce travail, cette partie sera traitée dans le chapitre suivant.

5. Applications de la spectroscopie IRTF en Microbiologie.

Dans les années 50, les premières applications de la spectroscopie IR à l'étude des microorganismes ont été rapportées par les travaux précurseurs de Thomas et Greenstreet (Thomas 1954), Bordner et coll. (Bordner 1956), Kenner et coll.(Kenner 1958) et enfin Goulden et Sharpe (Goulden 1958). Dans la majorité de ces études, la reconnaissance des espèces des microorganismes par spectroscopie infrarouge était impossible en raison de la lenteur de l'analyse et de la difficulté d'exploiter les spectres (Norris 1959).

Depuis les travaux pionniers de Naumann (Naumann 1991a; Naumann 1991b), l'utilisation de la spectroscopie infrarouge en microbiologie n'a cessé de se développer grâce aux progrès des spectromètres IRTF et des traitements informatiques de données qui ont permis d'exploiter les différences observées entre les spectres de différents microorganismes.

Le spectre IRTF donne trois types d'informations applicables au domaine de la microbiologie:

- une information qualitative : présence ou absence d'une bande caractéristique d'un produit particulier qui permet la caractérisation d'un état physiologique des cellules ou l'obtention d'une information sur le métabolisme.
- une information quantitative : permettant le dosage de composés intracellulaires ou secrétés.
- une information d'identité : la signature spectrale globale étant considérée comme "l'empreinte" du microorganisme.

5.1 Généralités sur *Candida*

Puisque ce travail concerne surtout des applications de la spectroscopie IRTF à l'identification et au typage des levures du genre *Candida*, nous présentons dans cette partie des généralités sur ces levures et leurs pathologies.

Les candidoses

Les candidoses sont des mycoses cosmopolites de fréquence croissante dues à des levures du genre *Candida*. Cet agent saprophyte endogène peut se comporter en opportuniste sur des terrains favorisants, tels que les patients des services d'hématologie ou de soins intensifs chez lesquels ils sont fréquemment associés. Dans ce contexte, les candidoses invasives sont associées à une mortalité élevée.

Position taxonomique de Candida

Les levures du genre *Candida* appartiennent aux embranchements suivants :

- les Deutéromycota, classe des Blastomycètes, famille des Cryptococcaceae, sous-famille des Cryptococcoïdeae pour la majorité des espèces de *Candida*.
- les Ascomycota, classe des Hemiascomycètes, famille des Endomycetaceae pour les espèces *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* (Tableau 9).

Embranchements	Classes	Familles	Sous-familles	Genres et espèces (phase sexuée ou télémorphe)	Genres et espèces (phase asexuée ou anamorphe)
Ascomycota	Hémiascomycètes	*Endomycetaceæ*		*Issatchenki orientalis*	*Candida krusei*
				Kluyvera fragilis	*Candida kefyr*
				Pichia guillermondi	*Candida guilliermondii*
Basidiomycota	Teliomycètes	*Filobasidiaceæ*		*Filobasidiella neoformans*	*Cryptococcus neoformans*
Deuteromycota	Blastomycètes	*Cryptococcaceæ*	*Cryptococcoidæ*		*Candida* *Cryptococcus* *Torulopsis* *Malassezia*
			Trichosporoidæ		*Trichosporon*
			Rhodotoruloidæ		*Rhodotorula*

Tableau 9 : Distribution des levures parmi les champignons

Facteurs favorisants

Le plus souvent, les candidoses sont d'origine endogène, les levures étant présentes dans la flore saprophyte. Les facteurs favorisants sont :

- soit des facteurs locaux résultant d'une altération des barrières mécaniques naturelles (cathéter intraveineux, sondes, ulcération des muqueuses, interventions chirurgicales, antibiothérapie).
- Soit des facteurs généraux tels que l'agranulocytose, la corticothérapie, mais aussi le diabète, les âges extrêmes de la vie (nouveau-nés, vieillards), la toxicomanie intraveineuse.

Epidémiologie des candidoses

L'incidence des candidoses, en particulier les infections profondes, a considérablement augmenté depuis l'avènement de l'antibiothérapie à large spectre et le développement des divers protocoles de chimiothérapie intensive. Leur fréquence est difficile à indiquer précisément car elle est très variable selon les critères de définition retenus et les populations étudiées. Dans l'ensemble des services hospitaliers, *Candida spp.* est le quatrième agent isolé d'hémocultures, chez des patients hospitalisés, comptant ainsi pour 10% de toutes les septicémies acquises à l'hôpital. Les candidoses se situeraient actuellement au quatrième rang des infections hospitalières (Pfaller 1996; Edmond 1999; Lupetti 2002).

En France, l'enquête nationale de prévalence de 2001 montre que 6% des infections nosocomiales sont d'origine fongique avec environ 75% d'entre elles imputables aux levures du genre *Candida*.

Différents programmes de surveillance clinique ont apporté des informations sur la fréquence et la distribution de ces levures pathogènes. Les espèces les plus fréquemment isolées en milieu clinique sont présentées dans les tableaux 10 et 11.

Espèce	Fréquence (%)
C. albicans	54
C. glabrata	16
C. parapsilosis	15
C. tropicalis	10
C. krusei	2
C. guilliermondii	1
C. lusitaniae	1
Candida spp.	1

Tableau 10 : Espèces fongiques les plus fréquentes en mycologie clinique

Pfaller et coll. 2002, programme SENTRY, évaluation réalisée sur 2047 hémocultures collectées par 71 centres médicaux entre 1997 et 2000 (Pfaller 2002; Pfaller 2004).

Species	No. (%) of episodes	Range[a]
C. albicans	1178 (56.4)	42.7–67.0
C. glabrata	284 (13.6)	8.3–16.1
C. parapsilosis	278 (13.3)	6.9–30.0
C. tropicalis	152 (7.2)	2.1–10.0
C. krusei	40 (1.9)	0–3.1
C. guilliermondii	30 (1.4)	0–2.1
C. lusitaniae	15 (0.7)	0–2.0
C. kefyr	10 (0.5)	0–1.6
C. pelliculosa	9 (0.4)	0–1.2
C. famata	7 (0.3)	0–1.4
C. dubliniensis	6 (0.3)	0–1.8
C. lipolytica	6 (0.3)	0–0.7
C. norvegensis	5 (0.2)	0–0.5
C. inconspicua	4 (0.2)	0–0.5
C. utilis	2 (0.1)	0–0.2
C. sake	2 (0.1)	0–0.5
Unidentified *C.* sp.	9 (0.6)	
>1 *C.* spp.	51 (2.4)	
Total	2089	

[a]Ranges reflect data from all participating countries

Tableau 11 : Espèces fongiques les plus fréquentes, dans une études effectuée sur une population européenne de 2089 cas de septicémie (Tortorano 2004; Tortorano 2006).

Mode de transmission des levures

Le typage moléculaire des champignons a apporté un nouveau marqueur épidémiologique permettant de suivre la circulation des souches de levures. Dans les situations épidémiques, il a été possible de déterminer l'origine des souches dans les infections profondes ainsi que leurs modalités de transmission.

✓ ***Contamination endogène***

Chez les sujets sains, il existe une forte disparité de la prévalence du portage commensal des différentes espèces de *Candida*, quel que soit le site analysé (bouche, anus, peau, vagin, tractus respiratoire).

L'espèce *C. albicans* est isolée :

- du tube digestif chez plus de 60% des sujets
- de la muqueuse vaginale chez plus de 75% des femmes.

En revanche, *Candida parapsilosis* est l'espèce la plus fréquemment isolée sur la peau.

Il faut noter que les patients qui développent une infection systémique à *Candida* sont souvent préalablement colonisés par la souche de *Candida* en un ou plusieurs sites : cette colonisation constitue l'étape initiale, indispensable pour que l'infection puisse se développer. Une rupture

de l'équilibre de l'écosystème peut créer une "explosion" du réservoir de *Candida* et l'infection peut alors se développer par contiguïté à partir du site anal ou génito-urinaire ou par voie hématogène.

Cependant, l'origine commensale des infections fongiques reste une explication incomplète et ne permet pas d'élucider tous les cas d'infections. Ainsi ont été rapportés plusieurs cas d'épidémies au cours desquelles des souches de *Candida* de mêmes caractéristiques génotypiques ont été isolées de plusieurs patients d'un même service. La contamination d'origine exogène est donc actuellement bien admise.

- ✓ ***Contamination exogène***

L'étude génotypique des souches de *Candida* a permis de mettre en évidence l'existence de génotypes identiques :

- chez des patients voisins de chambre
- sur les mains du personnel soignant permettant d'envisager une contamination croisée par l'intermédiaire du manuportage par le personnel soignant
- au niveau du matériel hospitalier (matériel réutilisable mal désinfecté, …), ou de solutions nutritives contaminées (Lupetti 2002).

La connaissance du type de contamination initiale est indispensable pour établir une stratégie de prévention de l'infection. C'est en raison de la fréquence de la contamination endogène, qu'un traitement prophylactique antifongique parait justifié. Tandis qu'en cas de contamination exogène, il faut revenir aux moyens classiques de lutte contre les infections nosocomiales (hygiène des mains, mesures d'hygiène générale, éducation du personnel soignant, …). Le diagnostic de ces infections doit être posé rapidement en raison de la mortalité importante à laquelle elles sont associées (environ 40%).

D'une manière générale, le diagnostic des candidoses et la détection des épidémies en mycologie clinique reposent respectivement sur l'identification et le typage des souches isolées chez les patients. Pour mieux comprendre l'apport de la spectroscopie IRTF dans le domaine de la microbiologie en général et son application comme outil d'identification et de typage en particulier en mycologie, nous abordons tout d'abord la notion de l'identification et le typage ainsi que les caractéristiques et les limites des méthodes appliquées actuellement et jugées comme crédible pour ce genre d'étude.

5.2 L'identification et typage

En cas d'infection, l'identification du microorganisme pathogène est nécessaire pour la prescription d'un traitement adapté, du fait de l'expression de la résistance constitutive de certaines espèces microbiennes vis à vis de certains agents anti-infectieux.

A l'heure actuelle il n'existe pas de démarche univoque applicable à l'ensemble des microorganismes. En général, l'identification des agents microbiens est le résultat d'une suite d'étapes : prélèvement, enrichissement, isolement puis identification.

On distingue deux grandes familles de méthodes d'identification : les méthodes conventionnelles et les méthodes non conventionnelles.

Les méthodes conventionnelles

Ce sont les plus utilisées dans les laboratoires de microbiologie médicale. La stratégie consiste à sélectionner au mieux les caractères les plus discriminants. Ces méthodes nécessitent une incubation préalable et la culture doit être pure. La mise en évidence de certains caractères peut nécessiter une longue période d'incubation pour permettre la consommation de substrats par l'agent microbien.

La première étape repose sur l'examen direct de l'échantillon (morphologie, mobilité et coloration). Cet examen peut être à lui seul très informatif pour le clinicien.

L'étape suivante repose sur le développement de l'agent microbien, son isolement, et ses caractéristiques de croissance. Cela nécessite de regrouper les conditions d'atmosphère (aérobie, anaérobie, enrichi en CO_2), de température et de culture favorables au développement microbien.

Le type de milieu ensemencé joue aussi un rôle important pour l'identification de l'agent microbien. Ce choix repose sur l'origine du prélèvement et sur les informations de l'examen direct (milieux standards ou milieux sélectifs).

Par exemple pour le **diagnostic biologique des candidoses** :

L'isolement de levures est réalisé par l'ensemencement sur milieu de Sabouraud gélosé avec antibiotiques à 25°C et/ou 37°C. Le diagnostic de genre et d'espèce est effectué à partir des colonies qui poussent en 24 à 48 heures.

✓ ***Identification de Candida albicans :***

Les colonies de *Candida albicans* apparaissent colorées sur certains milieux sélectifs contenant un substrat chromogène (ID-2®, Candi-select®, Chrom Agar *Candida*®), mettant ainsi en évidence *in situ* certaines voies métaboliques caractéristiques de cette espèce (Fricker-Hidalgo 1996).

Il est également possible d'identifier *Candida albicans* par les tests suivants :

• **Test de blastèse :** En trois heures dans du sérum à 37°C, les blastospores de *Candida albicans* émettent des filaments.

• **Test de chlamydosporulation :** l'apparition de chlamydospores après 24h de culture sur milieu PCB (Pomme de terre, Carotte, Bile) ou sur milieu RAT (Riz, Agar, Tween).

✓ ***Identification des autres espèces :***

• **Tests morphologiques en RAT ou PCB :** Certaines espèces émettent des pseudofilaments en culture sur milieu PCB (pomme de terre, carotte, bile) ou sur milieu RAT (riz, agar, Tween) alors que d'autres espèces, telle que *Candida glabrata,* ne filamentent pas.

• **Tests biochimiques :**

♦ L'étude par auxanogramme (étude de l'assimilation des sucres) ou par zymogramme (étude de la fermentation des sucres) permet de mettre en évidence un profil caractéristique d'espèce. Il existe dans le commerce des galeries utilisant ces propriétés. Citons Auxacolor® (Biorad) qui étudie l'assimilation de 13 sucres et permet d'identifier 25 différentes espèces de levures. La galerie ID32C® (BioMérieux) étudie l'assimilation de 29 sucres et permet le diagnostic de 63 espèces de levures.

♦ La sensibilité à l'actidione est variable selon l'espèce. Il s'agit d'un test utilisé dans de nombreuses galeries d'identification. *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* sont sensibles à l'actidione alors que *Candida albicans* est résistant.

♦ Reduction des sels de tétrazolium : Certaines levures sont capables de réduire les sels de tétrazolium et de les transformer en un composé coloré. Ce test est incorporé dans les galeries d'identification et permet surtout de

différencier *Candida albicans* de *Candida tropicalis*, ce dernier ayant une forte capacité de réduction.

- Détection d'enzymes : par exemple la tréhalase chez *Candida glabrata* : (test Glabrata R.T.T) (R.T.T. = Rapid Tréhalose Test) (Freydiere 2004 ; Willinger 2005).

Les tests biochimiques et d'assimilation sont désormais miniaturisés (galeries d'identification) et regroupés en batteries dans des systèmes automatisés. Elles utilisent le même principe que les techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des microorganismes. Elles se présentent sous forme de cupules prêtes à l'emploi contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques. Selon le type de galeries, l'inoculum et le milieu de suspension varient. Pour *Candida,* les galeries de type API 20C par exemple sont utilisées (Fricker-Hidalgo 1996).

Actuellement plusieurs dizaines de tests ont été réalisés par des automates (Vitek® I et II de BioMérieux, AutoSCAN® et WalkAway® de Dade Behring) qui regroupent jusqu'à 47 tests différents pour le Vitek® II. La détection du caractère positif d'une réaction s'est affinée avec l'utilisation de substrats fluorescents et la lecture peut s'effectuer en 2-3 heures (MicroSCAN®) à 4 heures (Vitek®). Les méthodes phénotypiques, et notamment les systèmes automatisés, sont éprouvés et performants pour l'identification d'un grand nombre d'espèces. Cependant, ces performances sont plus limitées pour l'identification de certaines souches.

D'une manière générale, le taux d'erreur des galeries varierait entre 5 et 20% selon les galeries considérées, comprenant les identifications incorrectes (1-15%) ou les identifications non concluantes (3-5%). Les systèmes d'identification commercialisés sont des systèmes fermés avec des bases de données limitées et leurs mises à jour si elles sont possibles, ne peuvent se faire que par le fabricant de la galerie. De plus, les nouvelles espèces ne sont pas prises en compte. Une espèce absente du thésaurus des galeries d'identification ne sera pas reconnue mais un ou plusieurs noms seront proposés. C'est la connaissance de la présomption d'espèce et des limites de la galerie qui permet de rectifier l'erreur d'identification.

Les méthodes non conventionnelles

Les méthodes dites non conventionnelles comprennent les méthodes de diagnostic moléculaire et l'identification antigénique à base d'anticorps monoclonaux.

Les méthodes antigéniques ou immunologiques sont basées sur la réaction d'un anticorps spécifique vis à vis d'un antigène soit du corps microbien soit un antigène soluble ou d'une toxine secrétée.

Ces méthodes ont l'avantage d'être rapides et spécifiques, mais peuvent manquer de sensibilité. Dans certains cas, on peut les associer à d'autres méthodes comme les méthodes génotypiques afin d'augmenter cette sensibilité. Il faut noter également que ces techniques sont globalement coûteuses. Malgré cela, l'identification antigénique des microorganismes a prouvé son utilité et plusieurs systèmes permettant le diagnostic au niveau de l'espèce sont commercialisés. On peut citer la technique d'agglutination sur latex (Bichrolatex *Albicans*® Fumouze). Le principe du test au latex repose sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement l'antigène de paroi de *Candida albicans*.

L'avènement de la biologie moléculaire a permis une approche génotypique complémentaire pour l'identification des microorganismes (Steffan 1997; Petti 2005; Rossetti 2005; Petti 2007).

Ces techniques permettent l'analyse à partir d'échantillons cliniques ou de colonies isolées sur milieux de culture et reposent sur la mise en évidence de séquences nucléotidiques spécifiques. Elles rassemblent des méthodes sans amplification de la cible (utilisation des sondes nucléiques marquées) ou au contraire avec amplification de la cible.

Plusieurs méthodes moléculaires sont utilisées :

- Analyse génotypique de l'ADN par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou ribotypage (Mirhendi 2006).
- Analyse par macrorestriction génotypique de l'ADN par champ pulsé (PFGE)
- Amplification aléatoire :

- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) : amplification sélective de fragments de restriction à l'aide des adaptateurs et amorces complémentaires.
- Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) (Howell 1996).

- PCR ciblée sur des séquences répétitives (séquence intergénique) (ERIC-PCR) (Casarez 2007).
- Multilocus SequenceTyping (MLST) : analyse de la variation allélique des gènes (Ahmed 2006).

Globalement, ces techniques souffrent également de limites, à savoir la complexité des protocoles, l'expertise nécessaire pour maîtriser ces systèmes, le manque de rapidité, le coût des réactifs, la nécessaire utilisation de sondes ou de séquences nucléotidiques spécifiques de chaque espèce et la sensibilité aux mutations et aux contaminations éventuelles.

Les méthodes de typage

En plus d'une identification précise et détaillée de l'espèce, le clinicien et l'épidémiologiste ont parfois besoin de savoir si une souche isolée chez un patient est identique à d'autres souches isolées chez d'autres patients ou dans l'environnement hospitalier. Cela permet de déceler avec précision la présence d'une chaîne infectieuse dans un hôpital ou lors d'un contact avec des facteurs de transmission. La mise en évidence d'une telle chaîne infectieuse est réalisable en utilisant une méthode de typage qui permet de comparer les souches d'une même espèce.

Plusieurs critères peuvent être considérés pour l'évaluation des méthodes de typage, les plus importants étant :

***La typabilité* :** la capacité à obtenir un résultat positif, non-ambigu pour chaque souche, les souches non typables étant celles dont le typage ne donne pas de résultat ou un résultat ininterprétable.

La reproductibilité : la capacité de la méthode à donner le même résultat lorsque la même souche est testée plusieurs fois. Ce critère peut être affecté par des variations des résultats d'un jour à l'autre ou par des variations dans la stabilité des caractéristiques de la souche étudiée.

Le pouvoir discriminant : la capacité à différencier différentes souches non apparentées. Plus le pouvoir discriminant augmente, plus la méthode est capable, par définition, de détecter des variations minimes ou moins fréquentes.

Un système idéal de typage devrait être standardisé, applicable à divers microorganismes, rapide, facilement disponible et peu coûteux. Malheureusement, il n'existe pas de méthode de typage idéale, et il faudra avoir recours dans certains cas à plusieurs méthodes.

Actuellement, les méthodes de typage qui répondent mieux à ces critères reposent principalement sur des tests génotypiques qui se basent sur des caractères de l'ADN pour comparer et identifier les souches.

Parmi les techniques moléculaires qui ont été appliquées pour le typage de levures du genre *Candida,* on peut citer :

- RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA-analysis), RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Howell 1996; Steffan 1997)
- PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) (Vazquez 1991; Khattak 1992)
- MME (multilocus enzyme electrophoresis) (Sanson 2000)
- DNA sequencing microsatellite marker analysis (Foulet 2005)
- MLST (Multilocus sequence typing) (Dodgson 2003).

Il n'existe donc pas de démarche unique, mais plutôt une hiérarchisation des tests dont le choix repose sur la présomption diagnostique *a priori*. Le microbiologiste dispose d'un grand nombre de techniques qu'il doit combiner en fonction des résultats et de son expérience. En raison de cette diversité même, aucun laboratoire ne peut pratiquer toutes ces techniques d'identification (compétences, coût, standardisation…).
Il n'y a donc pas de démarche universelle. Ces constatations ont motivé le développement de plusieurs méthodes alternatives, dont l'utilisation de techniques physicochimiques. Parmi ces méthodes, on peut citer la chromatographie en phase gazeuse(CPG), liquide à haute performance (HPLC) mais également des techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie de masse ainsi que les spectroscopies optiques et moléculaires comme la fluorescence, la spectroscopie d'absorption vibrationnelle Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) et la spectroscopie de diffusion Raman.

5.3 Classification des microorganismes

Pour mieux appréhender la classification, il est important de comprendre la notion de ces trois termes :
La phylogénie : est le processus par lequel les lignées des organismes ont évolué à partir d'un ancêtre commun.
La taxonomie : est une science qui a pour objet la classification des êtres vivants, leur identification et leur nomenclature. Elle permet de classer les organismes en groupes d'affinité ou taxons.

La classification : est l'arrangement des organismes en groupes ou taxons selon leur similitude ou leur parenté évolutive. Elle a pour but l'attribution d'une identité à un objet vivant. Cette attribution permet de résumer l'ensemble des propriétés assignées à un groupe d'individus de façon à prédire les propriétés d'un nouveau membre du groupe sans être obligé de l'explorer totalement.

En résumé, l'assignation d'un microorganisme à un taxon permet d'en déduire les caractéristiques écologiques, épidémiologiques, voire thérapeutiques, que possède ce taxon. La classification est donc un préalable à l'identification. Cette identification consiste à placer un individu particulier dans un taxon connu. La souche inconnue est comparée à des espèces déjà décrites (souches types) et le nom de l'espèce la plus proche est proposé.

La définition actuelle de l'identification ne considére plus la comparaison de propriétés biochimiques mais prend en compte l'identification globale de l'ADN avec une homologie supérieure à 70%.

L'espèce

Une espèce se définit comme un ensemble de souches ayant en commun de nombreuses propriétés stables et étant différente de façon significative des autres groupes de souches. Les espèces présentant des propriétés communes sont regroupées dans une catégorie supérieure, le genre.

Une espèce est définie phylogénétiquement comme le rassemblement des souches ayant des relations ADN-ADN avec des valeurs d'hybridation > à 70%.

Mais il reste nécessaire de disposer de caractères phénotypiques (et/ou génomiques) fiables et faciles à mettre en évidence pour identifier une espèce.

La souche

Une souche est une population de microorganimes descendant d'une espèce unique ou d'un isolat de culture pure. Au sein d'une même espèce, les souches peuvent présenter de légères différences entre elles qui pourront être caractérisées sur la base :

- de leurs propriétés biochimiques ou physiologiques pour les biovars.
- de leurs propriétés antigéniques pour les sérovars.
- de leur facteur de virulence pour les pathovars.

Parmi les types de classification proposée actuellement on peut citer :

Classification phénotypique

L'identification de l'espèce repose sur la comparaison de divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis à vis de ceux d'une souche de référence. La classification phénétique ou phénotypique utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la mise en évidence d'un caractère biochimique et l'habitat. Mais elle ne reflète qu'un nombre réduit d'informations, les caractères considérés comme importants sont subjectifs et dépendent des conditions environnementales.

Classification numérique

Elle évalue une similitude générale en comparant de nombreuses caractéristiques ayant chacune le même poids (morphologique, physiologique et biochimique). La forme d'utilisation des propriétés biochimiques permet leur analyse numérique.

L'existence de quelques caractères atypiques n'est ainsi pas un obstacle à l'identification, car la méthode calcule les similitudes entre les individus et regroupe ceux qui se ressemblent. Le nombre de caractères étudié varie entre 50 et 200. Le résultat est codé de façon binaire pour chaque test (0 ou 1). La comparaison de *n* souches sur *t* caractères fournit donc une matrice à *n* lignes et *t* colonnes qui peut être analysée.

L'établissement de la structure taxonomique se fait à l'aide de dendrogrammes (analyse en clusters) qui évaluent la ressemblance entre les souches en calculant un indice numérique (coefficient de simple appariemment et coefficient de Jaccard).

Classification moléculaire

La classification moderne des microorganismes est basée sur l'analyse des acides nucléiques. Elle permet une approche phylogénétique plus précise. Elle est possible depuis le développement des méthodes génétiques.

Parmi celle-ci on trouve la classification basé sur :

- L'évaluation de la taille du génome
- La mesure du pourcentage des bases C et G (GC%)
- L'hybridation ADN/ADN et ADN/ARNr
- L'étude des ARNr…

Après cette description des méthodes microbiologiques utilisées dans la classification, l'identification et le typage, il est clair qu'il n'existe pas une méthodologie de conduite universelle pour ce genre d'étude, mais plutôt la combinaison de nombreuses méthodes basées

parfois sur des techniques discriminantes mais souvent complexes ou bien sur des techniques simples mais peu discriminantes.

Pour résoudre ce problème, plusieurs méthodes physico-chimiques ont été développées par les biophysiciens. Les spectroscopies IRTF présentent l'intérêt majeur d'informer sur la totalité des composants d'un échantillon. Dans le cas de l'étude des microorganismes, le contenu génomique et son expression phénotypique sont pris en compte dans l'information restituée par le spectre IRTF vibrationnel.

5.4 Identification et typage par spectroscopie IRTF

La spectroscopie IRTF possède une sensibilité suffisamment importante pour détecter de subtiles modifications de composants cellulaires tels que les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides pariétaux, les protéoglycanes, les lipopolysaccharides et les phospholipides. Des souches appartenant à la même espèce peuvent donc présenter des signatures spectrales différentes. Des méthodes d'analyse spectrale suffisamment fines permettent de différencier des souches non-apparentées grâce à leur spectre. Le pouvoir discriminant de la spectroscopie IRTF va donc au delà de la séparation d'espèces et permet une séparation infraspécifique (Sockalingum 1998).

La capacité de la spectroscopie IRTF à séparer différents niveaux taxonomiques (sous-espèces, sérotype et souche) a été explorée pour plusieurs espèces bactériennes et fongiques impliquées en pathologie humaine ou animale (Rebuffo-Scheer 2007a; Rebuffo-Scheer 2007b).

Actuellement la spectroscopie IRTF est utilisée pour clarifier la position taxonomique d'isolats et pour discuter l'existence d'espèces ou de sous-espèces en comparant les souches types. (Huu 1999; Stan-Lotter 1999; Tindall 2000; Amiel 2001).
La capacité de la spectroscopie IRTF à mesurer des relations de parentés entre souches a été discutée par Kümmerle et coll. au niveau de l'espèce et par Oberreuter et coll. à un niveau infraspécifique (Kummerle 1998; Oberreuter 2002).

Bactériologie

Parmi les applications de spectroscopie IRTF dans le domaine de l'identification et la taxonomie on peut citer également le travail de Helm et coll. (Helm 1991a; Helm 1991b) qui ont rapporté la classification de souches de *E. coli* appartenant à 3 sérotypes différents (O18, O25, O118). Vingt trois souches ont été classées en fonction de la structure de leur antigène O grâce aux informations contenues dans la région des sucres (900-1200cm^{-1}) et de l'empreinte (700-900cm^{-1}).

Beer et coll.(Beer 2000) ont montré que la spectroscopie IRTF peut différencier des *E. coli* entérohémorragiques appartenant à 3 sérotypes, O26, O103:H2 et O157:H7. Ces différents sérotypes ont été caractérisés par des différences dans la région spectrale 1000-1045 cm^{-1}.

Irudayaraj et coll. ont montré que la spectroscopie IRTF a été utilisée pour détecter et identifier une souche de *E. coli* pathogène possédant le sérotype O157:H7 directement sur la peau d'un fruit (Irudayaraj 2002).

Seltmann et coll. ont appliqué la spectroscopie IRTF en conjonction avec d'autres méthodes pour différencier 135 souches de *Salmonella enteriditis*, 49 souches d'*Acinetobacter baumannii* et 66 souches de *Serratia narcescens* (Seltmann 1994; Seltmann 1995; Irmscher 1999).

Des études récentes confirment la capacité de la spectroscopie IRTF comme outil performant de classification et de différenciation des microorganismes. On peut citer l'étude de Karadenizli et coll. qui montre la possibilité de différencier entre deux espèces de *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) par spectroscopie IRTF (Karadenizli 2007) et l'étude de Al-Holy et coll. qui montre l'applicabilité de la spectroscopie IRTF pour la différenciation des souches d'*Escherichia coli* O157:H7 des autres souches bactériennes dans des produits alimentaires (Al-Holy 2006). Récemment Al-Qadiri et coll. ont appliqué cette technique pour la détection et l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Al-Qadiri 2006).

Des études antérieures menées au sein de notre laboratoire ont montré que la spectroscopie IRTF peut différencier des souches isogéniques de *P. aeruginosa* ou des souches de *E. coli* transformées par un plasmide codant pour un gène (Bouhedja 1997; Sockalingum 1997). D'autres études menées par notre équipe on montré que cette technique spectroscopique permet la différenciation au niveau de l'espèce et de la souche (typage) chez les principaux pathogènes (bactéries et levures) impliqués en pathologie humaine.(Sandt 2003; Sandt 2006)

Récemment en bactériologie, Amiali et coll ont utilisé la spectroscopie IRTF dans une étude épidémiologique pour le typage de souches *S. aureus* résistantes à la méticilline (Amiali 2007)

Mycologie

Les levures du genre *Candida* sont largement majoritaires en pathologie humaine. *Candida albicans* représente à lui seul de 50 à 70% des levures isolées (Pfaller 2004) mais les infections à *Candida* non-*albicans* sont en nette progression (Hazen 1995). [*Candida tropicalis* (25%), *Candida parapsilosis* (7-12%), *Candida glabrata* (8-10%), *Candida krusei* et *Candida lusitaniae* (4%)] (Fricker-Hidalgo 1996). Ces espèces de levures étant différentes les unes des autres par leur composition biochimique, quantitativement et qualitativement, chaque spectre IR est caractéristique d'une espèce et d'une souche. Il est dès lors possible de classer des souches et de les identifier en fonction de leurs profils spectraux. Des études préalables ont déjà démontré les performances de cette technique pour l'identification, la classification et la caractérisation de ces espèces, notamment dans notre laboratoire (Bouhedja 1997; Sockalingum 1997; Galichet 2001; Kirschner 2001; Sockalingum 2002 ; Sandt 2003).

Timmins et coll. ont montré que la spectroscopie IRTF peut différencier entre 3 espèces apparentées de *Candida* : *C. albicans, C. dubliniensis, C. stellatoidea* (Timmins 1998a; Timmins 1998b). Tintelnot et coll.(Tintelnot 2000) ont montré que la différenciation entre *C. albicans* et *C. dubliniensis*, difficile par les méthodes conventionnelles, est aussi fiable par spectroscopie IRTF que par la méthode de séquençage du gène de l'ARNr 26S.
En mycologie médicale la spectroscopie IRTF a été utilisée également pour différencier 40 souches de levures (Czaika 2000), 3 souches de dermatophytes responsables d'infections (Bastert 1999) et pour identifier des levures du genre *Cryptococcus* (Schmalreck 2000).

Depuis ces dernières années, on assiste à une augmentation considérable des applications de la spectroscopie IRTF dans le domaine du typage. Cette méthode présente un champ d'investigation important et regroupe à la fois la simplicité et un grand pouvoir discriminant. Parmi les applications, on peut citer le travail de Schmalreck et coll. réalisé pour le suivi mycologique de 22 enfants à risque en service de réanimation pédiatrique. Cent cinquante isolats de *C. albicans* ont été étudiés par spectroscopie IRTF. Les résultats de l'analyse spectroscopique ont permis de déterminer que 86% des enfants avaient été colonisés par 2 à 4 souches et que des contaminations croisées avaient eu lieu. Au cours de cette étude,

des souches d'*Exophiala dermatitidis* (n=31) collectées pendant 3 ans ont pu être groupées par patient (n=8) et suivies au cours des années. Une contamination croisée a pu être mise en évidence (Schmalreck 1998). Dans notre laboratoire, nous avons utilisé la spectroscopie IRTF pour la comparaison de souches de *Candida albicans* lors d'une épidémie de candidose oropharyngée chez des nouveaux nés. Les résultats obtenus par la spectroscopie ont été comparés par une technique de biologie moléculaire basée sur la RAPD et dans une contamination inter humaine a été confirmée (Sandt 2002).

D'après ces exemples d'applications, la spectroscopie IRTF présente un pouvoir de discrimination égal, voire supérieur à celui des techniques utilisées comme contrôle avec l'avantage qu'elle nécessite un travail moins laborieux. Il semble donc que la spectroscopie IRTF soit capable de différencier entre souches ou entre espèces différentes avec une grande sensibilité mais il faut noter que la distance spectrale n'est pas corrélée avec la mesure de la parenté obtenue par les méthodes conventionnelles en taxonomie numérique ou par les méthodes génétiques qui font encore référence.

5.5 Le spectre IRTF des échantillons microbiens

Pour comprendre une grande partie des spectres infrarouge des échantillons microbiens, et l'attribution des bandes au niveau de ces spectres, il faut commencer tout d'abord par la compréhension et l'analyse des structures moléculaires qui existe chez ces microorganismes.

Tous les microorganismes qui peuvent être obtenus en culture pure peuvent être étudiés par spectroscopie IRTF. Les microorganismes unicellulaires appartenant aux règnes Eukaryota, Prokaryota et Archeae sont donc susceptibles d'être analysés.

En général, tous les microorganismes sont constitués d'eau, de lipides, d'acides nucléiques, de protéines et d'hydrates de carbone. Comme nous l'avons vu, toutes ces molécules présentent une forte activité dans le domaine infrarouge. Ceci permet de considérer que les spectres IRTF issus des microorganismes comme des empreintes ou des signatures moléculaires qui peuvent être utilisés pour l'identification, la classification ou le typage.

Les spectres IRTF des microorganismes sont complexes et constitués de très nombreuses bandes correspondant à l'ensemble des constituants de la cellule (figure 15). Toutes les bandes ne peuvent être attribuées avec précision, mais certains présentent des absorptions

caractéristiques de composés particuliers (tableau 12) (Naumann 1991a), et la majorité de ces attributions spectrales a pu être réalisée grâce l'analyse des spectres de molécules purifiées. (Legal 1991; Verdel-zeroual 1994; Grube 1999).

En effet quelques bandes importantes du spectre des microorganismes n'ont cependant toujours pas été attribuées, particulièrement dans le domaine des faibles nombres d'onde entre 900 et 600 cm^{-1}. Certaines absorptions étant caractéristiques des acides nucléiques, l'information obtenue a parfois été décrite comme étant à la fois génotypique et phénotypique (Quinteiro 2000).

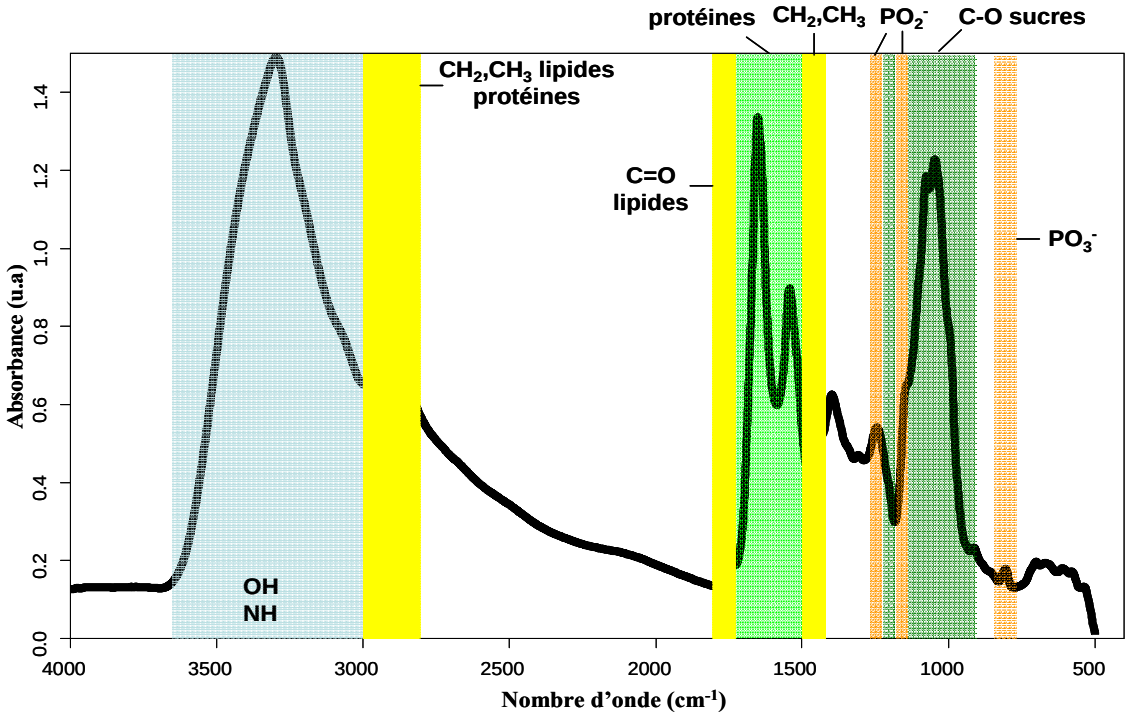


Figure 15 : Spectres IRTF représentatif d'un microorganisme (*Candida albicans*) avec l'attribution des principaux pics d'absorption

Fréquence (cm^{-1})	Attribution	Fréquence (cm^{-1})	Attribution
3250-3800	ν (O-H)	1460-1470	δ (C-H) de CH_3 épaulement
3200-3400	ν (N-H) amide A des protéines	1440-1460	δ (C-H) de CH_2
3090-3100	ν (N-H) amide B des protéines	1400	ν_{as} (C=O) de COO^-
2950-2960	ν_{as} (C-H) de CH_3	1240-1310	Amide III
2920-2935	ν_{as} (C-H) de CH_2	1220-1250	ν_{as} (P=O) de PO_2
2865-2880	ν (C-H) de CH_3	1150-1170	ν (C-O-C) des esters
2840-2860	ν (C-H) de CH_2	1120	ν (C-O) des riboses
1720-1750	ν (C=O) esters des lipides	1080-1085	ν (C-O-C), ν (P=O) acides nucléiques et glycogène
1715	ν (C=O) esters des acides nucléiques	1050-1070	ν (C-O) glycogène
1625-1695	Amide I	1024	ν (C-O) glycogène
1525-1560	Amide II	968	ν (C-C/C-O) des phosphates et des acides nucléiques
1515	Tyrosine (en dérivée 2nde)	900-600	Région « fingerprint »

Tableau 12 : Attribution des bandes pour les spectres IRTF des échantillons microbiens. Adapté de (Naumann 1991b)

Les microorganismes procaryotes sont représentés essentiellement par les bactéries. Ces dernières sont composées en grande partie de protéines (50-60% de la masse sèche), de polysaccharides (10-20%), de lipides (10-15%) et d'acides nucléiques ARN (5-20%) ou ADN (2-4%).

Les microorganismes eucaryotes, levures et champignons filamenteux, possèdent un matériel génétique condensé sous forme de chromosomes et compartimenté dans un noyau. Les levures sont composées de protéines (40-50% de la masse sèche), de polysaccharides (10-25%), de lipides (5-20%), d'acides nucléiques (ADN 1-3% et ARN 3-10%).

Les levures et les bactéries présentent des profils spectraux aisément différentiables (figure 16).

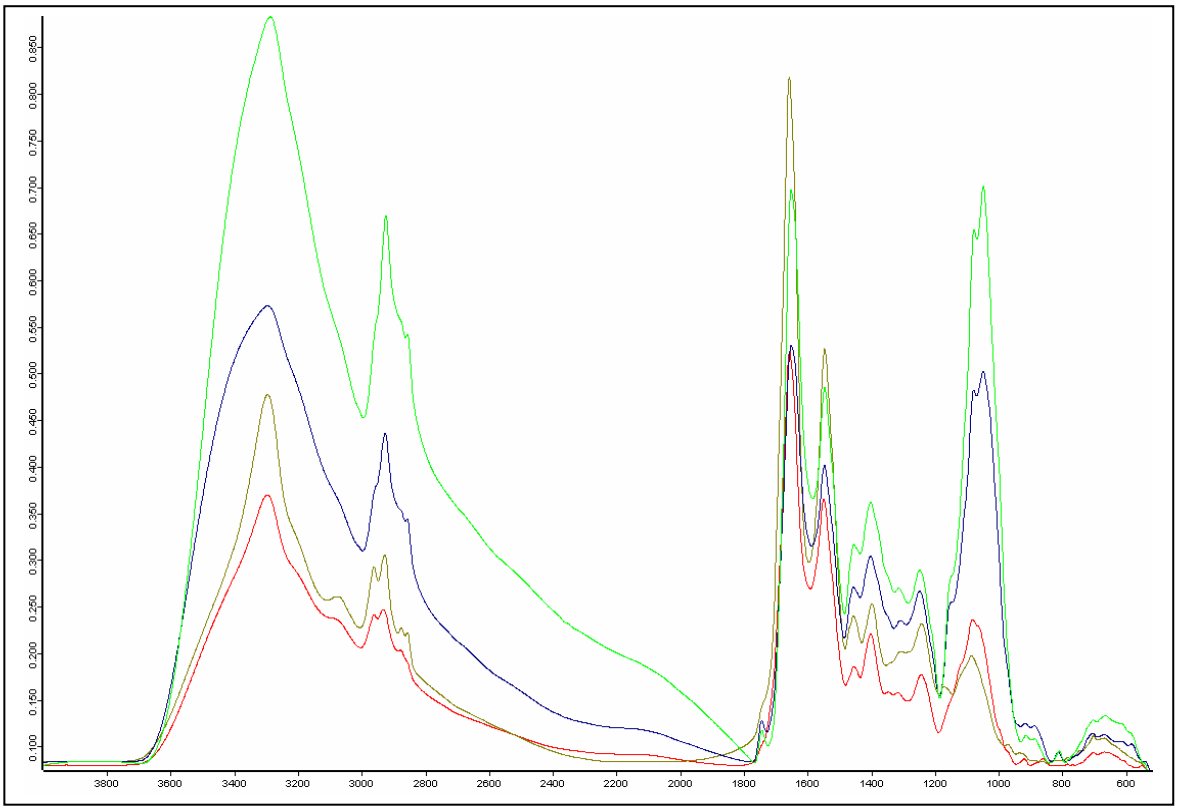


Figure 16 : Comparaison entre spectre IRTF de bactéries et de levures. *E. coli* (rouge), *E. feacalis* (marron), *C. albicans* (bleu) et *C. parapsilosis* (vert)

Le spectre IRTF des microorganismes peut être divisé en plusieurs régions dominées par des bandes d'absorption de macromolécules particulières :

- Le massif intense centré vers 3400 cm^{-1} est du aux vibrations ν (O-H), ce qui masque les bandes ν (N-H) des protéines.
- La région comprise entre 3100 et 2800 cm^{-1} est dominée par les vibrations d'élongation des liaisons C-H des groupements CH_3, CH_2 et CH essentiellement retrouvées dans les acides gras et les protéines des différentes membranes leurs vibrations de déformation donnent des bandes plus faibles vers 1450 cm^{-1}. Généralement pour les microorganismes on note une forte contribution des lipides entre 1400-1480 cm^{-1} et 2800-3000 cm^{-1} (Naumann 1988a; Naumann 1988b; Schultz 1991; Lang 1998).
- La région 1700-1500 cm^{-1} est dominée par deux bandes très intenses correspondant à l'absorption des groupements amides I et II qui fournissent une information à la fois

quantitative et qualitative sur le contenu protéique de la cellule. En raison de la présence de plus de 1000 types différents de protéines dans la cellule, il est extrêmement difficile de corréler les modifications de ces bandes avec l'expression ou l'activité d'une protéine particulière. Les données recueillies sont généralement interprétées en termes de remaniement global du protéome, notamment de la conformation des protéines exprimées (Oliver 1998).

- Le domaine spectral compris entre 1480 et 1200 cm^{-1} est appelé région mixte car aucune espèce moléculaire ne génère de contribution dominante à l'absorbance. Dans cette région, les bandes sont formées par la superposition des absorptions des liaisons C-H des protéines, lipides, polysaccharides et acides nucléiques, de la vibration amide III des protéines avec la vibration d'élongation antisymétrique des P=O des phosphodiesters des acides nucléiques et des sucres. Il est néanmoins possible de corréler l'absorbance à certaines fréquences avec l'expression de composés biochimiques précis en utilisant des méthodes d'analyse biomoléculaire complémentaires (Michell 1970; Helm 1995; Cheung 1999; Goodacre 2000)
- La région 1250-1200 cm^{-1} est dominée par les bandes d'absorption dues aux vibrations d'élongation asymétriques des différentes doubles liaisons P=O des groupements phosphodiesters retrouvés dans les structures polysaccharidiques des acides nucléiques, ainsi qu'aux phospholipides et aux groupements phosphoriques des polysaccharides tels que les acides teichoiques et lipoteichoiques des bactéries à coloration de Gram positive.
- L'incroyable diversité des polysaccharides qui composent la paroi, explique la complexité de la région spectrale comprise entre 900 et 1200 cm^{-1} avec des bandes qui résultent essentiellement des vibrations d'élongation C-O-C et C-O-P des oligo- et polysaccharides. Selon Naumann et coll., cette région du spectre est l'une des plus sensibles et des plus sélectives pour la différenciation de microorganismes (Naumann 1991b).
- La région entre 900 et 600 cm^{-1} présente de nombreuses bandes très faibles, mais très caractéristiques des souches et qui demeurent difficiles à attribuer du fait de leur superposition. Cette région a été qualifiée de région d'"empreinte" (Naumann 1991b). Généralement cette région contient les absorptions des modes de vibration des liaisons du squelette des macromolécules. L'attribution précise des bandes n'a toutefois pas été réalisée. (Tableau 12)

5.6 Modes de mesures et applications en microbiologie

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour la caractérisation d'échantillons microbiologiques par spectroscopie infrarouge avec l'emploi d'accessoires spécifiques à chaque mode de mesures.

Les mesures en transmission sont généralement obtenues à partir de suspensions cellulaires déposées sur un support transparent en infrarouge (ZnSe, CaF2, BaF2, ZnS, KRS-5) et desséché selon un protocole rigoureux pour obtenir un film mince et transparent en infrarouge. En transmission, l'absorbance doit être maintenue dans les limites de validité de la loi de Beer-Lambert (entre 0,3 et 1,3 pour des études de quantification), le rapport signal/bruit doit être suffisant et les propriétés de transmission de l'échantillon doivent être bonnes (la diffraction et la diffusion doivent être limitées).

Naumann et *coll*. ont mis au point un protocole visant à enregistrer les spectres de 15 échantillons dans les mêmes conditions en mode transmission (Naumann 2000). Gràce au développement de passeurs d'échantillons de capacités de plus en plus importantes, l'acquisition de plusieurs dizaines de spectres dans des conditions très similaires est devenue possible.

Actuellement il existe des modules de mesures à haut débit qui sont équipés de plaques de 96, 384 ou 1536 puits (figure 17), ce qui permet d'acquérir des spectres de plusieurs échantillons en une seule manipulation, d'où un gain de temps très important et une meilleure reproductibilité.

Figure 17 : Plaque multi-puits

Les mesures en réflexion totale atténuée (ATR) sont aussi possibles pour des échantillons de nature biologique. Les mesures en ATR sont effectuées en déposant l'échantillon sur un support dont l'indice de réfraction est élevé (ZnSe, diamant…) et le faisceau traverse deux fois l'échantillon. La réflexion interne des supports utilisés dans ce mode de mesure permet d'enregistrer des spectres sur une profondeur très limitée. (Goodacre 1996; Goodacre 1998; Lang 1998; Timmins 1998a; Timmins 1998b; Goodacre 2000). En relation avec ce type de mesure, des dispositifs expérimentaux ont été développés pour suivre la croissance d'échantillons microbiens dans des conditions précises. (Vrany 1997; Suci 1998; Cheung 1999; Gue 2001; Nivens 2001; Suci 2001).

Les mesures en microspectroscopie fournissent l'opportunité d'enregistrer le spectre IRTF de micro-échantillons, de différencier l'information spatialement et d'associer une information de position à l'information de composition chimique. Les avantages de cette technique sur la spectroscopie conventionnelle ont conduit à de nouvelles applications dans le domaine de la microbiologie. En effet, la microspectroscopie IRTF a été utilisée pour enregistrer les spectres de microcolonies de quelques centaines de cellules après quelques heures de culture, l'étape d'enrichissement de la culture n'est donc plus nécessaire. La résolution spatiale atteinte permet l'analyse de différentes microcolonies sur une même boîte

de culture permettant d'éliminer la culture d'isolement. Ces avantages peuvent permettre une identification précoce, en moins d'un jour à partir du prélèvement.

La microspectroscopie permet de cartographier une colonie (Ngo Thi 2000; Choo-Smith 2001) et de détecter des changements métaboliques entre les différentes parties de la colonie (Ngo Thi 2000; Orsini 2000; Choo-Smith 2001). Orsini et coll. ont montré que les cellules en périphérie de colonies de *C. albicans* sont plus actives que les cellules du centre. Des différences entre le centre et la périphérie de microcolonies de *E. coli* ont également été détectées par microspectroscopie IRTF tandis que des différences entre le sommet et le bas de la colonie ont été observées en microspectroscopie Raman (Choo-Smith 2001).

En microspectroscopie IRTF, les différences au sein de la même microcolonie (diamètre de quelques centaines de microns) sont insuffisantes pour perturber l'identification au niveau de l'espèce.(Ngo Thi 2000; Choo-Smith 2001).

En 2002, Wenning et coll. ont montré que la microspectroscopie permettait d'identifier 63 souches environnementales de levures appartenant à 13 espèces et 9 genres avec plus de 90% de succès (Wenning 2002). Maquelin et coll. ont réalisé une étude en prospective clinique pour déterminer l'efficacité des microspectroscopies IRTF et Raman lors de l'identification d'agents pathogènes isolés à partir d'hémocultures. La microspectroscopie IRTF pouvait identifier correctement 119 souches sur 121 en 6 à 10h (Maquelin 2002; Maquelin 2003).

La microspectroscopie IRTF présente en outre un intérêt pour l'identification des microorganismes à croissance lente comme les mycobactéries ou *Clostridium difficile* qui requièrent plusieurs semaines à plusieurs mois de culture pour donner une biomasse suffisante pour une identification par une technique conventionnelle.

Les spectres des microorganismes présentent beaucoup de caractéristiques communes. Certaines différences sont observables directement, mais leur utilisation pour discriminer et identifier les microorganismes étudiés nécessite des traitements statistiques des données spectrales permettant la comparaison des spectres entre eux. Dans ce but et à l'aide des logiciels spécifiques d'analyses spectrales, des banques de spectres peuvent être créées.

Kümmerle et coll. ont réalisé une base de données comprenant les spectres IRTF de 332 souches (11 genres et 36 espèces) de levures d'origine alimentaire provenant de collections. Sept cent vingt deux nouvelles souches ont été utilisées pour tester cette base de données (Kummerle 1998). 97,5% des souches inconnues ont été correctement identifiées par cette méthode.

La constitution de base de données spectrale représentative des échantillons microbiens a également été effectuée dans le domaine de l'environnement. Récemment, Boudaud et coll. ont montré que la spectroscopie IRTF est un outil efficace pour identifier et discriminer des souches de bactéries Sulfato-Réductrices (BSR) et Thiosulfato-Réductrices (BTR), impliqués dans les processus de la biocorosion. Les résultats de la classification hiérarchique obtenus à partir des spectres infrarouge montrent une bonne discrimination des BSR et BTR étudiés, à la fois au niveau genre et au niveau de l'espèce. (Boudaud 2005).

MATERIEL ET MÉTHODES

III. MATERIEL ET MÉTHODES

1. La collection des microorganismes

1.1 Souches de levures : collection interne du CHU de Reims

Les levures du genre *Candida* sont responsables de la majorité des mycoses invasives chez l'homme. Dans cette étude, nous avons travaillé essentiellement sur la caractérisation des levures du genre *Candida* et qui ont été isolées et identifiées préalablement au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Reims à l'occasion des prélèvements quotidiens à visée diagnostique.

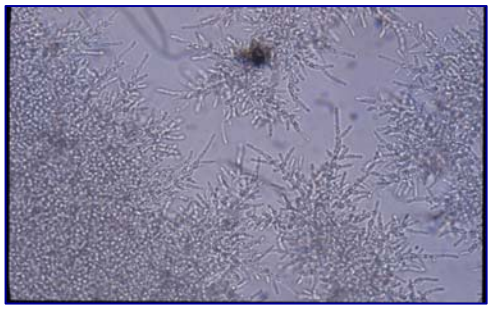
Les levures du genre *Candida* d'origine clinique ont été fournies à partir d'une collection interne, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Dominique Toubas du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Reims où elles ont été identifiées par des méthodes mycologiques conventionnelles.

