



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

Année 2017

THÈSE n° 36-2017

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement le **08 novembre 2017**
Par Madame **HOUHAMDI Linda**
Née le 20/06/1977 à Ain-Babouche – OUM-EL-BOUAGHI (ALGÉRIE)

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de thèse

THÈSE

Pour le **DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Amélioration du diagnostic microbiologique des endocardites infectieuses à hémoculture négative avec la description des trois premiers cas adultes dus à *Malassezia restricta*

Travail effectué dans le Laboratoire de Bactériologie
HOSPICES CIVILS DE LYON
Sous la direction de Monsieur le Professeur François VANDENESCH

JURY

<u>Présidente</u> :	Madame MORFIN-SHERPA Florence	Professeur des Universités Praticien Hospitalier
<u>Membres du Jury</u> :	Madame WALLON Martine	Professeur des Universités Praticien Hospitalier
	Madame BOUCHIAT-SARABI Coralie	Maître de Conférences des Universités Praticien Hospitalier
	Monsieur FERRY Tristan	Professeur des Universités Praticien Hospitalier
	Monsieur VANDENESCH François	Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Année 2017

THÈSE n° 36-2017

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement le **08 novembre 2017**
Par Madame **HOUHAMDI Linda**
Née le 20/06/1977 à Ain-Babouche – OUM-EL-BOUAGHI (ALGÉRIE)

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de thèse

THÈSE

Pour le **DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Amélioration du diagnostic microbiologique des endocardites infectieuses à hémoculture négative avec la description des trois premiers cas adultes dus à *Malassezia restricta*

Travail effectué dans le Laboratoire de Bactériologie
HOSPICES CIVILS DE LYON
Sous la direction de Monsieur le Professeur François VANDENESCH

JURY

<u>Présidente</u> :	Madame MORFIN-SHERPA Florence	Professeur des Universités Praticien Hospitalier
<u>Membres du Jury</u> :	Madame WALLON Martine	Professeur des Universités Praticien Hospitalier
	Madame BOUCHIAT-SARABI Coralie	Maître de Conférences des Universités Praticien Hospitalier
	Monsieur FERRY Tristan	Professeur des Universités Praticien Hospitalier
	Monsieur VANDENESCH François	Professeur des Universités Praticien Hospitalier

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	VV
LISTE DES TABLEAUX	VII
ABRÉVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	16
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	19
PARTIE I. ENDOCARDITES INFECTIEUSES : DONNEES GENERALES	20
1. Définition	21
2. Historique	22
3. Epidémiologie et facteurs de risque	22
4. Physiopathologie	24
4.1. Anatomie cardiaque	24
4.2. Mécanismes physiopathologiques	25
5. Examen clinique	26
5.1. Syndrome infectieux	26
5.2. Signes cardiaques	27
5.3. Manifestations extracardiaques	27
5.3.1. Manifestations cutanéomuqueuses	27
5.3.2. Manifestations respiratoires	28
5.3.3. Manifestations ophtalmologiques	28
5.3.4. Autres manifestations	28
6. Examens paracliniques	28
6.1. Examens d'orientation	29
6.2. Examens de décision	29
6.2.1. Examens anatomohistopathologiques	29
6.2.2. Examens microbiologiques	29
6.2.3. Examens d'imagerie	29
7. Microorganismes responsables d'EI	31
7.1. Répartition des microorganismes responsables d'EI	31
7.2. Microorganismes bactériens	32
7.2.1. Staphylocoques	32
7.2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	32
7.2.1.2. Staphylocoques à coagulase négative	32
7.2.2. Streptocoques	33
7.2.2.1. Streptocoques oraux	33
7.2.2.2. Streptocoques du groupe D	33
7.2.2.3. Ex-streptocoques déficients	33
7.2.2.4. Streptocoques bêta-hémolytiques	33
7.2.3. Entérocoques	33
7.2.4. Bactéries à développement intracellulaire obligatoire ou prédominant	33
7.2.4.1. <i>Coxiella burnetii</i>	33
7.2.4.2. <i>Bartonella (ex-Rochalimea) quintana</i> et <i>B. henselae</i>	34
7.2.4.3. <i>Chlamydia</i> spp.	34
7.2.4.4. <i>Tropheryma whipplei</i> .	34
7.2.4.5. <i>Mycoplasma</i> spp	34
7.2.5. Bactéries du groupe HACCEK	34
7.2.6. Autres bactéries	35
7.3. Microorganismes fongiques	35
7.3.1. Généralités sur l'EI fongique	35
7.3.2. Épidémiologie et facteurs de risque	35
7.3.3. Agents étiologiques des EI fongiques	36
8. Classification diagnostique des EI	38
9. Complications	39
9.1. Complications cardiaques	39
9.2. Complications extracardiaques	39
10. Evolution et facteurs pronostiques	40
10.1. Evolution à court terme	40
10.2. Evolution à long terme	40
11. Traitement, surveillance et prophylaxie	41
11.1. Traitement	41
11.1.1. Endocardite Team	41
11.1.2. Antibiothérapie	42
11.1.3. Traitement antifongique	45
11.1.4. Traitement chirurgical	46