L'étape d'isolement précède l'identification. Les prélèvements dans lesquels on recherche les levures du genre *Candida* sont ensemencés et incubés 24 à 48 heures. Deux milieux sont utilisés, un milieu Sabouraud contenant un substrat chromogène (*Candida* ID BioMérieux) incubé à 37 °C et un milieu Sabouraud Chloramphénicol incubé à 30 °C .

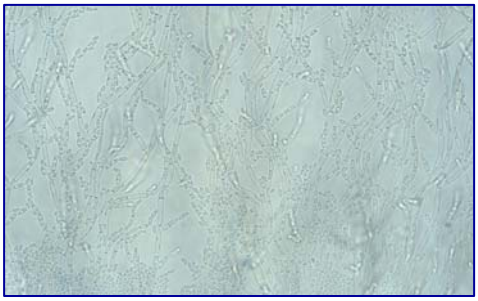
Les méthodes d'identification reposent principalement sur l'utilisation du milieu chromogène, de galeries d'identification associées à l'examen microscopique du milieu PCB. Les colonies bleues sur milieu *Candida* ID identifient directement l'espèce *Candida albicans.* Pour les non-*albicans* (colonies blanches), l'identification est réalisée par inoculation d'une galerie Auxacolor (Biorad) permettant l'étude de l'assimilation des sucres et du milieu PCB (Figure 18). Ces tests conventionnels conduisent à l'identification du genre et de l'espèce.

Les souches de levures du genre *Candida* que nous avons étudiées appartiennent aux 6 espèces majeures en pathologie humaine : *Candida albicans, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida tropicalis, Candida krusei* et *Candida kefyr*. Ces souches ont été isolées chez des patients hospitalisés, à partir de différents sites anatomiques.

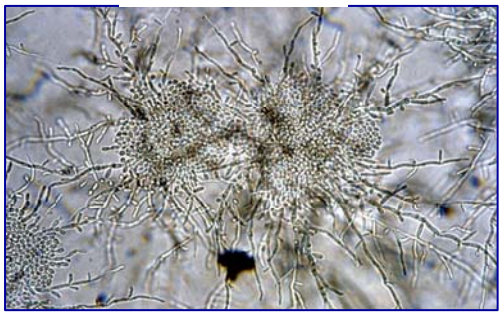
Les espèces et le nombre de souches utilisées dans ce travail sont présentés dans le tableau 13 selon chaque application.



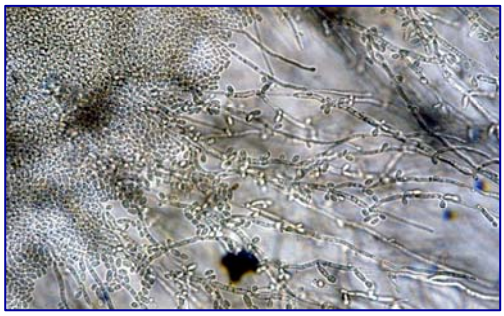
Candida kefyr



Candida krusei



Candida tropicalis



Candida parapsilosis

Figure 18 : Morphologie de *Candida* non-*albicans* en milieu PCB

Espèces	Nombre de souches	Applications
C. albicans *C. glabrata* *C. parapsilosis* *C. tropicalis*	10 10 10 9	**Identification d'espèces :** à partir de suspensions cellulaires et de microcolonies (étape de **mise au point** sur 4 espèces et **39 souches**)
C. albicans *C. glabrata* *C. parapsilosis* *C. tropicalis* *C. krusei* *C. kefyr*	10 10 10 8 10 9	**Identification d'espèces :** à partir de suspensions cellulaires et de microcolonies (identification précoce) (étape de **validation** sur 6 espèces et **57 souches**)
C. glabrata	14 8 13	**Typage des souches de *C. glabrata*** Test à l'aveugle Test de validation Application clinique (4 patients)
C. parapsilosis	14 14	**Typage de souches de *C. parapsilosis*** Test à l'aveugle Test de validation
C. albicans *C. glabrata* *C. parapsilosis* *C. tropicalis* *C. krusei* *C. kefyr*	30 30 30 30 30 30	**Constitution d'une base de données spectrales pour l'identification de 6 espèces de levures du genre *Candida* :** les souches utilisées dans la base de données sont identiques à celles utilisées pour l'identification et le typage ainsi que de nouvelles souches ajoutées pour obtenir une base comportant 30 souches par espèce étudiée

Tableau 13 : Souches de levures étudiées

1.2 Souches de référence

Lors de cette étude, selon l'application, nous avons utilisé des souches de référence interne, pour mieux contrôler les conditions de mesures en (micro)spectroscopie IRTF ainsi que pour l'analyse et la vérification de la reproductibilité des spectres obtenus. Les souches de référence utilisées sont présentées dans le tableau 14 :

Les espèces	Nombre de souches	Désignation	Origine
C. albicans	3	1712 1837 1914	Souches provenant de trois patients différents.
C. glabrata	3	9082 3599 102	Souches provenant de trois patients différents.
C. parapsilosis	2	22019 6579	Souche ATCC Souche clinique

Tableau 14 : Souches de levures utilisées comme référence interne

2. Conservation des souches et conditions de culture

2.1 Mode de conservation

Les souches de levures utilisées dans cette étude ont été conservées suivant deux modes différents :

Le premier consiste à conserver les souches en milieu aqueux (1 ml d'eau distillé stérile) à température ambiante pour une utilisation rapide. Ce mode de conservation ne peut pas excéder 2 mois de conservation. Le deuxième mode, utilisé pour une plus longue préservation, consiste à conserver les souches à -80°C en bouillon Sabouraud glucosé additionné de 10% du glycérol dans des tubes à cryobilles.

2.2 Milieux et conditions de culture

Milieux de culture

Les souches de levures ont été cultivées sur deux milieux :

- Sabouraud-glucose (SAB) : qui est le milieu de base en mycologie et qui permet la croissance des différentes espèces de levures.

- Sabouraud glucose-gentamycine-chloramphénicol (SGC) : qui permet la croissance des levures en inhibant celle des bactéries grâce à la présence de deux antibiotiques.

Ces deux milieux peuvent être utilisés pour des cultures solides sur milieu gélosé en boite de Pétri ou bien pour des cultures liquides en bouillon dans des tubes de 10 ml à 50 ml.

Conditions de culture

Les conditions optimales de croissance des espèces de levures étudiées ont été définies et standardisées au laboratoire (Sandt 2004).

Etant donné la sensibilité de spectroscopie infrarouge, l'étape de préculture et de culture revêt une importance majeure pour la répétabilité et la reproductibilité de la mesure. Pour cela, nous avons vérifié l'influence de plusieurs paramètres de culture sur la reproductibilité des spectres : le temps d'incubation, le milieu de culture, la méthode d'ensemencement et le mode de conservation des souches. D'après ces études, il s'avère que les conditions optimales de la croissance des levures du genre *Candida* et les mieux adaptées pour les mesures en spectroscopie IRTF sont :

- Ensemencement par la méthode d'inondation sur gélose : 150 µL de la suspension sont utilisés pour inonder une gélose SAB ou SGC.
- Température de croissance : les cultures sont réalisées dans un incubateur standard à 37°C sans contrôle de l'humidité ni du taux de CO_2 atmosphérique.
- Temps d'incubation : 24 à 48h selon la vitesse de croissance de chaque espèce et de chaque souche.
- Pour les cultures en milieux liquides en bouillon (SAB ou SGC) : tubes sous agitation de 150 rpm.

Culture des levures

Les précultures

Avant de débuter les cultures destinées aux mesures en spectroscopie IRTF, une préculture est réalisée afin de réduire l'impact du mode de conservation des souches sur la reproductibilité spectrale. Ces précultures sont effectuées soit à partir des cellules conservées en milieu aqueux soit à partir des échantillons congelés à -80°C.

- A partir des cellules conservées en milieu aqueux

Cent-cinquante µl de la suspension cellulaire sont déposés sur une gélose SAB ou SGC. Durée de la culture : 24 ou 48 h à 37°C.

- A partir de souches congelées en tubes à cryobilles

Quelques billes sont prélevées à l'aide d'une œse sont déposées et roulées sur une gélose SAB ou SGC. Durée de la culture : 24 ou 48 h à 37°C.

Vérification de la pureté des souches

Après la réalisation des précultures, leur pureté est systématiquement vérifiée sur milieu SAB après 24h d'incubation à 37°C. L'observation de l'aspect des colonies permet la vérification de la pureté de la souche.

Culture des levures pour la (micro)spectroscopie IRTF

Culture en nappe

Les précultures de 24 à 48 h sur milieu SGC sont utilisées pour prélever une œse de la masse cellulaire. Ces cellules sont ensuite mises en suspension dans 1ml d'eau distillé stérile. Cent-cinquante µl de la suspension cellulaire sont utilisés pour inonder une gélose SGC. Des cultures de 24 h sont ensuite réalisées pour les mesures en spectroscopie IRTF.

Culture en microcolonies

L'obtention de microcolonies pour les mesures en microspectroscopie IRTF se fait de la manière suivante :

A l'aide d'une œse, on recueille les levures à partir de la préculture afin de réaliser une suspension dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant 0,9 ml d'eau distillé stérile. Après une dilution en cascade au dix millième (1/10000), 150 µl de cette dilution sont prélevés pour ensemencer une culture sur gélose SGC par étalement à l'aide de billes stériles. Pour les microcolonies, il faut utiliser des boites de Pétri de 90mm de diamètre afin de pouvoir effectuer plusieurs empreintes sur la même boite de culture.

Les boites sont ensuite incubées à 37°C de façon à obtenir des microcolonies de taille comprise entre 50 et 250 µm de diamètre (durée variable de 12 à 18 heures selon la vitesse de

croissance de chaque espèce). Cette taille permet d'avoir des spectres IR de bonne qualité avec un bon rapport signal/bruit.

3. Méthodes d'analyse en spectroscopie IRTF

3.1 Préparation des levures pour la spectroscopie IRTF : Mesures sur suspensions déshydratées

Après 24 heures de culture sur milieu SGC à 37°C, les levures sont prélevées à l'aide d'une oese et mise en suspension dans 1 ml d'eau distillé stérile. Cette suspension est ajustée à une densité optique (DO) $_{500\ nm}$ de 3±0,1 à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible (Uvikon ; Kontron Instruments, Thiais, France). Trente cinq microlitres de cette suspension sont déposés sur chaque position du passeur d'échantillons [Roue en séléniure de zinc (ZnSe) qui est un matériau transparent aux IR] à 15 positions (Figure 19). Cette quantité correspond à environ 10^8 cellules par dépôt pour l'espèce *C. albicans* et à $2{,}9 \times 10^8$ cellules pour *C. glabrata*. Pour chaque souche, on réalise 3 cultures différentes et pour chaque culture 3 dépôts sont effectués. Au total, 9 spectres sont utilisés pour chaque souche afin de vérifier la répétabilité et la reproductibilité des spectres.

Figure 19 : Passeur d'échantillons en ZnSe

Les dépôts sont ensuite déshydratés pendant 20 à 30 min dans une enceinte sous vide modéré en présence d'un agent déssicant pour obtenir à la fin un film cellulaire sec, transparent et d'épaisseur homogène. La déshydratation des dépôts cellulaires est une étape indispensable en spectroscopie IRTF car elle permet de réduire la contribution de l'eau dans les spectres IRTF. Les mesures sont effectuées en mode transmission/absorption.

3.2 Préparation des microcolonies pour la microspectroscopie IRTF

Après la réalisation des cultures en microcolonies pendant 12 à 18 h d'incubation selon les espèces, on obtient des microcolonies isolées sur une gélose SGC. Les mesures en microspectroscopie IRTF sont effectuées en mode transmission/absorption. Il est donc nécessaire de transférer les microcolonies sur un support transparent en IR. Les supports utilisés dans notre étude sont en séléniure de zinc (ZnSe) ou en fluorure de calcium (CaF_2), d'une dimension de 13 mm de diamètre sur 2 mm d'épaisseur) Figure (20 A).

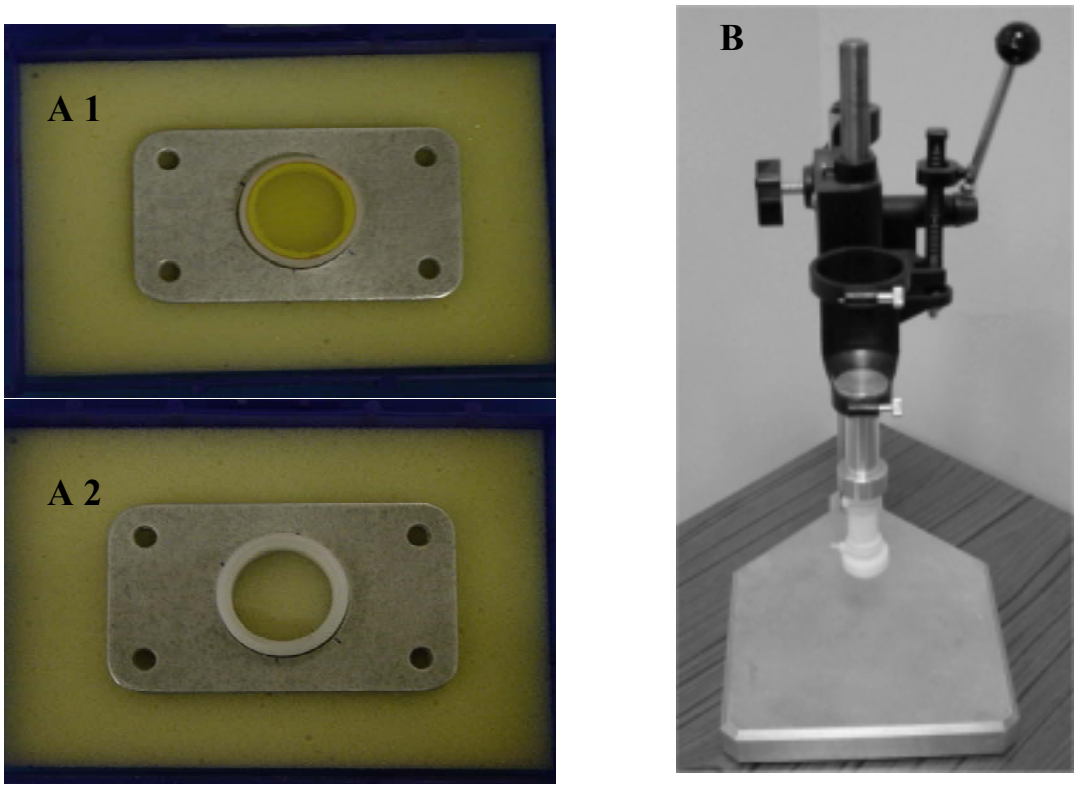


Figure 20 A. Fenêtre de ZnSe (1) et de CaF2 (2).
B. Presse utilisée pour réaliser le transfert des microcolonies sur les supports

Les empreintes des microcolonies sont obtenues en pressant délicatement la fenêtre sur la surface de la gélose au moyen d'une presse à main Figure (20 B). La fenêtre doit être retirée soigneusement de la surface des géloses afin d'éviter les traces du milieu et de garder les microcolonies intactes. Cette étape est importante car les empreintes des microcolonies ne doivent pas être trop déformées, ce qui entraînerait des spectres inexploitables.

Il faut aussi noter qu'une empreinte contient plusieurs microcolonies avec des diamètres différents. La taille des empreintes est mesurée par microscopie optique. Les microcolonies les moins déformées et qui présentent des diamètres compris entre 50 et 250 µm sont choisies pour la mesure IRTF (Figure 21).

La zone étudiée en microspectroscopie IRTF est ajustée au diamètre exact de la microcolonie grâce aux différentes ouvertures existant sur le microscope IR. Pour chaque souche, on mesure 5 microcolonies de la même culture. Cinq cultures différentes sont réalisées. Au total, 25 spectres pour chaque souche sont utilisés pour vérifier la répétabilité et la reproductibilité.

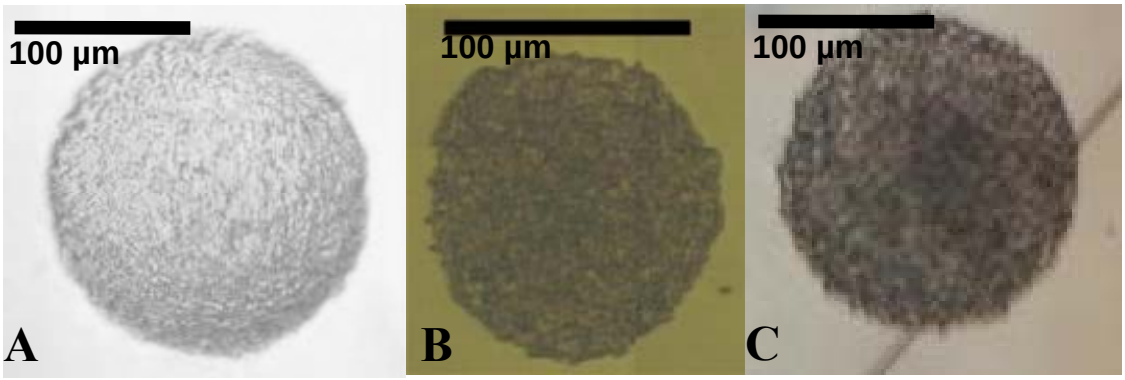


Figure 21 : Microscopie optique montrant des exemples d'empreinte de microcolonies de *C. glabrata* (A) *C. albicans* (B) et *C. krusei* (C) cultivée sur milieu SGC. (La barre représente 100µm)

4. Spectroscopie Infrarouge (IRTF)

4.1 Appareillage

Le spectromètre IRTF

Les spectromètres Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) comportent quatre éléments principaux :

- une source de rayonnement
- un dispositif permettant de séparer les longueurs d'onde
- un module d'analyse
- un ou plusieurs capteurs photosensibles

Le spectromètre IRTF utilisé pour cette étude est un Bruker modéle Equinox 55 (Wissembourg, France) qui fonctionne dans une gamme de fréquence allant de 7500 à 370

cm^{-1} et qui permet l'acquisition des spectres dans le moyen et le proche infrarouge en fonction de la combinaison source/séparatrice/détecteur utilisée.

L'Equinox 55 est équipé d'une source infrarouge de type Globar, d'un interféromètre de type Rocksolid™, d'une séparatrice en KBr isolée de l'atmosphère, d'un laser Hélium-Néon et de 2 détecteurs [DTGS (Deuterated Tri-Glycine Sulfate) et MCT (Mercure Cadmium Telluride)]. Ces principaux composants optiques sont protégés par des couvertures flexibles et peuvent être changés afin de commuter la gamme spectrale utilisée.
L'interféromètre Rocksolid™ (Figure 22) est aligné de manière permanente et assure une sortie d'énergie élevée et de faibles effets de polarisation. Pour mieux optimiser le fonctionnement de l'interféromètre ce dernier est isolé des vibrations et des effets thermiques par des couvertures et des supports spécifiques. Ce système de base est installé pour opérer dans le moyen infrarouge avec deux options disponibles de résolution spectrale différente. L'Equinox 55 est continuellement purgé par de l'air sec produit par un générateur de gaz (purge Whatman modèle 75-62), afin d'éviter l'influence des paramètres atmosphériques (air ambiant) lors des mesures.

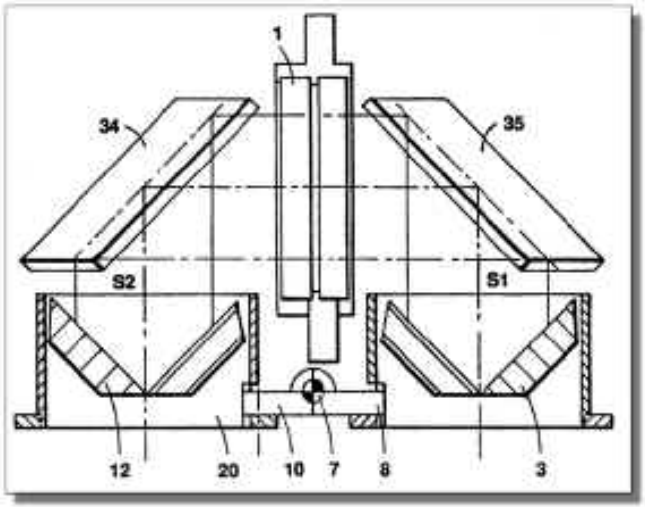


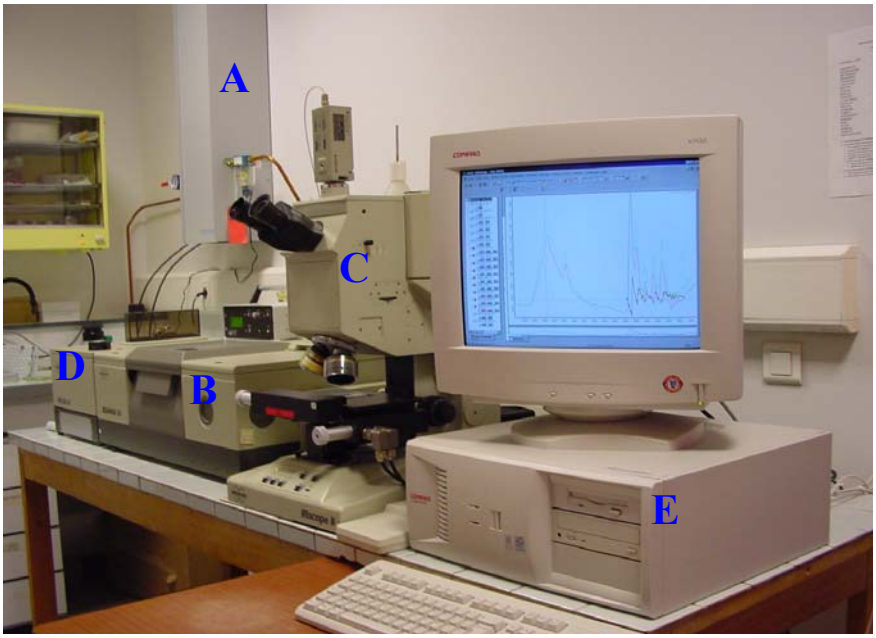
Figure 22 : Interféromètre Rocksolid ™ utilisé dans l'Equinox 55 (Bruker)

L'Equinox 55 (Figure 23) est couplé à différents modules :

- le compartiment MICOR-ID dédié à l'analyse macroscopique des microorganismes et des cellules en suspension. Il peut accomoder une roue en ZnSe (Figure 19) permettant d'analyser quinze échantillons dans les mêmes conditions. La position « 0 » est réservée pour la mesure de la référence. Cette roue est ensuite placée dans le

compartiment MICOR-ID. Un système de codes barres permet de programmer la corespondance de chaque position et d'automatiser l'acquisition des spectres par le logiciel OPUS O.S (version 3.0). Ce compartiment est équipé d'un détecteur DTGS.

- Un compartiment échantillon qui peut recevoir un support pour un échantillon unique (compartiment macro). Ce mode est utilisé également pour l'analyse des liquides et des solides par ATR. Il est muni d'un détecteur pyroélectrique DTGS.
- Un microscope, modèle IRSCOPE II (BRUKER), qui permet de faire des mesures des microzones d'un échantillon ou sur des échantillons microscopiques, comme les microcolonies. La description détaillée de ce module sera traitée dans le paragraphe suivant.
- Un ordinateur, en interface avec le spectromètre IRTF, permet la commande des mesures et le traitement des spectres à partir du logiciel OPUS (Bruker Optics, version 3.1).



A : Système de purge

B : Spectromètre IRTF

C : Microscope

D : Module passeur d'échantillons

E : **Micro-informatique**

Figure 23 : Spectromètre IRTF Equinox 55

Microspectroscopie IRTF : le microscope IRSCOPE II

Des spectres IRTF de micro-échantillons peuvent être enregistrés à l'aide du microscope IRscope II couplé au spectromètre Equinox 55. Ce microscope (Figure 24) dispose de son propre détecteur MCT, beaucoup plus sensible que le détecteur DTGS du spectromètre, mais qui nécessite un refroidissement à l'azote liquide (77 K). L'autonomie de ce détecteur refroidi

est de 6 heures. Une platine motorisée ***xy*** contrôlée par ordinateur permet de se positionner à des coordonnées précises et de cartographier un échantillon en programmant l'enregistrement automatique de spectres à des positions prédéterminées. Une caméra numérique permet la visualisation des images.

Le microscope IRscope II est équipé de 3 objectifs : un objectif visible x4 et deux objectifs infrarouge de type Cassegrain d'agrandissement x15 et x36. La taille de la zone analysée par le microscope dépend de l'objectif employé et du diamètre du diaphragme placé dans le trajet optique. Les différentes résolutions spatiales possibles avec ce microscope IR, figurent dans le tableau 15.

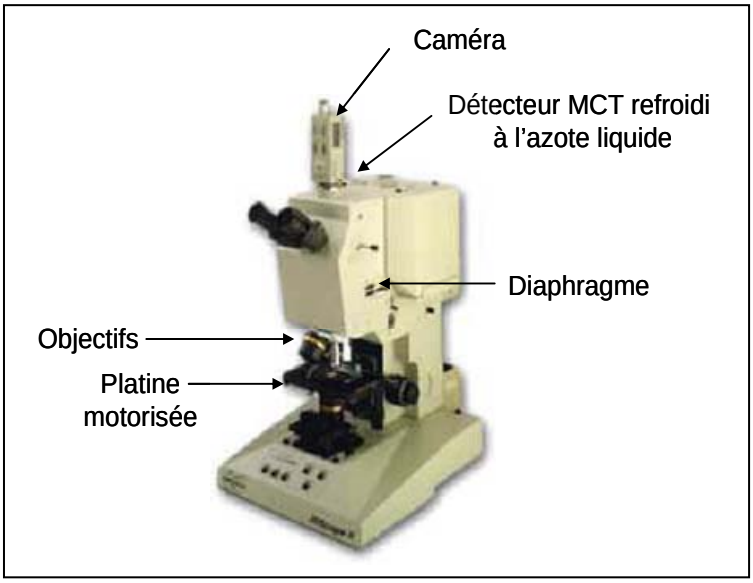


Figure 24 : Microscope IRSCOPE II

Ouverture (mm)	Objectif x36	Objectif x15
3 ,75	104 µm	250 µm
3,00	83 µm	200 µm
2,50	69 µm	166 µm
2,10	58 µm	140 µm
1,80	50 µm	120 µm
1,50	42 µm	100 µm
1,20	33 µm	80 µm
0,90	25 µm	60 µm
0,75	21 µm	50 µm
0,60	16,7 µm	40 µm
0,45	12,5 µm	30 µm
0,30	8,3 µm	20 µm

Tableau 15 : Les résolutions spatiales disponibles avec l'IRSCOPE II

Dans la pratique, en raison de l'utilisation d'un support en ZnSe ou CaF_2 de 2mm d'épaisseur, d'absorption non négligeable, le diamètre de la zone étudiée est compris entre 50 et 250 µm. En dessous de 50 µm, le signal est trop faible pour permettre l'acquisition de spectres de bonne qualité (bon rapport S/B) en un temps relativement court. Au delà de 250µm, le détecteur sature. Les spectres peuvent être acquis en mode transmission ou réflexion. Seuls des spectres acquis en mode transmission ont été utilisés lors de ce travail. Nous avons choisi d'utiliser l'objectif x15. En théorie, l'objectif 36 devrait permettre d'améliorer la résolution spatiale mais cela n'est vrai que si l'ouverture numérique de l'objectif augmente proportionnellement avec le grandissement, mais ceci n'est pas le cas.

4.2 Modes et paramètres d'acquisitions

Le mode d'acquisition employé dans cette étude pour les analyses en (micro)-spectroscopie IRTF est la transmission/absorption. La réalisation et les paramètres d'acquisition des spectres se font suivant un protocole mis au point à l'Institut de Robert Koch par Naumann *et coll* (Naumann 1991a).

Les paramètres d'acquisition sont définis dans le logiciel de mesure OPUS (Bruker Optics) :

Pour la spectroscopie IRTF :

- Spectre résultant : Absorbance
- Résolution spectrale : 6 cm^{-1}
- Nombre d'accumulations pour la référence (nombre de "scans") : 64
- Nombre d'accumulations pour l'échantillon : 64
- Limite supérieure d'acquisition : 4 000 cm^{-1}
- Limite inférieure d'acquisition : 400 cm^{-1}
- Fonction d'apodisation : Blackman-Harris 3 term
- Correction de phase : Power spectrum
- Facteur de « zero filling » : 4

Le passeur d'échantillons permet d'enregistrer successivement 15 spectres dans les mêmes conditions. Un spectre de référence est réalisé entre chaque spectre échantillon de façon à tenir compte des petites variations atmosphériques qui pourraient survenir dans la chambre malgré la purge continuelle en air sec. Le temps total pour l'analyse d'une roue complète est de 30 minutes pour ces conditions de travail.

Le nombre de scans (n=64) a été choisi car il donne un bon rapport signal sur bruit S/B.

Pour la microspectroscopie IRTF :

Les paramètres d'acquisition dépendent de la nature de l'échantillon étudié et de la taille de la zone à analyser. Pour les microcolonies de tailles comprises entre 50 et 250 µm, ces paramètres sont :

- Spectre résultant : Absorbance
- Ouverture du faisceau : 0,75 à 3,75 mm (selon l'objectif IR utilisé)
- Résolution spatiale : 50 à 250 µm (selon la taille de la microcolonie)
- Résolution spectrale : 6 cm^{-1}
- Nombre d'accumulations pour la référence (nombre de "scans") : 256. L'augmentation du nombre de scans en mode micro permet l'amélioration de la qualité des spectres (rapport S/B amélioré)
- Nombre d'accumulations pour l'échantillon : 256
- Limite supérieure d'acquisition : 4 000 cm^{-1}
- Limite inférieure d'acquisition : 400 cm^{-1}
- Fonction d'apodisation : Blackman-Harris 3 term
- Correction de phase : Power spectrum
- Facteur de « zero filling » : 4

Pour l'analyse des microcolonies en mode point par point, l'acquisition de plusieurs spectres pour chaque microlonies est nécessaire. Un compromis doit être trouvé entre la durée de la mesure qui est limitée par l'autonomie du détecteur (6h), la résolution spatiale et le rapport signal sur bruit. Le nombre d'accumulations, la taille de la zone mesurée et le nombre de spectres sont donc reliés.

5. Traitement des spectres Infrarouge (IRTF)

D'une manière générale, les spectres IR contiennent des informations qui présentent un intérêt analytique. Cependant, l'extraction de ces informations reste problématique due à la superposition des informations spectrales et nécessite presque toujours un traitement mathématique assez complexe. De plus, l'information peut ne pas être localisée à un endroit donné du spectre mais distribuée sur plusieurs fenêtres spectrales. Pour cette raison, il est

nécessaire de traiter les spectres par des méthodes d'analyse statistique multivarié, appelées aussi méthodes chimiométriques.

Les données spectrales brutes, telles qu'elles sont acquises par un spectromètre, doivent souvent être soumises à un processus de pré-sélection afin d'éliminer les mauvais spectres (***test de qualité spectrale***). Ensuite, ils doivent subir une étape de ***prétraitement*** qui inclut une correction des phénomènes physiques qui contribuent à l'information spectrale, une dérivation suivie d'une normalisation.

D'une manière générale, le traitement des spectres est informatisé et est effectué à l'aide du logiciel OPUS (BRUKER Wissemburg France version 3.1). Ce logiciel permet non seulement de travailler les spectres mais propose également des méthodes statistiques pour la comparaison et la classification des spectres. Il permet aussi de construire des bases de données spectrales. Ces différentes étapes de sélection et prétraitement des spectres sont décrites ci-après.

5.1 Test de qualité spectrale

Les spectres bruts subissent d'abord un test de qualité. La répétabilité et la reproductibilité des spectres d'une même souche sont aussi vérifiées avant d'inclure les spectres dans l'analyse ou dans la base de données.

Le test de qualité spectrale utilisé pour la sélection des spectres est adapté de Helm *et coll* et Amiel *et coll* (Helm 1991b; Amiel 2000).

Ce test repose sur trois critères (Figure 25) :

- Le premier critère est la vérification de l'absorbance maximale du spectre qui doit être comprise entre 0,35 et 1,25 (0,35<Absmax<1,25). Généralement, l'absorbance maximale dans un spectre IRTF correspond à la bande Amide I située vers 1655 cm^{-1}. Pour un spectre de bonne qualité il faut donc absolument que l'intensité de cette bande soit comprise entre 0,35 et 1,25.
- Le second critère est d'avoir un rapport signal sur bruit (S/B) suffisant. Ce critère permet de fixer les valeurs limites du rapport entre l'intensité du signal et celle du bruit de fond. Il est calculé sur la dérivée première du spectre pour une résolution de 6 cm^{-1}, pour 64 (spectroscopie conventionnelle) ou 256 accumulations (microspectroscopie) et une apodisation de type Blackman Harris 3 term. Deux régions sont utilisées pour le signal, celle de la plus forte absorbance comprise entre 1600 et 1700 cm^{-1} ***(valeur S1)***, et celle comprise entre 1178 et 1260 cm^{-1} ***(valeur S2)***.

L'intensité du bruit ***(valeur B),*** est définie sur la région 2000-2100 cm^{-1}, qui ne comporte pas de signal du matériel biologique.

Un spectre de bonne qualité est déterminé pour une valeur ***S1/B***>50 et une valeur ***S2/B***>10. Ces normes sont applicables pour les spectres des microorganimes, mais ils peuvent être modifiés pour d'autres types d'échantillons.

- Le troisième critère porte sur la contribution de la vapeur d'eau qui doit être minimisée. Le contrôle de l'absence d'eau résiduelle dans les spectres est quantifié par le rapport entre ***S1***, ***S2*** et la valeur ***W*** mesurée dans la zone spectrale comprise entre 1387 et 1847 cm^{-1} où se trouvent les bandes d'absorption de la vapeur d'eau. Les seuils fixés pour ce critère sont les suivants : ***S1/W***>20 et ***S2/W***>4.

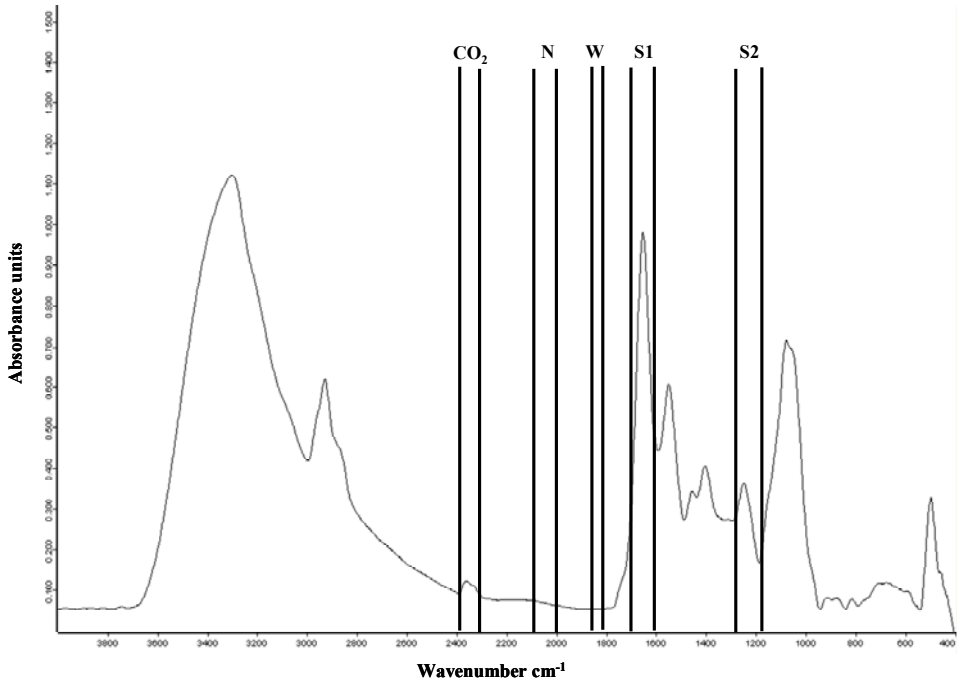


Figure 25 : Les critères utilisés pour le test de qualité spectrale

5.2 Prétraitement des données spectrales

Dans de nombreuses situations, les spectres présentent des variations incontrôlées d'intensité globale dépendant principalement de la longueur du trajet optique à travers l'échantillon. Quand ce trajet est très court, il est difficile d'avoir des conditions d'acquisition parfaitement reproductibles. De plus, les spectres sont généralement affectés par les

propriétés physiques de l'échantillon (taille et distribution des particules) (Bertrand 2000; Roggo 2003).

Les prétraitements sont donc nécessaires pour améliorer le signal et indispensables pour une meilleure analyse des données. Ils permettent d'éliminer l'effet du bruit ou d'une déformation du spectre.

Généralement, les prétraitements des données spectrales ont deux objectifs principaux : l'amélioration du signal et l'homogénéisation des données. Ces prétraitements sont évidemment en relation avec le mode ultérieur d'exploitation des données spectrales et généralement ils incluent :

1- Le lissage des spectres (si nécessaire)

2- La correction de la dérive de la ligne de base

3- L'élimination des variations d'intensité globale sans intérêt

Les prétraitements de données spectrales utilisés dans cette étude sont effectués à l'aide du logiciel OPUS (Opus software, version 3.1, Bruker) et comprennent :

La correction atmosphérique

Les bandes d'absorption résiduelle du gaz carbonique atmosphérique (CO_2) situées entre 2386 et 2284 cm^{-1} sont éliminées de tous les spectres sélectionnés. Il faut noter aussi que généralement les microorganismes ne présentent pas de bandes d'absorption dans cette région spectrale (Figure 25).

La correction de ligne de base

Lors de la transmission de la lumière au travers d'un échantillon, l'absorption n'est pas le seul phénomène optique mis en œuvre. D'autres phénomènes tels que la diffusion, les aberrations chromatiques et la diffraction sont observés. Une fraction significative de la lumière est alors déviée de son trajet et n'atteint pas le détecteur. Ces phénomènes dépendent de la longueur d'onde et de l'épaisseur de l'échantillon et se manifestent sous la forme d'une inclinaison du spectre plus prononcée pour les grands nombres d'onde. L'opération de correction de la ligne de base est nécessaire pour éliminer cette dérive de la ligne de base.

Cette correction est inclue dans la plupart des logiciels utilisés, l'opérateur ayant le choix entre un certain nombre de paramètres : nombre de points et degré du polynôme utilisé. La procédure implique la définition d'une ligne passant par n minima du spectre, n étant le nombre de points défini par l'opérateur. L'allure de la ligne de base passant par ces points dépend du degré du polynôme choisi pour son calcul. La ligne de base est alors soustraite

point par point au spectre. Cette procédure est toutefois génératrice d'artefacts et il est préférable de s'en passer chaque fois que cela est possible. Une autre approche pour corriger la ligne de base est de dériver les spectres (les dérivées premiére et second éliminent la dérive de la ligne de base).

Les spectres de transmission réalisés au cours de ce travail ont été corrigés avec une ligne de base polynomiale définie sur 10 à 80 points en fonction de l'intervalle de fréquence utilisé (généralement la correction de la ligne de base est effectuée sur la région spectrale totale entre 400 et 4000 cm^{-1}).

Lissage

La fonction de lissage est utilisée lorsque les spectres comportent un bruit assez élevé. Elle est à l'opposé de l'opération de l'augmentation de la résolution car la réduction des signaux parasites se fait aux dépens de la résolution spectrale. Pour notre étude, le lissage a été appliqué lorsque cela s'avérait nécessaire. Nous avons utilisé un filtre de Savitsky-Golay à 9 points, défini par l'utilisateur.

Dérivation

La principale utilité de la dérivation est la possibilité de rendre certaines informations du spectre plus distinctes en augmentant virtuellement la résolution spectrale. Généralement on utilise la dérivée première ou seconde. La dérivée première est utilisée pour mesurer les pentes des contours d'absorption en chaque point du spectre tandis que la dérivée seconde permet de mesurer la concavité. La dérivée seconde est utile pour la localisation de la position des maxima d'absorption car les pics sont mieux résolus mais avec une intensité négative. Les dérivées sont également utiles pour éliminer les dérives d'une ligne de base.

Pendant la dérivation des spectres, l'information en termes d'absorbance est perdue mais la structure fine des massifs peu résolus peut être dévoilée. Dans notre étude la dérivation du second ordre est réalisée par un algorithme de Savitsky-Golay comprenant un filtre de 9 points.

Normalisation

La procédure de la normalisation consiste à ramener les spectres à la même intensité (même échelle) afin de pouvoir les comparer aussi bien sur le plan quantitatif que sur le plan qualitatif. La normalisation peut être réalisée sur l'intensité d'un pic (normalisation min-max) ou sur l'aire du spectre (normalisation vectorielle). Dans ce cas, l'aire de chaque spectre est

calculée dans l'intervalle défini par l'utilisateur et tous les spectres sont ramenés à la même aire. Seules des intensités relatives peuvent être comparées après normalisation des spectres. Dans notre étude la normalisation vectorielle sur la région spectrale totale a été utilisée.

5.3 Tests de la répétabilité et de la reproductibilité spectrale

Le logiciel OPUS permet de comparer les spectres d'un même échantillon afin de pouvoir déterminer le pourcentage de similitude des spectres d'un même échantillon, qu'il soit pour la même culture ou pour des des cultures différentes.
Les seuils utilisés ont été définis dans notre laboratoire lors de ces travaux. La répétabilité est vérifiée en comparant les spectres des trois dépôts d'une même culture avec un seuil de 99 % (les spectres des trois dépôts d'une même culture doivent être regroupés dans le même cluster avec un seuil d'hétérogénéité ≤ 0,15).
Pour la reproductibilité entre les dépôts des 3 cultures différentes d'une même souche, le seuil est fixé à 97% (les spectres des trois cultures doivent être regroupés dans le même cluster avec un seuil d'hétérogénéité ≤ 0,25). Les spectres moyennés sur chaque culture sont utilisés pour la comparaison de la reproductibilité.
Seuls les spectres remplissant ces conditions sont retenus pour les analyses statistiques ultérieures, avec un minimum de deux spectres pour chacune des trois cultures d'une même souche, soit 6 à 9 spectres pour chaque souche étudiée.

Moyennage

Selon le nombre de souches impliquées dans chaque étude et afin de simplifier l'analyse statistique, la moyenne des trois spectres (3 dépôts) d'une même culture ou des 9 spectres des 3 cultures différentes est utilisée. Ceci est possible à condition que la répétabilité et la reproductibilité de la mesure soient parfaitement remplies. Ainsi, chaque souche est représentée par un spectre moyenné.

5.4 Méthodes statistiques pour le traitement des données spectrales

Les spectres IRTF obtenus sont complexes. Si dans certains cas les différences ou les ressemblances sont visibles à l'œil nu, dans d'autres l'inspection visuelle est impossible en raison de la complexité des profils spectraux, de la subtilité des différences recherchées et du nombre important de spectres impliqués. Le traitement de cette masse de données nécessite le

recours à des méthodes statistiques pour discriminer ou classer les spectres. De plus, la variabilité intrinsèque des échantillons peut parfois cacher l'information recherchée.

Les méthodes d'analyse statistique ont pour objectifs de décrire les données en assurant la réduction du nombre de variables impliqué, l'extraction d'informations pertinentes pour l'analyse, la classification des spectres, l'établissement et l'exploration de bases de données.

La chimiométrie est la discipline qui utilise les méthodes mathématiques et statistiques pour extraire « l'information utile » à partir d'un jeu de données. Les méthodes chimiométriques utilisent l'outil statistique, en particulier les méthodes multivariées qui sont employées pour l'analyse de problèmes comportant de nombreuses variables. L'analyse en composantes principales (ACP), la classification hiérarchique ascendante (HCA) et les tests de significativité font partie des outils que nous avons utilisés.

L'Analyse en Composantes Principales (ACP)

Elle est particulièrement adaptée à l'étude exploratoire des données spectrales. Elle permet de remplacer les variables d'origine (ici, absorbances), fortement redondantes, par des variables synthétiques (variables latentes), les ***composantes principales***, qui contiennent la quasi-totalité de l'information, et qui ont l'avantage d'être orthogonales entre elles. Ces composantes principales sont des combinaisons linéaires des variables de départ.

A l'aide de l'ACP, il est souvent possible de condenser la collection spectrale dans des proportions très importantes : 10 composantes au maximum sont en général largement suffisantes pour résumer l'information utile, et la taille de la matrice des données peut être réduite par un facteur de 10 à 100 ou plus.

La figure 26 explique le principe de l'ACP : Dans l'espace original, la collection spectrale peut être représentée par un nuage de points dans un espace à ***p*** dimensions. L'ACP consiste à une rotation qui conserve les échelles et les distances entre les spectres. Cette rotation est effectuée de manière à placer les nouveaux axes dans la direction de plus grande dispersion du nuage de points. Le premier axe correspond ainsi à la plus grande dispersion du nuage de points. Le deuxième axe est orthogonal au premier et tient compte de la plus grande dispersion résiduelle, et ainsi de suite.

Les composantes principales sont donc ordonnées par ordre décroissant de variance expliquée. Ainsi les composantes principales d'ordre « élevé » expliquent en général très peu de variance, et peuvent donc être éliminées de l'analyse. Les coordonnées des points représentatifs des spectres dans ce nouveau repère sont les coordonnées factorielles. L'intérêt de l'ACP apparaît clairement lorsque les variables d'origine présentent de fortes corrélations.

Les données condensées par ACP peuvent servir de variables de base pour d'autres traitements statistiques tels que la régression ou l'analyse discriminante. Pour de nombreuses méthodes supervisées, l'orthogonalité des variables rend les calculs numériques très simples et plus fiables.

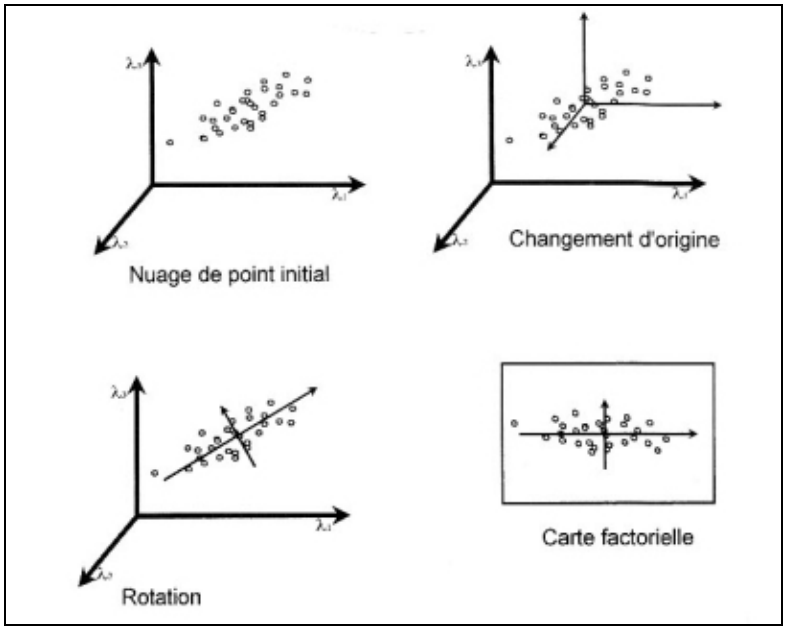


Figure 26 : Principales étapes de l'ACP : Vue comme un changement de repère dans un espace multidimensionnel

Dans un spectre IRTF on peut extraire autant de composantes principales qu'il y a de dimensions (donc de fréquences dans le spectre) moins une, chaque nouvelle composante principale exprimant la plus grande variabilité résiduelle après l'extraction des composantes précédentes. Puisque les axes sont perpendiculaires, les composantes principales sont dites orthogonales, ce qui signifie qu'elles sont non corrélées ou indépendantes. L'ACP permet en quelque sorte d'éliminer une certaine redondance contenue dans l'information initiale ce qui en fait une méthode de synthèse de données. Dans notre application, des spectres infrarouge comprenant plusieurs milliers de points peuvent être réduits à quelques variables seulement (de 8 à 25 en fonction de l'algorithme utilisé). Il est à noter que si les premières composantes principales (CP) contiennent une grande part de l'information spectrale, les composantes suivantes n'en contiennent qu'une quantité décroissante tandis que les dernières ne sont formées que de bruit. Généralement, on utilise les 6 premières CP qui cumulent 99% de l'information spectrale.

L'analyse en composantes principales est réalisée à l'aide de MATLAB version 6.5 ou à partie du logiciel LabSpec (Horiba Jobin Yvon, Lille, France) qui utilise l'algorithme NIPALS (Non Iterative PArtial Least Square).

La classification hiérarchique ascendante (HCA)

Cette méthode exploratoire permet de réaliser le regroupement « naturel » des données issues des spectres des différentes souches de levures en fonction de leurs caractéristiques communes sans prédéfinir de classe. C'est donc une méthode non supervisée qui consiste à regrouper de façon séquentielle les spectres des levures en classes ou clusters emboîtés en fonction de leur similarité par une procédure cyclique en se basant sur les distances respectives. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un arbre hiérarchique ou dendrogramme.

Le mode d'agglomération des spectres nécessite de définir deux paramètres, la mesure de la similarité (ou les distances) entre les spectres et une règle d'agrégation pour regrouper les classes obtenues à chaque étape de l'algorithme :

Mesure des distances

La distance entre les spectres est utilisée pour former les classes. Cette distance peut être mesurée de différentes manières. Le logiciel Opus propose plusieurs modes de calcul des distances. En mode « standard » la distance Euclidienne ***d*** est utilisée :

$$\boldsymbol{d}=\sqrt{\sum_i (x_i - y_i)^2}$$

En mode « normalisation à la première gamme » la différence entre les spectres est donnée par la valeur ***d'hétérogénéité D***. L'hétérogénéité est calculée à partir du coefficient de corrélation de ***Pearson.*** Le coefficient de corrélation de ***Pearson r*** est donné par la relation :

$$r=\frac{\sum (a(k)-a_m)\times(b(k)-b_m)}{\sqrt{\sum (a(k)-a_m)^2}\times\sqrt{\sum (b(k)-b_m)^2}}$$

a(k) et b(k) sont les absorbances des spectres a et b pour le nombres d'onde k et a_m, b_m sont les moyennes de l'absorbance pour le nombres d'onde k. ***L'hétérogénéité D*** est égale à :

$$D= (1-r)\cdot 1000$$

L'hétérogénéité peut varier de 0 pour des spectres identiques sur chacune des zones à 2000 pour des spectres inversement corrélés.
Dans ce mode, l'utilisateur doit définir plusieurs régions spectrales sur lesquelles l'hétérogénéité sera mesurée. L'hétérogénéité dans chacune des zones est normalisée de façon à ce qu'elle soit comprise entre les mêmes valeurs pour chacune des zones. Il est possible d'affecter un coefficient différent à chacune de ces zones de façon à ce que chacune ait un poids différent dans le processus de classification.

Règles d'agrégation

Au premier cycle, le programme calcule la matrice des distances inter-observations et groupe les 2 observations les plus proches. Les règles d'agrégation interviennent dès le deuxième cycle pour déterminer le mode de calcul des distances entre groupes. Il en existe plusieurs types. Nous avons utilisé la méthode de **Ward** basée sur la minimisation de la variance des groupes formés. Cette méthode permet de minimiser les distances entre couples tout en maximisant les distances entre classes. Elle donne les meilleurs résultats pour la classification de spectres (Helm 1991a).

Test de significativité

La sélection des régions discriminantes a été faite par exploration visuelle des spectres dans le cas où la variabilité spectrale entre les échantillons est détectable visuellement. Mais, afin de sélectionner de façon objective des nombres d'onde ayant des valeurs significativement différentes entre 2 groupes de spectres que la simple inspection visuelle ne pouvait pas séparer, nous avons utilisé une analyse statistique.
La comparaison de deux groupes, nombre d'onde par nombre d'onde, peut se faire au moyen d'un test de significativité univarié comme le test de Student (ou test de t). Ce test compare l'écart entre les moyennes des deux groupes avec la dispersion interne des groupes et renvoie la probabilité $\boldsymbol{P}$ de faire une erreur en rejetant l'hypothèse nulle (pas de différence entre les groupes comparés). Une probabilité de 5% ($\boldsymbol{P}<0{,}05$) est traditionnellement admise mais $\boldsymbol{P}<0{,}01$ a été choisi comme seuil. Des valeurs de $\boldsymbol{P}$ de l'ordre de 10^{-7} ont été couramment observées entre les groupes testés. De plus, un nombre d'onde n'était pas considéré comme significativement différent entre deux groupes s'il n'était pas inclus dans une région d'au moins 10 cm^{-1} de large. Un test bilatéral pour des groupes non appariés à variances inégales a été utilisé systématiquement.

RESULTATS ET DISCUSSION

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

Face à la grande diversité de levures du genre *Candida* isolées en milieu clinique, un accroissement global d'incidence des candidoses opportunistes est observé. Le diagnostic de ces infections demeure difficile car la preuve formelle n'est pas toujours obtenue. Par ailleurs, il est nécessaire d'identifier et de caractériser précocément ces levures, afin d'établir un diagnostic rapide et de prescrire une thérapie antifongique bien adaptée.

Le travail proposé dans cette thèse évaluera l'intérêt de la (micro)spectroscopie IRTF comme outil rapide d'identification et de typage spécifique (diagnostic d'espèce) et infraspécifique (identification de souches au sein d'une même espèce). Ce travail sera appliqué à 6 des principales espèces pathogènes du genre *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*) et pour lesquelles nous possédons des collections de souches caractérisées à l'échelon phénotypique.

Ce travail fera aussi l'objet de la mise en place dans notre laboratoire d'une banque de données spectrales spécifiques pour l'identification des principales espèces de levures du genre *Candida* isolées en milieu hospitalier.

Les retombées directes attendues de notre étude sont : (i) une meilleure identification de ces agents pathogènes au niveau de l'espèce (identification précoce). (ii) La mise en place d'une base de données spectrales pour l'identification des espèces étudiées. (iii) L'utilisation de la spectroscopie IRTF comme outil de typage et d'investigation épidémiologique pour le traçage des souches dans un contexte hospitalier (transmission endogène, exogène ou épidémie).

La partie résultats et discussion de ce mémoire sera présentée en quatre chapitres :

Chapitre 1 : Application de la (micro)spectroscopie IRTF à l'identification des espèces de levures du genre *Candida* d'origine clinique : Etude comparative entre la spectroscopie conventionnelle et la microscpectroscopie **(publication 1)**.

Chapitre 2 : Application de la spectroscopie IRTF à l'identification intraspécifique de 3 espèces de *Candida* (*C. albicans, C. glabrata* et *C. parapsilosis*) : Evaluation de l'intérêt de la spectroscopie IRTF comme un outil de typage **(publication 2)**.

Chapitre 3 : Application de la spectroscopie IRTF comme une méthode d'investigation épidémiologique : Suivi épidémiologique de souches de *C. glabrata* chez 4 patients hospitalisés en réanimation **(publication 3)**.

Chapitre 4 : Mise en place et standardisation d'une base de données spectrales pour l'identification de six espèces de levures du genre *Candida*.

Chapitre 1 : Identification des espèces de levures du genre *Candida* d'origine clinique : Etude comparative entre la spectroscopie conventionnelle et la microspectroscopie.

1. Introduction

Depuis plusieurs années, notre laboratoire développe les applications de la spectroscopie IRTF à la caractérisation de microorganismes pathogènes isolés en milieu clinique. Cette méthode a permis de différencier avec succès d'une part les bactéries Gram+ des Gram- dans une collection de 160 souches et d'autres part le genre et les espèces. Le couplage de l'IRTF avec un microscope infrarouge, a permis aussi d'effectuer une identification précoce de ces microorganismes à partir de microcolonies (Sandt 2006).

L'étude présentée dans ce chapitre porte sur l'application de la (micro)spectroscopie IRTF à l'identification et la caractérisation phénotypique de levures du genre *Candida* d'origine clinique. Cette étude est dans la continuité des travaux réalisés à l'unité MéDIAN par W. Verdel-Zeroual (Verdel-zeroual 1994), W. Bouhedja (Bouhedja 1997; Bouhedja 1998) et dernièrement C. Sandt (Sandt 2003; Sandt 2004; Sandt 2006).

La (micro)spectroscopie IRTF est une méthode d'analyse de la composition moléculaire globale d'un échantillon. Elle représente donc une technique de choix pour l'analyse des microorganismes. La méthode permet de détecter les variations minimes de la constitution moléculaire des microorganismes.

Le spectromètre est équipé de deux accessoires qui permettent l'étude des échantillons mycologiques dans des conditions stables : la spectroscopie conventionnelle avec le module MICOR-ID et la microspectroscopie grâce au microscope IRscope II.

Le module MICOR-ID est un passeur d'échantillons permettant d'acquérir séquentiellement les spectres de 15 échantillons dans des conditions très reproductibles. La mesure en mode transmission requiert l'adaptation du protocole de préparation des échantillons, notamment pour l'obtention de films cellulaires homogènes et transparents à l'IR. Le microscope IRscope II est utilisé pour obtenir les spectres de microéchantillons de taille comprise entre 50 et 250µm et permet l'étude de microcolonies après quelques heures de culture seulement.

Dans cette partie nous avons tenté de différencier 96 souches appartenant aux 6 espèces du genre *Candida* issues d'une collection interne du CHU de Reims. La différenciation a été réalisée à deux niveaux : à partir des cultures pures de 24 heures pour la

spectroscopie conventionnelle avec le module MICOR-ID, et à partir de microcolonies âgées de 10 à 18 heures pour une identification précoce en utilisant le microscope IRscope II.

2. Mise au point de différentes approches méthodologiques en mycologie médicale

Les modifications induites par des changements de conditions de culture et d'échantillonnage peuvent influencer la classification réalisée par spectroscopie IRTF (Van-Der Mei 1993; Van-Der Mei 1996). Cette contrainte impose que seuls les spectres enregistrés dans les mêmes conditions peuvent être comparés lors de la réalisation d'une identification ou d'un typage. Cependant, afin d'être transposable en mycologie clinique, la méthode d'identification doit être robuste et fiable. Il est donc nécessaire de déterminer quel est l'impact de la variation des paramètres de culture et d'échantillonnage sur les mesures en spectroscopie IRTF.

Avant toute analyse, une étape de mise au point de plusieurs paramètres est nécessaire. Pour cela, nous avons testé l'influence des paramètres de culture et de mesure pour les deux modes d'analyse : le module MICOR-ID pour l'analyse des suspensions cellulaires et le microscope IRscope II pour l'analyse des microcolonies.

2.1 Spectroscopie conventionnelle : Analyse des suspensions déshydratées

Conditions de culture

Dans le but d'évaluer l'influence de la composition du milieu de culture et le temps d'incubation sur la reproductibilité et la classification des spectres, nous avons étudié 8 souches de référence dans des conditions de culture différentes.

Les souches de référence utilisées pour ce test appartiennent à 3 espèces : *C. albicans* 1712, *C. albicans* 1837, *C. albicans* 1914, *C. glabrata* 9082, *C. glabrata* 3599, *C. glabrata* 102, *C. parapsilosis* ATCC 22019 et *C. parapsilosis* 6579.

Milieux de culture : comparaison entre les milieux SAB et SGC

Les spectres de la souche de référence *C. albicans* 1712 cultivée sur les deux milieux de culture Sabouraud glucose (SAB) et Sabouraud glucose-gentamycine-chloramphénicol (SGC) ont été comparés afin de vérifier l'influence du milieu sur les spectres infrarouge (Figure 27). La comparaison des dérivées secondes des spectres montre que la

souche *C. al* 1712 exprime des différences spectrales dues à la nature du milieu de culture. Ces variations sont détectées surtout dans la région des polysaccharides membranaires situés entre 900-1200 cm^{-1}. Pour les autres souches (*C. albicans* 1837, *C. albicans* 1914, *C. glabrata* 9082, *C. glabrata* 3599, *C. glabrata* 102, *C. parapsilosis* ATCC 22019 et *C. parapsilosis* 6579), les différences spectrales les plus prononcées ont été détectées également dans cette région spectrale (900-1200 cm^{-1}).

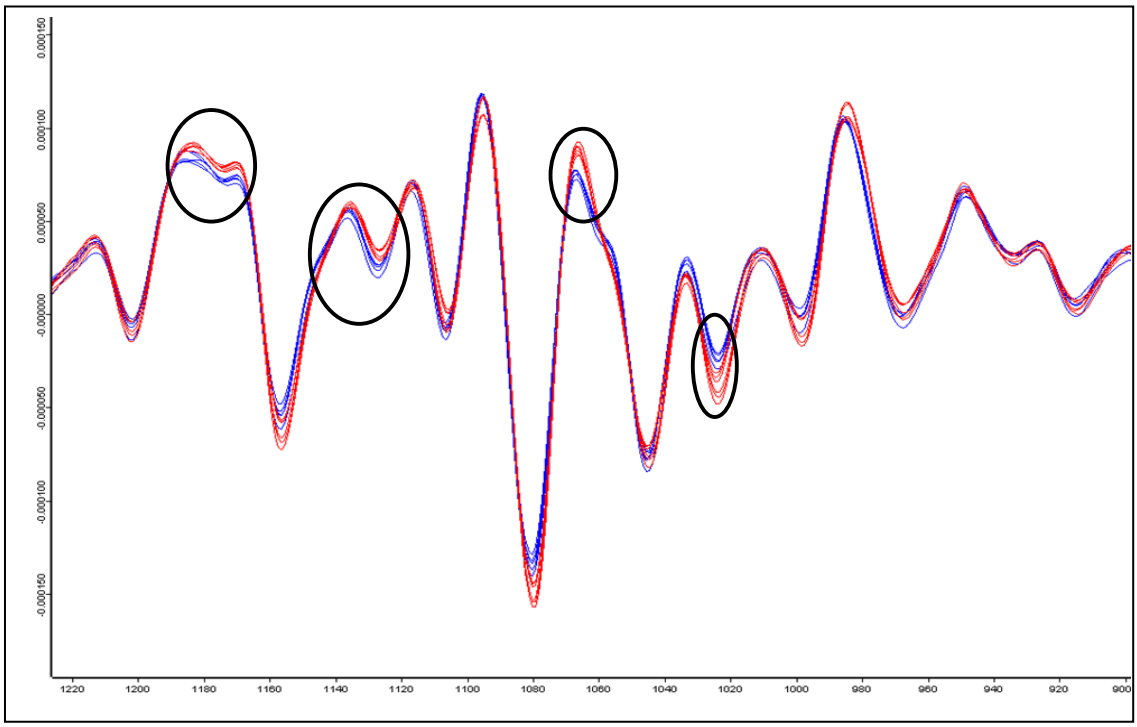


Figure 27 : Dérivées secondes des spectres infrarouge de la souche *C. albicans* 1712 cultivée à 37°C sur deux milieux de culture différents (milieu SAB en rouge et milieu SCG en bleu)

La comparaison des spectres des 8 souches de référence cultivées sur les milieux SAB et SGC révèle des variations spectrales essentiellement dans la région 900-1200 cm^{-1}. Cependant, pour l'identification des espèces et le typage, le plus important est de savoir si ces variations spectrales influencent la classification des spectres au niveau de l'espèce et de la souche. Pour répondre à cette question, nous avons analysé la totalité des spectres de souches de référence par classification hiérarchique.

Cette classification permet de séparer la totalité des souches en 3 groupes suivant l'espèce et ceci quel que soit le milieu de culture utilisé (Figure 28). Les groupes G1, G2, et G3 correspondent respectivement à *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata*.

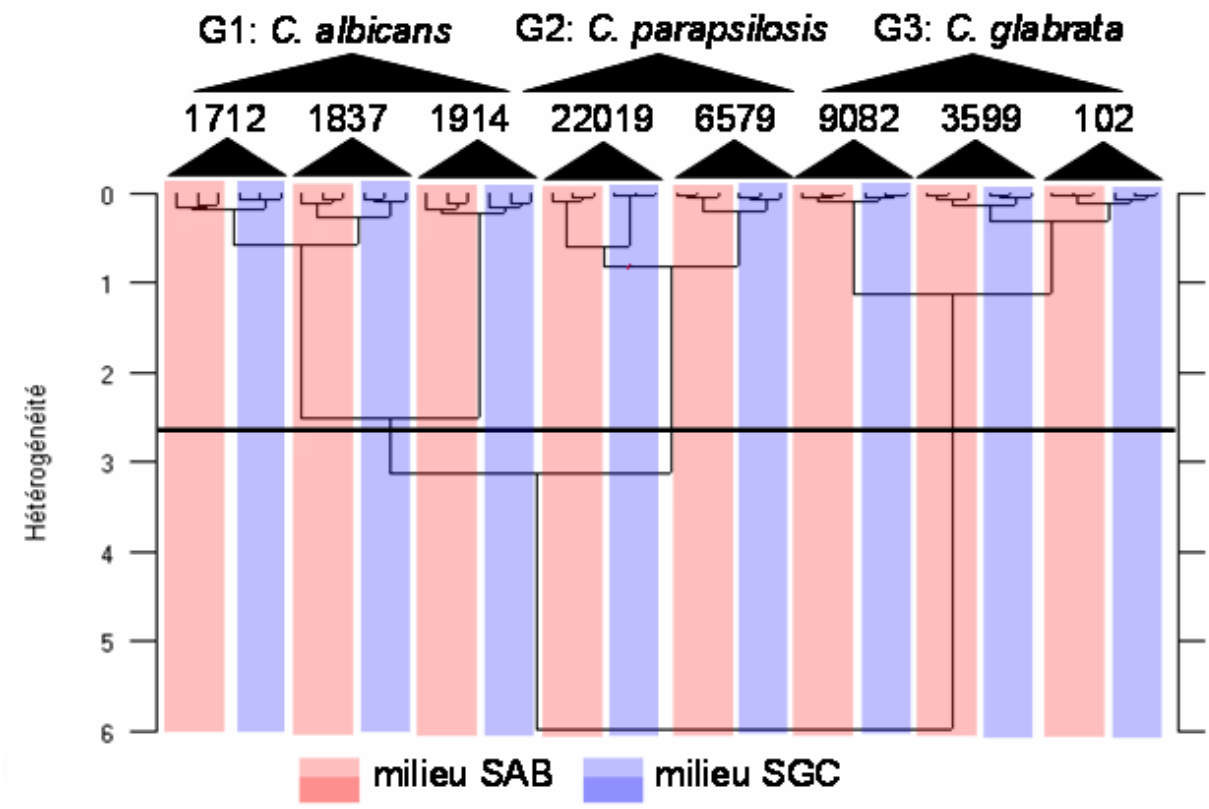


Figure 28 : Influence des milieux de culture SAB et SGC sur la classification des spectres IRTF des souches de référence de *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata* : classification réalisée par la méthode de Ward en utilisant la dérivée seconde de la gamme spectrale 900-1200 cm^{-1}

D'après le dendrogramme (Figure 28), au sein de chaque groupe, on peut différencier les souches selon le milieu utilisé sur la base de leurs spectres IRTF. Pour le groupe (G1) on peut séparer les souches 1712, 1837 et 1914 de *C. albicans*, pour le groupe (G2) on peut séparer les souches 22019 et 6579 de *C. parapsilosis* et enfin pour le groupe (G3) on distingue clairement les souches 102, 9082 et 3599 de *C. glabrata*. Cette classification n'est pas modifiée quand le milieu de culture change.

Les spectres de levure du genre *Candida* cultivées sur les milieux de culture SAB et SGC présentent des différences spectrales dans la région des polysaccharides qui sont dues à la

nature du milieu utilisé. Cependant, ces variations n'influencent pas la classification des spectres au niveau de l'espèce et de la souche. Pour les souches de référence, des bonnes classifications ont été obtenues au niveau de l'espèce et de la souche avec les deux types de milieu de culture utilisés dans notre étude.

La spectroscopie IRTF permet de mettre en évidence les différences de composition biochimique des *Candida* cultivés sur ces deux milieux. Les différences spectrales liées à la nature des levures restent supérieures à celles induites par la nature des milieux de culture (Figure 29). Ceci, permet une différenciation correcte au niveau de l'espèce et de la souche même en utilisant des milieux de culture différents chez les levures du genre *Candida*. Nous avons donc choisi de cultiver les échantillons de levure dans un milieu SGC pour mieux contrôler les sources de contamination, ce milieu permettant la croissance des levures en inhibant celle des bactéries grâce à la présence de deux antibiotiques, la gentamycine et le chloramphénicol. De plus le milieu SGC est celui qui est utilisé en routine en mycologie clinique.

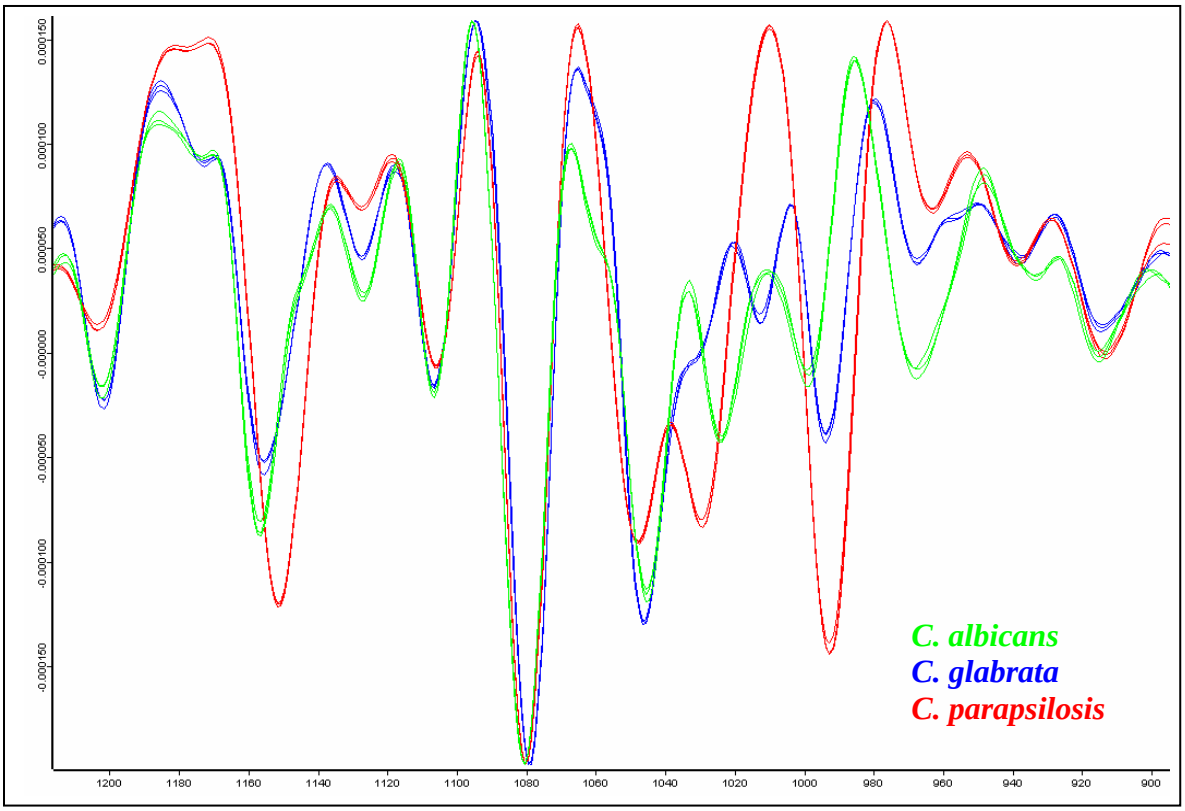


Figure 29 : Les variations spectrales inter-espèces pour les souches de référence de *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata*.

Durée de culture

Les souches 1712, 1914 et 1387 de *C. albicans* ont été analysées en spectroscopie IRTF à 8h, 12h, 18h et 24h de culture sur milieu SGC, pour suivre l'effet de la durée de culture sur la reproductibilité des spectres. Les différences spectrales sont observées essentiellement dans la région située entre 500 et 1800 cm^{-1}. Ces variations sont intenses dans la région des polysaccharides (900-1200 cm^{-1}) et dans la région des protéines (1500-1700 cm^{-1}). D'après la figure 30, on constate peu de différences entre les spectres des cultures de 8h et 12h ou entre les spectres des cultures de 18h et 24h, mais il existe des différences importantes entre les spectres de 8h et de 24h de culture.

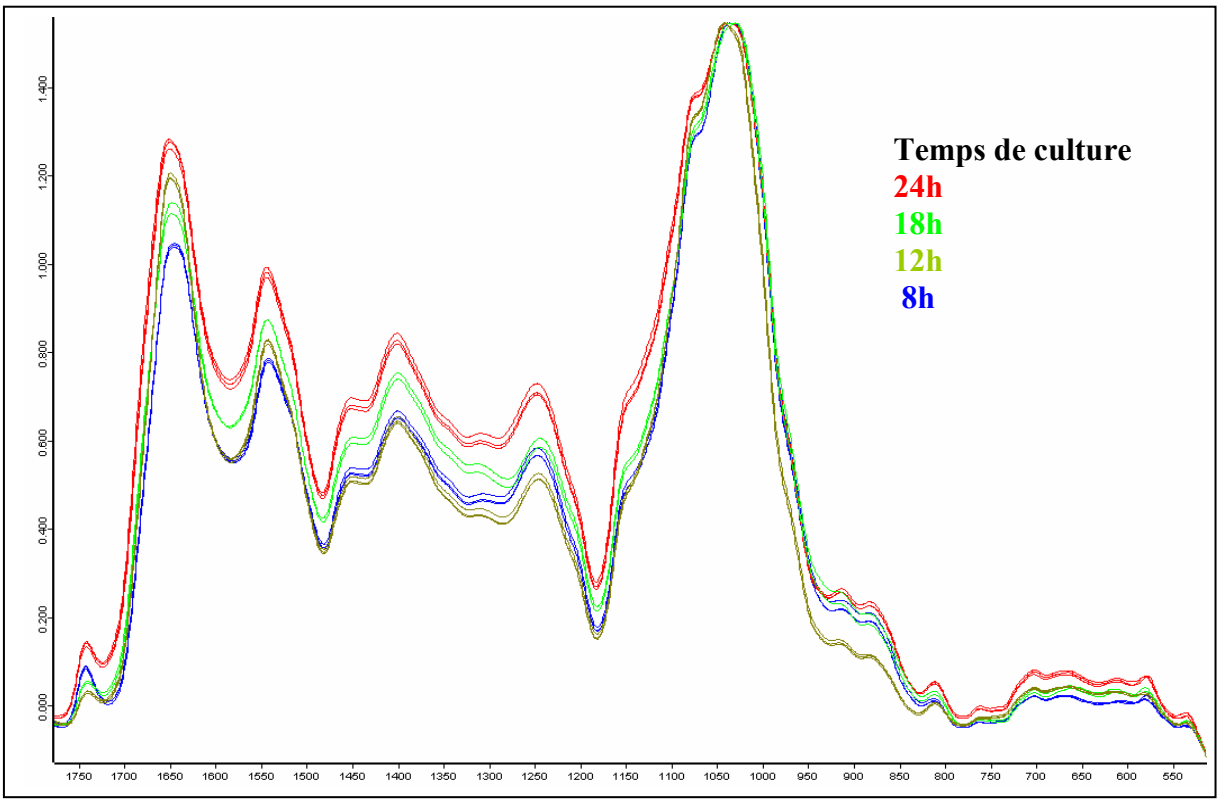


Figure 30 : Influence de la durée de culture sur les spectres IRTF de la souche de référence *C. albicans* 1712 : 8h, 12h, 18h et 24h de culture

Lorsque les spectres des 3 souches de référence de *C. albicans* (1712, 1914 et 1387) sont comparés par la classification hiérarchique, nous constatons que la séparation au niveau de la souche n'est pas possible pour les cultures de 8h, 12h et 18h d'incubation (Figure 31A : 8h de culture) et n'est possible qu'à partir des cultures âgées de 24 h (Figure 31B). Par contre

la différenciation au niveau de l'espèce reste correcte à 100% même pour des cultures de 12 à 18h (résultats non montrés ici), mais les variations spectrales entre les espèces sont nettement plus intenses pour les cultures de 24 h. On note également une augmentation dans le niveau d'hétérogénéité pour la classification réalisée sur les spectres de 24h de culture (Figure 31).

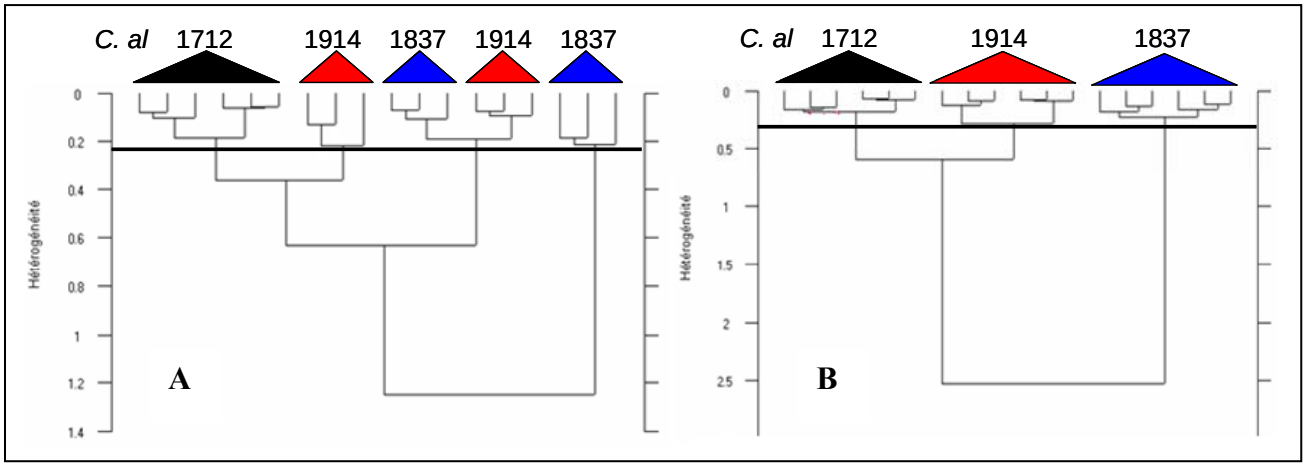


Figure 31 : Influence de la durée de culture sur la classification des spectres IRTF des 3 souches de référence de *C. albicans* (1712, 1914 et 1837) : (A) classification des spectres après 8h de culture et (B) classification des spectres après 24h de culture. Classification réalisée à partir des dérivées secondes des spectres dans la gamme spectrale 900-1200 cm^{-1}

La durée de culture est donc un paramètre important pour expliquer la variabilité des spectres et pour définir les limites respectives à prendre en compte pour l'identification au niveau de l'espèce et de la souche. Pour la suite de notre étude, nous avons standardisé les cultures à 24 h car c'est la durée qui donne une bonne reproductibilité des mesures, sans que la signature spectrale de la souche ou de l'espèce ne soit influencée.

Les variations spectrales en fonction de la durée de culture peuvent être expliquées par le fait que les spectres IRTF reflètent les phases de croissance des cellules (latence, exponentielle, stationnaire). Ceci explique également le fait que les cellules cultivées pendant 8h et 12h expriment peu de différences spectrales (même phase de croissance : latence) alors qu'il existe des différences importantes entre les spectres de 8h et 24h de culture (phases de croissance différentes : latence et stationnaire) (Figure 30).

Donc, les différences spectrales sont minimes pour des cellules dans la même phase de croissance et augmentent avec l'augmentation de la durée de culture. Après 24 h de culture, on constate peu de variations spectrales générées par la durée de culture, car généralement pour les levures du genre *Candida* après 24 h de culture les cellules atteignent la phase

stationnaire de croissance. Ceci est illustré par la comparaison des spectres de 24 h et de 48 h de culture pour la souche *C. albicans* 1712 qui montre que les spectres ne présentent aucune variabilité (Figure 32 A et B). Ceci est expliqué par le fait que les cellules après 24 h de culture atteignent la phase stationnaire de croissance. Après ce délai, la variabilité moléculaire au sein de la cellule n'est plus suffisamment importante pour provoquer des variations spectrales.

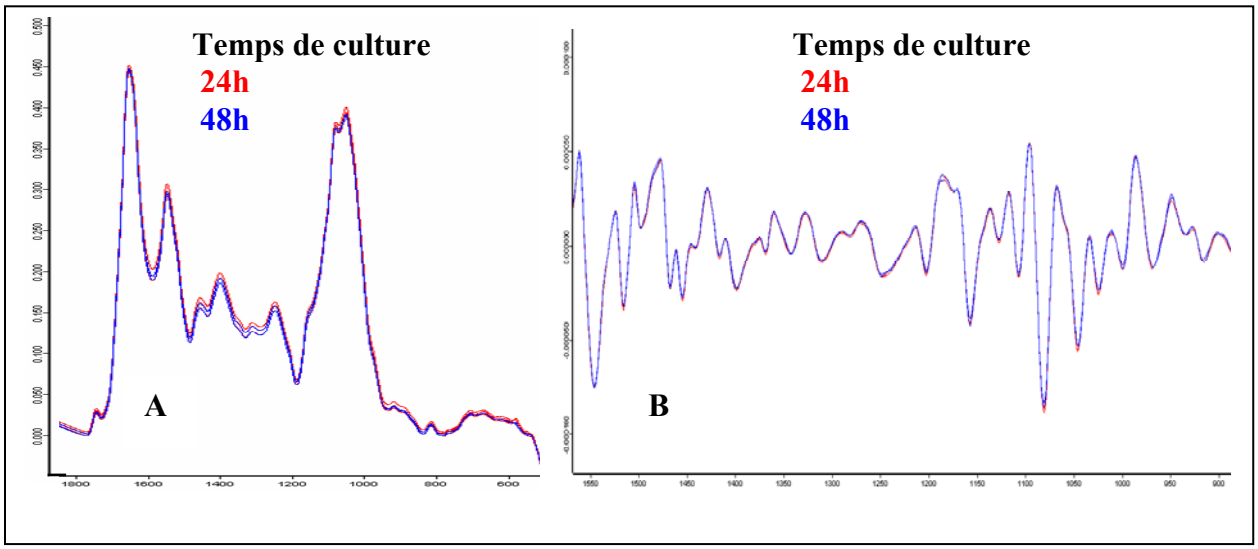


Figure 32 : Comparaison des spectres IRTF de la souche de référence *C. albicans* 1712 après 24 et 48 h de culture sur milieu SGC (A). Les dérivées secondes de ces mêmes spectres sont représentées pour illustrer leur ressemblance (B).

Concentration des suspensions

La concentration de la suspension cellulaire déposée sur le passeur d'échantillon a une influence sur l'épaisseur du film obtenu après séchage qui se répercute sur le trajet optique du rayonnement infrarouge et conséquemment sur le spectre final obtenu.

Pour préparer les suspensions, les cellules sont prélevées de la gélose et resuspendues dans 1ml d'eau stérile. Les suspensions obtenues présentent une concentration fortement hétérogène ce qui peut introduire des aberrations optiques très différentes d'une suspension à une autre.

Des spectres de la souche *C. albicans* 1712 ont été enregistrés à 3 concentrations différentes (DO=1, DO=2 et DO=3 à 500 nm), pour vérifier l'effet de la concentration des suspensions cellulaires sur l'allure des spectres. Malgré la correction de la ligne de base et la normalisation

des spectres, des différences sur toute la région spectrale sont observées entre les spectres de différentes concentrations (Figure 33A). Ces variabilités spectrales sont encore plus intenses dans les dérivées secondes (Figure 33B).

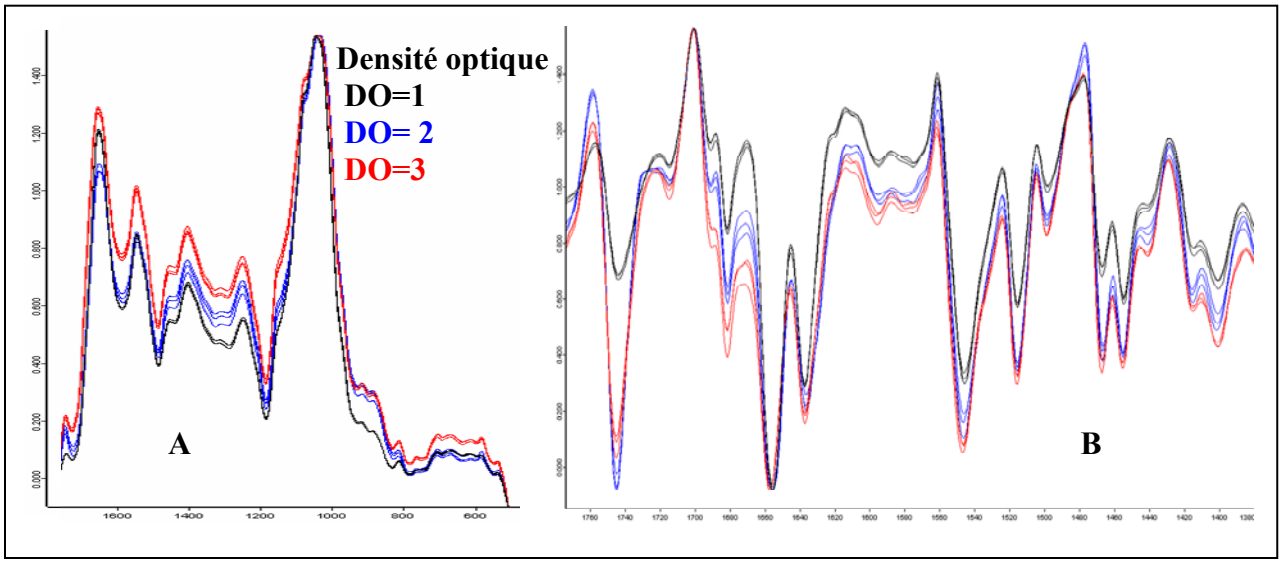


Figure 33 : Influence de la concentration cellulaire (DO) sur la variabilité spectrale pour la souche de référence *C. albicans* 1712. (A) spectres corrigés (B) leurs dérivées secondes.

La variabilité qui est due à la concentration des suspensions cellulaires s'explique essentiellement par la différence des épaisseurs des dépôts sur le passeur d'échantillons après séchage. Les opérations de prétraitement spectral comme la correction de la ligne de base, la normalisation et la dérivation se révèlent obligatoires mais pas assez efficace pour corriger les différences dues aux aberrations optiques générées lors de la mesure en transmission.

Donc, l'obtention d'un film cellulaire homogène lors du dépôt sur le passeur d'échantillons est primordiale pour la qualité et la reproductibilité du spectre. Pour cela, nous avons choisi d'ajuster la concentration cellulaire des suspensions en mesurant la densité optique avant le dépôt sur le passeur d'échantillons. Les spectres de suspensions dont la concentration cellulaire a été ajustée à une densité optique (DO) $_{500\ nm}$ de 3±0,1 et qui correspondent à l'analyse de $2{,}9 \times 10^8$ (cellules/mesure pour *C. albicans*) présentent un bon pourcentage de reproductibilité avec une très faible variabilité. Nous avons donc choisi cette concentration pour la suite de notre étude.

La mesure de la concentration cellulaire de la suspension déposée sur le passeur d'échantillons s'avère nécessaire pour des applications requérant une reproductibilité accrue,

telle que le typage. Pour éviter l'influence de l'eau sur les mesures en spectroscopie IRTF les dépôts cellulaires sont déshydratés pendant 20 min sous vide modéré.

Les résultats obtenus sur l'influence de ces paramètres sur les mesures en spectroscopie IRTF sont en accord avec les résultats de Helm *et coll*., Naumann *et coll*. et Sandt *et coll* montrant la sensibilité et le potentiel de la spectroscopie IRTF à détecter les variabilités liées aux conditions de mesures (Naumann 1991b; Helm 1995; Sandt 2002; Sandt 2006).

2.2 La microspectroscopie IRTF : Analyse des microcolonies

La spectroscopie IRTF conventionnelle permet l'enregistrement des spectres IRTF des levures du genre *Candida* avec une bonne qualité spectrale et une très grande reproductibilité à partir d'une culture pure de 24h. Le gain de temps reste minime comparé aux techniques traditionnelles utilisées dans les laboratoires de Mycologie. La microspectroscopie IRTF peut encore améliorer la rapidité de la méthode car elle permet d'analyser des microcolonies composées de quelques milliers de cellules seulement. La résolution spatiale qu'offre la microscopie IR (>10µm) permet d'enregistrer le spectre d'une microcolonie isolée.

Donc des microcolonies de quelques dizaines de micromètres de diamètre pourraient être analysées sans étape de purification et d'enrichissement préalable. Néanmoins, un transfert sur une fenêtre transparente en IR (ex : Znse) s'avère nécessaire. Le gain de temps pourrait ainsi être doublé. Nous avons donc évalué la faisabilité de la microspectroscopie IRTF à l'identification de 6 espèces de levures du genre *Candida* en vue d'une identification précoce par rapport à la spectroscopie conventionnelle.

Lors de cette étude, nous n'avons utilisé que des cultures pures de levures identifiées préalablement et provenant de la collection interne du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Reims. Toutes les levures ont été précultivées une nuit à 37°C sur milieu SGC. Cette étape a été jugée nécessaire pour revitaliser les souches de collection conservées à –80°C. Dans un objectif de standardisation, cette étape a été appliquée à l'ensemble des souches étudiées même lorsqu'elles n'avaient pas été congelées.

Ce travail a porté sur six espèces différentes de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr, C. parapsilosis* et *C. krusei*).

Temps de culture

Comme pour les mesures en suspension, il était important de déterminer les paramètres de culture nécessaires à l'obtention de données reproductibles et suffisantes pour la classification par spectroscopie. Nous avons donc testé l'influence du temps de culture (12 à 24h) sur la croissance de six espèces de levure (Figure 34), afin d'obtenir des microcolonies de taille entre 50 et 250 µm, convenables pour l'analyse en microcpectroscopie IRTF.

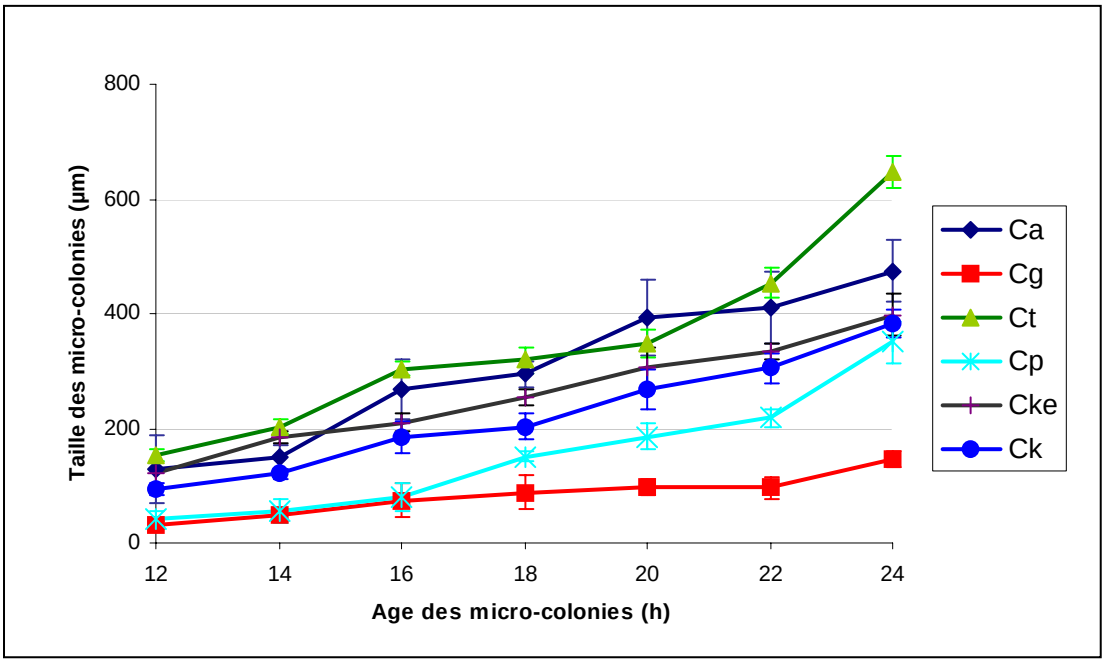


Figure 34 : Evolution de la taille des microcolonies de six espèces de *Candida* en fonction du temps de culture (12-24h) à 37°C. (Ca : *C. albicans*, Cg : *C. glabrata*, Ct : *C. tropicalis*, Cp : *C. parapsilosis*, Cke : *C. kefyr* et Ck : *C. krusei*). Chaque mesure a été répétée 3 fois.

Les résultats obtenus montrent que le temps de culture nécessaire à l'obtention d'une microcolonie exploitable en microspectrocopie IRTF est variable selon la vitesse de croissance de l'espèce considérée. Pour cela, nous avons choisi comme critère une durée de culture qui permet l'obtention des microcolonies de taille convenable (50 à 250 µm) à l'analyse spectrale pour chacune des 6 espèces étudiées (Tableau 16).

Espèces	Temps de culture (h)
C. albicans	14
C. glabrata	24
C. tropicalis	12
C. krusei	14
C. kefyr	12
C. parapsilosis	18

Tableau 16 : Temps de culture nécessaire pour l'obtention des microcolonies de *Candida spp.* exploitables pour l'analyse en microspectroscopie IRTF

Ces résultats montrent une grande variabilité de la vitesse de croissance entre les différentes espèces et dans certains cas même entre souches appartenant à la même espèce. Ainsi pour certaines souches de *C. tropicalis*, le diamètre de 100µm est atteint en 10h alors que d'autres souches produisent des microcolonies de 40-50µm dans le même temps. La croissance des souches de *C. parapsilosis* et *C. glabrata* s'est révélée la plus lente par rapport aux autres espèces de *Candida*. Pour ces deux espèces, il était nécessaire d'attendre 14 et 18h de culture respectivement.

Préparation des microcolonies pour l'analyse IRTF

Le deuxième facteur qui influence les mesures en microspectroscopie IRTF est le transfert des microcolonies sur un support adéquat. Ceci est réalisé par la production d'une empreinte sur un support transparent en IR (Znse dans notre étude). Ce transfert est réalisé en appliquant une fenêtre de Znse (25x2mm) à l'aide d'une presse permettant d'exercer une pression reproductible. Avant l'analyse IRTF, les empreintes obtenues sont déshydratées pendant 5 minutes dans une étuve à 37°C en présence d'un dessiccateur.
L'analyse en microspectroscopie IRTF en mode transmission nécessite que l'échantillon soit transparent au rayonnement infrarouge, ce qui est le cas pour des microcolonies qui ont une épaisseur de quelques micromètres. Il est donc impossible d'acquérir le spectre directement sur le milieu de culture en mode transmission en raison de la présence du milieu.

Des empreintes de colonies d'une taille comprise entre 50 et 250µm ont ainsi été obtenues en 10 à 18 h de culture à 37°C sur milieu SGC. La figure 35 présente deux empreintes de microcolonie exploitable pour les deux espèces, *C. glabrata* (Figure 35A) et *C. albicans* (Figure 35B). Les microcolonies appartenant à différentes espèces de *Candida* sont indifférenciables par un simple examen visuel.

La reproductibilité de la mesure spectrale en microscopie IR est fortement influencée par la qualité de l'empreinte et la taille de microcolonie. La qualité de l'empreinte dépend de l'épaisseur de la microcolonie, de sa forme, de sa taille, de la cohésion des cellules, de l'adhérence des cellules au milieu de culture et de la pression exercée sur la presse d'échantillonnage par le manipulateur lors du prélèvement des empreintes. Tous ces paramètres sont difficiles à contrôler et pour avoir une bonne reproductibilité des mesures ainsi qu'une bonne qualité spectrale, on élimine de notre analyse toutes les empreintes déformées (Figure 35C) ainsi que les prélèvements où des traces du milieu de culture apparaissent sur la fenêtre de mesure.

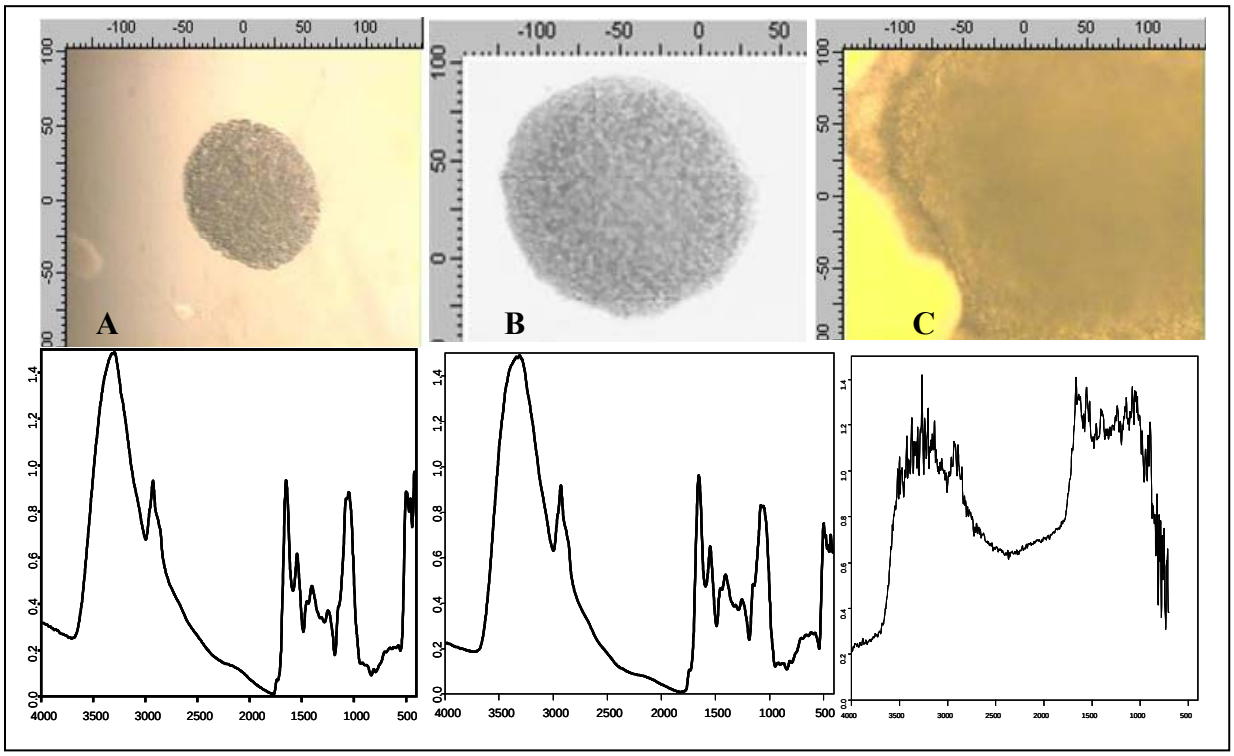


Figure 35 : Des exemples des spectres IRTF en fonction de la qualité des empreintes des microclonies. (A) *C. glabrata* (B) *C. albicans* et (C) empreinte de *C. albicans* déformée et non exploitable pour la mesure.

Ces résultats montrent l'importance de la phase de standardisation qui permet d'accéder à des mesures reproductibles et fiables en microspectroscopie IRTF.

3. Différenciation des espèces et des souches de *Candida*

Vu la complexité d'analyser un nombre important de souches et d'espèces dans une seule étape (96 souches pour 6 espèces), nous avons choisi d'effectuer notre étude en deux étapes, une première étape réalisée sur 39 souches de 4 espèces et une seconde effectuée sur 57 souches de 6 espèces.

3.1 Différenciation d'espèces à partir de mesures en suspension

Les 39 souches de notre collection ont été cultivées sur milieu SGC pendant 24h et leurs spectres enregistrés à l'aide du module MICOR-ID. Les spectres IRTF de ces souches sont analysés pour déterminer les régions discriminantes qui permettraient de différencier les spectres des différentes espèces. Selon ces régions discriminantes, les spectres sont classés par analyse en classification hiérarchique ascendante (HCA) et par analyse en composantes principales (ACP).

Recherche des fenêtres spectrales discriminantes

L'analyse préliminaire des dérivées secondes de la moyenne des spectres a permis de sélectionner 3 régions spectrales (900-1200, 1500-1780 et 2800-3000 cm^{-1}) pour lesquelles on constate à la fois une grande reproductibilité des spectres au sein d'une même espèce et une grande variabilité entre les spectres des 4 espèces étudiées (Figure 36).

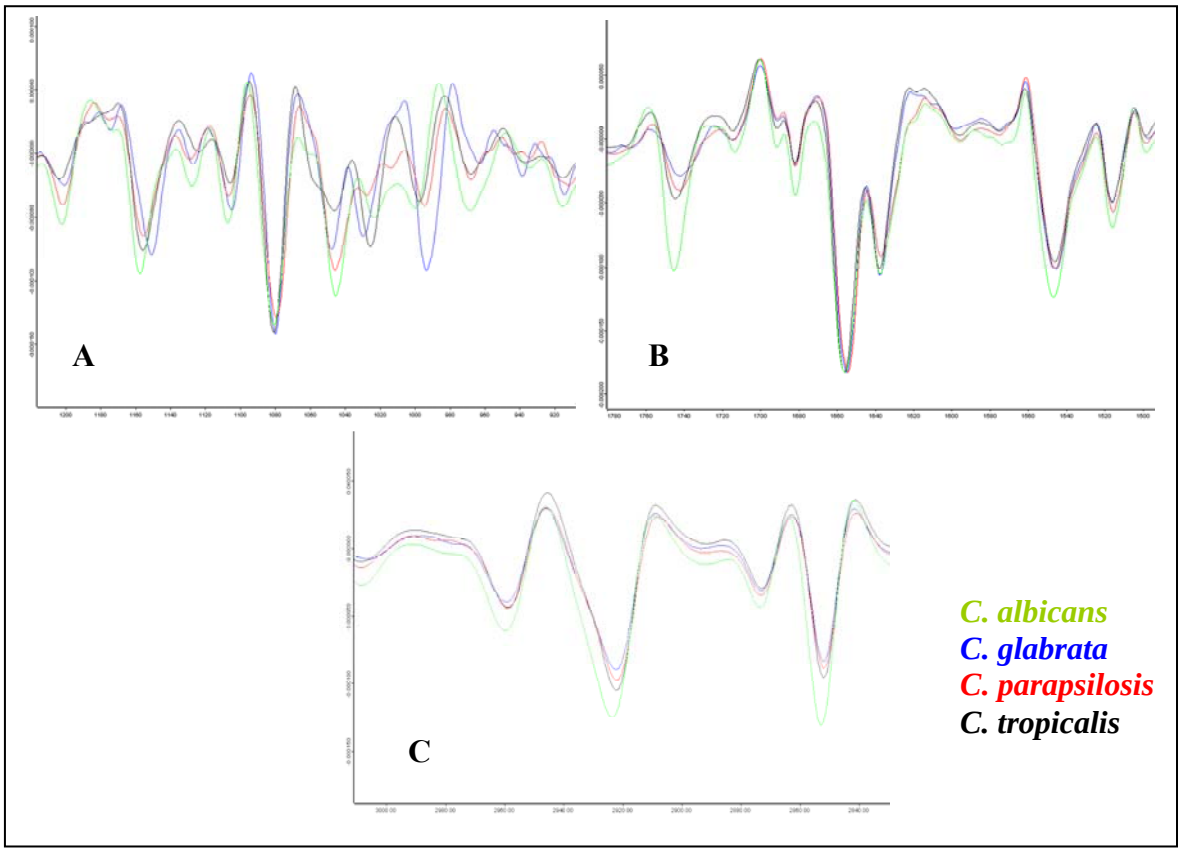


Figure 36 : Dérivées secondes de la moyenne des spectres de 4 espèces de *Candida* montrant les variations spectrales entre *C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis,* et *C. tropicalis*. (A) la région spectrale 900-1200 cm^{-1} (B) la région spectrale 1500-1780 cm^{-1} et (C) la région spectrale 2800-3000 cm^{-1}

L'analyse en classification hiérarchique (HCA) : mesures en suspenssion

En utilisant la dérivée seconde de ces 3 régions spectrales la classification hiérarchique permet de regrouper les spectres selon chaque espèce (Figure 37). D'après ce dendrogramme, il est possible de fixer un seuil maximal d'hétérogénéité pour un groupe de spectres d'une même espèce. En plaçant ce seuil d'hétérogénéité à 1,6 on peut distinguer 2 groupes incluant chacun 2 espèces :

Le groupe (G1) pour *C. albicans* et *C. tropicalis.*

Le groupe (G2) pour *C. glabrata* et *C. parapsilosis.*

En diminuant le seuil d'hétérogénéité à 0,6, on peut séparer directement les spectres en 4 clusters incluant chacun les spectres d'une seule espèce.

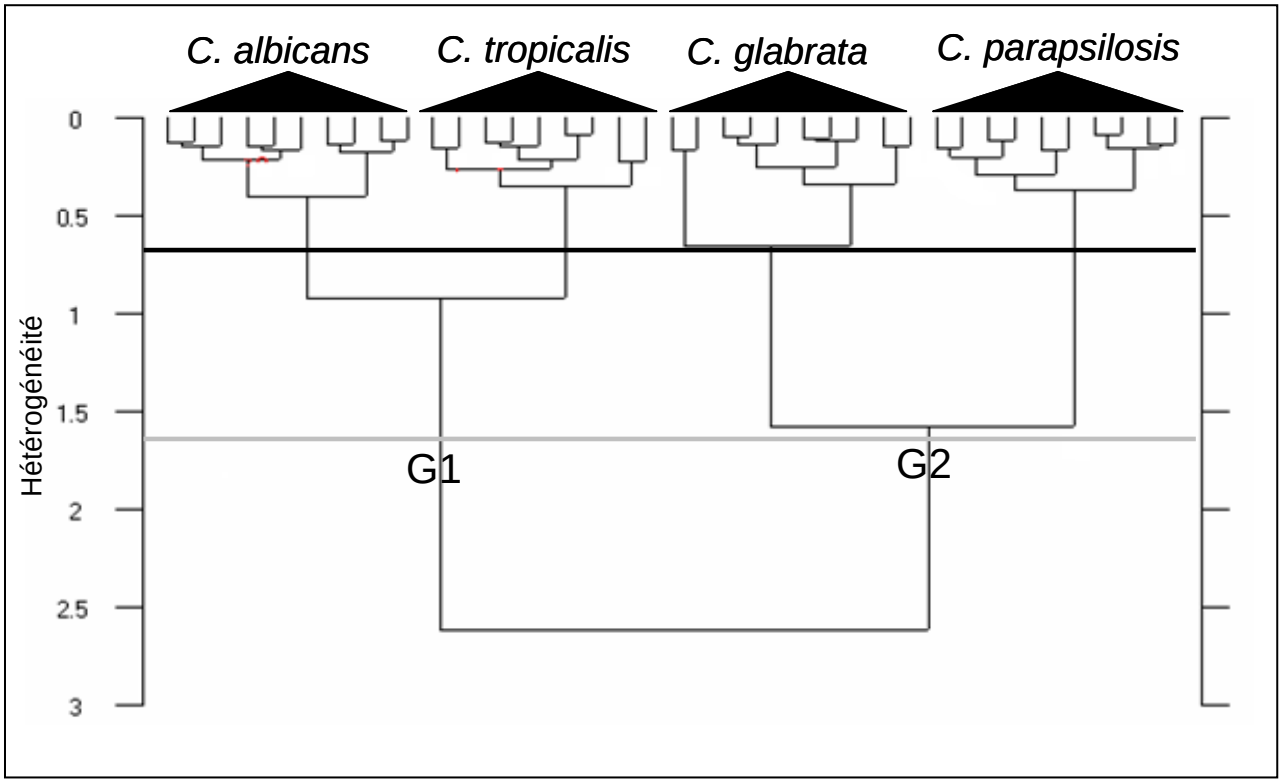


Figure 37 : Classification hiérarchique des spectres de 4 espèces de *Candida* en dérivée seconde et en combinant les 3 régions spectrales 900-1200, 1500-1780 et 2800-3000 cm^{-1}. Les lignes grise et noire représentent respectivement les seuils d'hétérogénéité à 1,6 et 0,6.