11.2. Surveillance	48
11.3. Prophylaxie	49
PARTIE II. ENDOCARDITES INFECTIEUSES : DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE	52
1. Hémoscultures	53
1.1. Généralités	53
1.2. Recommandations concernant les hémoscultures	54
1.2.1. Hémoscultures sur milieux usuels	54
1.2.2. Hémoscultures fongiques	54
1.2.3. Hémoscultures sur milieux spéciaux	54
1.3. EI à hémoscultures positives	55
1.4. EI à hémoscultures négatives	55
1.4.1. EI à hémoscultures négativées par une antibiothérapie préalable	56
1.4.2. EI à microrganismes fastidieux : « EI à hémoscultures souvent négatives »	57
1.4.3. EI à microorganismes non cultivables sur milieu usuel : « hémoscultures toujours négatives »	57
1.4.4. Agents fongiques	57
1.4.5. Endocardites du cœur droit	58
1.4.6. Endocardites murales	58
1.4.7. Endocardites marastiques	58
2. Sérologies	59
2.1. Sérologies <i>Coxiella burnetii</i>	59
2.2. Sérologies <i>Bartonella</i> spp.	59
2.3. Sérologies <i>Brucella</i> spp.	59
2.4. Sérologies <i>Chlamydia</i> spp.	59
2.5. Sérologies <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	59
2.6. Sérologies <i>Legionella</i> spp.	59
2.7. Sérologies fongiques	59
3. Kit EI au laboratoire de bactériologie de Lyon	60
4. Techniques d'étude des valves cardiaques	62
4.1. Partie destinée à la bactériologie	63
4.2. Partie destinée à l'anatomopathologie	63
5. Culture cellulaire	66
6. Biologie moléculaire	66
6.1. Extraction d'ADN	66
6.2. Détection et analyse des produits de PCR	66
6.2.1. PCR universelle	66
6.2.2. PCR spécifique	68
6.2.3. PCR universelle/PCR spécifique	68
6.3. Exploitation de la séquence	68
6.4. Avantages et limites de la PCR	69
6.4.1. Avantages	69
6.4.2. Limites	69
6.5. Application de la PCR en microbiologie	70
6.6. PCR dans les EI : « revue de la littérature »	70
6.6.1. PCR universelle dans les EI	71
6.6.1.1. PCR ADNr 16S sur sang ou sur sérum	71
6.6.1.2. PCR ADNr 16S sur valves cardiaques	71
6.6.1.3. PCR panfongique	72
6.6.2. PCR spécifiques sur sang, sérum ou valves cardiaques	72
6.6.2.1. PCR <i>Bartonella</i> spp	73
6.6.2.2. PCR <i>Coxiella burnetii</i>	73
6.6.2.3. PCR <i>Tropheryma whipplei</i>	73
6.6.2.4. PCR <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	73
6.6.2.5. Autres PCR	73
TRAVAIL PERSONNEL : ARTICLE	74
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	104
DISCUSSION	107
CONCLUSION	112
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
SERMENT DE GALIEN	131