La comparaison de ces 3 régions spectrales (Figure 36), révèle que la région des polysaccharides, situé entre 900 et 1200 cm^{-1}, présente le plus de variabilité spectrale entre les 4 espèces. Pour conforter cette observation en terme de pouvoir discriminant, nous avons refait une classification hiérarchique de la totalité des spectres en se basant seulement sur cette région spectrale. D'après le dendrogramme obtenu en Figure 38, nous pouvons séparer complètement les 4 espèces à partir d'un seuil d'hétérogénéité de 1, supérieur à celui observé avec la combinaison des trois fenêtres spectrales (Figure 37). Cette variation dans le niveau d'hétérogénéité est expliquée essentiellement par la concentration des marqueurs spectraux caractéristique de l'espèce dans la région spectrale 900-1200 cm^{-1}. Ceci indique l'importance des composés polysaccharidiques dans la différenciation entre les espèces du genre *Candida*.

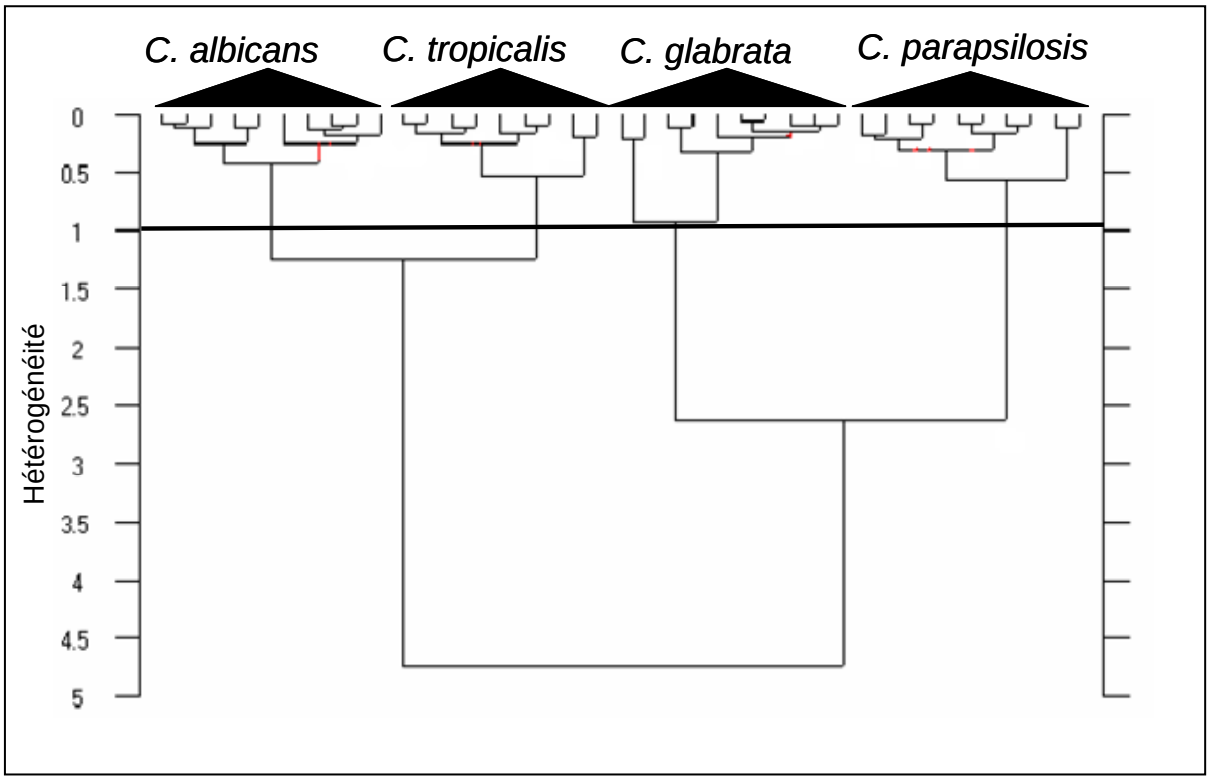


Figure 38 : Classification hiérarchique des spectres de 4 espèces de *Candida* en dérivée seconde et en utilisant la région des polysaccharides 900-1200 cm^{-1}. La ligne noire représente le seuil d'hétérogénéité égal à 1 permettant la séparation des 4 clusters.

L'analyse en composantes principales (ACP) : mesures en suspension

Ce résultat est confirmé par une autre approche d'analyse des données basée sur l'ACP des dérivées secondes des spectres moyens dans la région 900-1200 cm^{-1}. Une séparation nette des spectres en quatre groupes appartenant chacun à une espèce différente a été obtenue. La différenciation entre les 4 espèces est correcte à 100% en utilisant les composantes principales 2 et 3 (Figure 39). On constate une nette séparation entre les spectres et on distingue 4 groupes de points incluant chacun les spectres d'une seule espèce. Au sein de chaque groupe de spectres les points sont peu superposables et ceci reflète la variabilité spectrale au sein d'une même espèce. La spectroscopie IRTF possède donc non seulement le pouvoir de discrimination au niveau de l'espèce mais aussi au niveau des souches appartenant à une même espèce.

D'autres analyses en ACP ont été effectuées en se basant sur d'autres régions spectrales et sur d'autres composantes principales (4, 5 et 6). La comparaison des résultats obtenus montre que

la séparation entre les 4 espèces est plus prononcée avec la région spectrale 900-1200 cm^{-1} et les composantes principales 2 et 3.

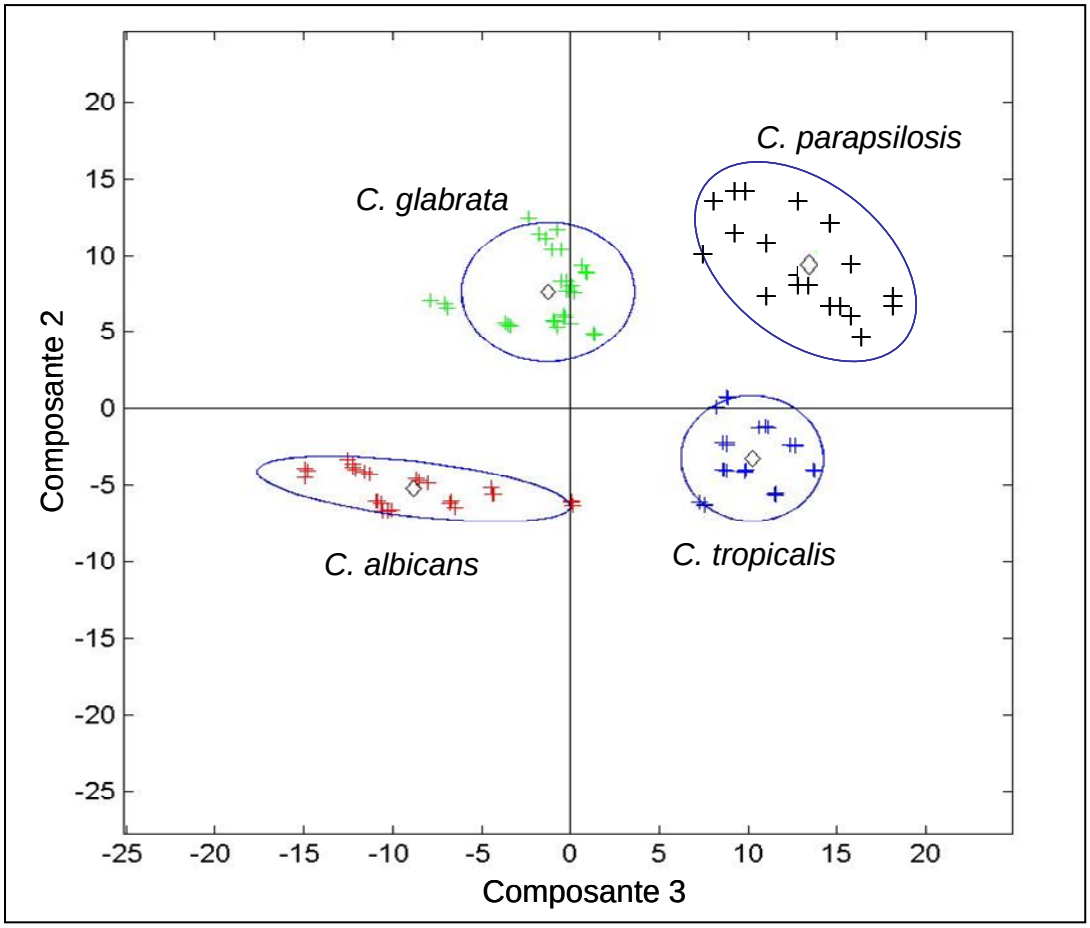


Figure 39 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur la région 900-1200cm^{-1} en utilisant la dérivée seconde des spectres moyens de 4 espèces de *Candida*. Les ellipses sont calculées pour un intervalle de confiance de 95% (◇: barycentre des points)

La composante 2 semble porter la variance, entre espèces tandis que la composante 3, qui capture une plus faible partie de la variance permet la séparation entre souches. Ceci est compatible avec l'hypothèse d'une faible hétérogénéité entre spectres d'une même espèce.

3.2 Typage à partir de mesures en suspension

Pour mieux mettre en évidence la capacité de la spectroscopie IRTF à détecter les variabilités entre souches au sein de la même espèce, nous avons comparé par ACP, 9 souches de l'espèce *C. glabrata* en utilisant la même région spectrale (900-1200 cm^{-1}) et les mêmes composantes principales (2 et 3). Le résultat obtenu en Figure 40 montre qu'on peut

différencier les spectres de chaque souche. Les distances entre les souches sont plus faibles que celles obtenues lors de la comparaison entre les espèces et cette observation est attribuable au fait que la variabilité intra-espèce est plus faible que la variabilité inter-espèce.

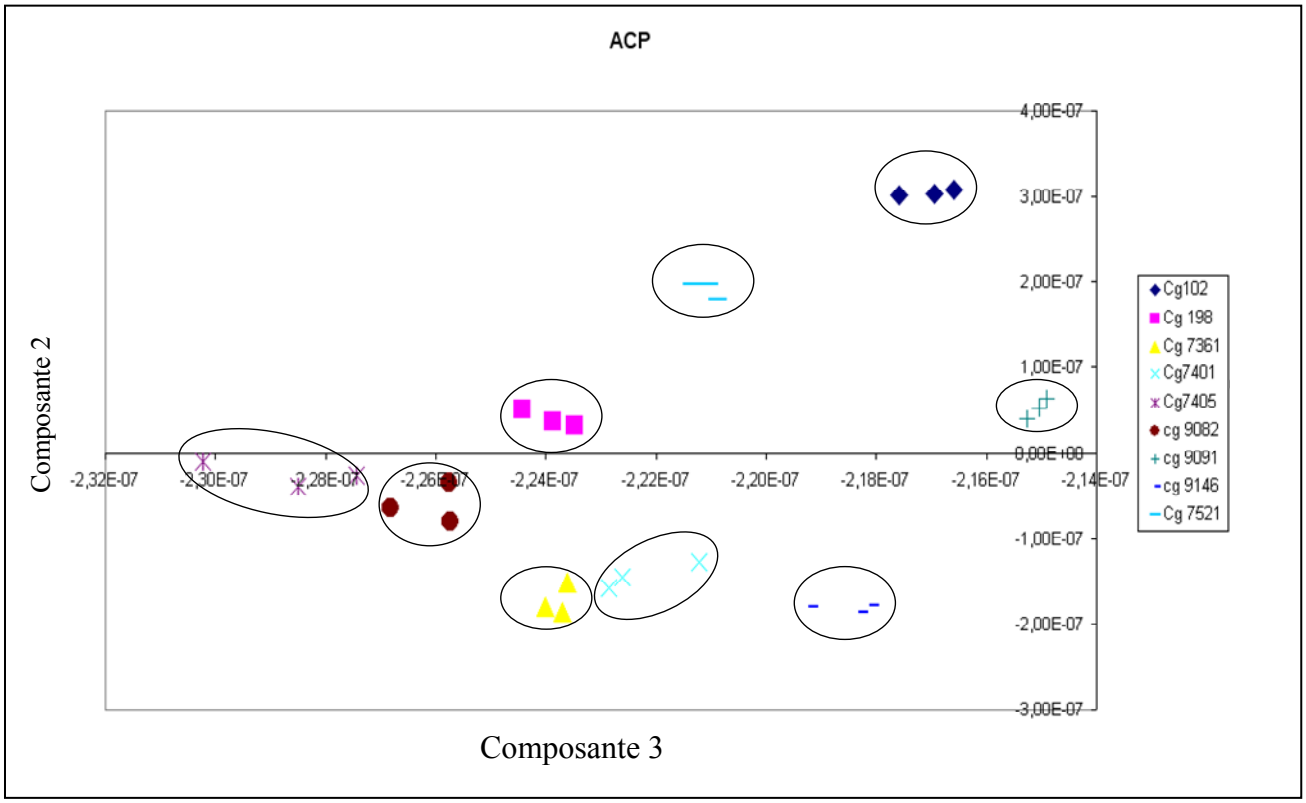


Figure 40 : ACP réalisée en utilisant la région 900-1200 cm^{-1} des dérivées seconde des spectres moyens de 9 souches de *C. glabrata*.

Les composantes principales 2 et 3 présentent des éléments discriminants dans toutes les régions du spectre, les plus importants étant situés dans la région des sucres et la région des protéines (bandes amide I et II).

D'après cette étude, la spectroscopie IRTF se révèle capable de discriminer les 4 espèces appartenant au genre *Candida*. Le pouvoir discriminant de cette technique a permis de détecter de subtiles variabilités entre les souches de chaque espèce, ce qui prouve que cette technique possède aussi le potentiel pour le typage des souches appartenant à une même espèce. Il faut noter également que l'utilisation du spectre entier ne permet pas dans tous les cas d'aboutir à une meilleure classification car les caractères spectraux caractéristiques de l'espèce sont concentrés dans la région des sucres. Cette région reflète l'importance de la

paroi fongique (15-30% de la masse sèche), riche en polysaccharides complexes (chitine, β-glucan et mannoprotéines essentiellement) dans la caractérisation de l'espèce et de la sous-espèce.

3.3 Différenciation des espèces par microspectroscopie à partir des microcolonies

Dans le but d'identifier précocement les quatre espèces de *Candida*, nous avons appliqué la microspectroscopie IRTF à l'étude de microcolonies de levures âgées de 10 à 18 h. Nous avons évalué les variabilités spectrales et comparé les résultats avec ceux obtenus à partir des suspensions déshydratées.

Recherche des fenêtres spectrales discriminantes

Les spectres des microcolonies obtenus à partir des 39 souches représentant les quatre espèces du genre *Candida* (les mêmes souches étudiées en spectroscopie conventionnelle) ont été enregistrés. Un total de 195 spectres a pu être exploité après élimination des spectres de mauvaise qualité. Lors de cette évaluation, 1 à 5 cultures indépendantes ont été réalisées pour chaque souche et 5 à 10 microcolonies ont été mesurées pour chaque culture. Les spectres de microcolonies ont été enregistrés dans les conditions optimales de mesure (conditions de culture, paramètres d'acquisition spectrale et échantillonnage), décrites précédemment.
L'analyse a porté comme auparavant sur la dérivée seconde des spectres moyennés. L'analyse préliminaire des spectres a permis de chercher les zones spectrales à variabilité élevée. La figure 41 présentent les dérivées secondes des spectres moyennés de quatre espèces dans les trois régions spectrales (900-1200, 1500-1780 et 2800-3000 cm^{-1}), les différences sont nettement visibles entre les spectres des quatre espèces dans les trois régions sélectionnées. Les variations les plus intenses sont observées dans la région des sucres 900-1200 cm^{-1} et la région des protéines 1500-1800 cm^{-1}. Ceci est en accord avec les observations faites à partir des données issues des spectres des suspensions.

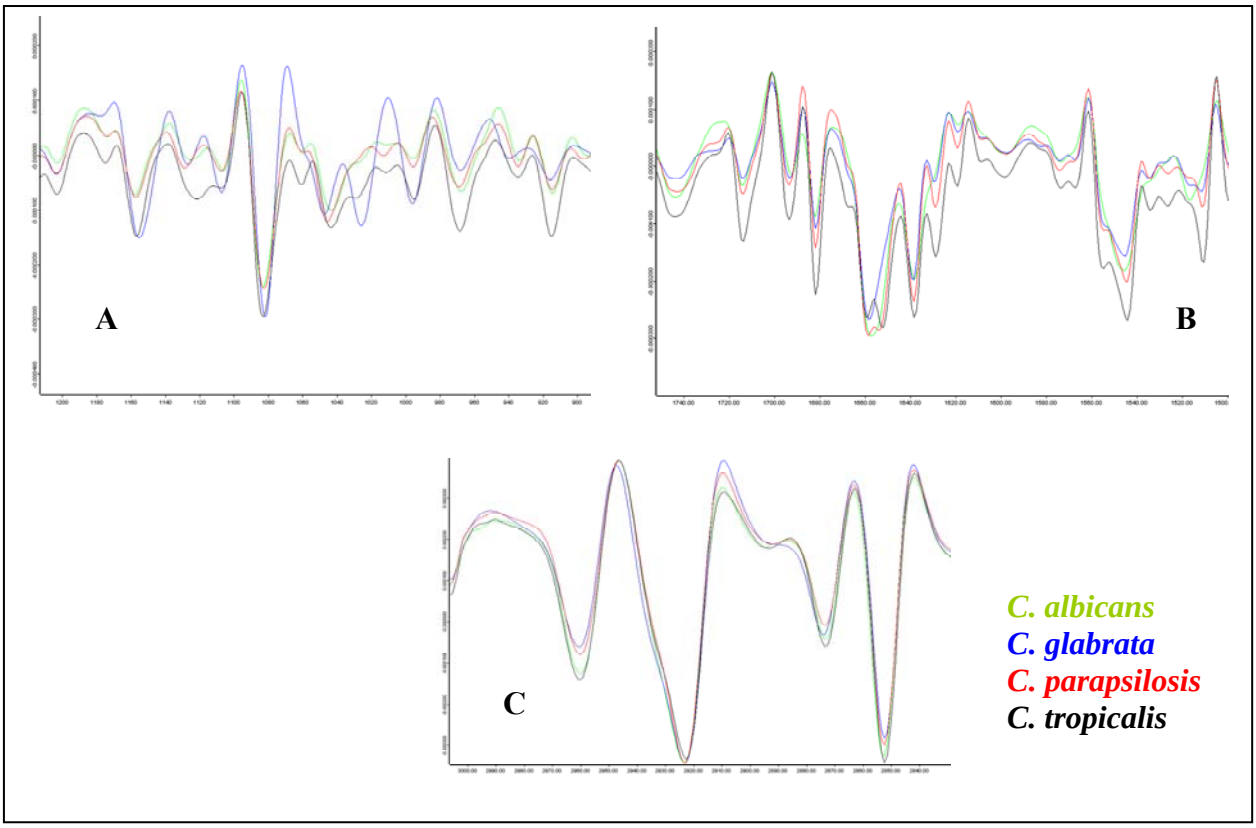


Figure 41 : Dérivées secondes des moyennes des spectres de microcolonies de 4 espèces de *Candida* montrant les variations spectrales entre *C. albicans, C. glabrata, C. Parapsilosis,* et *C. tropicalis*. (A) la région spectrale 900-1200 cm^{-1} (B) la région spectrale 1500-1780 cm^{-1} et (C) la région spectrale 2800-3000 cm^{-1}

L'analyse en classification hiérarchique (HCA) : mesure en microcolonie

La classification hiérarchique, réalisée à partir des dérivées secondes des spectres de microcolonies sur les 3 régions spectrales sélectionnées, permet de distinguer 2 groupes de spectres (G1 et G2) à partir d'un seuil d'hétérogénéité de 1,4 (Figure 42) :

- Le groupe 1 (G1) contenant les spectres des souches de *C. glabrata* et de *C. parapsilosis* avec une séparation correcte de 100% en se basant sur un seuil d'hétérogénéité de 0,8.
- Le groupe 2 (G2) contenant les spectres de *C. albicans, C. tropicalis* mais aussi deux souches de *C. glabrata* mal classées. A partir du seuil d'hétérogénéité de 0,8, tous les spectres de l'espèce *C. albicans* forment un seul « cluster », ce qui n'est pas le cas des spectres de *C. tropicalis* car ils regroupent également deux spectres d'une autre espèce (*C. glabrata* les souches 102 et 7521) qui sont mal classés.

Pour améliorer la classification au sein de ce groupe nous avons refait la classification en choisissant uniquement la région des sucres (900-1200cm^{-1}), car cette région s'étant avérée plus discriminante dans le cas des suspensions.

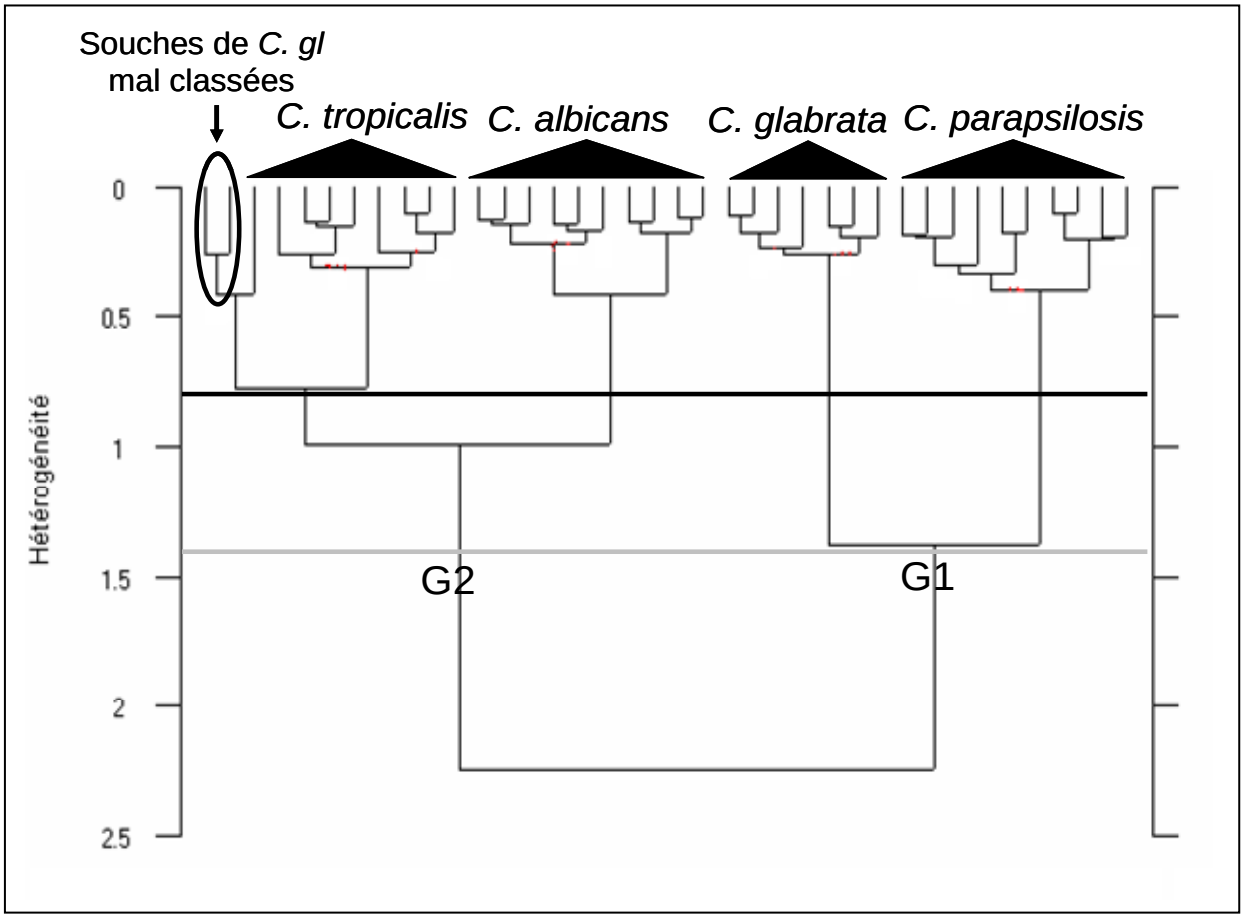


Figure 42 : Classification hiérarchique des spectres de microcolonies de 4 espèces de *Candida* en dérivée seconde et en utilisant les 3 régions spectrales discriminantes 900-1200, 1500-1780 et 2800-3000 cm^{-1}. Les lignes grise et noire représentent respectivement les seuils d'hétérogénéité à 1,4 et 0,8.

D'après le dendrogramme obtenu (Figure 43), il est possible de fixer un seuil maximal d'hétérogénéité pour chaque groupe de spectres d'une même espèce. En plaçant ce seuil à 1, on peut distinguer 4 clusters incluant chacun les spectres d'une même espèce. On peut ainsi différencier les 39 souches selon l'espèce sur la base des spectres obtenus par microscopie IR et en se basant uniquement sur la région des polysaccharides.

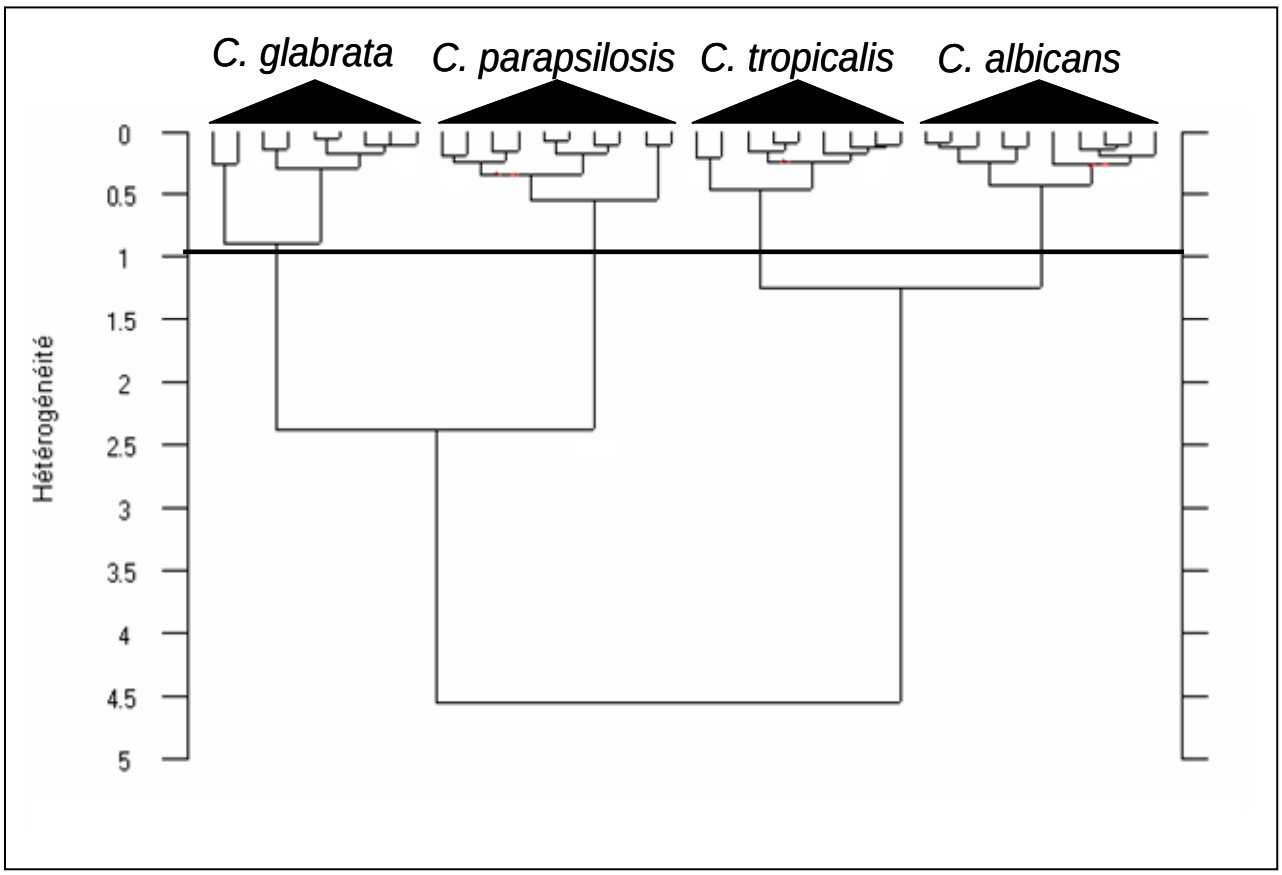


Figure 43 : Classification hiérarchique des spectres de microcolonies de 4 espèces de Candida en dérivée seconde et en utilisant la région spectrale 900-1200 cm^{-1}. La ligne noire représente le seuil d'hétérogénéité fixé à 1.

L'analyse en composantes principales (ACP) : mesure en microcolonies

La séparation des spectres de ces quatre espèces est également possible par comparaison des spectres en ACP dans la région des sucres comme effectuée précédemment avec les suspensions. Encore une fois, les composantes principales 2 et 3 (Figure 44) permettent de retrouver quatre clusters correspondant chacun à une espèce différente. Les données issues de la microscopie IRTF sont donc exploitables pour la différenciation des espèces de *Candida* et ceci a un stade précoce (10 à 18h), car comme pour les suspensions, la variabilité inter-espèces est supérieure à la variabilité intra-espèces.

Les variabilités entre les souches de chaque espèce peuvent être détectées, mais sont insuffisantes pour effectuer un typage au niveau des souches de *Candida*.

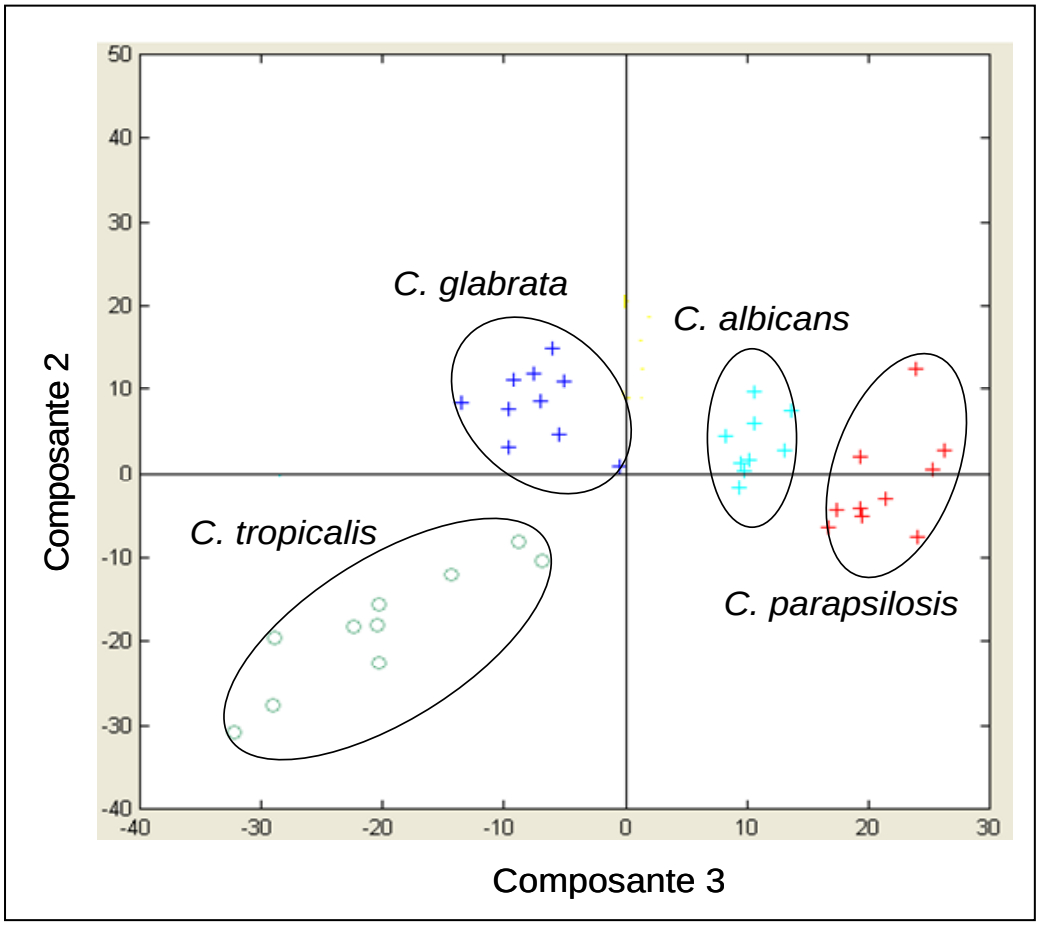


Figure 44 : Analyse en composantes principales réalisée sur la région 900-1200 cm^{-1} en utilisant la dérivée seconde des spectres moyennés de microcolonies de 4 espèces de *Candida*. Les ellipses sont calculées pour un intervalle de confiance de 95%.

Pour les mesures en microcolonies on note également que l'utilisation du spectre entier ne permet pas d'aboutir à la meilleure classification et c'est la région des polysaccharides qui se révèle plus discriminante.

Donc grâce à la microspectroscopie IRTF, il est possible d'obtenir des spectres à partir de microcolonies sans passer par une étape d'enrichissement de la culture. Ceci a permis de réduire le temps d'analyse nécessaire pour l'identification de ces agents pathogènes et qui peut être divisé par deux par rapport à la mesure sur des suspensions.

3.4 Typage à partir de mesures en microcolonies

Lors de cette étude, nous avons tenté de faire un typage sur une collection de 10 souches de *C. glabrata* par microspectroscopie IRTF. Le pourcentage de bonne classification obtenu était inférieur à 40% et donc très faible, ceci malgré l'utilisation de la région des polysaccharides qui est la plus discriminante.

La séparation au niveau de la souche n'a pas été possible pour les mesures à partir des microcolonies. En effet, ceci peut être expliqué par la qualité du spectre en microspectroscopie IRTF. Des microcolonies de tailles différentes génèrent diverses aberrations optiques (signal sur bruit trop faible, opacité, diffraction, diffusion…) même lorsque celle-ci est comprise entre 50 et 250 µm de diamètre. De plus il n'a pas été possible de corriger parfaitement ces aberrations lors du traitement des spectres.

Il faut noter aussi que la réalisation des empreintes de microcolonies de levures reproductibles de bonne qualité reste une tâche délicate. La fenêtre de ZnSe est appliquée sur la gélose à l'aide d'une presse conçue pour exercer des pressions équivalentes à chaque prise d'empreinte. Cependant, la reproductibilité n'est pas parfaite. Les empreintes obtenues sont souvent très déformées et étalées, donnant des absorbances trop faibles ou de fortes aberrations optiques. De plus, les contraintes de cisaillement et d'adhérence à la gélose ne sont pas parfaitement contrôlées. L'automatisation du processus de transfert des microcolonies pourrait augmenter la reproductibilité de la mesure spectrale en éliminant les imperfections dues à la réalisation manuelle de l'empreinte.

4. Comparaison entre la spectroscopie conventionnelle et la microspectroscopie IR

La comparaison entre les deux modes de mesures montre qu'il existe des différences entre les spectres de microcolonies et les spectres obtenus à partir de suspensions. La principale différence est située au niveau des absorbances des échantillons. Les spectres de microcolonies présentent des faibles valeurs d'absorbance variant entre 0,2 et 0,8 (Figure 45).

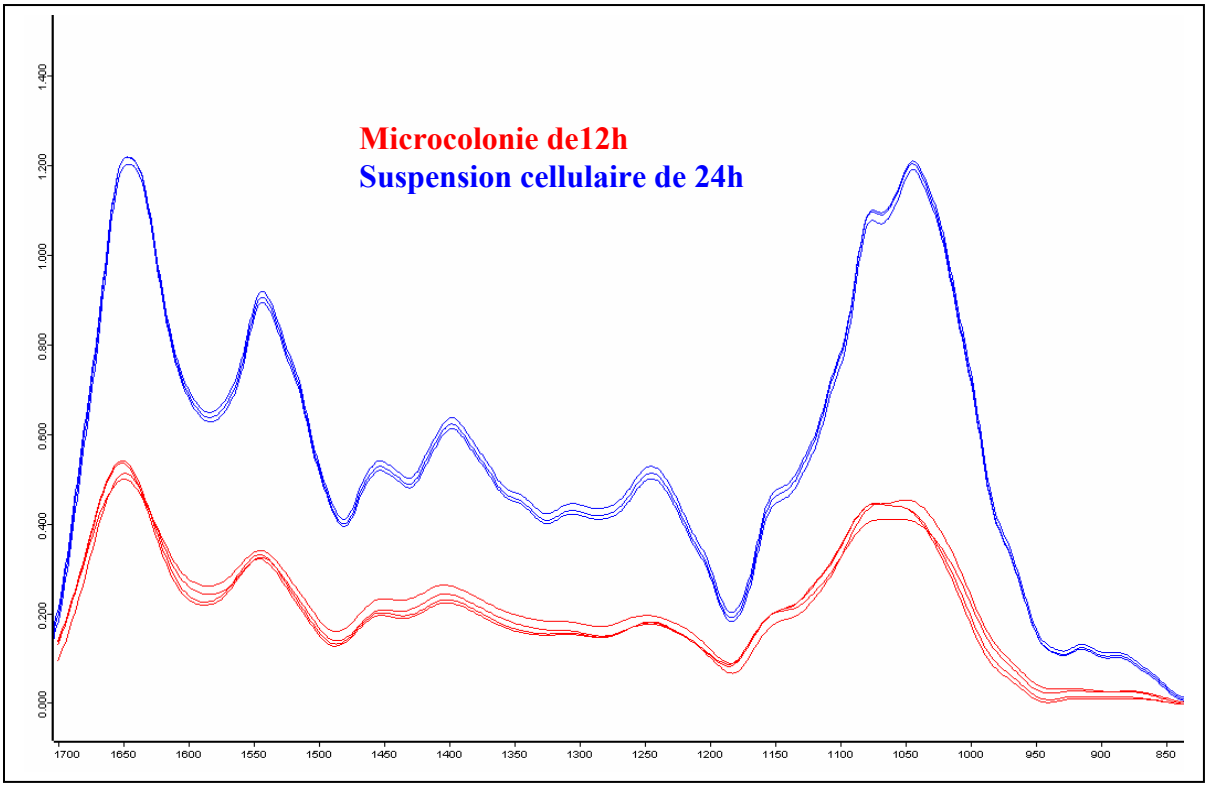


Figure 45 : Comparaison des spectres de la souche *C. albicans* 1712 obtenus à partir d'une microcolonie de 12h et d'une suspension cellulaire de 24h sur milieu SGC.

Cette disparité au niveau de l'absorbance complique la comparaison des spectres de microcolonies. Des altérations du rapport entre les pics peuvent être observées entre les spectres de microcolonies absorbant faiblement ou fortement. Ces déformations ne sont pas totalement corrigées lors du traitement du spectre.

L'hétérogénéité d'une colonie peut également influencer la reproductibilité du spectre et générer des variabilités spectrales non négligeables. La composition des microcolonies peut varier du centre à la périphérie et de la base au sommet. Cette hétérogénéité est reflétée dans les spectres infrarouge pour des colonies de plus de 100µm de diamètre (Choo-Smith 2001; Ngo Thi 2007).

Les différences entre les spectres des microcolonies et les spectres des suspensions sont dues également à d'autres paramètres essentiellement à l'âge des cellules (24h pour la spectroscopie conventionnelle et 10-18h pour la microspectroscopie), aux protocoles d'échantillonnage employés pour chaque méthode et aux sensibilités différentes des détecteurs DTGS et MCT.

5. Conclusion

Nous avons acquis les spectres IRTF des souches de *Candida* et montré que leur différenciation est plus efficace lorsque les souches sont cultivées dans les mêmes conditions. Bien que la classification des spectres ne soit que partiellement affectée par certains paramètres, nous avons choisi de standardiser toutes les conditions de culture, de mesure et d'acquisition pour avoir une bonne reproductibilité spectrale.

Dans cette étude préliminaire nous avons démontré également que 39 souches appartenant à 4 espèces de *Candida* fréquemment isolées en milieu clinique peuvent être différenciées par spectroscopie IRTF. La séparation est possible au niveau de l'espèce par spectroscopie conventionnelle en analysant des cultures de 24h et aussi par microspectroscopie en analysant des microcolonies de 10-18h de culture. Ces deux approches permettent de réduire le temps d'analyse nécessaire pour l'identification de ces agents pathogènes.

La spectroscopie conventionnelle présente des caractéristiques adaptées à une utilisation comme méthode d'identification des espèces de *Candida* dans le cadre des applications cliniques. Le pouvoir de discrimination de cette méthode est également suffisamment élevé pour envisager son utilisation pour le typage de plusieurs espèces de *Candida.* L'utilisation de la spectroscopie IRTF comme méthode de typage à partir de suspensions va être évalué dans le chapitre suivant pour 3 espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*).

A la fin de cette partie nous avons initié le travail sur la construction d'une base de données pour l'identification des différentes espèces de *Candida*. Cette base comprend les spectres de plusieurs souches de *Candida* isolées et identifiées en milieu clinique. A ce stade, nous avons incorporé quatre espèces, 39 souches et 39 spectres. Il est fondamental d'accroître le nombre d'espèces et de souches représentatives des espèces inclues dans cette base de données pour améliorer l'efficacité de cette méthode d'identification.

Publication: 1

Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy

Mohammed Essendoubi, Dominique Toubas, Mohamed Bouzaggou, Jean-Michel Pinon, Michel Manfait, Ganesh D. Sockalingum

Biochimica Biophysica Acta 1724 (2005) 239 – 247.

Received 28 February 2005; received in revised form 19 April 2005; accepted 21 April 2005
Available online 11 May 2005.

PREAMBULE A L'ARTICLE 1

CONTEXTE

Après la standardisation, la mise au point des approches et l'étude préliminaire sur l'identification qui a été réalisée par spectroscopie et par microspectroscopie IRTF de 39 souches appartenant à 4 espèces du genre *Candida*, nous montrons dans cette partie une application à un nombre plus important de souches et d'espèces. Pour cela, les deux approches ont été appliquées à une collection d'un plus grand nombre de souches appartenant à 6 espèces du genre *Candida*. Nous évaluons le potentiel de la technique à l'identification des espèces de *Candida* afin de les différencier à partir de mesures en suspension ou à partir de microcolonies.

METHODE

L'étude a été réalisée sur 57 souches cliniques appartenant à six espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr, C. parapsilosis* et *C. krusei*). Les spectres de transmission ont été enregistrés à l'aide du spectromètre de recherche Bruker Equinox 55 (Wissembourg, France) selon le protocole mis au point précédemment.

Les mesures en spectroscopie ont été réalisées à partir des cultures pures de 24 heures pour la spectroscopie conventionnelle et à partir de microcolonies âgées de 10 à 18h pour la microspectroscopie. Afin de différencier entre les 6 espèces, nous nous sommes particulièrement intéressé aux variations spectrales liées à la composition moléculaire et structurale de chaque espèce. Les spectres des souches de notre collection ont été comparés à l'aide de l'analyse hiérarchique (HCA).

RESULTATS

Les résultats montrent des variations spectrales entre les 6 espèces de *Candida* principalement détectées dans les régions suivantes : 900-1200 cm^{-1} (polysaccharides) et 1500-1800 cm^{-1} (protéines). L'analyse statistique (HCA) des données spectrales basée, sur les dérivées secondes et sur les régions discriminantes, a permis de différencier les 6 espèces de *Candida* aussi bien à partir des suspensions qu'à partir des microcolonies.

Les résultats montrent l'efficacité de la (micro)spectroscopie IRTF dans l'identification des espèces de *Candida* où l'on a obtenu un taux de classification de 100% par les deux approches.

CONCLUSION

Le pouvoir discriminant de la spectroscopie infrarouge a été confirmé dans cette étude portant sur l'identification des six espèces de levure du genre *Candida*. Les 57 souches ont pu être classées correctement et nous avons détecté également des variations spectrales intraspécifiques (entre les souches de la même espèce). Ceci constitue une forte incitation à la poursuite de travaux sur cette technologie pour le typage des souches de *Candida*. Néanmoins, il est important de noter que le typage nécessite un taux élevé de reproductibilité et qu'il ne sera possible qu'à partir des spectres issus des suspensions cellulaires.

Cette étude nous a également permis de compléter la base de données spectrales constituée lors de l'étude préliminaire et aussi de représenter dans cette base d'autres espèces comme *C. krusei* et *C. kefyr* qui présentent un intérêt clinique. Cette technique pourra être appliquée à l'identification ainsi qu'au typage de souches de *Candida* pour des applications médicales. Cependant, l'application en routine de cette technique requiert la construction d'une base de données extensive et complète. Ceci ne sera possible qu'avec le concours du laboratoire de Mycologie clinique (ou par une étude multi-centrique) qui fournira les souches nécessaires à l'établissement de cette base ainsi que l'utilisation d'un système d'analyse Infrarouge à haut débit afin d'analyser un nombre important de souches en temps réel et dans les mêmes conditions.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

Biochimica et Biophysica Acta 1724 (2005) 239 – 247

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA

BBA

http://www.elsevier.com/locate/bba

Minireview

Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy

Mohammed Essendoubi[a], Dominique Toubas[b], Mohamed Bouzaggou[a], Jean-Michel Pinon[b], Michel Manfait[a], Ganesh D. Sockalingum[a,*]

[a]*Unité MéDIAN, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, IFR53, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France*
[b]*Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, UFR de Médecine, IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France*

Received 28 February 2005; received in revised form 19 April 2005; accepted 21 April 2005
Available online 11 May 2005

Abstract

Due to the continuous increase of human candidiasis and the great diversity of yeasts of the *Candida* genera, it is indispensable to identify this yeast as early as possible. Early identification enables an early diagnostic and patient-adapted anti-fungal therapy, thus reducing morbidity and mortality related to these infections. In view of this, we have in this study investigated microcolonies using a method based on Fourier transform-infrared microspectroscopy (FTIRM) for a rapid and early identification of the most frequent *Candida* species encountered in human pathology. FTIR spectroscopy is a whole-cell "fingerprinting" method by which microorganisms can be identified. By exploiting the huge discriminating capacity of this technique, we identified 6 species (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida kefyr*) from a collection of 57 clinical strains of *Candida*, isolated from hospitalised patients. Data obtained on 10- to 18-h-old microcolonies were compared to cultures of 24 h. Our results clearly show the efficiency and the robustness of FTIR (micro)spectroscopy in identifying species with a classification rate of 100% for both microcolonies and 24-h cultures. FTIR microspectroscopy is thus a promising clinical approach, because compared to conventional and molecular techniques, it is time and money saving, has great identification and discriminating potentials, and is amenable to an automated high-throughput routine system.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Candida* species; Early identification; Microcolony; Fourier transform-infrared (micro)spectroscopy

1. Introduction

Candida is the fourth most commonly recovered organism from all blood cultures of hospitalised individuals, with an estimated crude mortality rate of 38 to 75% [1–4]. Nosocomial candidiasis, recognized as an important cause of morbidity and mortality, have been mainly described in neutropenic patients as well as in intensive care and post-surgery units [5–7]. The majority of candidemia is due to *Candida albicans* [3,4] but, many reports have documented an increasing incidence of *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, and *Candida kefyr* as nosocomial pathogens [8]. These species cause fungal infections particularly in neonatal intensive care and in neutropenic patients [1,2,4,9].

The time required for the identification of pathogens is an important determinant of infection-related mortality rates of hospitalised patients. Death rates and costs associated with infectious diseases could be significantly reduced by employing rapid identification techniques [10,11]. Most commercially available identification systems used in routine are based on physiological (morphology, growth temperature. . .) and nutritional (sugar assimilation and/or fermentation, enzymatic tests) characteristics. However, these conventional methods present delays in identification and limits to discriminate two closely-related species. Consequently, up to 5 days (for *Candida* species) between the receipt of patient material and presentation of identification results to the clinician can be expected [11,12].

* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 91 35 53; fax: +33 3 26 91 35 50.
E-mail address: ganesh.sockalingum@univ-reims.fr (G.D. Sockalingum).

0304-4165/$ - see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbagen.2005.04.019

Novel genotypic approaches to the rapid identification of clinically relevant microorganisms are finding their way into the field of clinical diagnostic microbiology [13,14]. For example, the amplification of specific gene sequences by PCR, such as randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), and inter-genic ribosomal PCR, or other PCR-based methods targeting various genes have been successfully used to identify *Candida* species. Although widely accepted, these techniques present some technical limits due to protocol complexities, reagent costs, choice of specific primers for each species, sensitivity to mutations, and are not up to now applied in routine [11–13].

A radically different approach to the development of identification methods is based on optical spectroscopic techniques. Fourier transform infrared (FTIR) and Raman spectra constitute highly specific spectroscopic fingerprints of microorganisms by which they can be identified [11,15]. This approach represents an analytical, non-destructive, and dynamic method to investigate a population of whole cells with only little biomass [11,15,16]. It permits not only the identification and characterisation of microbial cells (phenotype, species, sub-species, pathogenicity, virulence…) [17–19] but also a detailed structural analysis to identify certain macromolecules (nature, quantity, and conformation of molecular links) present in the cells [20].

In this study, we have applied Fourier transform infrared (micro)spectroscopy (FTIRM) for the rapid and accurate identification of clinically relevant *Candida* species, the main objective being to achieve an early and rapid identification of the most frequent *Candida* species in human pathology. FTIR data from pure 24-h cultures were used for comparison with those obtained rapidly (10–12 h) from growing microcolonies by FTIRM.

2. Materials and methods

2.1. Origin of the strains

Fifty seven *Candida* strains were provided by the Mycology Laboratory of Reims University Hospital, Reims, France. These strains were isolated from different hospitalised patients and identified by commercial systems (Auxacolor® and culture on PCB medium Bio-Rad Marnes-la-Coquette, France). Isolated strains were stored at room temperature in water until spectroscopic identification. For longer preservation, these strains were frozen at −80 °C in Sabouraud broth (bioMérieux Marcy l'Etoile France) with 10% glycerol (Sigma, St. Quentin Fallavier, France).

2.2. Culture conditions and sample preparation

For FTIR spectroscopy and measurements on suspensions, *Candida* spp. were cultured on Sabouraud-gentamicin-chloramphenicol agar (bioMérieux France) at 37 °C for 24 h. Cells were harvested by carefully scraping the agar plate with a 10 μl plastic loop and were resuspended in 1 ml of distilled water. The concentration of each suspension was spectrophotometrically measured (Uvikon; Kontron Instruments, Thiais, France) at 500 nm and adjusted to an optical density of 3 ± 0.1 to control film thickness. An aliquot of 35 μl of the suspension was transferred to a zinc selenide (ZnSe) optical carrier, with 16 positions (Fig. 1A) in a multisampling cuvette and dried in a desiccator over a drying agent with the application of a moderate vacuum (2.5 to 7.5 kPa) to form a thin transparent film suitable for FTIR measurements. Sample desiccation was necessary to avoid strong water absorption in the protein region of the infrared spectra.

For IR microspectroscopy measurement on microcolonies, *Candida* strains were cultured for 10 to 18 h (depending of the species), in order to obtain microcolonies between 50 and 250 μm in diameter. The microcolonies were transferred manually from the agar plate to an IR-transparent ZnSe optical window by gently pressing the plate onto the agar surface with a specially designed stamping device (Fig. 1B). The microcolony imprint on the IR-transparent window (Fig. 1C) was then placed under the infrared microscope, visualised, and measurements were performed on intact microcolonies with approximately the same size.

2.3. Recording of spectra and data processing

2.3.1. FTIR spectroscopy

Mid-infrared spectra were recorded using an Equinox 55 (Bruker Optics, Wissemburg, France) spectrometer coupled to a MICOR-ID sample changer (Bruker Optics) specially designed for the measurement of microorganisms, and which can accommodate the 16-position ZnSe sample carrier. The whole set-up is continuously purged with dry air generated by a model 75–62 FTIR spectroscopy purge gas generator (Whatman, Villeneuve d'Ascq, France) to reduce contributions from water vapour and CO_2. FTIR spectra were recorded in the region between 500 and 4000 cm^{-1}. For each FTIR spectrum, 64 scans were co-added and averaged. Fourier transformation was done using a Blackmann-Harris 3-term apodization function and a zerofilling factor of 4, to give a nominal resolution of 6 cm^{-1}. FTIR recording of 15 samples takes about 30 min under these conditions. Mean spectra were calculated from 3 repetitive measurements of the same culture, and in order to determine the reproducibility of our results, we have done 3 independent cultures.

2.3.2. FTIR microspectroscopy

Micro-FTIR spectra were collected using an IR microscope (IR Scope II Bruker Optics) coupled to the Equinox 55 spectrometer. The microscope was equipped with a motorized x–y stage, two Cassegrainian objectives (15×

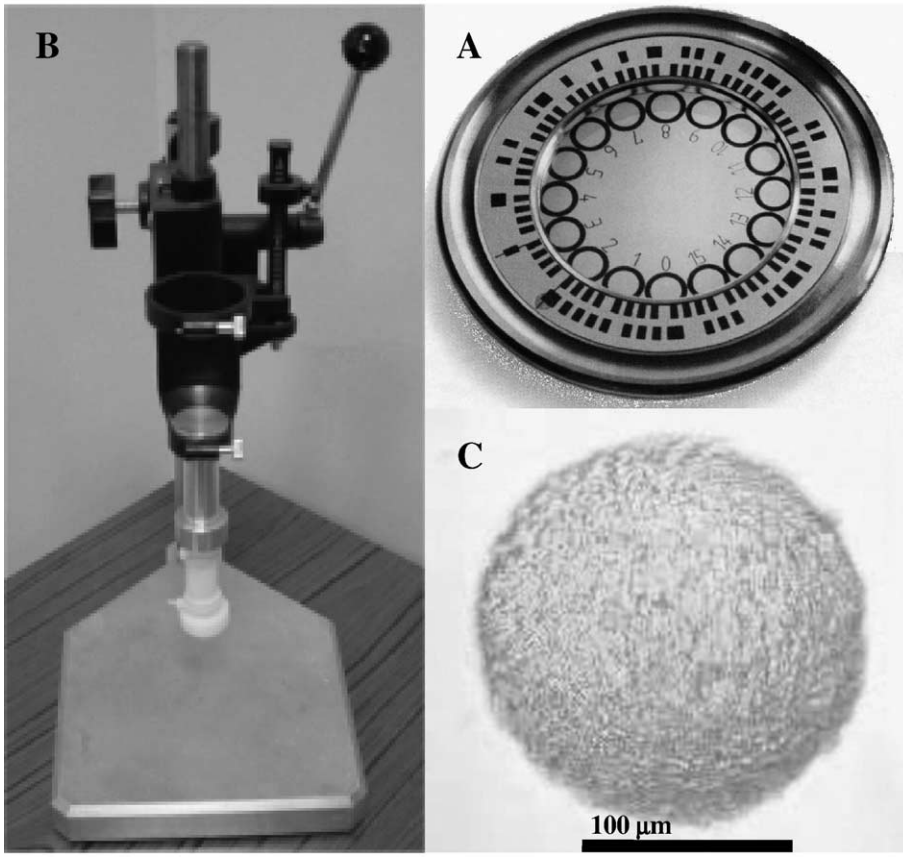


Fig. 1. (A) 16-position zinc selenide (ZnSe) optical plate for measurement on dried suspensions. (B) Stamping device for the transfer of microcolonies from the agar to the IR windows. (C) 18-h-old microcolony imprint of *C. glabrata* on a ZnSe window.

and 36×), and a broadband liquid N_2-cooled mercury cadmium telluride detector. All spectra were acquired with the 15× objective, using 256 scans, 6 cm^{-1} spectral resolution, and 50–250 μm spatial resolution (depending on the microcolony size and the species under study). Five intact and about same-size microcolonies per imprint were selected, and the average was calculated using 5 measurements of the same culture corresponding to 5 different microcolonies, and for reproducibility measurements, 3 independent cultures were investigated. For both microscopy and conventional measurements, spectra were recorded in transmission mode.

2.3.3. Data processing

The pre-processing and processing of FTIR spectral data were performed using OPUS software (version 3.1, Bruker). To compare the spectra of the different *Candida* species, cluster analysis using the second derivatives of the original spectra as input was carried out for different spectral regions. Spectra were classified by using Opus Ident cluster analysis (Opus NT 3.1) based on a hierarchical classification algorithm.

The procedure was as flows: baseline elastic correction of the total spectral region, vectorial normalisation, and finally, the calculation of the second derivative using a Savitsky-Golay algorithm. This pre-processing was done on the total spectral region (500–4000 cm^{-1}) of all spectra. The derivation of the spectra to the second order was used to increase the number of discriminant features present in the spectra. The spectra were classified by using Opus Ident cluster analysis based on hierarchical classification algorithm. The function used calculates Euclidean distances between the spectra and the group according to their similarities in a cluster. The spectral windows chosen in our studies are those which permit to have a good percentage of classification between species.

3. Results

FTIR spectroscopy is increasingly being used for the identification of microorganisms at the species level, and it has been proven to have enough discriminating power to identify *C. albicans* at the strain level [19]. In this study, our main objective is to apply FTIR (micro)spectroscopy to the identification of some clinically relevant *Candida* species at a very early stage of growth, i.e., at the level of microcolonies. The classification into species group was then compared with FTIR data obtained in a conventional approach based on suspensions from older cultures (24 h).

FTIR spectroscopy is sensitive enough to reflect small variations due to culture parameters (culture time, medium

composition, medium pH, temperature, humidity…) and storage mode. The standardization of both culture and spectral acquisition parameters and of sample preparation conditions is important for the reproducibility of spectra since FTIR spectroscopy is a phenotyping method. As a result, only spectra recorded for the same batch of culture medium, at the same temperature, and during the same precise culture time were compared, as this has been described elsewhere [21,22].

3.1. FTIR spectroscopy

An essential aspect of the FTIR analysis was to determine the spectral windows which would permit to differentiate the various species based on their spectra. A preliminary analysis (visual inspection) allows to compare the different spectral information and to detect zones with discriminating capacity and also those for which a good reproducibility of the spectra within the same species can be observed. Spectral differences can be better appraised by inspecting the second derivative of the mean spectra, as shown in Fig. 2. When hierarchical cluster analysis was applied to the second derivative mean FTIR spectra over the spectral window 750–1800 cm^{-1}, several clusters could be distinguished, as shown in Fig. 3. By inspecting the dendrogram, the following observations can be made. When the heterogeneity level was set at 1.25, three groups can be distinguished, each including 2 species: group 1 for *C. albicans* and *C. tropicalis*, group 2 for *C. glabrata* and *C. krusei*, and group 3 for *C. kefyr* and *C. parapsilosis*. When the heterogeneity threshold was fixed at 0.5, six groups corresponding each to the 6 species can be delineated. However, it can be noted that in both cases, there exists some misclassifications described as (A) 3 strains of *C. krusei* misclassified, (B) 2 strains of *C. glabrata* misclassified, (C) one strain of *C. parapsilosis* misclassified, and (D) 2 strains of *C. kefyr* misclassified.

According to this dendrogram, it was possible to identify the six species, with a classification rate of 100% for *C. albicans* and *C. tropicalis*, 90% for *C. parapsilosis*, 80% for *C. glabrata*, 77% for *C. kefyr*, and 70% for *C. krusei*.

During a second step, it was necessary to improve the classification rate for groups 2 and 3. For this, spectral areas were selected (Table 1), and as can be seen in Fig. 4, each of the 2 species belonging to the same group could be differentiated. The differentiation was again carried out on the second derivative of the original IR mean spectra. By targeting the spectral areas indicated in Table 1, the classification rates could be improved to 100% for both groups: *C. glabrata* and *C. krusei* in group 2 (Fig. 4A) and *C. kefyr* and *C. parapsilosis* in group 3 (Fig. 4B). Thus, this technique allowed obtaining an exact identification of 100% for the studied *Candida* spp. strains.

3.2. FTIR microspectroscopy

FTIR microspectroscopy was then performed in order to test the potentials of FTIRM as a method for a rapid and early identification of strains. This is an important aspect for early diagnosis and patient treatment management. For this propose, the same strains of each six species were studied, and microcolonies, with size ranging from 50 to 250 μm,

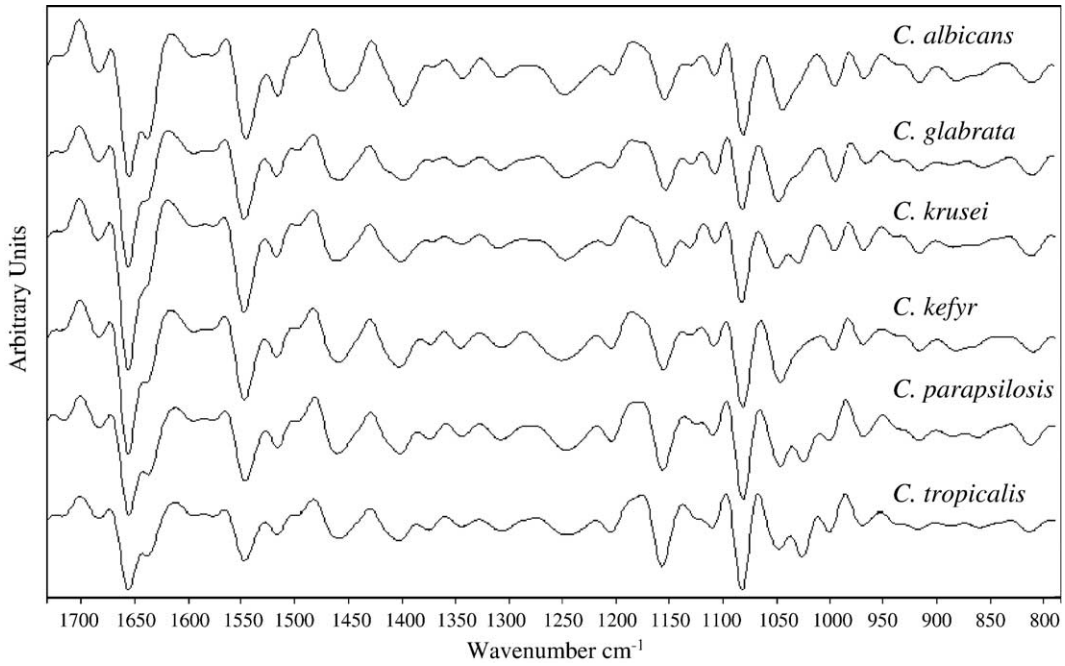


Fig. 2. Comparison of the second derivative FTIR mean spectra of *Candida* spp. showing the spectral variations between six different species of *Candida*.

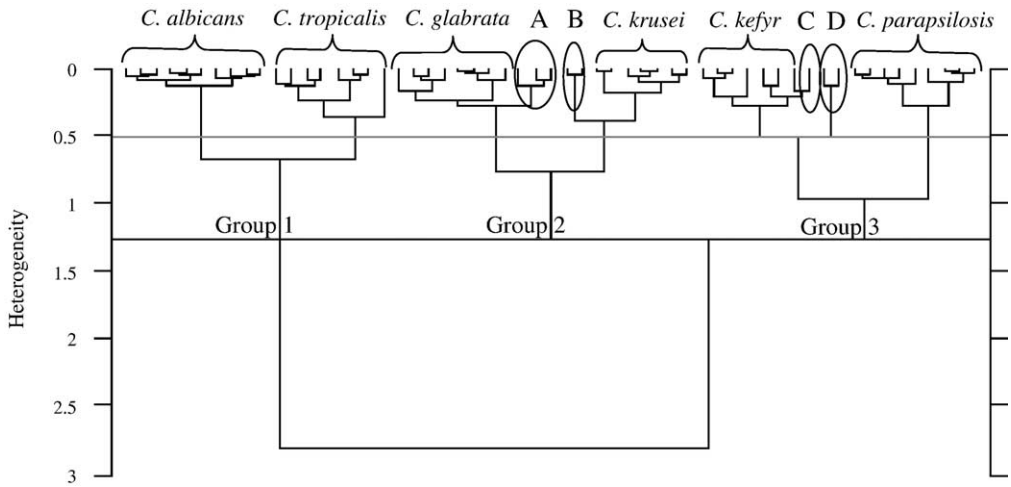


Fig. 3. Hierarchical cluster analysis of six *Candida* spp. using second derivative spectra and the spectral zone 750–1800 cm^{-1}, obtained from 3 independent cultures. (A) 3 strains of *C. krusei* misclassified, (B) 2 strains of *C. glabrata* misclassified, (C) one strain of *C. parapsilosis* misclassified, and (D) 2 strains of *C. kefyr* misclassified. The gray and black lines represent the threshold of heterogeneity at 0.5 and 1.25 respectively.

were analysed using an FTIR microscope. In a preliminary analysis, visual inspection of the second derivative spectra permitted to compare the signatures from the different strains (Fig. 5). As in the previous study, cluster analysis was performed on the mean derivative spectra. The hierarchical classification carried out using the spectral windows 800–1250 cm^{-1} and 1370–1500 cm^{-1} allowed to obtain different groups of spectra corresponding to the six species (Fig. 6). According to this classification, when threshold heterogeneity was set to 1.6, it was possible to distinguish 3 groups: group 1 for *C. albicans* and *C. parapsilosis*, group 2 for *C. krusei*, *C. kefyr*, and *C. tropicalis*, and group 3 for *C. glabrata*. However, when the threshold heterogeneity was placed at 0.8, it was possible to improve the delineation of the six species, with an identification rate of 100% for *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, and *C. glabrata*, 90% for *C. tropicalis*, and 77% for *C. kefyr*. The classification rates obtained for *C. tropicalis* and *C. kefyr* were due to a misclassification of some of these strains in group A (see Fig. 6).

As in the first study on suspension, a new selection of spectral areas (800–830 cm^{-1}, 1030–1050 cm^{-1}, 1110–1150 cm^{-1}, and 1300–1320 cm^{-1}) allowed to improve the separation of the spectra of group 2. Each of the 3 species of group 2 could be differentiated with a classification rate of 100% (Fig. 7). By targeting these specific zones, the outliers found in the first analysis were correctly identified. Therefore, as with the suspension measurement, a two-step classification is required.

Table 1
Spectral windows selected by visual inspection and used for hierarchical classification of FTIR spectra from yeast cell suspensions for discriminating groups 2 and 3

Group	Strain	Spectral windows (cm^{-1})
Group 2	*C. glabrata*	754–1054, 1149–1188, 1569–1590,
	C. krusei	1605–1619, 1669–1692, 1729–1745
Group 3	*C. parapsilosis*	843–909, 930–940, 980–1035,
	C. kefyr	1050–1072, 1140–1164, 1365–1390,
		1490–1510, 1522–1532, 1610–1632

4. Discussion

For the last 10 years, applications of FTIR spectroscopy in the biomedical field, particularly in the identification of microorganisms, have become increasingly interesting. This approach shows a high potential not only for identification at the genus and species levels but also for strain discrimination within the same species [23–26]. Thus, recent studies in our laboratory has shown that this methodology was useful in typing strains of *C. albicans* [19] and *C. glabrata* (manuscript in preparation) isolated from different patients. This phenotypical approach presents also the advantage of being fast, non-destructive, and simple to use. It is a dynamic method for analysing entire cells with requirement of little biomass.

In order to identify microorganisms more quickly than with routine laboratory methods, we have, in this study, applied FTIR microspectroscopy to the analysis of yeast microcolonies. We have therefore evaluated the capacity of FTIR microspectroscopy to discriminate 6 species of *Candida* most frequently encountered in human pathology. The results were compared with those obtained with conventional FTIR spectroscopy on cell suspensions.

The identification of yeasts by routine phenotypical methods can be sometimes problematic, even impossible, because of variations in the phenotypical characters. FTIR spectroscopy has been shown to be able to detect these weak variations of the cell composition which are due to changes in culture conditions (culture time, medium composition,

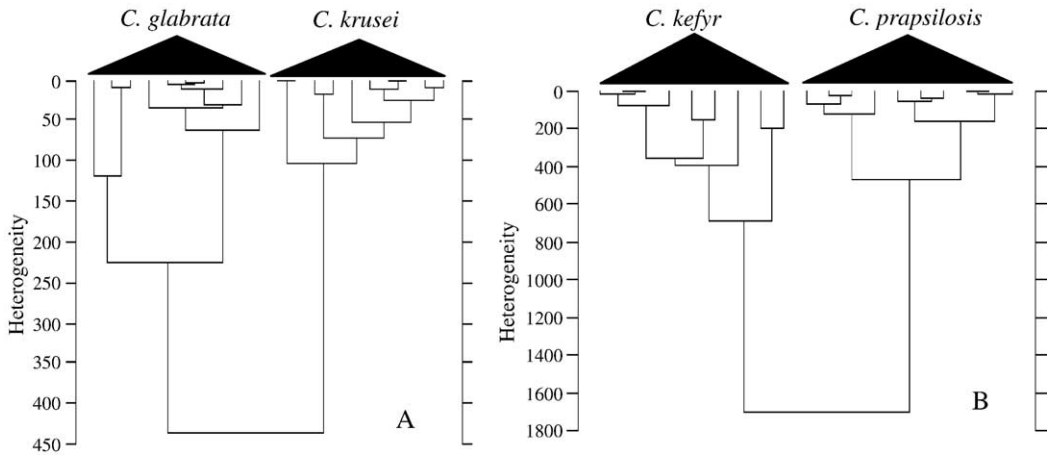


Fig. 4. Hierarchical cluster analysis of (A) *C. glabrata* and *C. krusei* and of (B) *C. parapsilosis* and *C. kefyr*, after selecting specific spectral zones (see Table 1).

medium pH, temperature, and humidity) [21]. During this present study, a standardized protocol was adapted for the yeasts analysis by FTIR spectroscopy [19]. However, for FTIR microspectroscopy, the size of the *Candida* spp. microcolonies, which varies with culture time according to the species, can influence the spectra. For example, *C. glabrata* requires 18 h to reach a diameter of 100 μm, while only 10 h are needed for *C. albicans*. Consequently, it was important to standardize this step. So, for a better spectral reproducibility, we decided to fix the microcolony size between 50 and 250 μm, depending on the species.

In our study, the identification of clinical yeasts by associating FTIR (micro)spectroscopy with multivariate statistical analysis allows to correctly identify 100% of the species. These percentage rates compare favourably with those obtained by conventional FTIR and also by the classical methods of identification, which are based on biochemical tests and which give identification rates higher than 90% for the most frequent species of *Candida* [27]. These results are also comparable with those obtained with bacteria and food yeasts by other research teams [22,24,28,29] using conventional FTIR spectroscopy.

Compared to other reported data, our study has two strong points in the sense that it was carried out with a clinical focus and that a more important number of strains and species (8 to 10 strains for each of the 6 species) were analysed. We show here that FTIR spectroscopy can be used in clinical mycology as a complementary approach of

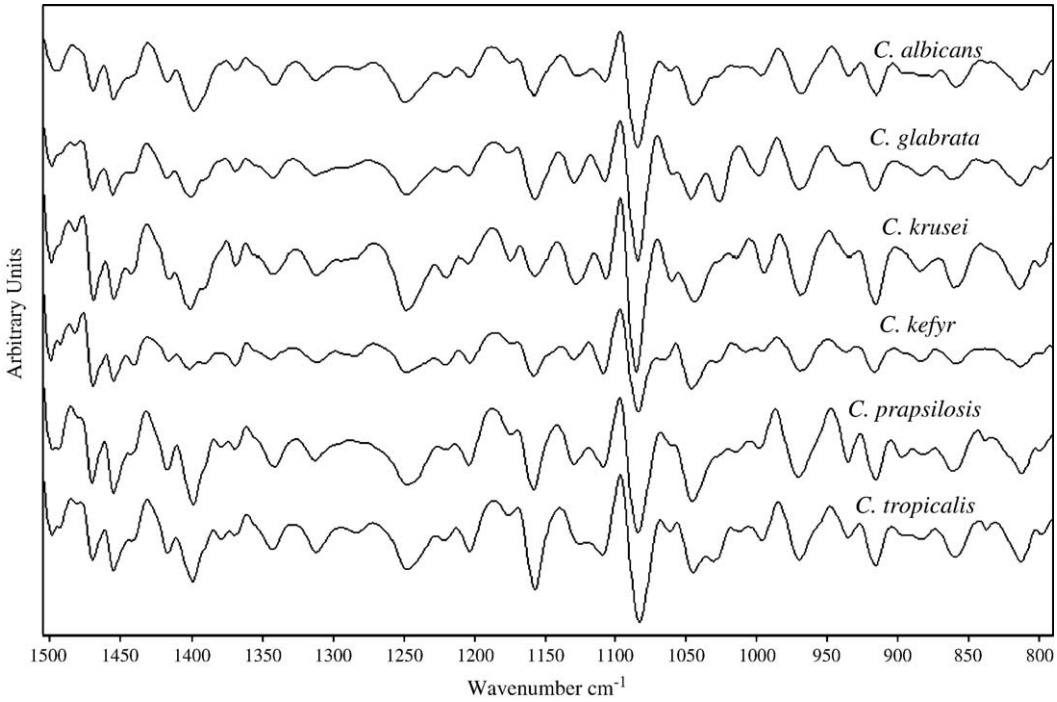


Fig. 5. Comparison between the second derivative FTIR mean spectra of *Candida* spp. microcolonies, showing the spectral variations between the six species of *Candida*.

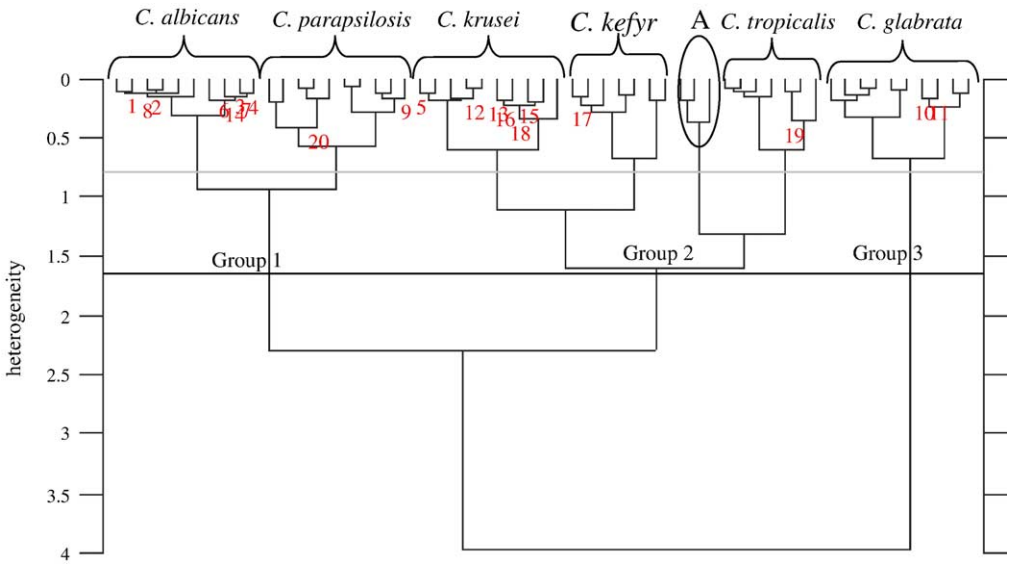


Fig. 6. Hierarchical classification of the average second derivative of *Candida* spp. microcolonies spectra using the spectral windows 800–1250 and 1370–1500 cm^{-1}. (A) 3 strains of *C. kefyr* and *C. tropicalis* misclassified. The gray line represents the threshold heterogeneity at 0.8 and the black line at 1.6.

simple and fast identification of the most frequent species of *Candida* in clinical set-ups; for this, an automated high-throughput system that can record spectra from 96-well plates will soon be operational in our laboratory, and the set-up will be tested routinely for rapid identification of *Candida* species. However, the database must be extended with the inclusion of other strains belonging to the six studied species and to rare or emergent species. Given the relatively high throughput of the method (60 strains per day), a database containing a hundred of strains per species could be built quite rapidly. The isolation frequency of the rare species may constitute the principal limit to the extension of the database.

Concerning the identification of microcolonies by FTIR microspectroscopy, the analysis time is globally halved compared to conventional FTIR spectroscopy. We show in this study that it is possible to obtain spectra from 12-h microcolonies without going through the purification and enrichment culture steps. The approach by FTIR microspectroscopy allowed obtaining an identification rate of 100% for the 6 species: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, and *C. kefyr*. This could have an

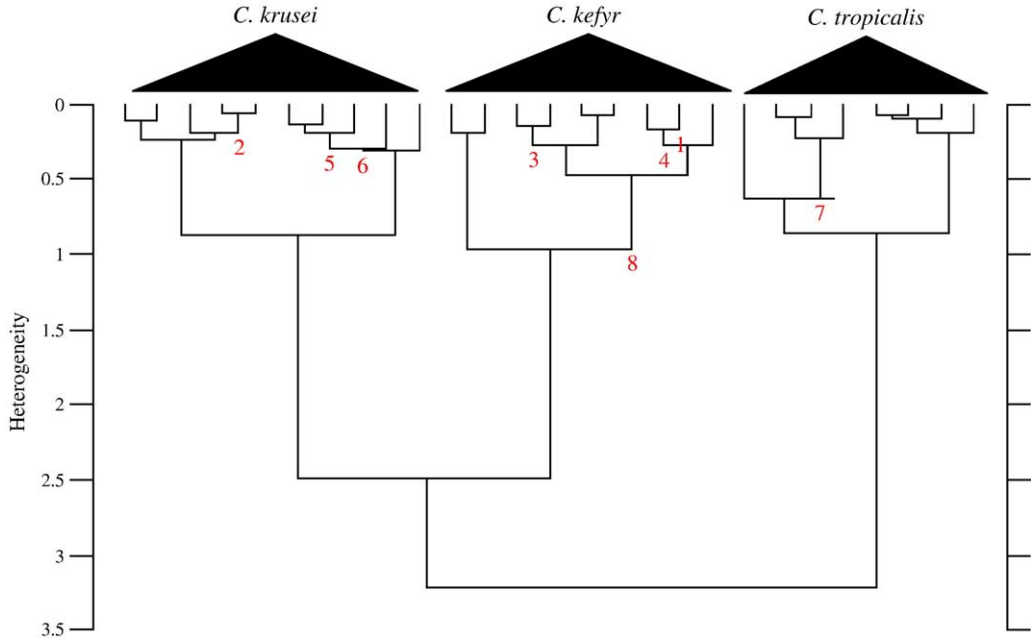


Fig. 7. Hierarchical classification of the average spectra of *C. krusei*, *C. tropicalis*, and *C. kefyr* microcolonies using specific spectral windows at 800–830 cm^{-1}, 1030–1050 cm^{-1}, 1110–1150 cm^{-1}, and 1300–1320 cm^{-1}.

impact in routine clinical microbiology since the following tendency is observed for identification times: FTIR microspectroscopy < FTIR spectroscopy < routine methods.

However, it should be noted that in general, the reliability of microspectroscopy measurements could be lower compared with that of conventional FTIR spectroscopy. This could be due to several parameters not yet controlled at this preliminary stage of the study: the variation of the microcolonies sizes, the imprint reproducibility, the spectral quality, and the high similarity of the cells at an early stage of their growth. The microcolony size influences the spectrum quality. Microcolonies with different thickness generate various physical aberrations (opacity, scattering, diffraction. . .), which are not yet possible to correct perfectly when pre-processing is carried out. However, we are currently developing new approaches to model physical effects contribution in the FTIR spectra. The microcolonies of sizes lower than 80 μm present a weak signal/noise ratio and are consequently badly identified. One can also exclude bad spectra by performing a spectral quality test. Microcolonies of size ranging between 80 and 150 μm seem to give a higher spectral reproducibility.

In addition, the imprint technique can also contribute to the bad reproducibility, since it can be sometimes quite problematic to implement. In fact, the ZnSe window is applied to the agar using a specially designed stamping device, but exerting equivalent pressures to each microcolony remains a delicate operation and the microcolonies are not stamped in a similar manner. Generally, only one layer of cells adheres to the ZnSe window. Moreover, adherence and shear constraints to the agar are not perfectly controlled. The automation of this step would contribute to obtain a better imprint reproducibility and consequently improve spectral quality.

Finally, the use of other multivariate statistical methods can be helpful for searching spectral zones with high discriminant capacities, and these can be, in turn, used as input in a spectral library for rapid comparison and identification of different species.

5. Conclusion

This study, which focused on the feasibility of using FTIR microspectroscopy to identify 10- to 18-h-old microcolonies of the various *Candida* species from clinical origin, shows that this approach is promising and can be developed further. The identification rates are comparable to those obtained using conventional FTIR spectroscopy of dried film suspensions and routine laboratory methods. Indeed, in bacteriology, an early and reliable identification can be carried out from 6-h-old microcolonies (size ranging between 50 and 80 μm) [11,30]. This approach allows, with a single measurement, to have a "molecular fingerprint" of the sample, which can then be exploited to identify or to characterize the sample.

FTIR microspectroscopy constitutes, therefore, a promising new approach that can be improved in terms of reliability and that will allow a considerable gain in time during microorganism identification and characterisation.

Acknowledgements

This work was supported by the "Projet Hospitalier de Recherche Clinique National 1998–2001" grant from the French Health Department, by the "Projet Hospitalier de Recherche Clinique local, 1998" grant from Reims University Hospital, and by Pfizer Laboratories.

References

[1] M.A. Pfaller, Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission, Clin. Infect. Dis. 22 (1996) S89–S94.

[2] D. Abi-Said, E. Anaissie, O. Uzun, I. Raad, H. Pinzcowski, S. Vartivarian, The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species, Clin. Infect. Dis. 24 (1997) 1122–1228.

[3] M.S. Rangel-Frausto, T. Wiblin, H.M. Blumberg, L. Saiman, J. Patterson, M. Rinaldi, M. Pfaller, J.E. Edwards Jr., W. Jarvis, J. Dawson, R.P. Wenzel, National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units, Clin. Infect. Dis. 29 (1999) 253–258.

[4] A. Lupetti, A. Tavanti, P. Davini, E. Ghelardi, V. Corsini, I. Merusi, A. Boldrini, M. Campa, S. Senesi, Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit, J. Clin. Microbiol. 40 (2002) 2363–2369.

[5] J. Bross, G.H. Talbot, G. Maislin, S. Hurwitz, B.L. Strom, Risk factors for nosocomial candidemia: a case-control study in adults without leukemia, Am. J. Med. 87 (1989) 614–620.

[6] S.B. Wey, M. Motomi, M.A. Pfaller, R.F. Wolsen, R.P. Wenzel, Risk factors for hospital-acquired candidemia: a matched case-control study, Arch. Intern. Med. 149 (1989) 2249–2253.

[7] J.A. Vazquez, L.M. Dembry, V. Sanchez, M.A. Vazquez, J.D. Sobel, C. Dmuchowski, M.J. Zervos, Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study, J. Clin. Microbiol. 36 (1998) 421–426.

[8] K.C. Hazen, New and emerging yeast pathogens, Clin. Microbiol. Rev. 8 (1995) 462–478.

[9] A.S. Kao, M.E. Brandt, W.R. Pruitt, L.A. Conn, B.A. Perkins, D.S. Stephens, W.S. Baughman, A.L. Reingold, G.A. Rothrock, M.A. Pfaller, R.W. Pinner, R.A. Hajjeh, The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance, Clin. Infect. Dis. 29 (1999) 1164–1170.

[10] G.V. Doern, R. Vautour, M. Gaudet, B. Levy, Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification, J. Clin. Microbiol. 32 (1994) 1757–1762.

[11] K. Maquelin, C. Kirschner, L.P. Choo-Smith, N.A. Ngo-Thi, T. Van Vreeswijk, M. Stammler, H.P. Endtz, H.A. Bruining, D. Naumann, G.J. Puppels, Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures, J. Clin. Microbiol. 41 (2003) 324–329.

[12] J.M. Miller, C.M. O'Hara, Manual and automated systems for microbial identification, in: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Yolken (Eds.), Manual of Clinical Microbiology, 7th ed., ASM Press, Washington, DC, 1999, pp. 193–201.

[13] M.A. Pfaller, Molecular approaches to diagnosing and managing

infectious diseases: practicality and costs, Emerg. Infect. Dis. 7 (2001) 312–318.

[14] S.A. Sakallah, Molecular diagnostics of infectious diseases: state of the technology, Biotechnol. Annu. Rev. 6 (2000) 141–161.

[15] D. Naumann, D. Helm, H. Labischinski, Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy, Nature 351 (1991) 81–82.

[16] C. Kirschner, K. Maquelin, P. Pina, N.A. Ngo Thi, L.P. Choo-Smith, G.D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S.M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G.J. Puppels, D. Naumann, Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study, J. Clin. Microbiol. 39 (2001) 1763–1770.

[17] G.D. Sockalingum, W. Bouhedja, P. Pina, P. Allouch, C. Mandray, R. Labia, J.M. Millot, M. Manfait, ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains, Biochem. Biophys. Res. Commun. 232 (1997) 240–246.

[18] W. Bouhedja, G.D. Sockalingum, P. Pina, P. Allouch, C. Mandray, R. Labia, J.M. Millot, M. Manfait, ATR-FTIR spectroscopic investigation of *E. coli* transconjugants β-lactams-resistance phenotype, FEBS Lett. 412 (1997) 39–42.

[19] C. Sandt, G.D. Sockalingum, D. Aubert, H. Lepan, C. Lepouse, M. Jaussaud, A. Leon, J.M. Pinon, M. Manfait, D. Toubas, Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units, J. Clin. Microbiol. 41 (2003) 954–959.

[20] A. Galichet, G.D. Sockalingum, A. Belarbi, M. Manfait, FTIR spectroscopy analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype, FEMS Microbiol. Lett. 197 (2001) 179–186.

[21] D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn, D. Naumann, Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy, J. Gen. Microbiol. 137 (1991) 69–79.

[22] M. Kümmerle, S. Scherer, H. Seiler, Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy, Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 2207–2214.

[23] G. Seltmann, W. Beer, H. Claus, H. Seifert, Comparative classification of *Acinetobacter baumannii* strains using seven different typing methods, Zentralbl. Bakteriol. 282 (1995) 372–383.

[24] E.M. Timmins, D.E. Quains, R. Goodacre, Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy, Yeast 14 (1998) 885–893.

[25] H.M. Irmscher, R. Fischer, W. Beer, G. Seltmann, Characterization of nosocomial *Serratia marcescens* isolates: comparison of Fourier-transform infrared spectroscopy with pulsed-field gel electrophoresis of genomic DNA fragments and multilocus enzyme electrophoresis, Zentralbl. Bakteriol. 289 (1999) 249–263.

[26] C.L. Winder, R. Goodacre, Comparison of diffuse-reflectance absorbance and attenuated total reflectance FT-IR for the discrimination of bacteria, Analyst 129 (2004) 1118–1122.

[27] H. Fricker-Hidalgo, O. Vandapel, M.A. Duchesne, M.A. Mazoyer, D. Monget, B. Lardy, B. Lebeau, J. Freney, P. Ambroise-Thomas, R. Grillot, Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species, J. Clin. Microbiol. 34 (1996) 1846–1848.

[28] T. Udelhoven, D. Naumann, J. Schmitt, Development of hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria, Appl. Spectrosc. 54 (2000) 1471–1479.

[29] C.L. Winder, E. Carr, R. Goodacre, R. Seviour, The rapid identification of *Acinetobacter* species using Fourier transform infrared spectroscopy, J. Appl. Microbiol. 96 (2004) 328–339.

[30] D. Nauman, Infrared spectroscopy in microbiology, in: R.A. Meyers (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 2000, pp. 102–131 (36).

Chapitre 2 : Application de la spectroscopie IRTF à l'identification intraspécifique de 3 espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*) : Evaluation de l'intérêt de la spectroscopie IRTF comme un outil de typage.

Publication: 2

FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*

Dominique Toubas, Mohammed Essendoubi, Isabelle Adt, Jean-Michel Pinon & Michel Manfait, Ganesh D Sockalingum

Anal. Bioanal. Chem. 2007 Mar; 387(5):1729-37.

Received: 25 July 2006 / Revised: 10 October 2006 / Accepted: 9 November 2006.

PREAMBULE A L'ARTICLE 2

CONTEXTE

En plus d'une identification fiable, le clinicien a souvent besoin de savoir si une souche de *Candida* isolée chez un patient provient de la même source que d'autres souches apparemment identiques et isolées chez d'autres patients ou dans l'environnement. Cela permet de déceler avec précision la présence d'une chaîne infectieuse dans un hôpital ou lors d'une transmission interhumaine. La mise en évidence d'une telle chaîne infectieuse est réalisable en utilisant une méthode de typage qui permet une différenciation plus précise entre des souches de la même espèce.

Pendant les dix dernières années, les méthodes de typage des levures du genre *Candida* qui ont été utilisées sont basées essentiellement sur la détection du polymorphisme au niveau de l'acide nucléique l'ADN. Parmi ces méthodes on peut citer certaines comme RAPD, RFLP, PFGE et MLST. Ces techniques moléculaires sont applicables à la plupart des microorganismes et leur pouvoir de discrimination est généralement très élevé. Cependant, ces méthodes ne sont pas applicables en routine dans les laboratoires et ont également leurs limites. Il faut noter également qu'il n'existe pas une méthode moléculaire générale pour toutes les espèces de levures et pour la majorité de ces techniques moléculaires, leur valeur comme outil de typage n'a été que partiellement établie.

En raison de ces limites et de l'absence d'outils de typage performants en mycologie, nous proposons dans cette étude d'évaluer l'intérêt de la spectroscopie IRTF comme outil de typage intraspécifique (identification de souches au sein de l'espèce). Ce travail a été appliqué à trois des principaux pathogènes fongiques du genre *Candida* (*C. albicans, C. glabrata* et *C. parapsilosis*) et pour lesquels nous disposons des souches bien caractérisées.

METHODE

Pour effectuer le typage par spectroscopie IRTF des 3 espèces de *Candida* (*C. albicans, C. glabrata* et *C. parapsilosis*), nous avons constitué une collection de souches pour

chaque espèce et chaque souche a été identifiée préalablement par des méthodes phénotypiques au laboratoire Parasitologie-Mycologie du CHU de Reims.
Les souches de collection (n=81) utilisées lors de cette étude sont détaillées dans le tableau suivant :

	Test à l'aveugle (mise au point)	**Application clinique (test de validation)**			
Les espèces de *Candida*	**Nombre d'isolats**	**Nombre d'isolats**	**Nombre de patients**	**Souches de références**	**Totale**
Candida albicans	9	17	5	1 souche (1712)	27
Candida glabrata	14	9	3	2 souches (102 et 9082)	25
Candida parapsilosis	14	14	4	1 souche ATCC 22019	29

Tableau 17 : Nombre de souches étudiées pour le typage de chaque espèce

Une étape préalable au typage par spectroscopie IRTF est le test à l'aveugle. Ceci consiste à grouper, sur la base de leurs spectres IRTF, les isolats correspondant à un nombre inconnu de souches. Une souche peut être représentée par un seul ou plusieurs échantillons dans la même série. Cette première étape a été réalisée pour la mise au point du protocole de mesure et pour rechercher les zones discriminantes adapté au typage de chaque espèce.
Les spectres de la totalité des souches ont été réalisés à partir des suspensions de cultures pures de 24 heures, suivant les mêmes conditions de culture et les mêmes paramètres d'acquisition standardisés précédemment.
Les dérivées secondes des spectres de 3 cultures indépendantes pour chaque isolat ont été analysées par HCA, pour évaluer la capacité de la spectroscopie IRTF à déterminer l'identité et l'apparenté de chaque souche appartenant à ces trois espèces étudiées.

Les résultats obtenus montrent une identification au niveau de la souche avec un taux de réussite de 100% pour les 3 espèces.

La figure 46 montre le dendrogramme obtenu à partir des spectres du test à l'aveugle des 9 échantillons de *C. albicans* numérotés de 1 à 9 plus la souche de référence *C. albicans* 1712. Une hétérogénéité maximale de 0,4 a été obtenue pour *C. albicans*. Le seuil de 0,4 a permis de former quatre groupes de souches contenant respectivement les échantillons : A (4, 2 et 1), B (8), C (5, 6 et 7) et D (3 et 9). Ces groupes donnent une identification de souche correcte à 100%. Les tests à l'aveugle pour les 3 espèces ont permis de proposer un appariement des échantillons qui est en accord à 100 % avec l'origine des souches fournies pour le test en aveugle.

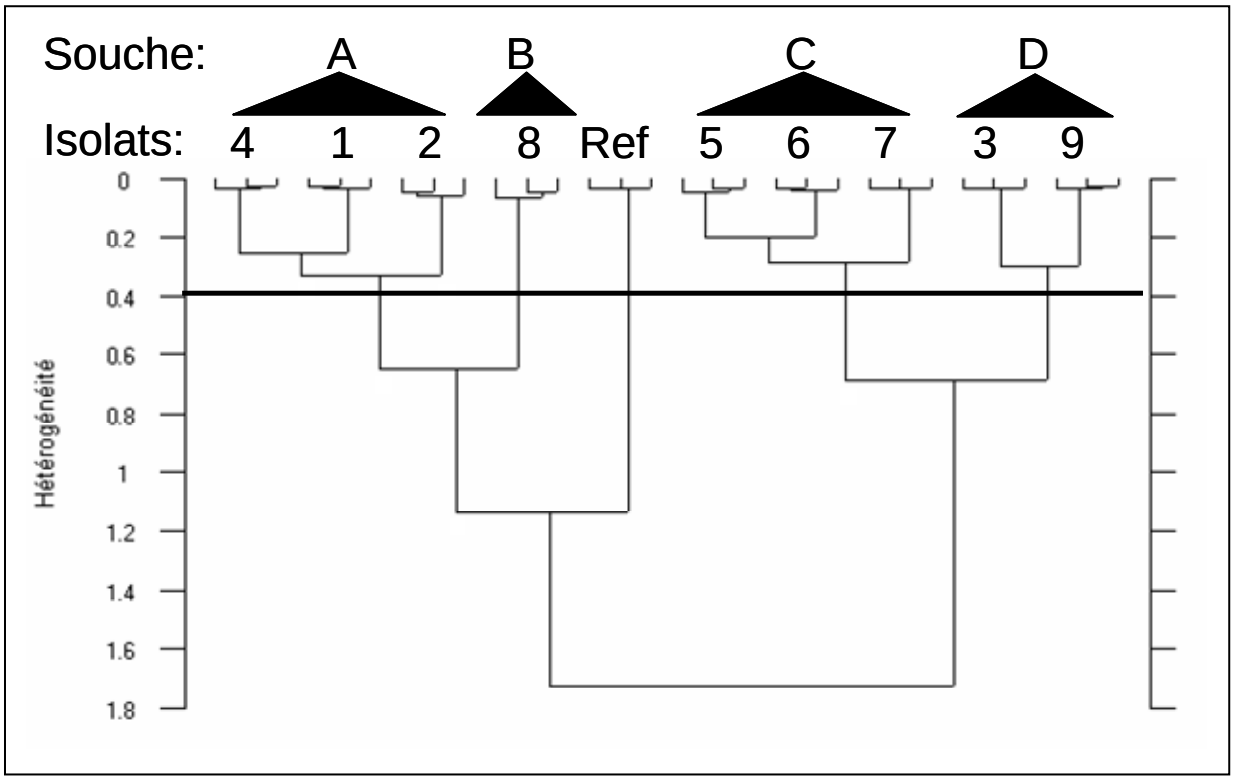


Figure 46 : Classification hiérarchique des dérivées secondes des spectres de 9 isolats de *C. albicans* sur la région spectrale discriminante 900-1200 cm^{-1}.

L'identification au niveau de la souche s'est révélée possible aussi bien à 48h qu'à 24h de culture. Nous avons donc choisi de travailler sur des cultures de 24h.

Lors de ces trois tests une sélection des longueurs d'onde a été effectuée et les régions de forte variabilité ont été choisies pour être utilisées dans l'algorithme qui servira à comparer et classifier les spectres par analyse hiérarchique ascendante (HCA) incorporé dans le logiciel Opus Ident. Pour les souches des deux espèces *C. albicans* et *C. glabrata* la région des polysaccharides (900-1200 cm^{-1}) s'est avérée la plus discriminantes (Figure 47), alors que pour l'espèce *C. parapsilosis* la combinaison de trois fenêtres spectrales (1090-1110, 1120-1140 et 1170-1190 cm^{-1}) (Figure 48) a été nécessaire pour effectuer le typage des souches de cette espèce.

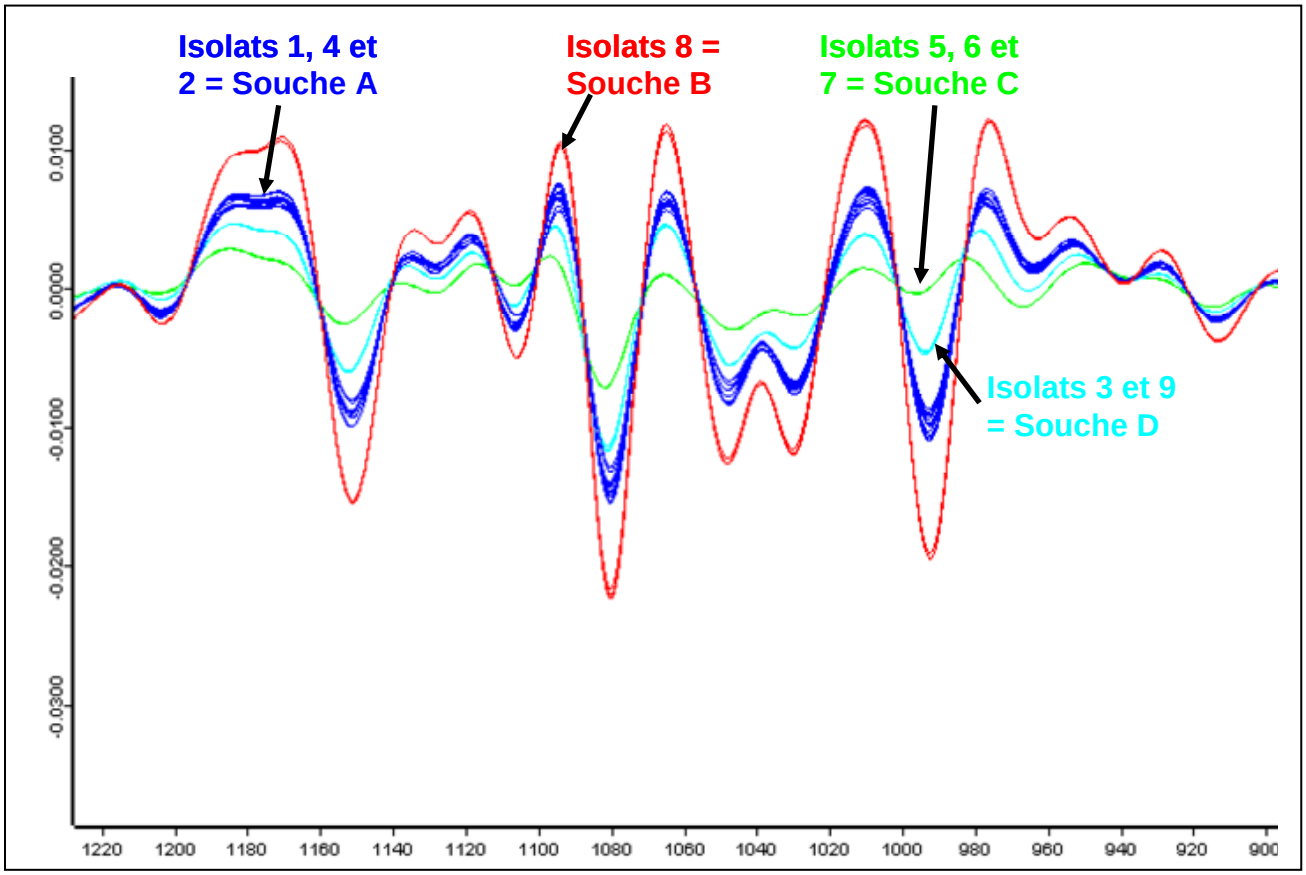


Figure 47 : Dérivée seconde des spectres de *C. albicans* montrant les variations spectrales entre les 9 isolats dans les régions 900-1200 cm^{-1}.

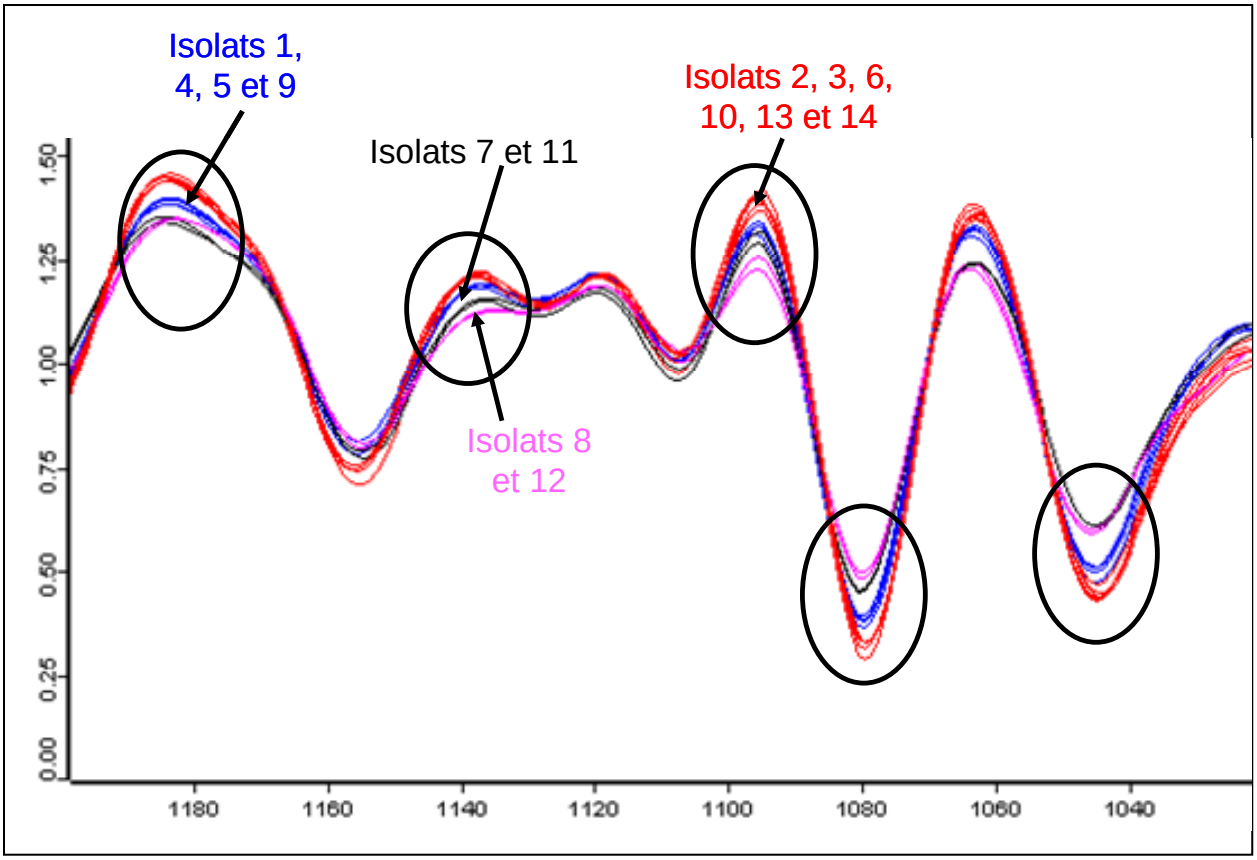


Figure 48 : Dérivée seconde des spectres de *C. parapsilosis* montrant les variations spectrales entre les 14 isolats dans les régions (1090-1110, 1120-1140, 1170-1190 cm^{-1}) sélectionnées pour la classification

Le seuil d'hétérogénéité de 0,4 et la combinaison de trois régions spectrales (1090-1110, 1120-1140 et 1170-1190 cm^{-1}) ont permis de former 4 groupes de souches contenant respectivement les isolats : A (2, 3, 6, 10, 13 et 14), B (1, 4, 5 et 9), C (7 et 11) et D (8 et 12) (Figure 49). Ces groupes donnent une identification correcte, en accord à 100 % avec l'origine des souches.

La différence dans les régions spectrales discriminantes utilisées pour le typage de *C. parapsilosis* peut être expliquée par la faible variabilité inter-souche au sein de cette espèce ainsi que par le faible polymorphisme génétique que présente cette espèce comparée à *C. albicans* et *C. glabrata*.

Dans ce préambule nous avons présenté seulement les résultats qui concernent les tests à l'aveugle des 3 espèces permettant la mise au point, les résultats sur les applications cliniques et les tests de validation seront présentés en détail dans l'article.