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Épidémiologie de l'endocardite infectieuse	23
Figure 2. Végétations sur sondes de pacemaker	23
Figure 3. Anatomie des tuniques cardiaques	24
Figure 4. Anatomie cardiaque	24
Figure 5. Valve mitrale infectée (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	25
Figure 6. Histoire naturelle de l'EI	25
Figure 7. Manifestations cutanéomuqueuses au cours de l'endocardite infectieuse	27
Figure 8. Taches de Roth, au fond d'œil, avec hémorragies rétiniennees	28
Figure 9. Incidence de l'EI, en fonction de l'âge et du microorganisme causal	32
Figure 10. Lésions cutanées au cours d'EI fongique	37
Figure 11. Kit d'EI à utiliser en cas de suspicion d'EI, au laboratoire de bactériologie de Lyon	61
Figure 12. Fiche de renseignements cliniques en cas de suspicion d'EI	61
Figure 13. Végétations mitrales de deux patients différents	63
Figure 14. Principe de l'immunohistochimie	65
Figure 15. Représentation schématique de l'ARN 16S	67
Figure 16. Schéma des régions 18S, 5,8S et 28S de l'ADNr fongique	67
Figure 17. <i>Malassezia furfur</i> cultivée sur gélose Columbia au sang.....	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Proportion des cas d'EI causées par différents microorganismes.....	31
Tableau 2. Principaux microorganismes isolés d'EI fongiques.....	37
Tableau 3. Critères diagnostiques de DUKE.....	37
Tableau 4. Principales antibiothérapies de première ligne de l'EI.....	42
Tableau 5. Durées de traitement suggérées pour l'EI.....	44
Tableau 6. Durées de traitement suggérées pour l'EI non compliquée et les infections sur pacemakers et défibrillateurs.....	45
Tableau 7. Recommandations des sociétés savantes pour la prise en charge des EI fongiques.....	48
Tableau 8. Patients à haut risque d'EI.....	49
Tableau 9. Procédures à haut risque d'EI.....	50
Tableau 10. Antibioprophylaxie et mesures préventives avant interventions cardiaques et vasculaires.....	51
Tableau 11. Mesures de prévention non spécifiques. Recommandations ESC 2015.....	52
Tableau 12. Principales causes de la négativité des hémocultures lors de l'EI.....	56
Tableau 13. Performances analytiques des nouveaux outils diagnostiques dans l'EI fongique.....	60

ABRÉVIATIONS

°C : degré Celsius
ADN : acide désoxyribonucléique
AEPEI : Association pour l'Étude et la Prévention de l'Endocardite Infectieuse
ARN : acide ribonucléique
ARNr : acide ribonucléique ribosomaux
AHA : American Heart Association
BDG : β -1,3-D-glucane
BLAST : *Blast Local Alignment Search Tool*
C.à.d : c'est-à-dire
CHU : Centre hospitalier universitaire
CNR : Centre National de Référence
CRP : Protéine C réactive
ddNTP : didéoxyribonucléotides
EDTA : éthylène diamine tétra-acétique
EI : Endocardite(s) infectieuse(s)
EIHN : endocardite infectieuse à hémocultures négatives
EIHP : valeur prédictive positive endocardite infectieuse à hémocultures positives
ELISA : *Enzyme linked immunosorbent assay*
ESC : Société Européenne de Cardiologie (European Society of Cardiology)
ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease
etc : et cetera
ETO : échographie transoesophagienne
ETT : échographie transthoracique
HES : Hématoxyline éosine safran
IAI : Institut des Agents Infectieux
IC : Insuffisance cardiaque
ICE-PCS : International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Studies
IDSA : the Infectious Diseases Society of America
IFI : Immunofluorescence indirecte / Infection fongique invasive
IV : intraveineux (se)
MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
mm : millimètre(s)
NICE : National Institute of health and Clinical Excellence
PAS : acide périodique de Schiff
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
RCP : réunion de concertation pluridisciplinaire
SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
SPS : polyanéthol sulfonate de sodium
TAVI : Transcatheter Aortic Valve Implantation
UDIV : usagers de drogue intraveineuse
UV : ultraviolet
18F-FDG : 2-désoxy-2-18-fluoro-D-glucose

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. Frédéric FLEURY
- Présidence du Conseil Académique M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Didier REVEL
- Vice-Président de la Commission Recherche M. Fabrice VALLEE
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire M. Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Gilles RODE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directeur : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Xavier PERROT
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Polytech Lyon Directeur : M. Emmanuel PERRIN
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE
- Observatoire des Sciences de l'Univers Directrice : Mme. Isabelle DANIEL

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

- **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU - PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH - HRD)

- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU- PH)
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Madame Sarah HUET (AHU)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU - PAST)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Monsieur Alexandre JANIN

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Camille ROZIER

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

Au **Professeur MORFIN**, pour m'avoir fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse. Merci pour ces deux semestres de virologie. Je ne pourrai jamais vous remercier assez !

Au **Professeur WALLON** pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce Jury. Vous m'avez grand ouvert votre laboratoire ! Je ne pourrai jamais vous remercier assez ! Pour moi, vous êtes le Soleil de l'IAI Lyonnais.