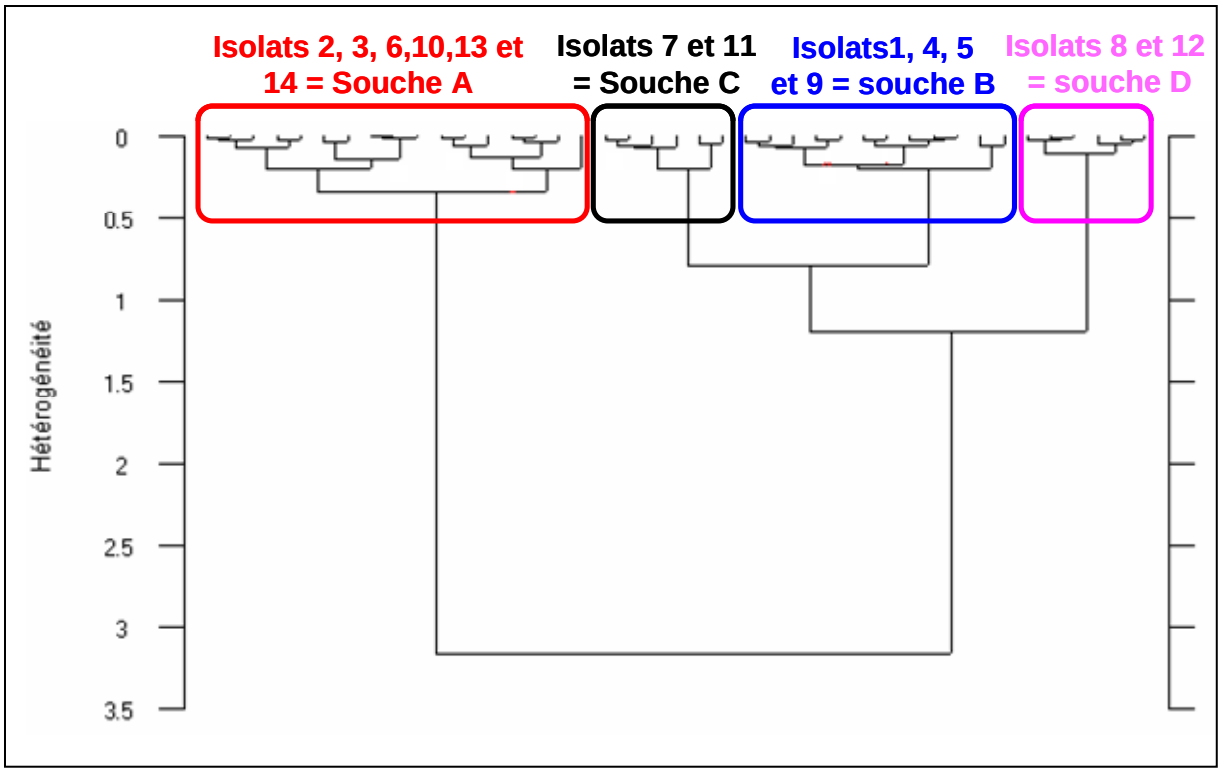


Figure 49 : Classification hiérarchique des dérivées secondes des spectres de 14 isolats de *C. parapsilosis* sur les régions spectrales discriminantes (1090-1110, 1120-1140 et 1170-1190 cm^{-1}).

Conclusion

Au cours de ces différents travaux, nous avons montré que la spectroscopie IRTF permettait de réaliser le typage des souches de *C. albicans, C. glabrata* et *C. parapsilosis*. Le typage spectroscopique de ces trois espèces a été réalisé également lors d'un suivi de patients hospitalisés en Service de Réanimation pour comparer les souches provenant de différents patients. Nous avons également montré que le pouvoir discriminant de la méthode était suffisant pour différencier et classifier les spectres de plusieurs isolats appartenant à de nombreux patients.

La spectroscopie IRTF permet d'obtenir des résultats en 2 heures à partir d'une culture pure des souches étudiées. Cette technique rapide, simple et peu coûteuse répond aux critères définissant une méthode de typage efficace. Donc, elle pourrait être proposée comme méthode de typage rapide utilisée en amont d'une technique génotypique. Cette procédure, en confirmant précocement la parenté et l'identité des souches, pourrait contribuer à accélérer la mise en place de mesures destinées à contrôler la dissémination de souches de *Candida*.

Anal Bioanal Chem (2007) 387:1729–1737
DOI 10.1007/s00216-006-1005-1

ORIGINAL PAPER

FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*

Dominique Toubas · Mohammed Essendoubi · Isabelle Adt · Jean-Michel Pinon · Michel Manfait · Ganesh D Sockalingum

Received: 25 July 2006 / Revised: 10 October 2006 / Accepted: 9 November 2006 / Published online: 5 December 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The incidence of fungal infections, in particular candidiasis and aspergillosis, has considerably increased during the last three decades. This is mainly due to advances in medical treatments and technologies. In high risk patients (e.g. in haematology or intensive care), the prognosis of invasive candidiasis is relatively poor. Therefore, a rapid and correct identification of the infectious agent is important for an efficient and prompt therapy. Most clinical laboratories rely on conventional identification methods that are based on morphological, physiological and nutritional characteristics. However, these have their limitations because they are time-consuming and not always very accurate. Moreover, molecular methods may be required to determine the genetic relationship between the infectious strains, for instance in *Candida* outbreaks. In addition, the latter methods require time, expensive consumables and highly trained staff to be performed adequately. In this study, we have applied the FTIR spectroscopic approach to different situations encountered in routine mycological diagnosis. We show the potentials of this phenotypic approach, used in parallel with routine identification methods, for the differentiation of 3 frequently encountered *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*) by using both suspensions and microcolonies. This approach, developed for an early discrimination, may help in the initial choice of antifungal treatment. Furthermore, we demonstrate the feasibility of the method for intraspecies comparison (typing) of 3 *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*), particularly when an outbreak is suspected.

Keywords FTIR spectroscopy · *Candida* species · Microcolonies · Discrimination · Typing

D. Toubas · J.-M. Pinon
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Reims,
EA 3800, IFR53, Université de Reims Champagne-Ardenne,
51 rue Cognacq-Jay,
51096 Reims Cedex, France

M. Essendoubi · I. Adt · M. Manfait · G. D. Sockalingum (✉)
Unité MéDIAN, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, IFR53,
Université de Reims Champagne-Ardenne,
51 rue Cognacq-Jay,
51096 Reims Cedex, France
e-mail: ganesh.sockalingum@univ-reims.fr

Introduction

During recent decades, important advances in medical technologies and treatments have taken place and, consequently, patients have become more vulnerable to fungal infections. These advances have largely contributed to increase the incidence of disseminated candidemia. Main risk factors are associated with drug treatment, use of catheters, abdominal surgery and severe neutropenia [1].

Candida albicans is the main species of the *Candida* genus responsible for fungal infections but several *Candida* non *albicans* species are now often implicated, particularly in immunodepressed patients (e.g. in oncohaematology or those undergoing organ transplantation), patients in intensive care and in those with medical devices [1, 2]. Prognosis is relatively poor for invasive candidiasis and a rapid diagnosis may contribute to improve the clinical evolution.

Isolation and identification are the two steps in conventional medical mycology. Identification is important for several reasons. It can inform about the origin of the infection by comparing strains isolated from different anatomical sites of the same patient. A rapid identification at species level can be helpful for an early diagnosis and for the initial choice of antifungal treatment before obtaining susceptibility tests

results. Similarly, rapid identification at strain level is equally important in epidemic situations to compare strains from different patients [2, 3].

In routine analysis, methods for the identification of *Candida* species are based on assimilation, fermentation reactions and morphology [4]. However, although largely applied, these tests present several limits. They are time-consuming, and for some closely related species, they are not very accurate. Consequently, up to 5 days can be expected (for *Candida* species) between the receipt of patient material and presentation of identification results to the clinician [4, 5]. Moreover, these methods cannot be universally applied for the typing of *Candida* [6].

These limitations have led to the development of molecular and biophysical methods. Recent advances in the use of molecular DNA analysis have facilitated the development of identification systems at species and sub-species levels [7, 8]. Identification of *Candida* species has been achieved by randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and pulsed-field gel electrophoresis [9–13]. Although widely accepted, these techniques present some technical limits due to protocol complexities and choice of specific primers for each species. Moreover, the routine application of these techniques is relatively expensive [7, 14].

A different approach based on optical spectroscopic techniques has been proposed for *Candida* identification. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) is one such approach. It characterizes the chemical composition of very complex biological systems such as microorganisms and provides highly specific spectroscopic fingerprints. This technique represents an analytical, non-destructive and dynamic method to investigate a population of whole cells with only little biomass [15–18]. It permits identification and characterisation of microbial cells at both species and sub-species level [19–21].

We present here the application of FTIR spectroscopy to the rapid differentiation and typing of the most frequent *Candida* species. In a first part of this study, we have compared the FTIR discrimination of 3 *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*) from pure 24-h cultures and from 10- to 18-h-old microcolonies. In the second part, we have tested the potential of FTIR spectroscopy for typing 3 *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*), frequently encountered in human pathology.

Materials and methods

Candida strains

For species identification, 30 strains belonging to 3 *Candida* species isolated from 30 patients hospitalized in different wards were studied. For typing studies, 40 strains belonging to 3 *Candida* species were isolated from 12 patients. For *C. albicans* and *C. glabrata* typing, the reference strains were arbitrarily chosen from our in-house collection, whereas for *C. parapsilosis* typing the reference strain was an ATCC strain N° 22019 (see Table 1).

Table 1 Patient and reference strains used for *Candida* typing

Candida species	N° of patients	N° of strains isolated from different sites	Reference strains
C. albicans	5	17	*C. albicans* (1712, in-house collection)
C. glabrata	3	9	*C. glabrata* (102 and 9082, in-house collection)
C. parapsilosis	4	14	*C. parapsilosis* (ATCC 22019)

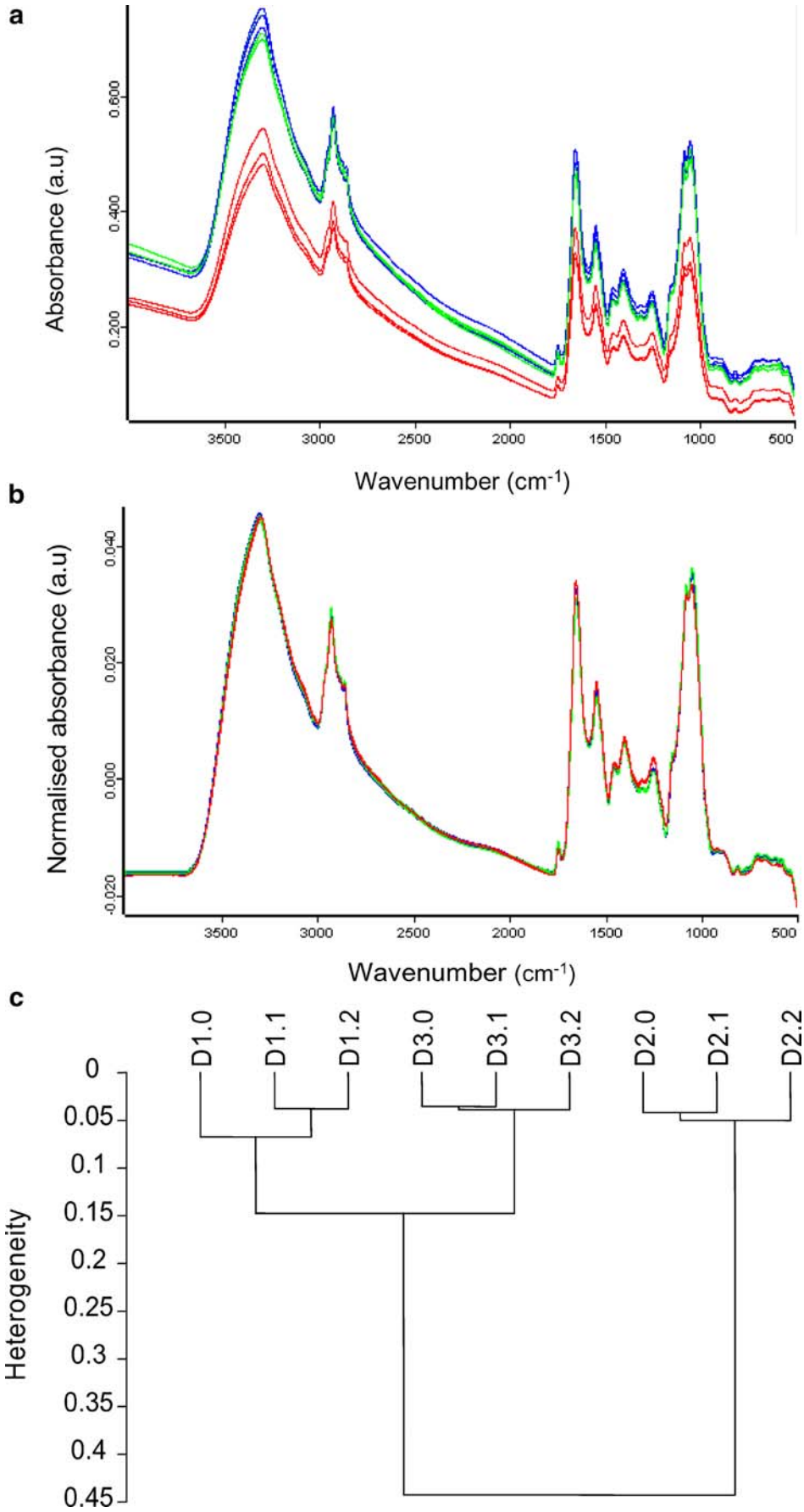
Identification of *C. albicans* species was obtained by a 24- to 48-h culture on Chromagar medium (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA). *Candida* non *albicans* species were identified by complementary tests, auxanogram (Auxacolor, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) associated to morphological profiles on PCB medium (Bio-Rad). These tests required a further incubation of 24–48 h. FTIR species discrimination, using both suspensions of 24-h-old cultures and from 10- to 18-h-old microcolonies, was performed in parallel with the identification by conventional clinical methods.

For FTIR typing, strains were stored in water at room temperature before spectroscopic identification, and for longer conservation, the strains were frozen at −80 °C in Sabouraud broth (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) with 10% glycerol.

Culture conditions and sample preparation

For FTIR measurements using suspensions, *Candida* strains were cultured on Sabouraud medium (bioMérieux) for 24 h at 37 °C. Cells were harvested with a plastic loop and suspended in 1 mL distilled water. Obtaining highly reliable spectra is one of the crucial steps in FTIR identification of microorganisms. This is even more important in typing or

Fig. 1 FTIR spectra of one *C. albicans* strain recorded from 3 independent cultures (3 different days: D1 (*red spectra*), D2 (*blue spectra*) and D3 (*green spectra*)) and in triplicate (**a** raw data, **b** after pre-processing); and **c** cluster analysis of the 9 spectra in the 900–1,200 cm^{-1} region showing the reproducibility level of the FTIR measurements. Experiments from the same culture show heterogeneity of about 0.07, whereas those from different cultures of the same strain exhibit heterogeneity of 0.15


a
Absorbance (a.u)
0.600
0.400
0.200
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber (cm-1)
b
Normalised absorbance (a.u)
0.040
0.020
0.000
-0.020
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber (cm-1)
c
D1.0
D1.1
D1.2
D3.0
D3.1
D3.2
D2.0
D2.1
D2.2
Heterogeneity
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
0.35
0.4
0.45

sub-species analysis. The standardisation of parameters such as culture medium, culture time and biomass has already been described in our previous study [20]. The thickness of the film deposited on the IR-transparent window is one of the parameters that must be carefully controlled. To achieve this, we spectrophotometrically adjusted the optical density to 3±0.01 (λ=500 nm) for each suspension. Thirty-five μL of each suspension was deposited in 3 replicates on the zinc selenide (ZnSe) sample carrier composed of 16 positions, one of which was for background measurement. This was repeated for 3 independent cultures. In order to minimise the influence of water in the spectra, the suspensions were dried in a dessicator under moderate vacuum and the measurement chamber purged with dry air. FTIR measurements were performed in transmission mode. This procedure was applied to both the differentiation of species and to the typing studies.

Early identification of *Candida* species was performed by IR microspectroscopy measurements on microcolonies. Depending on the species, the microcolonies were obtained after 10- to 18-h culture on Sabouraud medium. Microcolony diameters ranged between 50 and 250 μm. With a stamping device, microcolonies were transferred onto ZnSe infrared-transparent windows, which were then analysed in transmission by an infrared microscope.

FTIR spectroscopic measurements

After dessication of the suspensions, the sample carrier was placed in a MICOR-ID module (Bruker Optics, Wissenbourg, France) coupled to an Equinox 55 (Bruker Optics) spectrometer. The system was continuously purged with dry air to reduce water vapour and CO_2. FTIR spectra were recorded using 64 scans in the region between 400 and 4,000 cm^{-1} at a spectral resolution of 6 cm^{-1}. Under these conditions, FTIR recordings of a whole sample carrier (15 samples) took about 30 min. To test the reproducibility, we have investigated 3 independent cultures of the same isolate and, for each culture, 3 replicate measurements were recorded (9 measurements for each strain). This procedure was used for measurements on suspensions both for species discrimination and strain typing. Figure 1a shows the 9 raw FTIR spectra obtained from the 3 independent *C. albicans* cultures, performed on three different days, and 3 replicates were measured for each culture. As can be seen, there are some variations in the spectral profiles, here mostly physical effects such as baseline offset and drift, even if the quantity of biomass deposited is controlled by fixing the optical density of the suspension. For studies on *Candida* microcolonies, we used an infrared microscope (IRscope II, Bruker Optics) coupled to the Equinox 55 spectrometer. This microscope comprises a liquid nitrogen-cooled mercury cadmium telluride (MCT) detector, a motorized *x-y* stage and a X15 Cassegrain objective. Micro-FTIR spectra were recorded in the transmission mode using 256 scans and a 6 cm^{-1} spectral resolution. Depending of the microcolony size, spatial resolution was set between 50 and 250 μm. Three independent cultures were analysed and spectra from 5 colonies were recorded for each culture (15 measurements for each strain) and averaged.

Data pre-processing and analysis

Before analysis, all FTIR spectra were pre-processed using a background elastic correction, second derivation followed by vector normalisation. The effect of such pre-processing is shown in Fig. 1b, where the nine spectra (previously presented in Fig. 1a) are now well superimposed. Thus, after taking into consideration these standardisation parameters, pre-processing of the spectra obtained from the same isolate gave reproducible information, which is necessary for strain discrimination. This step is important, since very highly reliable data are required for species and sub-species identification. The reproducibility level of these measurements has been assessed using cluster analysis as shown in Fig. 1c. The heterogeneity level, also called the *d* value which represents the spectral distance, is found to be about 0.07 for replicate experiments from the same culture, whereas it is 0.15 for those from different cultures of the same strain. It can be noted that these *d* values are very low. For microcolonies, these values were respectively about 0.42 and 0.85, showing higher variability in the data which is introduced by the sampling method and/or sample heterogeneity.

The mean of these 9 pre-processed spectra was then used as a representative spectrum for further analysis. Hierarchical cluster analysis (HCA) was applied using the Opus software (version 3.1, Bruker optics) to compare samples based on their normalised second-derivative spectra. Second-derivative spectra were used to highlight the differences between closely related samples. HCA consisted of grouping the spectra with the same degree of similarity. The method calculates the Euclidean distance between all the data set by using the Ward's algorithm method. The merging process can be visualized in a tree-like diagram, called a dendrogram, presenting the regrouping of the spectra in clusters according to a heterogeneity scale. A thorough description of this statistical analysis can be found elsewhere [22, 23].

Results and discussion

This study has two main objectives: (i) to use FTIR spectroscopy in parallel with routine microbiological

methods, during a given time interval, in order to identify from suspensions some prevalent *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*) and to compare data to those obtained with FTIR microscopy of 10- to 18-h-old microcolonies, for an early discrimination approach; (ii) to evaluate the potential of FTIR spectroscopy in the typing of *Candida* species frequently encountered in human pathology (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*).

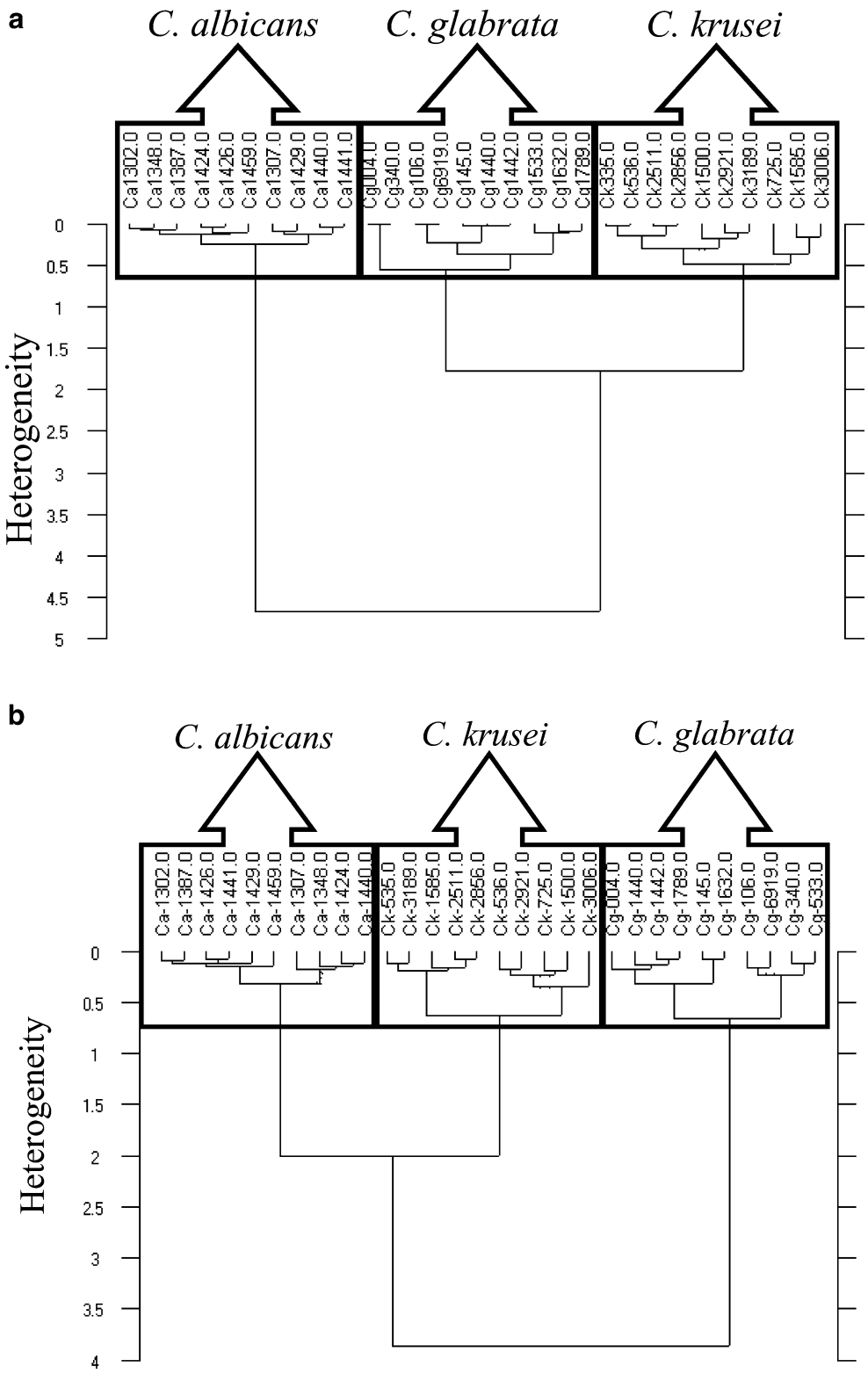


Fig. 2 HCA of 3 *Candida* species using second-derivative spectra in the 900–1,200 cm^{-1} spectral zone obtained from **a** measurements on suspensions and **b** measurements on microcolonies. The heterogeneity level was set at 0.6 and the *numbers* refer to different patients strains

FTIR identification of *Candida* species

The FTIR spectrum of a biological system like *Candida* is quite complex and consists of broad bands (see Fig. 1) that arise from the superposition of absorption peaks of various contributing macromolecules (3,200–3,100 cm^{-1}: NH from proteins; 2,800–3,000 cm^{-1}: CH from lipids and proteins; 1,720–1,750 cm^{-1}: C=O from lipid esters; 1,500–1,700 cm^{-1}: C=O and N–H from proteins; 1,200–1,250 cm^{-1}: PO_2^- from nucleic acids, 900–1,200 cm^{-1}: various polysaccharide absorptions).

Based on this information, we propose here to determine the criteria that would permit one to differentiate 3 different *Candida* species by FTIR spectroscopy. In view of decreasing the identification time, data obtained from 10- to 18-h-old *Candida* microcolonies will be compared to those acquired from 24-h cultures. The spectral profiles differ depending on parameters such as growth stage, medium and biomass. Therefore, the standardisation of culture parameters is important to minimise these variations. Nevertheless, spectral variations may still be observed within a same species for a given culture condition. We have previously reported on the standardisation procedures that lead to reliable FTIR data [20].

We have calculated the mean spectra from the replicates (triplicates for 24-h cultures and 5 measurements for microcolonies). A preliminary analysis (visual inspection) consists of comparing different spectra and searching for the spectral regions that present both a strong discriminating capacity and a great reproducibility within the same species. In order to accentuate the spectral differences between the different species, the second derivatives of the mean spectra were used. We have found that the spectral window with the best discriminating features was localised in the polysaccharide absorption region between 900 and 1,200 cm^{-1}, as has been also found previously [21]. Hierarchical cluster analysis was applied to the second-derivative mean FTIR spectra using this spectral window and 3 clusters that can be respectively associated to each *Candida* species could be distinguished (Fig. 2a,b). By inspecting the dendrograms obtained from spectra of suspensions (Fig. 2a) and microcolonies imprints (Fig. 2b), it was possible to separate 3 groups according to each species of *Candida* with a heterogeneity level of about 0.6. The comparison of the results obtained by these two approaches show that the polysaccharide absorption window is a good marker region, since it reveals the best reproducibility and variability between the 3 *Candida* species. This is due to highly conserved polysaccharide components at species and sub-species levels.

In this study, the discrimination of the 3 *Candida* species by FTIR (micro)spectroscopy allowed a correct classification of the 3 species. Other groups have also reported on the usefulness of FTIR microspectroscopy for identifying *Candida* [5, 16]. Compared to the other techniques, the major advantages of FTIR microspectroscopy in species identification are its simplicity, accuracy and rapidity, which make it an interesting approach to improve the prognosis in high risk patients.

Intra-species typing of *Candida* species by FTIR spectroscopy

When several cases of infections due to the same species occur in a clinical setting, it is necessary to carry out an epidemiological investigation by comparing the strains. *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* have been implicated in several cases of outbreak [24, 25]. FTIR

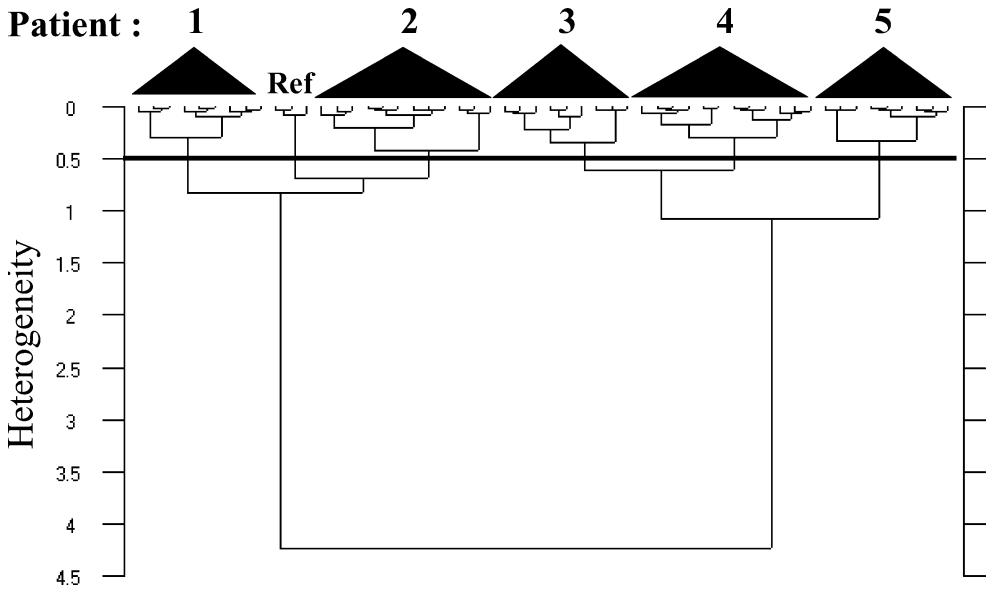


Fig. 3 HCA of 15 strains of *C. albicans* isolated from 5 patients and reference strain. The *bold black line* represents the threshold of heterogeneity at 0.5

spectroscopy has been previously developed as a typing method to compare *C. albicans* strains in a clinical setting [20]. Here, our study has been extended further to evaluate the potential of the technique for typing other important *Candida* species such as *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. When strain typing is performed, it is a usual practice to include in the study one or two reference strains as controls. For our FTIR study, such reference strains are arbitrarily chosen and can be a previously identified isolate from another patient. Due to the polymorphism of *Candida* strains, it is expected that these references should not group with the other investigated strains. They are therefore used as "internal standards" to determine the heterogeneity threshold level for forming the other groups.

For the *C. albicans* typing study, we have investigated 17 strains isolated from different anatomical sites of 5 patients In a preliminary analysis, the second-derivative spectra permitted one to identify the spectral window, namely the polysaccharide region between 900 and 1,200 cm^{-1}, which had the best discriminating capacity. HCA analysis carried out using this spectral window allowed one to obtain 6 different spectral groups (Fig. 3), corresponding respectively to the 5 patients strains and to the reference strain, with a heterogeneity threshold level of 0.5.

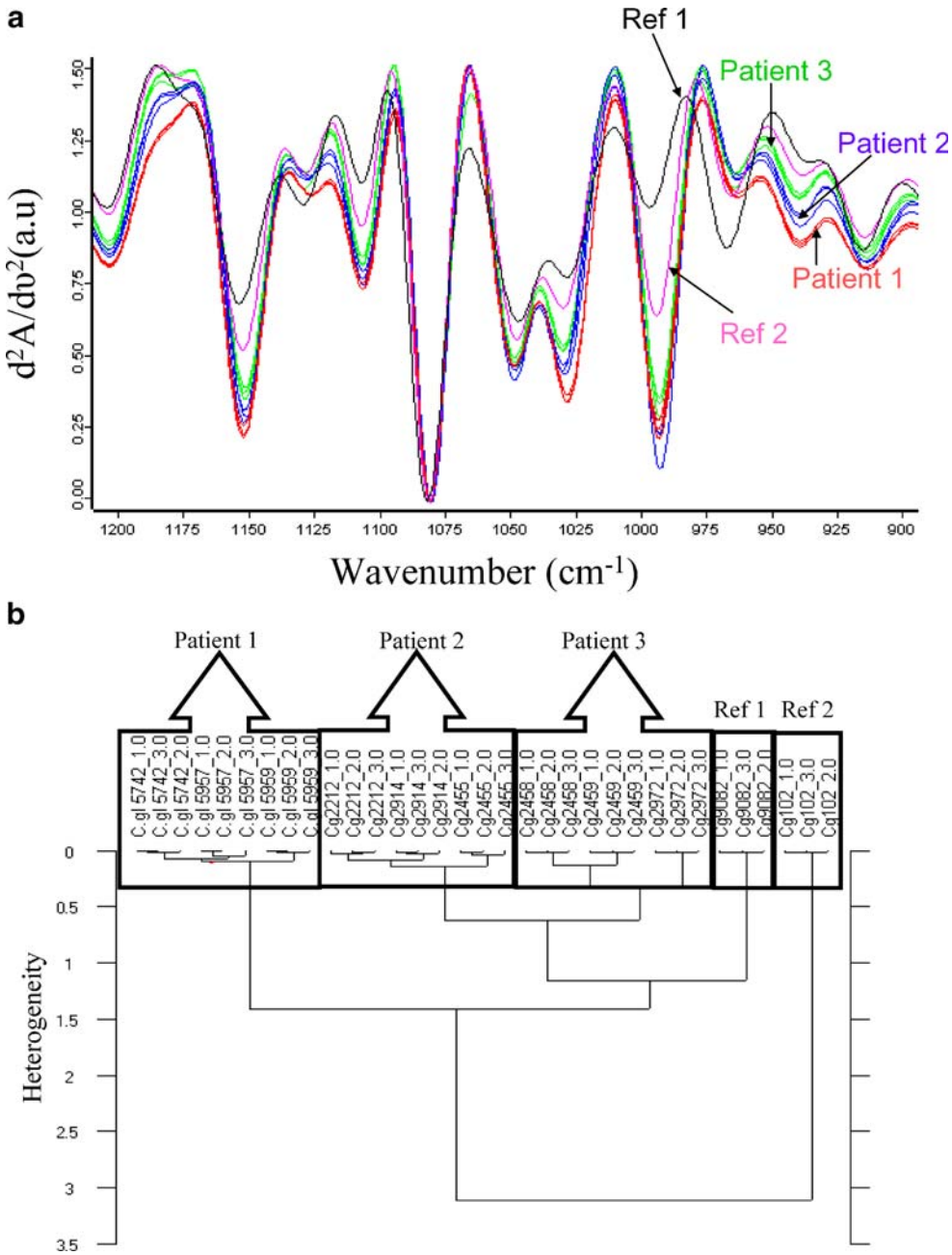


Fig. 4 **a** Spectral variations between 9 strains of *C. glabrata* isolated from 3 patients and 2 reference strains (102 and 9082) and **b** dendrogram of 9 strains of *C. glabrata* isolated from 3 patients and 2 reference strains (102 and 9082) using second-derivative spectra in the 900–1,200 cm^{-1} spectral zone. The heterogeneity level was set at 0.4 and the *numbers* refer to different patient strains

For *C. glabrata* typing, the 9 strains were isolated from 3 different anatomical sites of 3 intensive care patients (3 strains per patient). For this species, we again used second-derivative spectra in the polysaccharide region between 900 and 1,200 cm^{-1}. The comparison of the spectra of the 9 strains in this region showed high similarities within the same patient, whereas they were different from one patient to another (Fig. 4a). Two in-house collection strains have been used as reference strains. HCA analysis performed on these data allowed one to obtain 5 distinct groups, one group corresponding to each patient and the remaining 2 groups to the two reference strains (Fig. 4b).

The clinical situation could have suggested an inter-patient transmission (patients hospitalised in the same ward during the same period). Our results showed that the patients were infected by unrelated strains of *C. glabrata*. These data were in complete agreement with a molecular typing method (RAPD) (data not shown) and it was concluded that the origin of the infections was not due to an outbreak caused by a single epidemic strain but was of endogenous origin.

Thus, FTIR spectroscopy could contribute to accelerate the implementation of control measures in clinical settings, particularly in an epidemic situation, and it could be proposed as a rapid phenotypic typing method that can be associated with a molecular technique.

We have then extended this method to *C. parapsilosis* typing, and applied FTIR spectroscopy to type 14 strains isolated from 4 patients. The ATCC strain N° 22019 was used as reference strain. By using second-derivative spectra, we identified 3 spectral windows in the polysaccharide region: 1,090–1,110, 1,120–1,140 and 1,170–1,190 cm^{-1} with good discriminating capacity. HCA analysis carried out using these spectral windows allowed one to obtain 5 different clusters, a cluster corresponding to each of the four patients and to the reference strain (Fig. 5), the last of these having been used to set the threshold level. It can be noted that, although this discriminating region presented less variations in *C. parapsilosis* FTIR spectra than in those of *C. albicans* and *C. glabrata*, the method nevertheless allowed a good typing of the strains to be achieved.

Our data show that typing of *Candida* strains by FTIR spectroscopy is feasible. Recently, we have successfully shown that *C. albicans* typing can be performed not only with blastospores but also using the hyphal forms [26], which have been suggested to be the most virulent form of *C. albicans*. The technique has emerged as a powerful epidemiological tool for the investigation of strain identity in a number of infections, and other applications to food-borne yeasts [27], air-borne fungi [28] or for building data bases [29] have been described.

Conclusion

We demonstrate in this study the usefulness of FTIR spectroscopy in medical mycology both for species discrimination and strain typing. The technique exhibits several advantages that make it an interesting approach for analysing the most common yeasts isolated in clinical settings. It has been proved to be capable of species differentiation both on dried suspensions and on micro-colonies, the latter reducing the time required for FTIR identification. It has also shown its potentials as a typing method and can be used as a complementary but faster

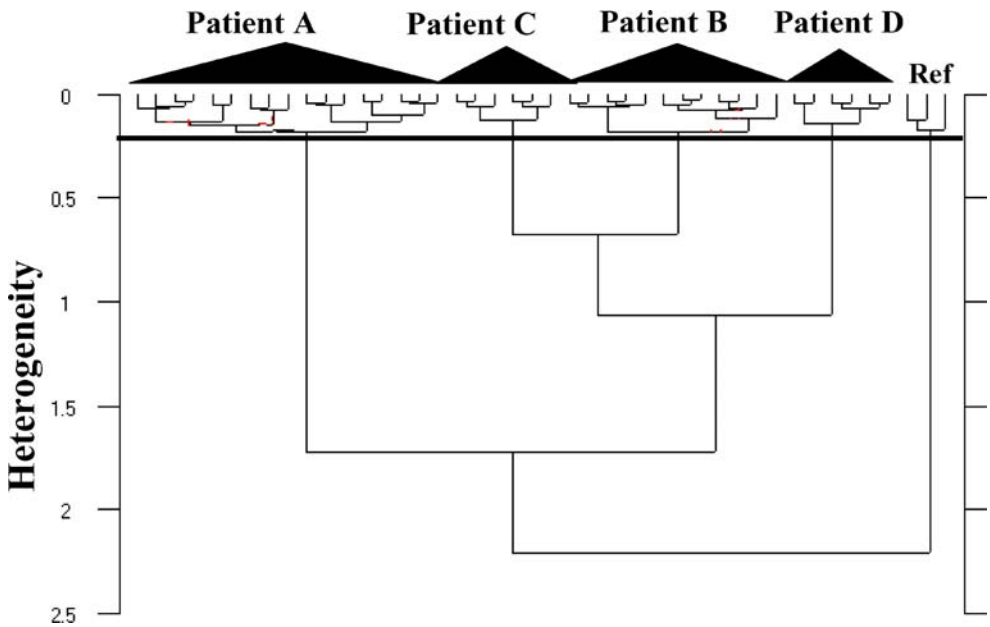


Fig. 5 Dendrogram of 14 strains of *C. parapsilosis* isolated from 4 patients and 1 reference strain (ATCC 22019), using second-derivative spectra in the 1,090–1,110, 1,120–1,140 and 1,170–1,190 cm^{-1} spectral zones. The *bold black line* represents the threshold of heterogeneity at 0.2

approach to confirm an outbreak, investigate the origins of an infection and/or its modes of transmission.

FTIR spectroscopy can be a novel approach for other various applications in medical mycology, such as identification of other yeasts and of filamentous fungi, and in therapeutic applications (e.g. the study of resistance to antifungal agents and biofilm formation). Moreover, this technique could also be applied in more fundamental approaches such as the study of virulence factors of *Candida* (morphogenesis, adherence and invasion).

Acknowledgements The authors thank Pfizer Laboratories for supporting this work.

References

1. Sims CR, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH (2005) Arch Med Res 36:660–671
2. Ruhnke M (2006) Curr Drug Targets 7:495–504
3. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD (1999) Clin Microbiol Rev 12:80–96
4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds) (1999) Manual of clinical microbiology, 7th edn. ASM Press, Washington
5. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, Van Vreeswijk T, Stammler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ (2003) J Clin Microbiol 41:324–329
6. Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindós G, Sentandreu R, Pontón J (1997) Mycoses 40:445–450
7. Pfaller MA (2001) Emerg Infect Dis 7:312–318
8. Sakallah SA (2000) Biotechnol Annu Rev 6:141–161
9. Williams DW, Wilson MJ, Lewis MAO, Potts AJ (1995) J Clin Microbiol 33:2476–2479
10. Senses-Ergul S, Agoston R, Belak A, Deak T (2006) Int J Food Microbiol 108:120–124
11. Plachy R, Hamal P, Raclavsky V (2005) J Microbiol Methods 60:107–113
12. Rozynek P, Gilges S, Brüning T, Wilhelm M (2004) Int J Hyg Environ Health 207:297–299
13. Nazzal D, Yasin S, Abu-Elteen K (2005) New Microbiol 28:245–250
14. Fischer G, Dott W (2002) Int J Hyg Environ Health 205:433–442
15. Naumann D, Helm D, Labischinski H (1991) Nature 351:81–82
16. Timmins EM, Howell SA, Alsberg BK, Noble WC, Goodacre R (1998) J Clin Microbiol 36:367–374
17. Schmalreck AF, Trankle P, Vanca E, Blaschke-Hellmessen R (1998) Mycoses 41:71–77
18. Orsini F, Ami D, Villa AM, Sala G, Bellotti MG, Doglia SM (2000) J Microbiol Methods 42:17–27
19. Sockalingum GD, Bouhedja W, Pina P, Allouch P, Mandray C, Labia R, Millot JM, Manfait M (1997) Biochem Biophys Res Com 232:240–246
20. Sandt C, Sockalingum GD, Aubert D, Lepan H, Lépousé C, Jaussaud M, Léon A, Pinon JM, Manfait M, Toubas D (2003) J Clin Microbiol 41:954–959
21. Essendoubi M, Toubas D, Bouzaggou M, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD (2005) Biochim Biophys Acta 1724:239–247
22. Ward JH, Hierarchical grouping to optimise an objective function (1963) J Am Stat Assoc 58:236–244
23. OPUS/IDENT (1996) Reference manual. Autorenkollektiv, Ettlingen, Germany
24. Nedret Koc A, Kocagoz S, Erdem F, Gunduz Z (2002) Mycoses 45:470–475
25. Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, Webb RM, Currier M, Flowers RH, Fridkin SK, Hajjeh RA (2004) J Clin Microbiol 42:4468–4472
26. Adt I, Toubas D, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD (2006) Arch Microbiol 185:277–285
27. Kummerle M, Scherer S, Seiler H (1998) Appl Environ Microbiol 64:2207–2214
28. Fischer G, Braun S, Thissen R, Dott W (2006) J Microbiol Methods 64:63–77
29. Wenning M, Seiler H, Scherere S (2002) Appl Environ Microbiol 68:4717–4721

Chapitre 3 : Utilisation de la spectroscopie IRTF comme une méthode d'investigation épidémiologique : Suivi épidémiologique de souches de *C. glabrata* chez 4 patients hospitalisés en réanimation.

Publication: 3

Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy

Mohammed Essendoubi, Dominique Toubas, Claire Lepouse, Alain Leon, Fabienne Bourgeade, Jean-Michel Pinon, Michel Manfait, Ganesh D. Sockalingum

Journal of Microbiological Methods

Received: 21 May 2007; Revised: 7 September 2007; Accepted: 28 September 2007.

PREAMBULE A L'ARTICLE 3

CONTEXTE

L'augmentation de l'incidence des infections fongiques a été rapportée chez les patients immunodéprimés hospitalisés dans les services de soins intensifs médicaux et chirurgicaux et chez les patients neutropéniques. Si *Candida albicans* représente l'espèce la plus importante responsable de candidose invasive, on note une augmentation de l'incidence chez les autres espèces telle que *Candida glabrata*. Les infections à *C. glabrata* atteignent les muqueuses ou peuvent être systémiques. Elles posent un problème thérapeutique majeur en raison de leur résistance fréquente au traitement par les azolés.

Généralement on considère qu'un individu est colonisé ou infecté par une seule souche d'origine endogène (Verduyn-lunel 999; Hedderwick 2000; Vrioni 2001; Daniels 2001) mais des cas de contaminations exogènes ont été rapportés (Pertowski 1995; Schmid 1995; Pfaller 1998; Hedderwick 2000; Hamal 2001). Lorsqu'une transmission nosocomiale est suspectée, le typage des souches prélevées est important pour déterminer l'origine de la contamination.
Après une première étape de mise au point du typage de *C. glabrata* par spectroscopie IRTF, nous avons appliqué cette technique pour le typage de différentes souches de *C. glabrata* lors de deux situations cliniques, la première lors d'un suivi longitudinal pour comparer cinq souches isolées de différents sites de prélèvement chez le même patient, et la seconde lors d'un suivi épidémiologique de quatre patients en service de réanimation. Les résultats du typage par spectroscopie IRTF ont été comparés à ceux obtenus par une analyse génotypique basée sur la RAPD.

METHODE

Pour le suivi longitudinal, les cinq souches de *C. glabrata* prélevées chez le même patient à partir de différents sites anatomiques (tableau 18), ont été comparées par spectroscopie IRTF. Les spectres ont été enregistrés dans les conditions définies précédemment. Pour le deuxième cas de suivi épidémiologique, l'étude a porté sur 13 souches isolées de différents sites chez quatre patients hospitalisés en réanimation. Les spectres IRTF des 13 isolats ont été enregistrés et analysés par la classification hiérarchique ascendante (HCA).

Afin de comparer les résultats du typage obtenus par spectroscopie IRTF, le typage de ces souches a été réalisé par une technique moléculaire basée sur la RAPD en utilisant deux amorces VAZ et SOY.

samples	Patient	Age(yr)	Sex[a]	Reason for hospitalisation	Body site or type of samples
1					trachea
2					thoracic drain
3	A	58	M	Acute pneumonia	Sputum
4					throat
5					bronchial aspiration
1	Reference (1)	40	M	Bladder cancer	stool
1	Reference (2)	49	M	Haematological malignancy	throat

Tableau 18 : Les cinq souches du même patient et leurs sites de prélèvements

RESULTATS

- Suivi longitudinal : L'exploitation visuelle des spectres IRTF des cinq isolats prélevés chez le même patient, à partir de différents sites anatomiques, montre que les profils spectraux pour les cinq échantillons sont identiques entre eux mais diffèrent par rapport aux deux souches de référence (Figure 50). Cette observation suggère l'infection un temps donné du patient par une même souche d'origine endogène.

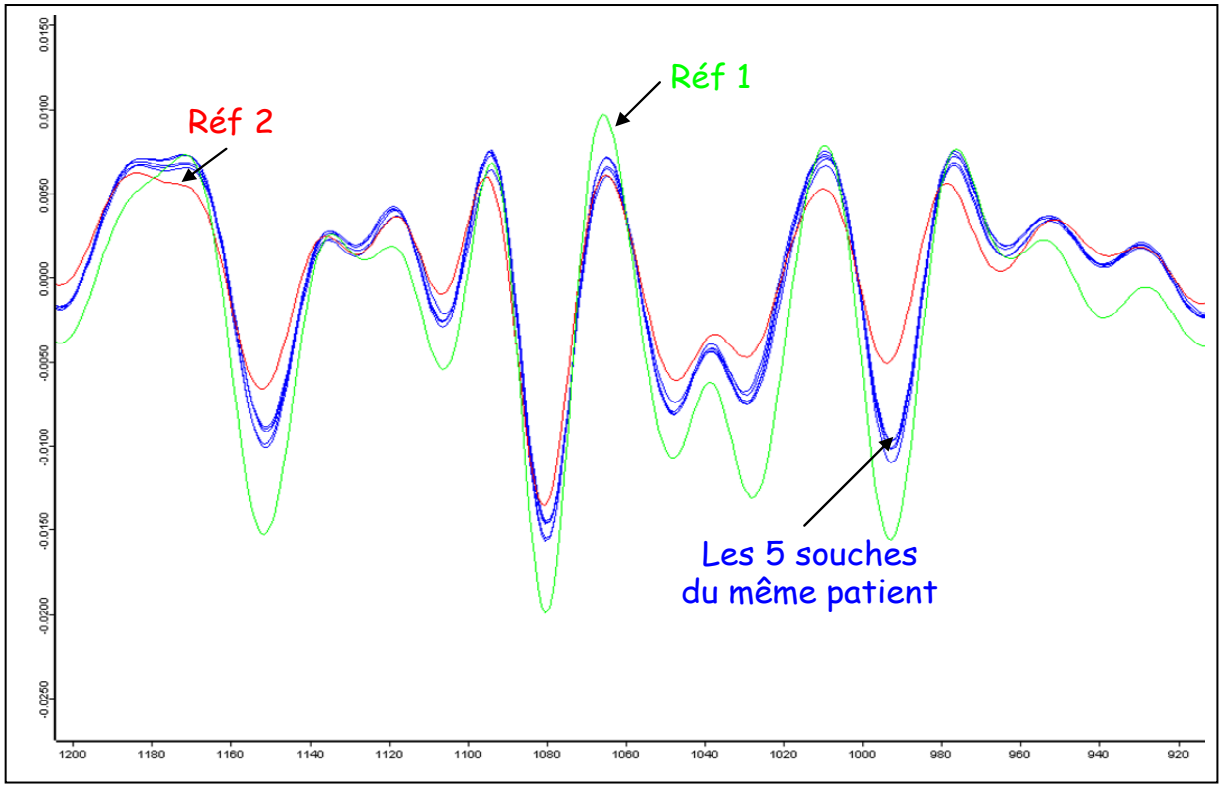


Figure 50 : Dérivée seconde des spectres de *C. glabrata* dans la région spectrale 900-1200 cm^{-1}, montrant les variations spectrales entre les cinq isolats du même patient et les deux souches de référence.

Le dendrogramme obtenu par HCA est montré en Figure 51. Le seuil d'hétérogénéité de 0,3 fixé pour la séparation des 2 souches de référence, et la combinaison de 3 régions spectrales (900-1200, 1540-1800, et 2800- 3000 cm^{-1}) ont permis de déterminer un seul groupe de souche englobant les spectres des cinq isolats. Ceci montre que le patient a été colonisé par la même souche et que les isolats prélevés à partir de différents sites anatomiques sont identiques.

Le typage de ces souches est également possible en se basant seulement sur la région des polysaccharides (900-1200 cm^{-1}) qui est la plus discriminante. Cependant nous avons choisi d'y associer la zone des protéines (1540-1800 cm^{-1}) et celle des lipides (2800- 3000 cm^{-1}), pour augmenter l'hétérogénéité entre les souches de *C. glabrata*.

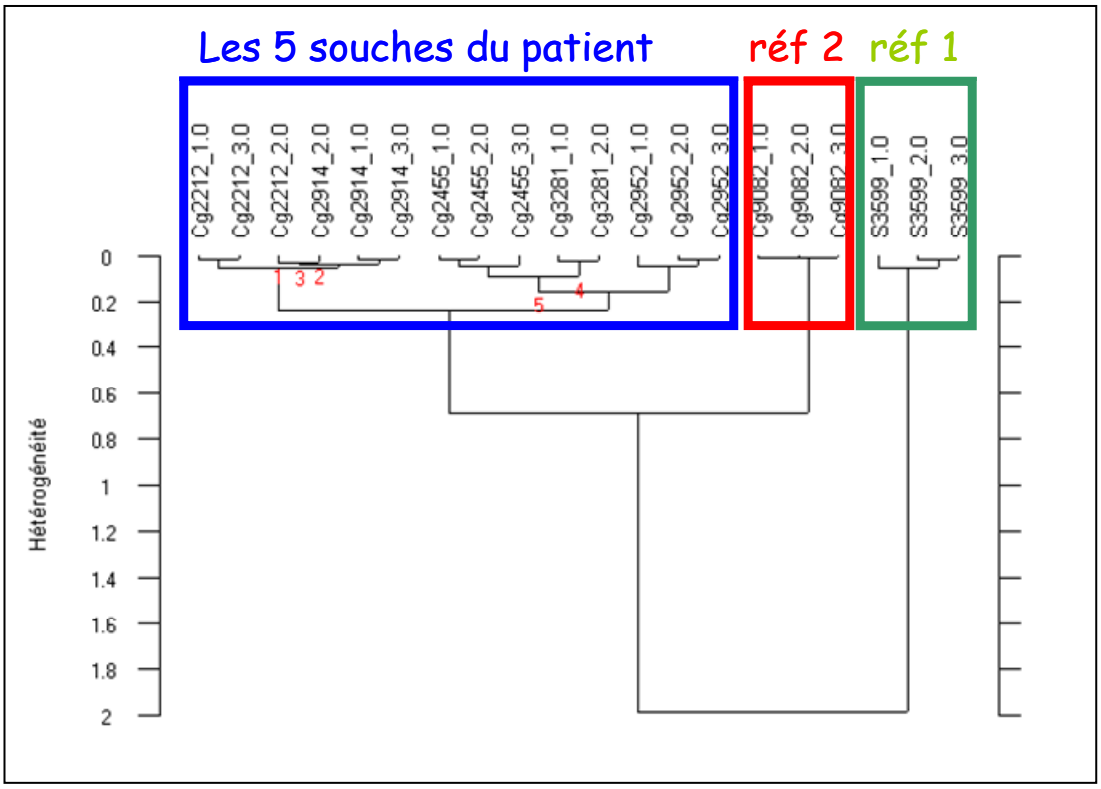


Figure 51 : Classification hiérarchique des dérivées secondes des spectres des cinq isolats d'un même patient et de deux souches références (9082 et S3599) de *C. glabrata* en combinant les régions spectrales 900-1200, 1540-1800, et 2800- 3000 cm^{-1}.

Le résultat obtenu par spectroscopie IRTF a été confirmé par la RAPD (Figure 52). En analysant les gels RAPD pour les deux amorces, on constate que les profils des cinq isolats sont identiques entre eux mais diffèrent par rapport aux deux souches de référence. Ceci est en faveur d'une colonisation du patient par une seule souche d'origine endogène.

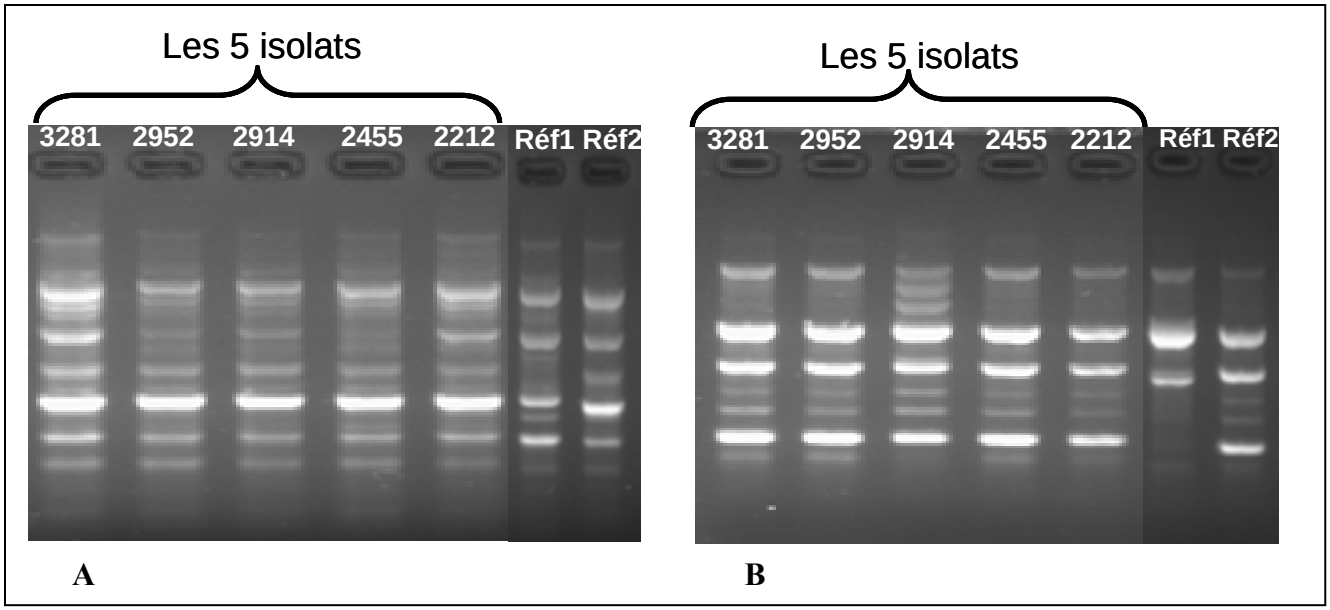


Figure 52 : Profils d'amplification de cinq isolats du même patient et de 2 souches de référence (9082 et S3599) de *C. glabrata*. Deux amorces ont été utilisées (A) avec sonde VAZ et (B) avec sonde SOY.

Donc les cinq souches provenant de ce patient sont identiques.

- Suivi épidémiologique : Dans cette deuxième approche les résultats obtenus pour les quatre patients montrent que les souches isolées d'un même patient sont identiques mais diffèrent d'un patient à l'autre. Ces résultats ont été confirmés par technique moléculaire (RAPD) et tous les profils des isolats d'un même patient sont identiques. Les résultats de cette étude sont décrits en détail dans l'article. Le typage par spectroscopie IRTF a permis d'exclure une transmission interhumaine de *C. glabrata* entre ces patients.

CONCLUSION

Pour être performant en tant que méthode de typage en mycologie médicale, la spectroscopie IRTF doit être capable de différencier des souches non apparentées, d'identifier une même souche dans des échantillons différents et de donner une information sur l'identité des souches prélevées chez les patients. Elle doit aussi être facile à mettre en œuvre, rapide et robuste. Ces critères ont été confirmés lors de ces travaux. Nous avons montré que la spectroscopie IRTF a permis de réaliser un suivi longitudinal de souches de *C. glabrata* chez un patient hospitalisé en Service de Réanimation en montrant que les souches prélevées en

différents sites anatomiques étaient identiques. Nous avons également montré que le pouvoir discriminant de la méthode était suffisant pour différencier et classifier 13 échantillons appartenant à 4 patients différents lors d'un suivi épidémiologique et exclure une transmission interhumaine.

Accepted Manuscript

Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy

Mohammed Essendoubi, Dominique Toubas, Claire Lepouse, Alain Leon, Fabienne Bourgeade, Jean-Michel Pinon, Michel Manfait, Ganesh D. Sockalingum

PII: S0167-7012(07)00326-0
DOI: doi: 10.1016/j.mimet.2007.09.018
Reference: MIMET 2828

To appear in: *Journal of Microbiological Methods*

Received date: 21 May 2007
Revised date: 7 September 2007
Accepted date: 28 September 2007

Please cite this article as: Essendoubi, Mohammed, Toubas, Dominique, Lepouse, Claire, Leon, Alain, Bourgeade, Fabienne, Pinon, Jean-Michel, Manfait, Michel, Sockalingum, Ganesh D., Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy, *Journal of Microbiological Methods* (2007), doi: 10.1016/j.mimet.2007.09.018

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy

Mohammed Essendoubi [a], Dominique Toubas [b], Claire Lepouse [c], Alain Leon [c], Fabienne Bourgeade [c], Jean-Michel Pinon [b], Michel Manfait [a], Ganesh D. Sockalingum [a,*]

[a] *Unité MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims CEDEX, France.*

[b] *Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université de Reims Champagne-Ardenne, EA 3800, UFR de Médecine, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims CEDEX, France.*

[c] *Département d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Robert Debré, 51092 Reims CEDEX, France.*

* Corresponding author: Dr. Ganesh D Sockalingum

Unité MéDIAN, CNRS UMR 6142

UFR de Pharmacie

Université de Reims Champagne-Ardenne

51 rue Cognacq-Jay

51096 Reims CEDEX, France.

Email : ganesh.sockalingum@univ-reims.fr

Tel : + 33 3 26 91 35 53

Fax : + 33 3 26 91 35 50

ACCEPTED MANUSCRIPT

ABSTRACT

Candida glabrata has emerged as one of the leading agents of fungal infections and strain typing is essential for epidemiological investigation that is generally achieved by molecular techniques. In this work, we studied twenty-nine *C. glabrata* strains isolated from different patients, using a phenotypic approach based on Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, which has been in a previous study successfully applied as a rapid typing method for *Candida albicans*. A two-step procedure was used for the analysis. The first step included sixteen strains for the internal validation phase, which aimed at finding the spectral windows that would provide the best differentiation between strains. In this phase, hierarchical cluster analysis (HCA) carried out using three spectral windows (900-1200, 1540-1800, 2800-3000 cm^{-1}) allowed to obtain the best classification, where each patient strains could be clustered together. A genotypic technique based on randomly amplified polymorphic DNA-analysis (RAPD) confirmed these results. In a second step, the external validation phase, thirteen other clinical strains of *C. glabrata* isolated from multiple sites in four ICU patients, were tested by FTIR spectroscopy. The analysis was based on the spectral regions previously found in the first step. HCA classification of the strains gave four groups, one group per patient. These results suggest that no inter-human transmission took place. This study shows the potential of FTIR approach for typing of *C. glabrata* with several advantages compared to other techniques. FTIR typing is fast, effective, and reagent free. Moreover, it is applicable to all micro-organisms and requires a small quantity of biomass.

Keywords: *Candida glabrata*; Typing; FTIR spectroscopy; RAPD.

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

INTRODUCTION

Opportunistic candidemia is an increasing problem in intensive care units (ICUs) and in neutropenic patients. *Candida* species represent the fourth most commonly recovered organism from blood cultures, with an estimated crude mortality rate of 38 to 75% (Pfaller and Diekema, 2004). Although the majority of serious fungal infections are caused by *C. albicans*, other *Candida* species have emerged as clinically important pathogens associated with opportunistic infections (Hazen, 1995). Several epidemiological studies have described outbreaks caused by different *Candida* species (Huang et al., 1999; Boccia et al., 2002; Roilides et al., 2003).

Forty to fifty percent of candidemia are caused by *non-albicans Candida* species (Hazen, 1995; Tortorano et al., 2004). Among these, *C. glabrata* is now considered as the most frequently isolated species (Pfaller et al., 2001; Diekema et al., 2002). The incidence of *C. glabrata* hospital bloodstream infections is in progress (Pfaller et al., 2000). This evolution of *C. glabrata* infection is noteworthy because of the association with a high rate of morbidity and mortality in immunocompromised patients. The frequency of *C. glabrata* as a cause of bloodstream infection in adult patients has been observed to increase with increasing patient age in the geriatric population. (Kauffman, 2001; Diekema et al., 2002). In addition, some strains show decreased susceptibility to azole antifungal agents, in particular to fluconazole and voriconazole (Pfaller et al., 2000; Pfaller et al., 2003; Pfaller and Diekema, 2004). The emergence of *C. glabrata* as an important bloodstream infection pathogen may not be a simple matter of selective pressure by a drug (e.g., fluconazole) but may also be influenced by underlying diseases, and geographic location (Pfaller et al., 2003).

Although *Candida* infections are mainly of endogenous origin, recent studies using typing methods have suggested the occurrence of cross-transmission of nosocomial *Candida* species. This exogenous acquisition is significantly increased with intravascular devices and parenteral nutrition (Eggimann et al., 2003; Tortorano et al., 2006).

The demonstration of an exogenous origin is based on the identification and comparison of different strains isolated from patients and from clinical environment. A clear understanding of the epidemiology of *C. glabrata* infection and colonization has been difficult because of a lack of reliable typing systems to evaluate strains homology (Fidel et al., 1999). Previous *Candida* typing systems relying on phenotypic differences within a *Candida* species do not reflect true strain differences (Dembry et al., 1994). However, recent advances in the use of genotypic techniques have enabled investigators to develop typing methods with greater

ACCEPTED MANUSCRIPT

sensitivity, particularly the amplification of specific gene sequences by PCR, such as randomly amplified polymorphic DNA-analysis (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Howell et al., 1996; Steffan et al., 1997), pulsed-field gel electrophoresis (Vazquez et al., 1991; Khattak et al., 1992), multilocus enzyme electrophoresis (MEE) (Sanson et al., 2000), microsatellite marker analysis (Foulet et al., 2005), and multilocus sequence typing (MLST) (Dodgson, 2003). Although these techniques have the potential to differentiate closely related strains, they are time-consuming, costly, and require highly trained staff to be performed adequately.

Beyond the molecular methods, other approaches including optical spectroscopic methods have been proposed for comparing strains. FTIR spectra provide highly specific spectroscopic fingerprints of microorganisms allowing identification at species and sub-species levels (Naumann et al., 1991; Maquelin et al., 2003). This approach represents an analytical, non-destructive, and dynamic method to investigate a cell population with little biomass (Naumann et al., 1991; Helm et al., 1991; Kirschner et al., 2001; Maquelin et al., 2003). It not only permits the identification and characterization of microbial cells (phenotype, species, sub-species, pathogenicity, resistance…) but also a detailed structural analysis to identify diverse macromolecules (nature, quantity, and conformation of molecular bonds) (Sockalingum et al., 1997; Bouhedja et al., 1997; Galichet et al., 2001; Sandt et al., 2003; Adt et al., 2006).

We have previously shown that FTIR spectroscopy allows rapid identification of *Candida* species (Essendoubi et al., 2005) and typing of *C. albicans* strains (Sandt et al., 2003). Most of the molecular techniques have been applied for *C. albicans* typing. Only few applications have been developed for *C. glabrata* typing, despite a similar epidemiological situation of these two species (Foulet et al., 2005).

In this study, we have applied FTIR spectroscopy for typing clinically relevant strains of *C. glabrata* with the aim to verify the presence or absence of cross infection between patients. In order to evaluate the potential of FTIR spectroscopy for typing *C. glabrata* strains, we compared FTIR results to RAPD analysis.

ACCEPTED MANUSCRIPT

MATERIALS AND METHODS

Origin of the strains

Twenty-nine isolates of *Candida glabrata* were collected by the Mycology Laboratory of the University Hospital, Reims, France. The identification at species level was performed by commercial systems (Auxacolor® and culture on PCB medium, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). All strains were stored at room temperature in sterile distilled water for analysis by FTIR spectroscopy. For long–term storage, these strains were frozen at -80°C in Sabouraud broth (bioMérieux Marcy l'Etoile France) with 10% glycerol (Sigma, St. Quentin Fallavier, France).

In a first step, the internal validation phase, 16 isolates originating from an unknown number of strains were provided by the mycology laboratory and subjected to FTIR analysis. Eight isolates out of 16 were used for an optimization test, and the remaining set was subjected to a validation test. The results were compared to RAPD data.

In a second step, the external validation phase, we studied 13 strains of *C. glabrata* isolated from different anatomical sites of 4 ICU patients during the same period of hospitalisation. Two *C. glabrata* strains, isolated from 2 other patients not hospitalised at the same time, have been arbitrarily chosen as references for FTIR spectroscopy and RAPD analyses. Strains data are presented in Table 1.

Culture conditions and sample preparation for FTIR spectroscopy

Candida glabrata strains were cultured on Sabouraud-Gentamicin-Chloramphenicol medium (bioMérieux France) at 37 °C for 24 h. Cells were harvested by carefully scraping the agar plate with a 10 µl plastic loop and suspended in 1 ml of distilled water. The concentration of each suspension was spectrophotometrically measured (Uvikon; Kontron Instruments, Thiais, France) at 500 nm and adjusted to an optical density of 3±0.1 to control film thickness. An aliquot of 35 µl of the suspension containing about 3×10^8 cells was transferred to a zinc selenide (ZnSe) multisample carrier with 16 positions and dried in a dessicator over a drying agent with the application of a mild vacuum (2.5 to 7.5 kPa) so as to obtain a thin transparent film suitable for FTIR measurements. Sample desiccation was necessary to avoid strong water absorption in the protein region of the infrared spectra.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Recording of spectra

Infrared spectra were recorded using an Equinox 55 (Bruker Optics, Wissemburg, France) equipped with a deuterated triglycine sulphate detector and a MICOR-ID sample changer (Bruker Optics) which accommodates the sample carrier and which is specially designed for analyzing a dried suspension of cells. The spectrometer was continuously purged with dry air generated by a model 75-62 FTIR spectroscopy purge gas generator (Whatman, Villeneuve d'Ascq, France) to reduce absorption due to atmospheric water vapour and CO_2. FTIR spectra were recorded in the region between 400 and 4000 cm^{-1}. For each spectrum, 64 scans were co-added and averaged at a resolution of 6 cm^{-1}. These parameters have been optimized in a previous study (Sandt et al., 2003). Fourier transformation was done using a Blackmann-Harris 3-term apodization function and a zero filling factor of 2 was applied to give a final resolution of one point per wave number. FTIR recording of 15 samples takes about 30 min. under these conditions. The spectra were recorded in transmission mode. In order to determine the reproducibility of our results, three independent cultures were examined and mean spectra were based on three replicate measurement of each culture (for each culture, 3 spectra were recorded making a total of 9 spectra per sample).

Data processing

The pre-processing and processing of spectra were achieved using the Opus software (version 3.1, Bruker). The procedure was as follows: baseline elastic correction of the total spectral region, calculation of the second derivative using a Savitzky-Golay algorithm and finally vector normalisation. This pre-processing was done on the whole spectral region (400-4000 cm^{-1}) of all spectra. In order to compare the spectra of the different strains, cluster analysis using the second derivative of the original spectra as input was carried out for different spectral regions. Spectra were classified by using Opus Ident cluster analysis (Opus NT 3.1) based on a hierarchical classification algorithm. Derivation of the spectra to the second order was used to increase the number of discriminant features present in the spectra. The HCA function used calculates Euclidean distances between the spectra and between the groups according to their similarities in cluster. The spectral windows chosen for typing of *C. glabrata* isolates were those which enabled the greatest discrimination between the strains examined here.

ACCEPTED MANUSCRIPT

RAPD analysis

We have used the eight strains, previously studied in the validation test (second step of the internal validation phase) and the same two reference strains for RAPD analysis. Each strain was cultured on Sabouraud-gentamicin-chloramphenicol agar. A suspension of 2×10^8 cells/ml was prepared. DNA was extracted with a QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Briefly, after centrifugation of the suspension (5,000 x *g* for 5 min), the pellet was incubated with tissue lysis buffer and proteinase K for 1 h. DNA treatment with lysis buffer (70°C for 10 min) was followed by ethanol precipitation. The lysate was bound to microcentrifugation columns, washed twice, and finally eluted with water.

A Ready to go RAPD Analysis Beads kit (Amersham Pharmacia Biotech) was used for the analysis. Two oligonucleotides were used as primers, VAZ (5'-TGGACCCTGC-3') (Bougnoux et al., 1994) and SOY (5'-AGGTCACTGA-3') (Lehmann et al., 1992). The DNA content was measured photometrically at 260 nm. PCR was performed with 20 ng of DNA as a template in a final volume of 25 µl. Samples were denatured at 95°C for 5 min with a thermocycler; this step was followed by 45 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 36°C and 2 min at 72°C. The PCR products were analyzed under UV light after electrophoresis through 1.6% (wt/vol) agarose gels containing ethidium bromide. Patterns were digitized by using a FluorS Multimager (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) with Quantity One 4.1.0 software (Bio-Rad) and analyzed by using Biodiversity 2.20 (Bio-Rad).

RESULTS AND DISCUSSION

FTIR spectroscopy is based on the vibrational excitation of molecular bonds by absorption of infrared light energy. The sum vibrational spectra for a cell's macromolecule content (nucleic acids, proteins, lipids, polysaccharides, etc.) can be thought of as a spectral "fingerprint" for that organism. As such, these spectra can be used diagnostically in typing or identification applications. Additionally, FTIR spectroscopy can reveal small variations stemming from cultural parameters (culture time, medium composition and pH, temperature, water content, etc.) or culture storage conditions. Standardization of culture conditions, sample preparation, and spectral acquisition parameters (number of scans and spectral resolution) were performed previously to achieve reproducibility of spectral data acquisition. All studies were performed using the same culture conditions as described previously (Toubas et al., 2006).

We have shown in a previous study that FTIR spectroscopy presents enough discriminating power to identify *C. albicans* strains (Sandt et al., 2003). In this study, our objective was to

ACCEPTED MANUSCRIPT

apply FTIR spectroscopy to achieve an early typing of *C. glabrata* strains. This procedure may help epidemiological investigation in order to verify if there is any cross infection between patients. In the validation test, FTIR spectroscopy and RAPD analysis were compared, in view of evaluating the typing potential of FTIR spectroscopy for *C. glabrata*.

Internal validation phase

The internal validation phase was utilized to establish the optimal spectral windows that would differentiate the *C. glabrata* strains. For the optimization test, eight samples originating from an unknown number of strains and patients were analyzed by FTIR spectroscopy. The aims were to identify the spectral windows that best determine the number of patients and discriminate the strains according to each patient. A visual inspection of the second derivative spectra allowed to detect 3 spectral windows with a possible discriminating capacity: 900-1200, 1540-1800, and 2800-3000 cm^{-1}. Hierarchical classification by using these spectral windows allowed to obtain 6 clusters with a heterogeneity threshold of 0.2 (Fig.1). These 6 clusters correspond to the 4 patients (A, B, C and D) and the two reference strains (Ref 1 and Ref 2). The results also indicate that all samples belonging to the same patients are pooled together showing a complete concordance with patient sources. As previously described, in order to achieve reproducibility of spectral data acquisition, three independent cultures were investigated.

For the validation test, the analysis of the remaining eight strains by FTIR spectroscopy enabled the distinction of four groups. These four groups correspond to two patients (E and F) and the two reference strains (Ref 1 and Ref 2) with a heterogeneity level of 0.3 (Fig.2A). These results confirmed the discriminatory power of the spectral analysis using the identified regions in the optimization test, and demonstrate the utility of FTIR spectroscopy for typing of *C. glabrata*.

RAPD analysis

We used the eight strains previously studied in the validation test (second step of the internal validation phase) and the 2 reference strains. RAPD was chosen for the genotyping of *C. glabrata* strains, to evaluate and confirm previously FTIR spectroscopy obtained results (Fig.2 A). The results obtained by the two primers (Fig. 2 B and 2 C) show that the RAPD profiles of these strains are identical for each patient and differ from one patient to another.

ACCEPTED MANUSCRIPT

We were able to distinguish the same four groups: two groups for the two patients (E and F) and two groups for the reference strains. These results confirm the potential and robustness of FTIR spectroscopy in the typing of the *C. glabrata*.

The comparison between RAPD and FTIR spectroscopy shows that the detected intraspecific spectral variability is higher when compared to the polymorphism obtained with RAPD. The latter is work intensive due to the choice of primers and the complexity of the protocols (DNA extraction, amplification, migration, and visualization…) and the interpretation of bands intensities may be subjective.

External validation phase

In the external validation phase, thirteen strains (Table 1) of *C. glabrata* isolated from 4 ICU patients hospitalized during the same period have been selected to evaluate the potential of FTIR spectroscopy as a typing method. After validation of spectral bands selected for *C. glabrata* typing, our objective was to compare the spectral signatures of all patient strains in order to detect the possibility of inter-human infection. For this purpose, the different strains from each patient were studied by FTIR spectroscopy. An initial visual inspection of the mean second derivative spectra revealed several windows in the polysaccharide region (900-1200 cm^{-1}) where spectral differences could be observed (Fig.3). The spectra showed high similarities within the same patients while they are very heterogeneous from patient to patient.

The hierarchical classification was then applied to the second derivative spectra over the three previously selected spectral windows (900-1200, 1540-1800, and 2800-3000 cm^{-1}). The results allowed to distinguish 6 spectral groups corresponding respectively to the 4 patients (G, H, I and J) and the two reference strains when the heterogeneity threshold was set at 0.4 (Fig.4). All individual patient strains were correctly grouped. Hierarchical cluster analysis first carried out using a combination of 3 spectral windows (900-1200, 1540-1800, 2800-3000 cm^{-1}) allowed to obtain a correct classification of the patient and reference spectra. However, the typing of *C. glabrata* like the typing of *C. albicans* can be achieved using only the polysaccharide region located between 900 and 1200 cm^{-1}(Sandt et al., 2003). Although spectral variations between the *C. glabrata* strains are less important than those observed in *C. albicans* (Toubas et al., 2006), they still contain enough discriminant information to be used for typing of *C. glabrata* strains. This region reveals higher reproducibility and variability between strains, which can be explained by the highly conserved polysaccharidic

ACCEPTED MANUSCRIPT

components between species and sub-species. Indeed, the polysaccharide region allows reducing significantly the heterogeneity threshold for *C. glabrata* typing.

This finding allowed to conclude that there was no cross infection between the patients. The epidemiology of *Candida* infections is still controversial. It is generally recognized that infection arises from invasion by endogenous *Candida* strains. However, several reports of outbreaks of *Candida* infections support exogenous acquisition of a *Candida* strain. The results obtained in our study show that the FTIR spectroscopy approach could potentially serve as an epidemiological investigative tool to identify and control sources of infection in a clinical setting by determining the origins of infection, the routes of acquisition, transmission of strains, and their persistence. This technique could also be developed to analyse the micro-evolution of a single strain.

In the last 15 years, modern infrared spectroscopy has been developed into a useful tool for the analysis of micro-organisms. Rapid identification of *Candida* sub-species is necessary to enable an early diagnostic and adapt anti-fungal therapy, thus reducing morbidity and mortality related to these infections. Currently, we are also developing FTIR typing of other *Candida* species, particularly *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis.*

FTIR spectroscopy has a high discriminating power for identification at genus and species levels. In addition, it has the ability to type *C. glabrata* strains. This phenotypic approach is fast, effective, and label-free. It is applicable to all growing micro-organisms and requires only a small quantity of biomass. All these advantages qualified this technique as a valuable phenotypical method that can complement molecular techniques currently used for the typing of the *Candida* species. We believe that the method is transferable to other laboratories with the conditions that the experimental protocol is followed and that an equivalent-type FTIR spectrometer is available. However, if the objective is to apply FTIR spectroscopy for the typing of other yeast species or of bacteria, it would be necessary to perform a feasibility study, the discriminating capacity of FTIR spectroscopy at a subspecies level having been proven only for a limited number of micro-organisms (*C. glabrata*, *C. albicans*, *E. coli*, and *S. aureus*....).

Our work on FTIR-based typing typically uses 24 hr-old cultures. It would be clinically valuable to reduce this time further. Therefore, a focus of future work will be to extend our current approach to include FTIR microspectroscopy of microcolonies after only 10 - 18 hrs of growth.

ACCEPTED MANUSCRIPT

References

Adt, I., Toubas, D., Pinon, J.M., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2006. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. Arch. Microbiol. 185, 277-285.

Boccia, S., Posteraro, B., La Sorda, M., Vento, G., Matassa, P.G., Tempera, A., Petrucci, S., Fadda, G., 2002. Genotypic analysis by 27A DNA fingerprinting of *Candida albicans* strains isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 23, 281-284.

Bouhedja, W., Sockalingum, G. D., Pina, P., Allouch, P., Mandray, C., Labia, R., Millot, J.M., Manfait, M., 1997. ATR-FTIR spectroscopic investigation of *E. coli* transconjugants β-lactams-resistance phenotype. FEBS. Lett. 412, 39-42.

Bougnoux, M.E., Robert, F., Beria, S., Cassinat, B., Nicolas, M.H., Dupouy-Camet, J., 1994. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Candida*. J. Mycol. Med. 4, 3-8.

Dembry, L.M., Vazquez, J.A., Zervos, M.J., 1994. DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 5, 48-53.

Diekema, D.J., Messer S.A., Brueggemann A.B., Coffman S.L., Doern G.V., Herwaldt L.A., Pfaller M.A., 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. J. Clin. Microbiol. 40, 1298-1302.

Dodgson, A.R., 2003. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. J. Clin. Microbiol. 41, 5709-5717.

Eggimann, P., Garbino, J., Pittet, D., 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet. Infect. Dis. 3, 685-702.

Essendoubi, M., Toubas, D., Bouzaggou, M., Pinon, J.M., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2005. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. 1724, 239-247.

Fidel, P.L.Jr., Vazquez, J.A., Sobel, J.D., 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin. Microbiol. Rev. 12, 80-96.

Foulet, F., Nicolas, N., Eloy, O., Botterel, F., Gantier, J.C., Costa, J.M., Bretagne, S., 2005. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. J. Clin. Microbiol. 43, 4574-4579.

Galichet, G.A., Sockalingum, G.D., Belarbi, A., Manfait, M., 2001. FTIR spectroscopy analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. FEMS. Microbiol. Lett. 197, 179-186.

Hazen, K.C., 1995. New and emerging yeast pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 8, 462–478.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., Naumann, D., 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J. Gen. Microbiol. 137, 69-79.

Howell, S.A., Anthony, R.M., Power, E., 1996. Application of RAPD and restriction enzyme analysis to the study of oral carriage of *Candida albicans*. Lett. Appl. Microbiol. 22, 125–128.

Huang, Y.C., Lin, T.Y., Leu, H.S., Peng, H.L., Wu, J.H., Chang, H.Y., 1999. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. Infection 27, 97-102.

Kauffman, C.A., 2001. Fungal infections in older adults. Clin. Infect. Dis. 33, 550-555.

Khattak, M.N., Burnie, J.P., Matthews, R.C., Oppenheim B.A., 1992. Clamped homogenous electric field gel electrophoresis typing of *Torulopsis glabrata* isolates causing nosocomial infections. J. Clin. Microbiol. 30, 2211– 2215.

Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo-Thi, N.A., Choo-Smith, L.P., Sockalingum, G. D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S.M., Allouch P., Manfait, M., Puppels, G.J., Naumann, D., 2001. Classification and identification of *Enterococci*: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. J. Clin. Microbiol. 39, 1763-1770.

Lehmann, P.F., Lin, D., Lasker, B.A., 1992. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. J. Clin. Microbiol. 30, 3249-3254.

Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., Ngo-Thi, N.A., Van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H.P., Bruining, H.A., Naumann, D., Puppels, G.J., 2003. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 41,324-329.

Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature 351, 81-82.

Pfaller, M.A. and Diekema D. J., 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 42, 4419–4431.

Pfaller M.A., Diekema D.J., International Fungal Surveillance Participant Group, 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. Clin. Microbiol. Infect. 10, 11-23.

Pfaller, M.A., Diekema D.J., Jones R.N., Sader H.S., Fluit A.C., Hollis R.J., Messer S.A., and the SENTRY Participant Group, 2001 . International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J. Clin. Microbiol. 39, 3254-3259.

Pfaller, M.A., Jones R.N., Doern G.V., Sader H.S., Messer S.A., Houston, A., Coffman, S., Hollis, R.J., and the SENTRY Participant Group, 2000. Bloodstream infections due to

ACCEPTED MANUSCRIPT

Candida species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America 1997-1998. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 747-751.

Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L., Tendolkar, S., Hollis R. J., Diekema D. J., 2003. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location. J. Clin. Microbiol. 41, 2176–2179.

Roilides, E., Farmaki, E., Evdoridou, J., Francesconi, A., Kasai, M., Filioti, J., Tsivitanidou, M., Sofianou, D., Kremenopoulos, G., Walsh, T.J., 2003. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. J. Clin. Microbiol. 41, 735-741.

Sandt, C., Sockalingum, G. D., Aubert, D., Lepan, H., Lepouse, C., Jaussaud, M., Leon, A., Pinon, J.M., Manfait, M., Toubas, D., 2003. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. J. Clin. Microbiol. 41, 954-959.

Sanson, G.F., and Briones, M.R., 2000. Typing of *Candida glabrata* in clinical isolates by comparative sequence analysis of the cytochrome c oxidase subunit 2 gene distinguishes two clusters of strains associated with geographical sequence polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 38, 227–235.

Sockalingum, G.D., Bouhedja, W., Pina, P., Allouch, P., Mandray, C., Labia, R., Millot, J.M., Manfait, M., 1997. ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains. Biochem. Biophys. Res. Com. 232, 240-246.

Steffan, P., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J.D., Akins, R.A., Vazquez, J.A., 1997. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. J. Clin. Microbiol. 35, 2031–2039.

Tortorano, A.M, Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Grillot, R., 2006. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. Int. J. Antimicrob. Agents. 27, 359-366.

Tortorano, A.M., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Kibbler, C.C., Faure, O., Biraghi, E., Canton, E., Zimmermann, K., Seaton, S., Grillot, R., 2004. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23, 317-322.

Toubas, D., Essendoubi, M., Adt, I., Pinon, J.M., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2007. FTIR spectroscopy in medical mycology : applications to the differentiation and typing of *Candida*. Anal. Bioanal. Chem. 387, 1729-1737.

Vazquez, J.A., Beckley, A., Sobel, J.D., Zervos M.J., 1991. Comparison of restriction enzyme analysis versus pulse-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 29, 962–967.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 1. Origins of the *C. glabrata* isolates (used in the external validation phase) and clinical data of patients.

No. of samples	Patient	Age(yr)	Sex	Reason for hospitalisation	Body site or type of samples
5	G	58	M	Acute pneumonia	*Tr, Th, Sp, Tr, Br*
3	H	50	M	Acute respiratory failure	*Tr, Pu, Pl*
3	I	32	M	Multiple trauma	*T, T, Tr*
2	J	40	M	Bladder cancer	*U, Il*
1	Reference (1)	49	M	Haematological malignancy	*S*
1	Reference (2)	96	M	Oropharyngeal candidiasis (Outpatient)	*T*

T: throat, *Tr*: trachea, *Th*: thoracic drain, *Sp*: sputum, *Br*: bronchial aspiration, *Pu*: pulmonary abscess, *Pl*: pleural fluid, *U*: urine, *Il*: ileostomia, *S*: stools.

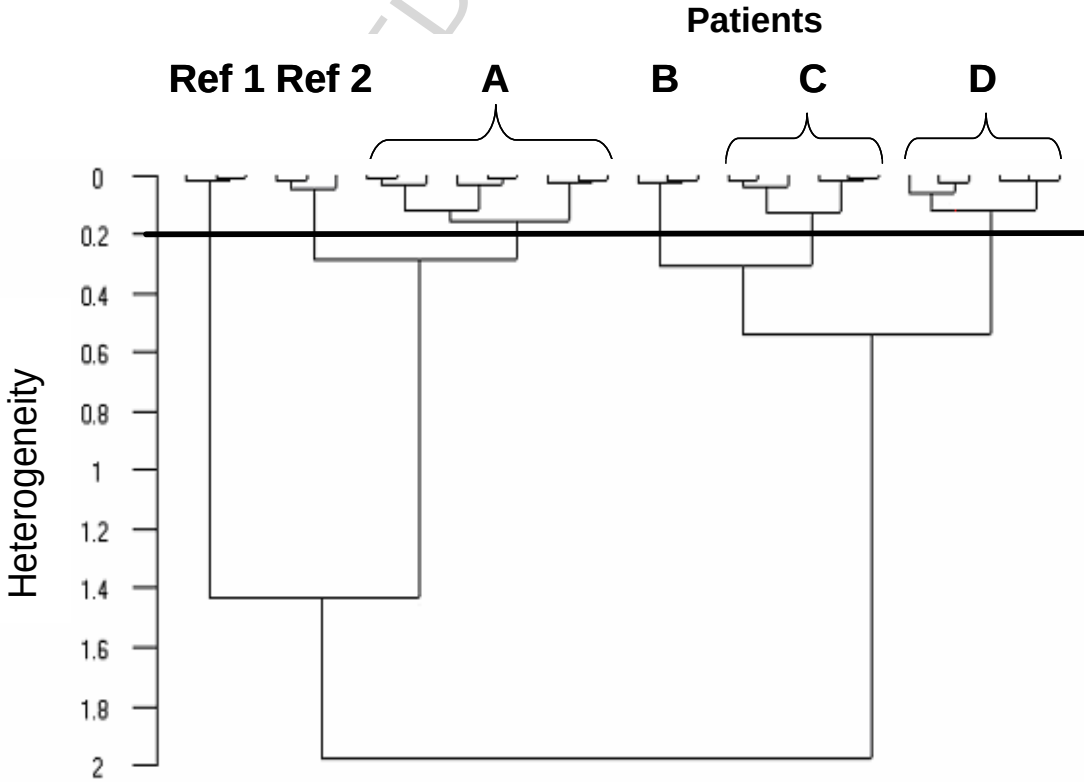
M: male

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure 1

Hierarchical cluster analysis of the optimization test by using second derivative spectra and 3 discriminating spectral zones 900-1200, 1540-1800, and 2800-3000 cm^{-1}, obtained from eight *C. glabrata* isolates. The black line represents a heterogeneity threshold of 0.2. Patient A (9 spectra corresponding to 3 isolates); Patient B (3 spectra corresponding to 1 isolate); Patient C (6 spectra corresponding to 2 isolates) and Patient D (6 spectra corresponding to 2 isolates).



ACCEPTED MANUSCRIPT

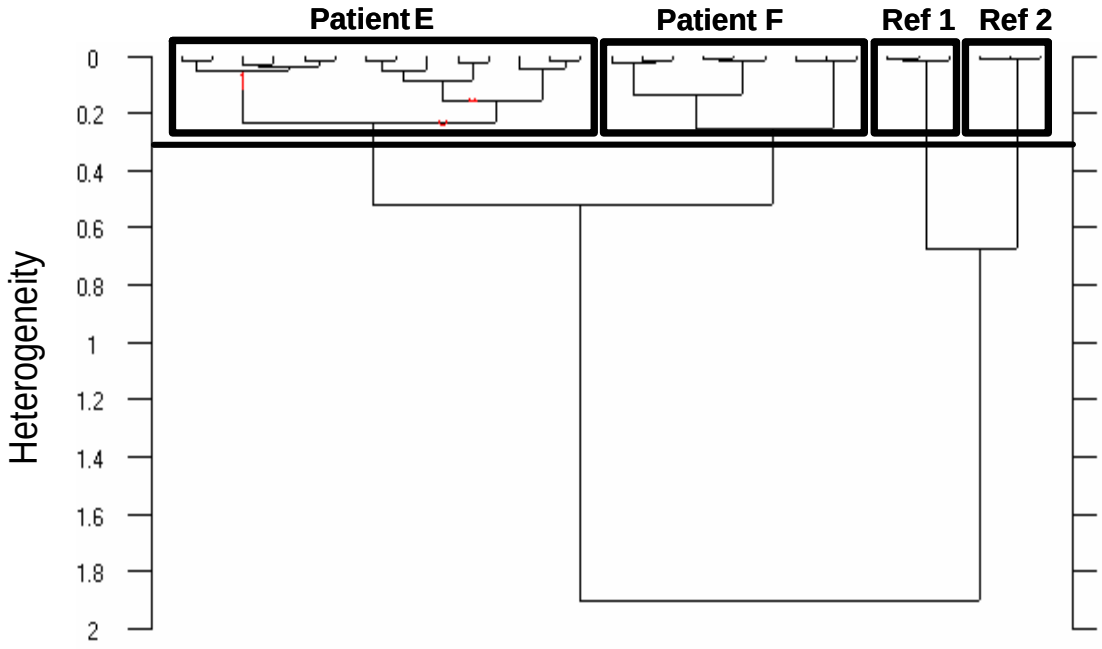
Figure 2

Validation test and comparison with RAPD analysis.

Fig. 2A Hierarchical cluster analysis of validation test of eight *C. glabrata* isolates (patients E and F) using second derivative and 3 spectral zones 900-1200, 1540-1800, and 2800-3000 cm^{-1}. The black line represents a heterogeneity threshold of 0.3. Patient E (14 spectra corresponding to 5 isolates) and Patient F (9 spectra corresponding to 3 isolates).

Fig. 2B and 2C Ethidium bromide-stained gels showing representative RAPD patterns for *C. glabrata* strains from 2 patients (E and F) and 2 references (Ref 1 and Ref 2) with each of the two primers SOY **(B)** and VAZ **(C)**.

Fig. 2 A



ACCEPTED MANUSCRIPT

Fig. 2 B

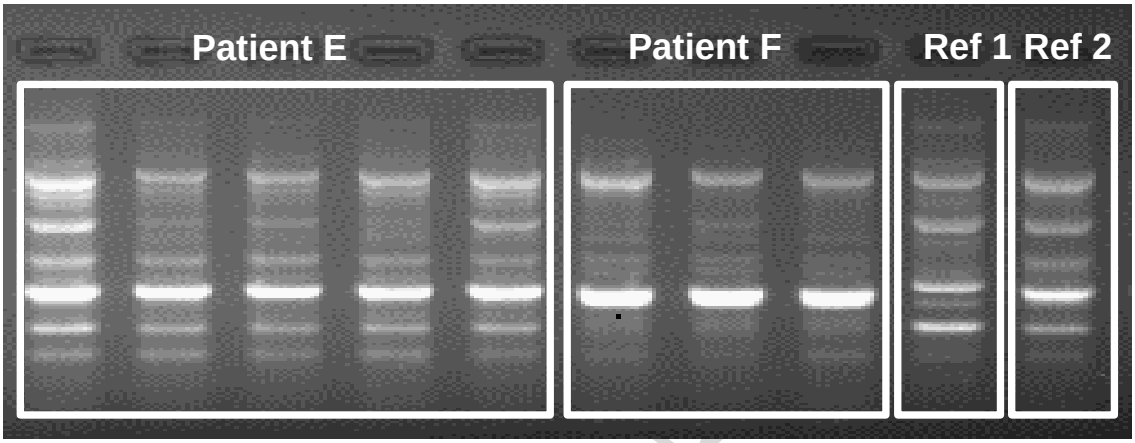
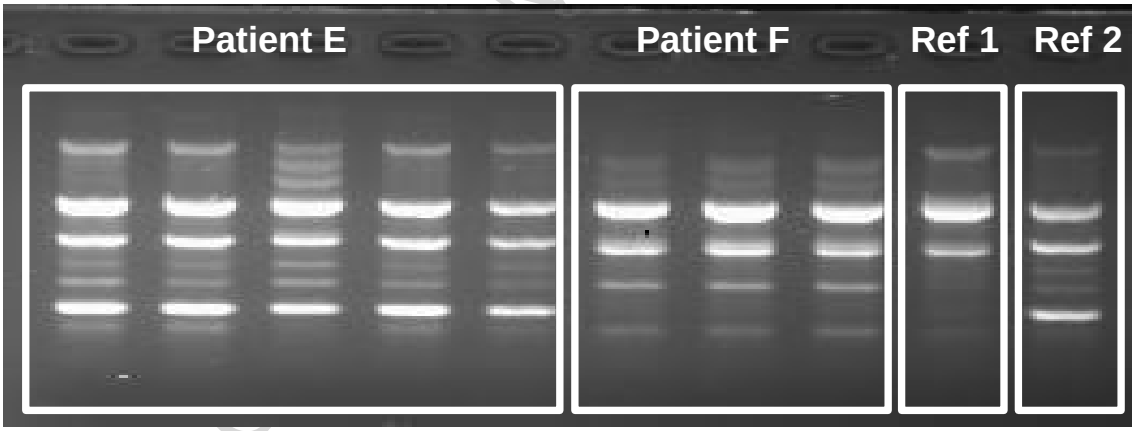


Fig. 2 C

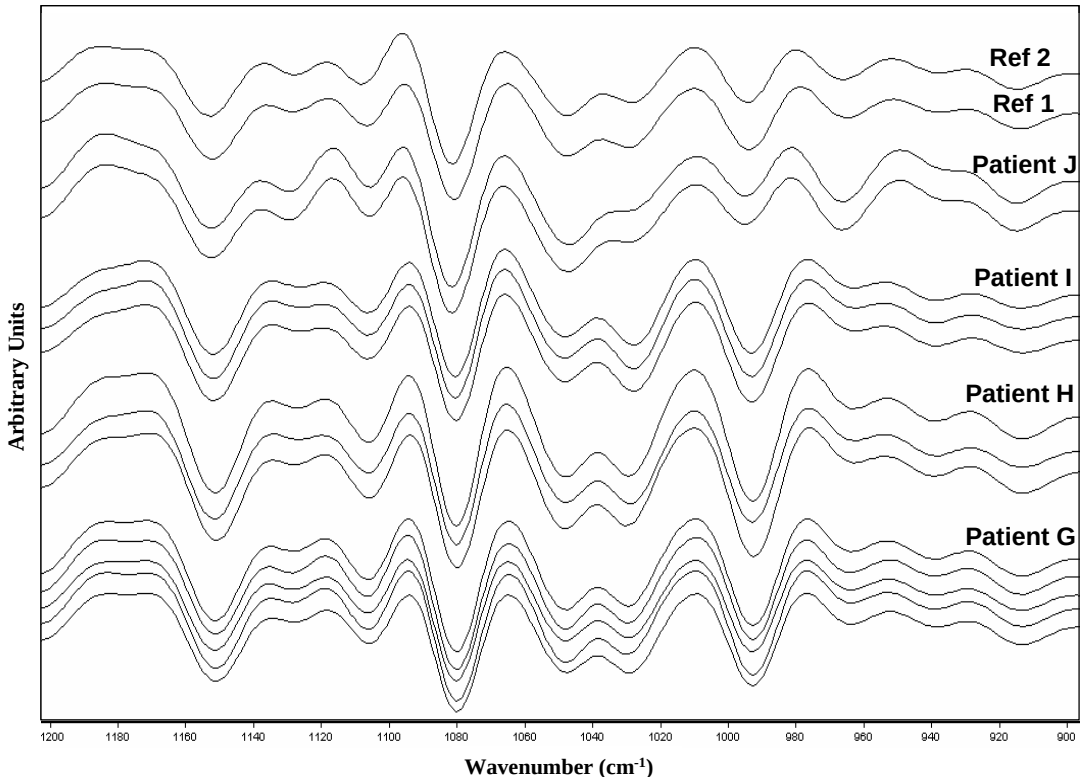


ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure 3

Comparison of the second derivative FTIR mean spectra of *Candida glabrata* strains (isolated from 4 ICU patients and 2 reference strains), showing the spectral variations between different strains in the polysaccharide region, 900-1200 cm^{-1}. Some visible spectral differences between *C. glabrata* isolates are highlighted in grey.

Fig. 3

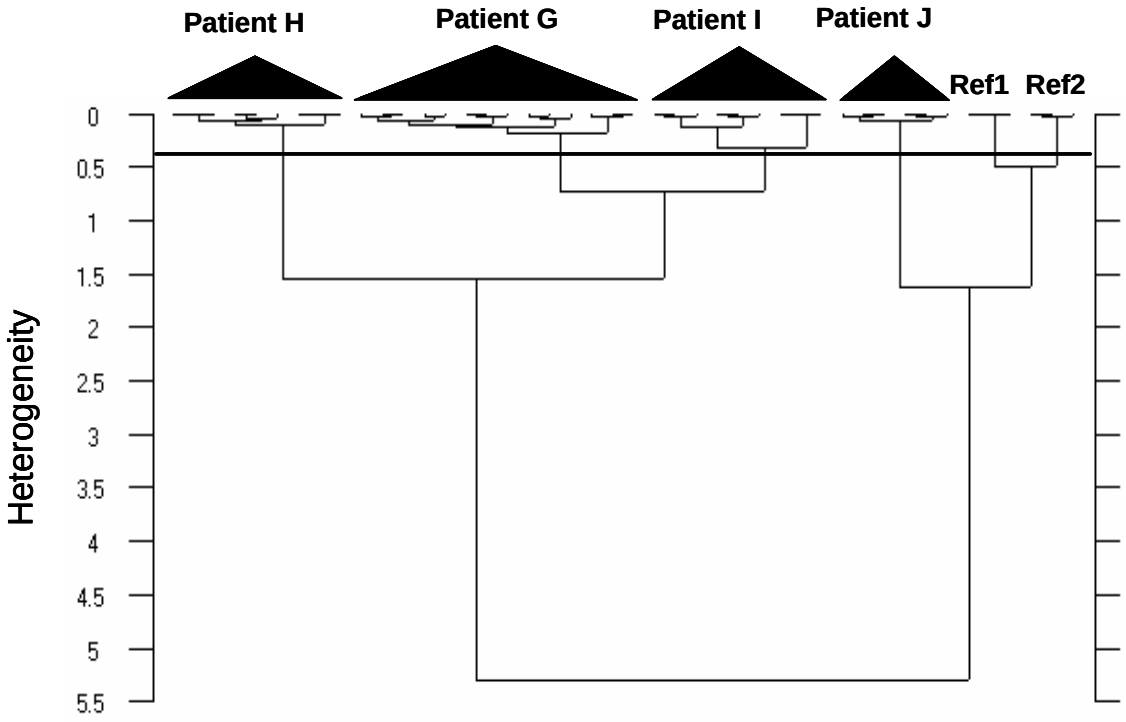


ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure 4

External validation phase: Hierarchical cluster analysis of *Candida glabrata* isolates using second derivative spectra and three spectral zones 900-1200, 1540-1800, and 2800-3000 cm^{-1}, obtained from three independent cultures. The black line represents a heterogeneity threshold of 0.4.

Fig. 4



Chapitre 4 : Mise en place et standardisation d'une base de données spectrales pour l'identification de 6 espèces du genre *Candida*.

1. Introduction

Nous avons montré que la spectroscopie IRTF était capable de discriminer six des espèces appartenant au genre *Candida* et avec une implication importante en pathologie humaine. L'application d'une telle méthode à l'identification de *Candida* spp. pour une application clinique en routine requiert la construction d'une base de données plus élaborée. Il est donc nécessaire d'augmenter le nombre de souches au sein de chaque espèce et de standardiser la mise en place d'une bibliothèque de spectres.

La fiabilité de l'identification par spectroscopie IRTF dépend donc d'une base de données représentative de toutes les espèces à identifier. Etant donné la multiplicité des espèces de levures du genre *Candida* isolées en milieu clinique et la difficulté à rassembler des échantillons représentatifs de chacune de ces espèces, nous avons à ce stade intégré dans notre base de données six espèces de *Candida* les plus rencontrées en mycologie clinique qui ont été identifiées de façon conventionnelle.

De plus, dans la base de données spectrales, on a inclus non seulement les spectres, mais aussi les régions spectrales discriminantes pour classifier ces spectres.

2. Constitution de la base de données

En collaboration avec le laboratoire de Mycologie du CHU de Reims, nous avons constitué une collection de 180 souches isolées lors des suivis cliniques des patients. Nous avons veillé également à ce que chaque souche provenant d'un patient donné, ne soit représentée qu'une seule fois dans la base, car deux prélèvements d'un même patient correspondent généralement à la même souche. Les 180 souches ont été analysées en spectroscopie IRTF par des mesures en suspension suivant le protocole décrit précédemment.

La réalisation de multiples spectres sur plusieurs cultures indépendantes d'une même souche a été nécessaire afin d'obtenir une information sur la variabilité spectrale de chaque souche et de chaque espèce. La moyenne de 6 à 9 spectres pour chaque souche étudiée a été prise

comme spectre représentatif et intégrée dans la base de données. La base de données comporte actuellement 180 spectres représentatifs de 6 espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr, C. parapsilosis* et *C. krusei*) avec 30 spectres par espèce.

La base de données a été réalisée sur des suspensions déshydratées. Elle va permettre de comparer les spectres des souches inconnues à ceux de la base de données. La méthode de comparaison est une analyse statistique basée sur une classification hiérarchique (HCA). Pour une identification fiable, la comparaison des spectres doit prendre en compte la variabilité entre les différentes espèces étudiées ainsi que la variabilité entre les souches d'une même espèce.

Il a été nécessaire d'optimiser les paramètres de comparaison tels que le mode de calcul de la distance spectrale, l'algorithme de classification et la recherche des régions spectrales caractéristiques de chaque espèce. Nous avons employé la dérivée seconde afin d'accroître le nombre d'éléments spectraux discriminants et d'éliminer les variations dues à la dérive de la ligne de base. La règle d'agrégation employée est la méthode de Ward et la distance entre spectres est calculée à partir du coefficient de corrélation de Pearson. Chaque région du spectre est normalisée de façon à ce que toutes les fenêtres spectrales utilisées contribuent avec la même importance au calcul de la distance.

La comparaison spectrale adopte une procédure qui consiste à regrouper séquentiellement les spectres en classes de plus en plus proches. A chaque étape, les spectres inconnus sont comparés aux spectres de la base de données sur un jeu de régions spectrales prédéterminé. La classification hiérarchique permet de séparer le jeu de spectres en deux groupes. Les spectres situés dans le même groupe que le spectre inconnu sont conservés pour l'analyse à l'étape suivante. Les autres spectres sont éliminés du modèle. Au cours de l'étape suivante, le spectre inconnu est comparé aux spectres restants dans le modèle en utilisant un nouveau jeu de régions spectrales. Après plusieurs étapes, seuls les spectres appartenant à un même taxon sont conservés dans le résultat. Cette procédure permet l'identification des espèces inclues dans le modèle mais ne permet pas de déterminer si la souche inconnue appartient à une espèce non connue de la base de données.

3. Résultats

3.1 La constitution de la base de données

La comparaison des spectres d'une souche inconnue avec les spectres de la base de données nécessite la détermination des régions spectrales discriminantes pour l'espèce.

Pour notre étude nous avons choisi la région des sucres (900-1200 cm^{-1}) dont nous avons montré l'importance à travers les études décrites précédemment dans ce travail, comme pour l'identification et le typage des espèces de *Candida*. Il faut noter aussi qu'avant de commencer la phase d'identification, il faut traiter les spectres de la même manière que le jeu des spectres représenté dans la base, à savoir : correction de ligne de base, calcul de la moyenne, dérivation (même ordre : 2) et normalisation.

La normalisation vectorielle des spectres s'avère nécessaire pour ce genre d'analyse, afin que les variabilités au sein de chaque région spectrale utilisée contribuent avec la même importance au calcul de distance entre les spectres. La Figure 53 présente le rapport de validation de notre base de données avec tous les paramètres nécessaires pour l'identification.

Validation report

Algorithm:	Standard
No. of used factor sp.:	[illegible]
No. of Hits to be Listed:	10
Vector normalized spectra:	Yes
No. of Ref. Spectra:	180
Delta x of x raster:	0.964442
FXV (or LXV) mod Delta x:	7.70495e-014
min x of x raster:	749.372
max x of x raster:	3100.68
No. of x Points in all x Ranges:	313
No. of x Ranges:	1
From:	899.825
to:	1200.73
Weight:	1
Reprolevel:	1
BlockID:	266255
Order of Derivative:	2

Figure 53 : Rapport de validation montrant les critères et les paramètres de la base de données spectrales

3.2 Test de l'identification à l'aide de la base de données

La base de données a été testée à l'aide d'un jeu de validation de 15 spectres enregistrés à partir de 15 souches appartenant aux six espèces de *Candida* représentées dans la base de données (tableau 19).

spèce	Nombre de souches
C. albicans	4
C. glabrata	2
C. parapsilosis	2
C. tropicalis	2
C. krusei	3
C. kefyr	2

Tableau 19 : Souches de *Candida* utilisées lors de la validation de la base de données

Chaque spectre inconnu a été comparé aux spectres inclus dans la base aux différentes étapes de l'identification. L'algorithme de classification donne une liste des dix spectres les plus proches. Le spectre classé en premier a été utilisé pour déterminer si l'identification est bonne ou mauvaise. La Figure 58 présente des rapports des tests d'identité qui peuvent être réalisés par le logiciel OPUS afin d'identifier les spectres de souches inconnues.

Echantillon 3

Hit No.	Hit Quality	Sample Name	File Name
1	0.101292	Cgl1085S GLY | Av. of 3	Cgl 13.0
2	0.109503	Cgl5579S GLY | Av. of 3	Cgl 17.0
3	0.117607	Cgl1085S AGAR | Av. of 3	Cgl 12.0
4	0.118619	Cgl1085M GLY | Av. of 3	Cgl 11.0
5	0.119350	Cgl5579S AGAR | Av. of 3	Cgl 16.0
6	0.125690	Cgl5579R GLY | Av. of 3	Cgl 15.0
7	0.127254	Cg7401 | Av. of 3	Cgl 4.0
8	0.140677	Cg9146 | Av. of 3	Cgl 9.0
9	0.140816	Cgl5579R AGAR | Av. of 3	Cgl 14.0
10	0.185735	Ck2 | Av. of 3	Ck 22.0

Echantillon 9

Hit No.	Hit Quality	Sample Name	File Name
1	0.208160	1914 | Av. of 3	Cal 3.0
2	0.270163	1712 | Av. of 3	Cal 1.0
3	0.274393	1837 | Av. of 3	Cal 2.0
4	0.293394	Calb-1406 | Av. of 3	Ca1426.0
5	0.307269	Calb-1424 | Av. of 3	Ca1424.0
6	0.308476	Calb-1348 | Av. of 3	Ca1348.0
7	0.312164	Calb-1449 | Av. of 3	Ca1449.0
8	0.315422	Calb-1387 | Av. of 3	Ca1387.0
9	0.317527	Calb-1440 | Av. of 3	Ca1440.0
10	0.317771	Calb-1441 | Av. of 3	Ca1441.0

Figure 54 : Exemples de rapport obtenu pour les échantillons 3 et 9 après un test d'identité.

Le pourcentage d'identification correcte a été calculé pour chacun des spectres de chaque espèce. Ces résultats montrent qu'un taux d'identification de 100% peut être obtenu pour certaines espèces (*C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis et C. kefyr*) alors que ce taux est inférieur à 100% pour *C. parapsilosis* et *C. krusei* (tableau 20). Un taux moyen d'identification de 86,67% a été obtenu. Des taux d'identification supérieurs à 90% ont été rapportés pour l'identification par spectroscopie IRTF (Goodacre 1998) et microspectroscopie IRTF (Maquelin 2003).

Nombre d'échantillon	Espèces de *Candida*	Spectres mal classés	Pourcentage(%) d'identification correcte pour chaque espèce
4	*C. albicans*	0	100
2	*C. glabrata*	0	100
2	*C. parapsilosis*	1	50
2	*C. tropicalis*	0	100
3	*C. krusei*	1	66,6
2	*C. kefyr*	0	100

Tableau 20 : Résultats du test d'identification de 15 échantillons.

Dans certains cas, le taux d'identification rapporté ici est légèrement inférieur aux taux d'identification obtenus par les systèmes d'identification automatisés de type Vitek®, API® ou Microscan® qui donnent généralement une identification correcte à plus de 90%.
Il est donc nécessaire d'améliorer les performances de la base de données en augmentant le nombre de souches inclues afin de couvrir une plus grande partie de la variabilité phénotypique propre à chaque espèce. Il est aussi important de tester d'autres méthodes de classification. Un consensus semble se dégager en faveur d'une combinaison de l'analyse discriminante et de méthodes d'intelligence artificielle (Goodacre 1998).

4. Conclusion

L'analyse des échantillons de *Candida* en spectroscopie IRTF conventionnelle a permis d'évaluer le potentiel de la méthode dans l'identification de ces levures pathogènes. L'obtention de spectres de bonne qualité dans des conditions reproductibles est possible avec un bon rendement (jusqu'à 60 souches analysées chaque jour). Une base de données comprenant 180 spectres de plusieurs dizaines de souches de *Candida* isolées en milieu clinique a été construite. Le taux moyen d'identification correcte de 86,67%, obtenu lors de la validation de la base de données, est comparable aux autres techniques de référence. L'amélioration des performances de la base de données est cependant possible grâce à l'utilisation de méthodes d'analyse statistique plus puissantes. Il est nécessaire d'accroître le nombre d'espèces de *Candida* et de souches par espèce dans la base de données. L'apport de la spectroscopie infrarouge à haut débit facilitera certainement la mise en place de telles bases de données avec la possibilité d'enregistrer rapidement et de façon reproductible un grand nombre de souches (Boudaud 2005).

CONCLUSION GENERALE

V. CONCLUSION GENERALE

La survenue de mycoses systémiques est particulièrement redoutée en unité de réanimation et chez les patients neutropéniques. *Candida albicans* est responsable d'environ 50% des candidoses profondes mais l'implication de *Candida* non-*albicans* est en augmentation. L'identification rapide de ces levures peut contribuer à en améliorer le pronostic.

Au cours des travaux présentés ici, nous avons pu montrer, à partir de collections hospitalières de levures du genre *Candida*, que la spectroscopie IRTF permet de différencier les souches de *Candida* au niveau de l'espèce et de la sous-espèce.

Deux modes de mesure ont été utilisés, la spectroscopie conventionnelle en transmission/absorption et la microspectroscopie. Chacune de ces deux approches présente des avantages particuliers en fonction desquels leurs applications pourraient être proposées. La spectroscopie conventionnelle en mode T/A permet l'enregistrement de spectres reproductibles et d'excellente qualité à partir de suspensions cellulaires déshydratées dans des conditions standardisées. Nous avons analysé jusqu'à 60 souches par jour dans nos conditions expérimentales et un rendement élevé, allant jusqu'à 256 spectres en une seule expérience est possible. Ce mode est particulièrement bien adapté au développement d'une base de données spectrales.

La microspectroscopie IRTF, à partir de l'analyse des microcolonies de 50 à 250 µm de diamètre obtenues après des temps de culture de 10 à 18 h, semble adaptée à une première approche d'identification précoce car l'identification en moins d'une journée à partir de l'isolement d'une souche devient possible..

Dans la première partie de ce travail de recherche, la (micro)spectroscopie IRTF a été appliquée à la différenciation de 96 souches appartenant à 6 espèces de *Candida* fréquemment isolées en milieu clinique (*C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei* et *C. kefyr*). Les deux approches abordées, mesures en mode macroscopie à partir de suspensions déshydratées des cultures pures de 24 heures et mesures en mode microscopie à partir de micro-colonies âgées de 10 à 18 heures pour une identification précoce, ont été mises au point et standardisées pour cette collection.

En effet, l'analyse des résultats révèlent des variations spectrales entre ces 6 espèces. Ces variations sont principalement détectées dans la région des polysaccharides (900-1200 cm^{-1}) et celle des protéines (1500-1800 cm^{-1}). L'analyse statistique multivariée (HCA et ACP)

des données spectrales à partir des dérivées secondes et sur ces deux régions discriminantes a permis de différencier entre les 6 espèces de *Candida*. La différenciation est donc possible au niveau de l'espèce par spectroscopie conventionnelle en analysant des cultures de 24h ainsi que par microspectroscopie à partir de microcolonies de 50 à 250 µm de diamètre. Des résultats satisfaisants avec des taux d'identification de 100% pour certaines espèces ont été obtenues en macroscopie.
La microspectroscopie permet de réduire le temps d'analyse mais la reproductibilité de transfert de microcolonies et par conséquent celle des spectres reste à améliorer afin d'améliorer le taux d'identification des espèces et d'étendre son application à l'identification de sous-espèces à partir de microcolonies.

Lors de cette étude, nous avons également démontré que la spectroscopie IRTF possède les caractéristiques d'un système de typage : la capacité à différencier des souches non-apparentées, à mettre en évidence l'identité d'une souche isolée de différents échantillons et à réaliser un suivi longitudinal chez un même patient.
Le typage par spectroscopie IRTF a été réalisé pour les espèces *C. albicans, C. glabrata* et *C. parapsilosis*. La région des polysaccharides membranaires (900-1200 cm^{-1}) s'est avérée la plus discriminante pour le typage de *C. albicans* et de *C. glabrata*, alors que, pour l'espèce *C. parapsilosis*, la combinaison de trois fenêtres spectrales (1090-1110, 1120-1140 et 1170-1190 cm^{-1}) a été nécessaire pour effectuer le typage de cette espèce. Nous avons également montré que le pouvoir discriminant de la méthode permettait de différencier et classer les spectres de plusieurs isolats (de la même espèce) appartenant à différents patients.

Ainsi, nous avons pu typer une collection de 29 souches de *C. glabrata* dans des situations cliniques différentes. Nous avons montré que la spectroscopie IRTF permettait de réaliser un suivi longitudinal de souches de *C. glabrata* chez un patient hospitalisé en Service de Réanimation en identifiant une même souche prélevée en différents sites anatomiques. Lors d'un suivi épidémiologique, nous avons également différencié et classé les spectres de 13 isolats de *C. glabrata* provenant de 4 patients différents. La transmission interhumaine de ces souches a pu être exclue. Ces résultats ont été confirmés par une technique moléculaire, la RAPD.
La spectroscopie IRTF permet d'obtenir les résultats du typage en 2 heures à partir d'une culture pure des souches étudiées. Comparée aux méthodes génotypiques généralement employées, elle est rapide, simple d'emploi et ne nécessite aucun réactif ou sondes

spécifiques, ce qui en fait une technique très économique. Cette technique pourrait être proposée comme méthode de typage rapide utilisée en première intention, avant confirmation par une technique génotypique. Cette procédure, en indiquant de façon rapide, l'identité ou non, de différents isolats, pourrait contribuer à accélérer la mise en place de mesures destinées à contrôler une situation épidémique.

L'application de la spectroscopie IRTF à l'identification en routine de *Candida* spp. requiert la construction d'une base de données fiable. Pour cela, nous avons développé une base de données spectrales à partir de souches de levures d'origine clinique. Cette base de données est représentative des espèces majoritairement isolées en milieu hospitalier et a inclus 180 souches de 6 espèces du genre *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. krusei* et *C. kefyr*).
Une analyse par méthode statistique multivariée basée sur la classification hiérarchique a été utilisée pour exploiter cette base de données. Le taux d'identification moyen est de 86,67%, obtenu lors de la validation de notre base de données, est comparable à d'autres techniques de référence. L'amélioration des performances de la base de donnée est cependant possible grâce à l'utilisation de méthodes d'analyse statistique plus puissantes et à l'augmentation du nombre d'échantillons compris dans la base. Il est fondamental d'accroître la taille de cette base de données avec l'intégration de nouvelles souches et de nouvelles espèces de *Candida*. Ceci est possible grâce à l'utilisation d'un module de mesure à haut débit pouvant analyser des plaques de 96, 384 ou 1536 puits. Cette nouvelle technologie permettra d'acquérir, dans des conditions identiques, les spectres d'un grand nombre d'échantillons en une seule manipulation, d'où un gain de temps très important, un rendement très élevé et une meilleure reproductibilité.

Ces résultats ouvrent de nouveaux champs d'applications en microbiologie clinique, notamment à l'évaluation du pouvoir pathogène de levures cliniques, de la résistance de différents microorganismes aux agents anti-infectieux ou à l'étude de l'organisation de *Candida* en biofilms. Diverses applications dans l'industrie pharmaceutique, l'agroalimentaire et la recherche en biotechnologies sont également très prometteuses.

BIBLIOGRAPHIE

VI. BIBLIOGRAPHIE

Ahmed, N. Devi, S. M. Valverde M. L. Vijayachari, P. Machang'u, R. S. Ellis, W. A. et al.
Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species.
Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 23; 5:28.

Akhebat, A. Dadgneaux, C. Liquier, J. Taillandier, E.
Triple helical polynucleotidic structures: an FTIR study of the C+ .G. Ctriplet.
J Biomol Struct Dyn 1992; 10(3): 577-88.

Al-Holy, M. A. Lin, M. Cavinato, A. G. Rasco, B. A.
The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice.
Food Microbiol 2006; 23(2): 162-8.

Al-Qadiri, H. M. Al-Holy, M. A. Lin, M. Alami, N. I. Cavinato, A. G. Rasco, B. A.
Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis.
J Agric Food Chem 2006; 54(16): 5749-54.

Amharref, N. Beljebbar, A. Dukic, S. Venteo, L. Schneider, L. Pluot, M. et al.
Brain tissue characterisation by infrared imaging in a rat glioma model
Biochim Biophys Acta 2006; 1758(7): 892-9.

Amiali, N. M. Mulvey, M. R. Sedman, J. Simor, A. E. Ismail, A. A.
Epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by Fourier transform infrared spectroscopy.
J Microbiol Methods 2007; 69(1): 146-53.

Amiel, C. Mariey, L. Cruck-Daubie, MC. Pichon, P. Travert, J.
Pontentiality of FTIR for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria.
Lait 2000; 20: 445-459.

Amiel, C. Mariey, M. Denis, C. Pichon, P. Travert, J.
FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: contribution to the classification of lactic acid bacteria.
Lait 2001; 81: 249-255.

Bastert, J. Korting, H. C. Traenkle, P. Schmalreck, A. F.
Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR).
Mycoses 1999; 42(9-10): 525-8.

Beer, W. Rienacker, I. Reissbrodt, R.
Selected biochemical reactions and FT-IR spectra characterize EHEC serovars *E. coli* O26, O103, and O157:H7.
Forum FTIR Diagnostik, 4, 2000, Berlin 3: 13-14.

Bellon-Maurel. Thése de doctorat. Institut polytechnique, 1992; Toulouse.

Benedetti, E. Papineschi, F. Vergamini, P. Consolini, R. Spremolla, G.
Analytical infrared spectral differences between human normal and leukaemic cells (CLL)-I.
Leuk Res 1984; 8(3): 483-9.

Benedetti, E. Palatresi, M. P. Vergamini, P. Papineschi, F. Spremolla, G.
New possibilities of research in chronic lymphatic leukemia by means of Fourier transform-infrared spectroscopy--II.
Leuk Res 1985; 9(8): 1001-8.

Bertrand D., Dufour E.
La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques.
Tec & Doc 2000.

Bohic, S. Heymann, D. Pouezat, J. A. Gauthier, O. Daculsi, G.
Transmission FT-IR microspectroscopy of mineral phases in calcified tissues.
C R Acad Sci III 1998; 321(10): 865-76.

Bonnier, F. Rubin, S. Venteo, L. Krishna, C. M. Pluot, M. Baehrel, B. et al.
In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy.
Biochim Biophys Acta 2006; 1758(7): 968-73.

Bordner, R. H. Kabler, P. W. Kenner, B. A. Riddle, J. W. Rockwood, S. W. Stevenson, H. J.
Bacterial identification by infrared spectrophotometry.
J Bacteriol 1956; 72(5): 593-603.

Boudaud, N. Carayon, A. Amiel, C. Mariey, L. Travert, J.
Mise en place d'une bibliothèque de spectres infrarouges de bactéries sulfato-réductrices et thiosulfato-réductrices.
Matériaux & Techniques 2005; 93: 147-154

Bouhedja, W. Sockalingum, G. D. Pina, P. Allouch, P. Bloy, C. Labia, R. et al.
ATR-FTIR spectroscopic investigation of *E. coli* transconjugants beta-lactams-resistance phenotype.
FEBS Lett 1997; 412(1): 39-42.

Bouhedja Walide
Identification et discrimination de souches bactériennes en milieu clinique par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et les méthodes chimiométriques.
Th 3 cycle Pharm Reims 1998; 206.

Casarez, E. A. Pillai, S. D. Di Giovanni, G. D.
Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR.
Water Res 2007; 41(16):3643-8

Cheung, H. Y. Cui, J. Sun, S.
Real-time monitoring of Bacillus subtilis endospore components by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy during germination.
Microbiology 1999; 145 (5): 1043-8.

Chew, S. F. Wood, B. R. Kanaan, C. Browning, J. Macgregor, D. Davis, I. D. et al.
Fourier transform infrared imaging as a method for detection of HLA class I expression in melanoma without the use of antibody.
Tissue Antigens 2007; 69 (Suppl 1): 252-8.

Choo-Smith, L. P. Maquelin, K. Van Vreeswijk, T. Bruining, H. A. Puppels, G. J. Ngo Thi, N. A. et al.
Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy.
Appl Environ Microbiol 2001; 67(4): 1461-9.

Cohenford, M. A. Godwin, T. A. Cahn, F. Bhandare, P. Caputo, T. A. Rigas, B.
Infrared spectroscopy of normal and abnormal cervical smears: evaluation by principal component analysis.
Gynecol Oncol 1997; 66(1): 59-65.

Czaika V, Tietz H. J. Schmalreck A, Sterry W, Schultze W.
Antifungal susceptibility testing in chronically recurrent vaginal candidosis as basis for effective therapy
Mycoses 2000; 43 (Suppl 2): 45-50.

Daniels, W. Glover, D.D. Essmann, M. Larsen, B.
Candidiasis during pregnancy may result from isogenic commensal strains.
Infect Dis Obstet Gynecol 2001; 9(2): 65-73.

Diem, M.
Infrared spectroscopy of fully and partially condensed chromatin: evidence for optically dense (dark) DNA. FTIR spectroscopy in microbiological and medical diagnostic.
FTIR WORKSHOP 2002; 5, Berlin.

Dodgson, A. R. Pujol, C. Denning, D. W. Soll, D. R. Fox, A. J.
Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades.
J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5709-17.

Dukor, R. K. Liebman, M. N. Johnson, B. L.
A new, non-destructive method for analysis of clinical samples with FT-IR microspectroscopy. Breast cancer tissue as an example.
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1998; 44(1): 211-7.

Dukor, R. K., Story, G M. Marcott, C.
A method for analysis of clinical tissue samples using FT-IR microspectroscopic imaging: Spectroscopy of biological molecules: new directions.
Ed by Puppels G. J., Otto C. Norwell : Kluwer Academic Publisher 1999.

Edmond, M. B. Wallace, S. E. McClish, D. K. Pfaller, M. A. Jones, R. N. Wenzel, R. P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis 1999; 29(2): 239-44.

Essendoubi, M. Toubas, D. Bouzaggou, M. Pinon, J. M. Manfait, M. Sockalingum, G. D. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy.
Biochim Biophys Acta 2005; 1724(3): 239-47.

Essendoubi, M. Toubas, D. Lepouse, C. Leon, A. Bourgeade, F. Pinon, J-M. et al. Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy.
J Microbio Meth 2007 (Article in Press).

Fabian, H. Jackson, M. Murphy, L. Watson, P. H. Fichtner, I. Mantsh H. H.
A comparative infrared spectroscopic study of human breast tumors and breast tumor cell xenograft.
Biospectroscopy 1995; 1: 37-45.

Fernandez, D. C. Bhargava, R. Hewitt, S. M. Levin, I. W.
Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition.
Nat Biotechnol 2005; 23(4): 469-74.

Foulet, F. Nicolas, N. Eloy, O. Botterel, F. Gantier, J. C. Costa, J. M. et al.
Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*.
J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4574-9.

Freydiere, A. Perry, J. D. Faure, O. Willinger, B. Tortorano, A. M. Nicholson, A. et al. Routine use of a commercial test, GLABRATA RTT, for rapid identification of *Candida glabrata* in six laboratories.
J Clin Microbiol 2004; 42(10): 4870-2.

Fricker-Hidalgo, H. Vandapel, O. Duchesne, M. A. Mazoyer, M. A. Monget, D. Lardy, B. et al.
Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species.
J Clin Microbiol 1996; 34(7): 1846-8.

Fritzsche, H. Akhebat, A. Taillandier, E. Rippe, K. Jovin, T. M.
Structure and drug interactions of parallel-stranded DNA studied by infrared spectroscopy and fluorescence.
Nucleic Acids Res 1993; 21(22): 5085-91.

Gaigneaux, A. Ruysschaert, J. M. Goormaghtigh, E.
Infrared spectroscopy as a tool for discrimination between sensitive and multiresistant K562 cells.
Eur J Biochem 2002; 269(7): 1968-73.

Galichet, A. Sockalingum, G. D. Belarbi, A. Manfait, M.
FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype.
FEMS Microbiol Lett 2001; 197(2): 179-86.

Goodacre, R. Timmins, E. M. Rooney, P. J. Rowland, J. J. Kell, D. B.
Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks.
FEMS Microbiol Lett 1996; 140(2-3): 233-9.

Goodacre, R. Timmins, E. M. Burton, R. Kaderbhai, N. Woodward, A. M. Kell, D. B. et al.
Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks.
Microbiology 1998; 144 (5): 1157-70.

Goodarcre, R. Shann, B. Gilbert, R. J. Timmins, E. M. Mcgovern, A. C. Albsberg, B. K. et al.
Detection of the dipicolinic acid biomarker in Bacillus spores using Curie-point pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy.
Anal Chem 2000; 72: 119-127.

Goulden, J. D. Sharpe, M. E.
The infra-red absorption spectra of *lactobacilli*.
J Gen Microbiol 1958; 19(1): 76-86.

Griffiths, P. R. Haseth, J. A.
Fourier transform infrared spectroscopy in chemical analysis: a series of monographs on analytical chemestry and its applications. 1986; 38.

Grube, M. Zagreba, E. Gromozova, E. Fomina, M.
Comparative investigation of themacromolecular composition of mycelia forms *Thielavia terrestris* by infraredspectroscopy.
Vib Spectrosc 1999; (19): 301-306.

Gue, M. Dupont, V. Dufour, A. Sire, O.
Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation.
Biochemistry 2001; 40(39): 11938-45.

Hamal, P. Kappe, R. Rimek, D.
Rate of transmission and endogenous origin of *Candida albicans* and *Candida glabrata* on adult intensive care units studied by pulsed field gel electrophoresis.
J Hosp Infect 2001; 49(1): 37-42.

Hazen, K. C.
New and emerging yeast pathogens.
Clin Microbiol Rev 1995; 8(4): 462-78.

Hedderwick, S. A. Lyons, M. J. Liu, M. Vazquez, J. A. Kauffman, C. A.
Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(9): 663-70.

Helm, D. Labischinski, H. Schallehn, G. Naumann, D.
Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy.
J Gen Microbiol 1991a; 137(1): 69-79.

Helm, D. Labischinski, H.
Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach.
J Microbiol Meth 1991b; 14: 127-142.

Helm D. Naumann, D.
Identification of some bacterial call components by FTIR spectroscopy.
FEMS Microbiol Lett 1995; 126: 75-80.

Howell, S. A. Anthony, R. M. Power, E.
Application of RAPD and restriction enzyme analysis to the study of oral carriage of *Candida albicans*.
Lett Appl Microbiol 1996; 22(2): 125-8.

Huu, N. B. Denner, E. B. Ha, D. T. Wanner, G. Stan-Lotter, H.
Marinobacter *aquaeolei sp. nov.*, a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well.
Int J Syst Bacteriol 1999; 49 (2): 367-75.

Irmscher, H. M. Fischer, R. Beer, W. Seltmann, G.
Characterization of nosocomial *Serratia marcescens* isolates: comparison of Fourier-transform infrared spectroscopy with pulsed-field gel electrophoresis of genomic DNA fragments and multilocus enzyme electrophoresis.
Zentralbl Bakteriol 1999; 289(3): 249-63.

Irudayaraj, J. J. Hong, Y. Sivakesava, S.
Differentiation and detection of microorganisms using Fourier-transform infrared photoaccoustic spectroscopy.
J Mol Struc 2002; 606: 181-188.

Jackson, M. Mantsch, H. H.
Infrared Spectroscopy of Biomolecules
Mantch H. H. Chapman, D. eds. New York Wiley-Liss 1996; 311-340.

Jackson, M. Mansfield, J. R. Dolenko, B. Somorjai R. L. Mantsch H. H. Watson P. H.
Classification of breast tumors by grade and steroid receptor status using pattern recognition analysis of infrared spectra.
Cancer Detect Prev 1999; 23(3): 245-253.

Jung, C.
Insight into protein structure and protein-ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy.
J Mol Recognit 2000; 13 (6): 325-51.

Kacurakova, M. Capek, P. Sasinkova, V. Wellner, N. Ebringérova, A.
FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses.
Carb Polymers 2000; 43: 195-203.

Karadenizli, A. Kolayli, F. Ergen, K.
A novel application of Fourier-transformed infrared spectroscopy: classification of slime from *staphylococci*.
Biofouling 2007; 23(1-2): 63-71.

Kenner, B. A. Riddel, J. W. Rockwood, S. W. Bordner, R. H.
Bacterial identification by infrared spectrophotometry. II. Effect of instrumental and environmental variables.
J Bacteriol 1958; 75(1): 16-20.

Khattak, M. N. Burnie, J. P. Matthews, R. C. Oppenheim, B. A.
Clamped homogenous electric field gel electrophoresis typing of *Torulopsis glabrata* isolates causing nosocomial infections.
J Clin Microbiol 1992; 30: 2211- 2215.

Kidder, L. H. Kalasinsky, V. F. Luke, J. L. Levin, I. W. Lewis, E. N.
Visualization of silicone gel in human breast tissue using new infrared imaging spectroscopy.
Nature Medicine 1997; 3(2) 235-237.

Kirschner, C. Maquelin, K. Pina, P. Ngo Thi, N. A. Choo-Smith, L. P. Sockalingum, G. D. et al.
Classification and identification of *enterococci*: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study.
J Clin Microbiol 2001; 39(5): 1763-70.

Kneipp, J. Lastch, P. Baldauf, E. Beekes, M. Naumann, D.
Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy.
Biochim Biophys Acta 2000; 1501(2-3): 189-99.

Krishna, C. M. Kegelaer, G. Adt, I. Rubin, S. Kartha, V. B. Manfait, M. et al.
Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines.
Biopolymers 2006; 82(5): 462-70.

Krishna, C. M. Sockalingum, G. D. Bhat, R. A. Venteo, L. Kushtagi, P. Pluot, M. et al.
FTIR and Raman microspectroscopy of normal, benign, and malignant formalin-fixed ovarian tissues.
Anal Bioanal Chem 2007; 387(5): 1649-56.

Kummerle, M. Scherer, S. Seiler, H.
Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy.
Appl Environ Microbiol 1998; 64(6): 2207-14.

Lang, P. L. Sang, S. C.
The in situ infrared microspectroscopy of bacterial colonies on agar plates.
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1998; 44(1): 231-8.

Latxague Chrystelle-Lorin
Effets de l'hormone thyroïdienne sur les cellules ostéoprogénitrices humaines. Etude par spectroscopie IR-TF des conséquences métaboliques de l'implantation d'un substitut osseux.
Thèse d'Université de Bordeaux 2 - Sciences Biologiques et Médicales - Option Biologie Santé 2004.

Latxague, L. Melin, A. M.
Human plasma modifications induced by total joint replacement: analysis by Fourier transform infrared spectroscopy.
Physiol Meas 2005; 26(1): 49-58.

Legal, J. M. Manfait, M. Theophanidest, T.
Applications of FTIR spectroscopy in structural studies of cells and bacteria.
J Mol Struc 1991; 242: 397-407.

Low Ying, S. Shaw, R. A. Leroux, M. Mantsch, H. H.
Quantitation of glucose and urea in whole blood by mid-infrared spectroscopy of dry films.
Vib Spectrosc 2002; 28: 111-116.

Lupetti, A. Tavanti, A. Davini, P. Ghelardi, E. Corsini, V. Merusi, I. et al.
Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit.
J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2363-9.

Mantsch, H. H. Choo-Smith L-P. Shawr, A.
Vibrational spectroscopy and medicine: an alliance in the making.
Vib Spectrosc 2002; 30: 31-41.

Maquelin, K. Kirschner, C. Choo-Smith, L. P. Van den Braak, N. Endtz, H. P. Naumann, D. et al.
Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy.
J Microbiol Methods 2002; 51(3): 255-71.

Maquelin, K. Kirschner C. Choo-Smith, L. P. Ngo-Thi, N. A. Van Vreeswijk, T. Stammler, M. et al.
Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures.
J Clin Microbiol 2003; 41(1): 324-9.

Max, J. J. Chapados, C.
Glucose and fructose hydrates in aqueous solution by IR spectroscopy.
J Phys Chem 2007a; 111(14): 2679-89.

Max, J. J. Gessinger, V. Van Driessche, C. Larouche, P. Chapados, C.
Infrared spectroscopy of aqueous ionic salt solutions at low concentrations.
J Chem Phys 2007b; 126(18): 184507.

Messerschmidt, R. G. Harthcock, M. A.
Infrared microspectroscopy : Theory and applications.
New-York : Marcel Dekker Inc, 1988. (Practical spectroscopy series; 6).

Meurens, M. Wallon, J. Tong, J. Noel, H. Haot, J.
Breast Cancer Detection by Fourier Transform Infrared Spectrometry.
Vibrational Spectrosc 1996; 10: 341-346.

Michell, A. J. Scurfield, G.
An assessment of infrared as indicators of fungal cell wall composition.
Aust J Biol Sci 1970; 23: 345-360.

Mirhendi, H. Makimura, K. Khoramizadeh, M. Yamaguchi, H.
A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species.
Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006; 47(3): 225-9.

Moreno, P. R. Lodder, R. A. Purushothaman, K. R. Charash, W. E. O'Connor, W. N. Muller, J. E.
Detection of lipid pool, thin fibrous cap, and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by near-infrared spectroscopy.
Circulation 2002; 105(8): 923-7.

Morris, B. J. Lee, C. Nightingale, B. N. Molodysky, E. Morris, L. J. Appio, R. et al.
Fourier transform infrared spectroscopy of dysplastic, papillomavirus-positive cervicovaginal lavage specimens.
Gynecol Oncol 1995; 56(2): 245-9.

Mourant, J. R. Gibson, R. R. Johnson, T. M. Carpenter, S. Short, K. W. Yamada, Y. R. et al.
Methods for measuring the infrared spectra of biological cells.
Phys Med Biol 2003; 48(2): 243-57.

Naumann, D. Fijala, V. Labischinski, H.
The differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR and multivariate statistical analysis.
Mikrochim Acta 1988a; 1: 373-377.

Naumann, D. Fijala, V. Labischinski, H. Giesbrecht, P.
The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate analysis.
J Mol Structure 1988b; 174: 165-170.

Naumann, D. Helm, D. Labischinski, H.
Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy.
Nature 1991a; 351(6321): 81-2.

Naumann, D. Helm, D. Labischinski, H. Giesbrecht, P.
The characterization of microorganisms by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in Modern techniques for rapid microbiological analysis.
Nelson, W. H. (ed). New York, USA: 1991b; 43-92.

Naumann, D. Shultz, C. P. Helm, D.
What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacteria cells?
Infrared spectroccopy of Biomolécules, H. H Mantsch and D. Chapman eds. Wiley-Liss, Inc., New-York 1996; 279-310.

Naumann, D.
Infrared Spectroscopy in Microbiology
Encyplopedia of analytical Chemistry R.A. Meyers Ed. Chichester, Wiley & Sons td. 2000; 102-131.

Ngo Thi, N. A. Kirschner, C. Naumann, D. ().
FT-IR microspectrometry: a new tool for characterizing micro-organisms.
Biomedical spectroscopy: Vibrational spectroscopy and other novel techniques. Ed Mahadevan-Jansen A, Puppels G. J. Washington Bellingam; 2000; (Proceeding of SPIE ; 3918): 36-44.

Ngo Thi, N. A. Naumann, D.
Investigating the heterogeneity of cell growth in microbial colonies by FTIR microspectroscopy.
Anal Bioanal Chem 2007; 387(5): 1769-77.

Nivens, D. E. Ohman, D. E. Williams, J. Franklin, M. J.
Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms.
J Bacteriol 2001; 183(3): 1047-57.

Norris, K. P.
Infrared spectroscopy and its application to microspectroscopy.
J Hyg 1959; 57: 326-345.

Oberreuter, H. Charzinski, J. Scherer, S.
Intraspecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy.
Microbiology 2002; 148 (5): 1523-32.

Oliver, S. G. Winson, M. K. Kell, D. B. Baganz, F.
Systematic functional analysis of the yeast genome.
Trends Biotechnol 1998; 16(9): 373-8.

Orsini, F. Ami, D. Villa, A. M. Sala, G. Bellotti, M. G. Doglia, S. M.
FT-IR microspectroscopy for microbiological studies.
J Microbiol Methods 2000; 42(1): 17-27.

Pertowski, C. A. Baron, R. C. Lasker, B. A. Werner, S. B. Jarvis, W. R.
Nosocomial outbreak of *Candida albicans* sternal wound infections following cardiac surgery traced to a scrub nurse.
J Infect Dis 1995; 172(3): 817-22.

Petibois, C. Rigalleau, V. Melin, A. M. Perromat, A. Cazorla, G. Gin, H. et al.
Determination of glucose in dried serum samples by Fourier-transform infrared spectroscopy.
Clin Chem 1999; 45(9): 1530-5.

Petibois Cyril
Applications de la spectrométrie IRTF à l'analyse biochimique globale de paramètres sanguins du surentraînement.
Thèse de l'Université de Bordeaux 2 - option Sciences Biologiques et Médicales - Mention STAPS. 2000.

Petibois, C. Cazorla, G. Cassaigne, A. Deleris, G.
Plasma protein contents determined by Fourier-transform infrared spectrometry.
Clin Chem 2001; 47(4): 730-8.

Petibois, C. Gionnet, K. Goncalves, M. Perromat, A. Moenner, M. Deleris, G.
Analytical performances of FT-IR spectrometry and imaging for concentration measurements within biological fluids, cells, and tissues.
Analyst 2006; 131(5): 640-7.

Petti, C. A. Polage, C. R. Schreckenberger, P.
The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods.
J Clin Microbiol 2005; 43(12): 6123-5.

Petti, C. A.
Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing.
Clin Infect Dis 2007; 44(8): 1108-14.

Pfaller, M. A.
Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission.
Clin Infect Dis 1996; 22: S89-S94.

Pfaller, M. Messer, S. A. Houston, A. Rangel-Frausto, M. S. Wiblin, T. Blumberg, H. M. et al.
National epidemiology of mycoses survey: A multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species.
Diag Microbiol Infect Dis 1998; 31: 289-296.

Pfaller, M. A. Diekema, D. J. Jones, R. N. Messer, S. A. Hollis, R. J.
Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000.
J Clin Microbiol 2002; 40(3): 852-6.

Pfaller, M. A. Diekema, D. J.
Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*.
Clin Microbiol Infect 2004; 10 (1): 11-23.

Quinteiro Rodriguez, M. P.
Fourier transform infrared (FTIR) technology for the identification of organisms.
Clin Microbiol Newslett 2000; 22(8): 57-61.

Ramesh, J. Kapelushnik, J. Mordehai, J. Moser, A. Huleihel, M. Erukhimovitch, V. et al.
Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy.
J Biochem Biophys Methods 2002; 51(3): 251-61.

Rebuffo-Scheer, C. A. Kirschner, C. Staemmler, M. Naumann, D.
Rapid species and strain differentiation of non-tubercoulous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy.
J Microbiol Methods 2007a; 68(2): 282-90.

Rebuffo-Scheer, C. A. Schmitt, J. Scherer, S.
Differentiation of *Listeria monocytogenes* serovars by using artificial neural network analysis of Fourier-transformed infrared spectra.
Appl Environ Microbiol 2007b; 73(3): 1036-40.

Roggo, Y.
Détermination de la qualité de la betterave sucrière par spectroscopie infrarouge et chimiométrie.
Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, France, 2003.

Rossetti, L. Giraffa, G.
Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases.
J Microbiol Methods 2005; 63(2): 135-44.

Sandt, C. Sockalingum, G. D. Toubas, D. Aubert, D. Lepan, H. Lepouse, C. et al.
Comparing FTIR and RAPD techniques in the typing of *C. albicans* in a clinical set-up.
Proceedings of SPIE, 4614. Progress in biomedical optics and imaging Ed by H. H. Mantsch, G. J. Puppels 2002; 3(6): 1-11.

Sandt C. Sockalingum, G. Aubert D. Lepan H. Lepouse C. Jaussaud M. et al.
Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units.
J Clin Microbiol 2003; 41: 954-9.

Sandt Christophe.
Identification de microorganismes pathogénes impliqués dans les inféctions nosocomiales par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et méthodes statistiques.
Thèse 3 cycle: Pharm: Reims 2004; 204.

Sandt, C. Madoulet, C. Kohler, A. Allouch, P. De Champs, C. Manfait, M. et al.
FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens.
J Appl Microbiol 2006; 101(4): 785-97.

Sanson, G. F. Briones, M. R.
Typing of *Candida glabrata* in clinical isolates by comparative sequence analysis of the cytochrome C oxidase subunit 2 gene distinguishes two clusters of strains associated with geographical sequence polymorphisms.
J Clin Microbiol 2000; 38(1): 227-35.

Schmalreck, A. F. Trankle, P.Vanca, E. Blaschke-Hellmessen, R.
Differentiation and characterization of yeasts pathogenic for humans (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) and algae pathogenic for animals (*Prototheca* spp.) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in comparison with conventional methods.
Mycoses 1998; 41 (1): 71-7.

Schmalreck, A. F. Hotzel, H.
Fourier transform infrared spectroscopy, molecular biologic methods and antimyocotic susceptibility patterns for identification and differentiation of *Cryptococcus* species.
Mycoses 2000, 43 (1): 61-8.

Schmid, J. Tay, Y. P. Wan, L. Carr, M. Parr, D. McKinney, W.
Evidence for nosocomial transmission of *Candida albicans* obtained by Ca3 fingerprinting.
J Clin Microbiol 1995; 33(5): 1223-1230.

Schultz, C. Naumann, D.
In vivo study of the state of order of the membranes of gram-negative bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR).
FEBS Lett 1991; 294(1-2): 43-6.

Schultz, C. P. Liu, K. Johnston, J. B. Mantsch, H. H.
Study of chronic lymphocytic leukemia cells by FT-IR spectroscopy and cluster analysis.
Leuk Res 1996; 20(8): 649-55.

Seltmann, G. Voigt, W. Beer, W.
Application of physico-chemical typing methods for the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains of phage type 25/17.
Epidemiol Infect 1994; 113(3): 411-24.

Seltmann, G. Beer, W. Claus, H. Seifert, H.
Comparative classification of *Acinetobacter baumannii* strains using seven different typing methods.
Zentralbl Bakteriol 1995; 282(4): 372-83.

Sockalingum, G. D. Bouhedja, W. Pina, P. Allouch, P. Mandray, C. Labia, R. et al.
ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains.
Biochem Biophys Res Commun 1997; 232(1): 240-6.

Sockalingum G. D. Bouhedja. W. Pina P. Allouch P. Bloy C. Manfait M.
FT-IR spectroscopy as an emerging method for rapid characterization of microorganisms.
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1998; 44(1): 261-9.

Sockalingum, G. D. Sandt, C. Toubas, D. Gomez, J. Pina, P. Beguinot, I. et al.
FTIR characterization of *Candida* species: a study on some reference strains and pathogenic *C. albicans* isolates from HIV+ patients.
Vib Spectrosc 2002; 28(1): 137-146.

Stan-Lotter, H. Mcgenity, T. J. Legat, A. Denner, E. B. Glaser, K. Stetter, K. O. et al.
Very similar strains of Halococcus salifodinae are found in geographically separated permo-triassic salt deposits.
Microbiology 1999; 145 (12): 3565-74.

Steffan, P. Vazquez, J. A. Boikov, D. Xu, C. Sobel, J. D. Akins, R. A.
Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates.
J Clin Microbiol 1997; 35(8): 2031-9.

Suci, P. A. Vrany, J. D. Mittelman, M. W.
Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy.
Biomaterials 1998; 19(4-5): 327-339.

Suci, P. A. Geesey, G. G. Tyler, B. J.
Integration of Raman microscopy, differential interference contrast microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate chlorhexidine spatial and temporal distribution in *Candida albicans* biofilms.
J Microbiol Methods 2001; 46(3): 193-208.

Tfayli, A. Piot, O. Durlach, A. Bernard, P. Manfait, M.
Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy.
Biochim Biophys Acta 2005; 1724(3): 262-9.

Thomas, L. C. Greenstreet, J. E. S.
The identification of microorganisms by infrared spectrophotometry.
Spectrochim Acta 1954; 6: 302-319.

Timmins, E. M. Howell, S. A. Alsberg, B. K. Noble, W. C. Goodacre, R.
Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy.
J Clin Microbiol 1998a; 36(2): 367-74.

Timmins, E. M. Quain, D. E. Goodacre, R.
Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy.
Yeast 1998b; 14(10): 885-93.

Tindall, B. J. Brambilla, E. Steffen, M. Neumann, R. Pukall, R. Kroppenstedt, R. M. et al.
Cultivatable microbial biodiversity: gnawing at the Gordian knot.
Environ Microbiol 2000; 2(3): 310-8.

Tintelnot, K. Haase, G. Seibold, M. Bergmann, F. Staemmler, M. Franz, T. et al.
Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*.
J Clin Microbiol 2000; 38(4): 1599-608.

Tortorano, A. M. Perman, J. Bernhardt, H. Klingspor, L. Kibbler, C. C. Faure, O. et al.
Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23(4): 317-22.

Tortorano, A. M. Kibbler, C. Peman, J. Bernhardt, H. Klingspor, L. Grillot, R.
Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance.
Int J Antimicrob Agents 2006; 27(5): 359-66.

Toubas, D. Essendoubi, M. Adt, I. Pinon, J. M. Manfait, M. Sockalingum, G. D.
FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*.
Anal Bioanal Chem 2007; 387(5): 1729-37.

Van-Der Mei, H. C. Naumann, D. Busscher, H. J.
Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification.
J Oral Biol 1993; 38(11): 1013-1019.

Van-Der Mei, H. C. Naumann, D. Busscher, H. J.
Grouping of *Streptococcus mitis* strains grown on different growth media by FT-IR.
Infrared Phys Technol 1996; 37: 561-564.

Vazquez, J. A. Beckley, A. Sobel, J. D. Zervos, M. J.
Comparison of restriction enzyme analysis versus pulse-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Candida albicans*.
J Clin. Microbiol 1991; 29: 962-967.

Verdel-Zeroual Widad
Application de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à l'étude des comportements bactériens en fonction de l'environnement. Essai de reconnaissance de cible des antibactériens.
Thèse 3° cycle : Pharm : Reims 1994.

Verduyn-lunel, F. M. Neis, J. F. Voss, A.
Nosocomial fungal infection : candidemia.
Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34(3): 213-220.

Vrany, J. D. Stewart, P. S. Suci, P. A.
Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* bofilms displaying rapid-transport characteristics. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(6): 1352-8.

Vrioni, G. Matsiota-Bernard, P.
Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit.
J Infect 2001; 42(1): 50-6.

Wenning, M. Seiler, H. Scherer, S.
Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts.
Appl Environ Microbiol 2002; 68(10): 4717-21.

Willinger, B. Wein, S. Hirschl, A. M. Rotter, M. L. Manafi, M.
Comparison of a new commercial test, GLABRATA RTT, with a dipstick test for rapid identification of *Candida glabrata*.
J Clin Microbiol 2005; 43(1): 499-501.

Wong, P. T. Wong, R. K. Caputo, T. A. Godwin, T. A. Rigas, B.
Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: evidence of extensive structural changes during carcinogenesis.
Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(24): 10988-92.

Wood, B. R. Quinn, M. A. Burden, F. R. Mcnaughton, D.
An investigation into FTIR spectroscopy as a biodiagnostic tool for cervical cancer Biospectroscopy 1996; 2(3): 143-153.

ANNEXES

VII. ANNEXES

PUBLICATIONS

(1) Rapid Identification of *Candida* species by FT-IR Microspectroscopy. **Essendoubi Mohammed**, Toubas D, Bouzaggou M, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. **Bioch Bioph Acta**. 2005 Aug 5; 1724 (3):239-47.

(2) FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. Dominique Toubas, **Mohammed Essendoubi**, Isabelle Adt, Jean-Michel Pinon, Michel Manfait, Ganesh Sockalingum**, Anal Bioanal Chem.** 2007 Mar ;387(5):1729-37

(3) Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. **Essendoubi Mohammed**, Toubas D, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. **(Journal of Microbiological Methods 2007)**.

(4) Osmoadaptative responses in the *rhizobia* nodulating Acacia isolated from south eastern Moroccan Sahara, **Mohammed Essendoubi**, Fatiha Brhada, Jamal Eddine Jamali, Abdelkarim Filali-Maltouf, Sylvie Bonnassie, Sylvie Georgeault, Carlos Blanco and Mohamed Jebbar, (Environ Microbiol. 2007 Mar;9(3):603-11.)

COMMUNICATIONS :

- **COMMUNICATION ORALE**

(1) 7ème congrès national de la Société Française de Microbiologie, Cité des Congrès de Nantes les 30 - 31 mai et 1er juin 2007, **M. Essendoubi**, G. Sockalingum, C. Sandt, I. Adt, JM Pinon, M. Manfait, D. Toubas. **«APPORTS DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE EN MICROBIOLOGIE».**

(2) Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, SFMM Nancy 9,10-11 Mai 2007, **ESSENDOUBI Mohammed** , SOCKALINGUM Ganesh , PINON Jean Michel , MANFAIT Michel , TOUBAS Dominique. **«APPORTS DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE EN MYCOLOGIE MÉDICALE»**.

(3) 19éme Congrès de la Société Française de Biophysique SFB 2004 Anglet 16-19 Octobre 2004. **M. Essendoubi**, G. D. Sockalingum, D. Toubas, J-M. Pinon, M. Manfait. **« Identification et typage par Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des souches de *Candida glabrata* isolées en milieu clinique »**.

❖ COMMUNICATION PAR AFFICHES

• Presentations internationales

(1) ISHAM 2006 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology 25-29 June 2006 Paris, France. **M. Essendoubi**, D. Toubas, M. Manfait, J-M. Pinon, G. Sockalingum, **Typing of *Candida parapsilosis* isolates by FTIR Spectroscopy.**

(2) SPEC 2006 Shedding light on disease: optical diagnosis for the new millennium 20-24 May 2006 Heidelberg Germany. **M. Essendoubi**, D. Toubas, J-M. Pinon, M. Manfait, G. D. Sockalingum. **Typing of *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* clinical strains by FTIR Spectroscopy.**

(3) 11th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. ECSBM 2005 Aschaffenburg, Germany September 03 – 08, 2005. **M. Essendoubi**, G. D. Sockalingum, J. M. Pinon, M. Manfait and D. Toubas. **Characterization of *Candida glabrata*: typing and evaluation of resistance to fluconazole.**

(4) Dataspec 2005, 30 juin et 1er juillet 2005, Reims. **M. Essendoubi**, G. D. Sockalingum, J-M.Pinon, M. Manfait, D. Toubas. **Combined use of FTIR spectroscopy and data analysis for the characterization of *Candida glabrata*: typing and evaluation of resistance to fluconazole.**

• Presentations nationales

(1) Journée « Jeunes Chercheurs » de l'I.F.R 53 Reims – 13 Juin 2006, **M. Essendoubi**, D. Toubas, J-M. Pinon, M. Manfait, G. D. Sockalingum. **Typage des souches de *Candida glabrata* et *Candida parapsilosis* par spectroscopie infrarouge**.

(2) Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, SFMM 2005 Besançon, 26-27 Mai 2005. **M. Essendoubi**, D. Toubas, I. Adt, J. Cousson, A. Léon, C. Lépousé, M. Manfait, J-M. Pinon, G. D. Sockalingum. **Caractérisation de souches de *Candida glabrata* en milieu hospitalier : Approche phénotypique par spectroscopie infrarouge.**

(3) Journée « Jeunes Chercheurs » de l'I.F.R 53 Reims – 28 Juin 2004, **M. Essendoubi**, G. D. Sockalingum, M. Bouzagou, M. Manfait, J-M. Pinon, D. Toubas. **Identification et typage par (micro)-spectroscopie IR-TF de levures du genre *Candida* isolées en milieu clinique.**

(4) 2éme journée de recherche clinique du CHU de Reims – 8 Octobre 2004 Institut Régional de Formation. **M. Essendoubi**, G. D. Sockalingum, M. Manfait, J-M. Pinon, D. Toubas. **Caractérisation de levures du genre *Candida* d'origine clinique par Spectroscopie IRTF.**

Résumé

L'apport de la (micro)spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) à la différenciation et l'identification des levures du genre *Candida* isolés en milieu clinique a été évalué. Nous avons appliqué cette technique d'une part à l'identification 96 souches appartenant à 6 espèces de *Candida* les plus fréquentes en clinique, d'autre part au typage de 3 espèces (*C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*). Les résultats montrent que la différenciation des espèces est possible à partir des suspensions et des microcolonies. Une base de données comprenant 180 spectres de *Candida* appartenant à ces 6 espèces a été construite. A l'aide de souches inconnues, nous avons testé le potentiel de la méthode comme outil d'identification en routine. Pour quatre des espèces, un taux d'identification de 100% a pu être atteint. Le taux inférieur observé pour les deux autres espèces est expliqué par le manque de spectres représentatifs de ces espèces dans la base de données initiale. Pour le typage, deux applications cliniques ont été menées : un suivi longitudinal de souches de *C. glabrata* chez un patient hospitalisé en service de réanimation et un suivi épidémiologique sur 13 souches de *C. glabrata* isolées chez 4 patients. Une transmission interhumaine des souches entre ces patients a pu être exclue aussi bien par spectroscopie IRTF que par RAPD.
Ces travaux confirment la capacité de la (micro)spectroscopie IRTF à discriminer des souches de *Candida* au niveau de l'espèce mais également de la souche lors d'un typage ou d'une étude clinique. Au-delà de son haut contenu en informations, la spectroscopie IRTF est rapide, fiable, peu coûteuse et peut représenter une approche nouvelle au diagnostic mycologie.

Mots clés : (Micro)spectroscopies Infrarouge à Transformée de Fourier, Identification, Typage, *Candida* , Analyse statistique, Base de données.

Abstract

The use of FTIR (micro)spectroscopy for the differentiation and identification of *Candida* yeasts of clinical origin has been evaluated. Ninety-six strains belonging to six different species have been tested for the differentiation process while strains from three species (*C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*) have been used for the typing tests. Our results show that species differentiation is achievable by analysing both suspensions and microcolonies. A spectral data base consisting of 180 strains from six different *Candida* species frequently encountered in medical practice has been set up. The data base was then tested with unknown species from patients. An identification score of 100% was achieved for four of the species. The lower score obtained for the other two species was explained by the lack of representative spectra belonging to these strains in the initial data base. To demonstrate the feasibility of the method for strain typing, two clinical studies were conducted. The first study reports on to the longitudinal follow-up of *C. glabrata* strains in an intensive care patient and the second concerns an epidemiological study where 13 *C. glabrata* strains isolated from four different patients were investigated. In both cases, the FTIR results excluded an inter-human transmission. This was further confirmed by RAPD technique.
These results confirm the potentials of (micro)FTIR spectroscopy to discriminate *Candida* strains both at species and strain levels. Besides its high information content, FTIR spectroscopy is a rapid, reliable, and low-cost technique and can be foreseen as a new diagnostic approach in medical mycology.

Keywords: Fourier transform infrared (micro)spectroscopy, Identification, Typing, *Candida*, Statistical analysis, Data base.

Mohammed ESSENDOUBI

Identification et typage par (micro)spectroscopie IRTF des levures du genre *Candida* d'origine clinique.

Th. Pharm. Univ. : Reims : 2007

Résumé : L'apport de la (micro)spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) à la différenciation et l'identification des levures du genre *Candida* isolés en milieu clinique a été évalué. Nous avons appliqué cette technique d'une part à l'identification 96 souches appartenant à 6 espèces de *Candida* les plus fréquentes en clinique, d'autre part au typage de 3 espèces (*C. albicans, C. glabrata et C. parapsilosis*). Les résultats montrent que la différenciation des espèces est possible à partir des suspensions et des microcolonies. Une base de données comprenant 180 spectres de *Candida* appartenant à ces 6 espèces a été construite. A l'aide de souches inconnues, nous avons testé le potentiel de la méthode comme outil d'identification en routine. Pour quatre des espèces, un taux d'identification de 100% a pu être atteint. Le taux inférieur observé pour les deux autres espèces est expliqué par le manque de spectres représentatifs de ces espèces dans la base de données initiale. Pour le typage, deux applications cliniques ont été menées : un suivi longitudinal de souches de *C. glabrata* chez un patient hospitalisé en service de réanimation et un suivi épidémiologique sur 13 souches de *C. glabrata* isolées chez 4 patients. Une transmission interhumaine des souches entre ces patients a pu être exclue aussi bien par spectroscopie IRTF que par RAPD.

Ces travaux confirment la capacité de la (micro)spectroscopie IRTF à discriminer des souches de *Candida* au niveau de l'espèce mais également de la souche lors d'un typage ou d'une étude clinique. Au-delà de son haut contenu en informations, la spectroscopie IRTF est rapide, fiable, peu coûteuse et peut représenter une approche nouvelle au diagnostic mycologie.

Mots clés : (Micro)spectroscopies infrarouge à transformée de Fourier, Identification, Typage, *Candida* , Analyse statistique, Base de données.

JURY

Pr. Philippe DANIEL	Rapporteur
Dr. Laurence MARIEY	Rapporteur
Pr. Claude GUIGUEN	Examinateur
Dr. Dominique TOUBAS	Examinateur
Dr Ganesh SOCKALINGUM	Directeur de thèse
Pr. Michel MANFAIT	Président

Adresse de l'auteur :

M. Mohammed ESSENDOUBI

14, esplanade Paul Cézanne Apt: 4F 51100 REIMS