Au **Professeur FERRY** qui m'a honoré par sa présence. Je suis toujours très admirative de vos cours de DU d'Infectiologie et de vos conseils thérapeutiques, avec des explications, lors des RCP d'EI au GHE. Merci de l'intérêt que vous portez à mon travail. Votre vision clinique et vos connaissances sont un apport précieux pour le jugement de ce travail.

Au **Professeur VANDENESCH**, vous m'avez honoré en me proposant de travailler sur votre thème préféré « l'endocardite infectieuse » et notamment à hémoculture négative. Ce projet loin d'être facile me tient beaucoup à cœur, merci à vous et pour votre confiance. Merci également pour ce dernier mois !

A **Coralie**, merci pour tes corrections malgré ton congé maternité et pour tes encouragements durant ce dernier mois.

Au **Professeur Gérard LINA**, le concours des circonstances a fait que je n'ai malheureusement pas pu travailler avec vous, mais j'ai eu l'immense honneur de passer ma dernière année d'internat en virologie avec Monsieur le **Professeur Bruno LINA** et le **Professeur MORFIN**. Je vous remercie pour l'accueil que vous m'avez fait.

À tous, je vous prie de trouver dans ces quelques lignes, l'expression de toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Chère **Yvonne BENITO**, ma chère Yvonne, tu es unique. Molzym® t'a contacté et tu as pensé à moi. Merci pour tout !

À l'équipe d'anatomopathologie : - Lyonnaise

Au **GHE** : **Professeur THIVOLET**, merci de m'avoir donné énormément de votre précieux temps pour m'expliquer, en observant les lames des patients, comment poser le diagnostic histologique de l'EI. Merci pour votre confiance, vous également vous m'avez grand ouvert votre laboratoire. Au **Professeur BREVET** et à la technicienne hors du commun **Dominique** (aujourd'hui tu auras la réponse à ton éternelle question) et au technicien **Sofiane**.

Au **GHN** : merci au **Professeur DEVOUASSOUX** et à la technicienne **Amina**.

- Marseillaise

Au **Professeur LEPIDI**. Merci pour vos encouragements, vos conseils ainsi que les corrections de notre protocole d'auto-IHC (rédigé avec la super **Dominique**) et également pour votre gentillesse toujours égale à celle que j'ai connu en travaillant ensemble à l'Unité des Rickettsies.

À l'équipe de parasitologie-mycologie :

A ma chère équipe de choc de parasitologie-mycologie lyonnaise. Je ne pourrai jamais vous remercier assez. Vous serez pour toujours dans mon cœur.

À **Méjà**, vous êtes la force tranquille. En un coup d'œil, vous trouvez le genre *Malassezia* en observant le Grocott. Et **Damien** le confirme, entre autres, en identifiant l'espèce. Et tous se déclenche après ! Merci également à **Florence** pour toutes les explications (entre 12h-14h et même les samedis, excuses !). Merci à tous les techniciens de mycologie : **Clément** (je te souhaite une brillante réussite pour ta thèse de science), **Angélique**, **Élodie**, **Marion** (c'était un plaisir de faire des gardes avec toi à HEH et puis de te revoir en mycologie), **Emilie**... Un énorme merci également à **Aline** !

Egalement, merci au **Dr RABERIN** de Saint-Etienne qui m'a gentiment donné son protocole de sérologie lors de son cours de DIU-Infectiologie et Hygiène Hospitalière à Saint-Etienne.

A l'équipe de l'IAI - CBN :

Merci à vous tous pour cette dernière année d'internat : **Christophe R, Maud, Isabelle, Antonin, Laurence, Rolf, Yahia, William B, Rodolph P, Geneviève, Vanessa, Marie-Paule, Khadidja, Caroline**...et TOUS les techniciens de virologie (**Gislaine, Delphine, Rémy, Jérôme, Yanis** et TOUS les autres...), le plateau de sérologie (**Laurence, Myriam**...) et de BioMol.

Cher **Olivier D**, je ne sais toujours pas comment tu arrives à tout bien faire, tout en répondant au téléphone, et avec le sourire : respect chef !

Merci au **Dr. TIGAUD, Pascale G, Chantal R, Wael, Christine P, Patricia (PMS), Christophe G, Aline B, Christelle F** ...

Merci aux secrétaires : **Solange, Marie-Claire, Yamina, Toky, Blandine, Florence, Evelyne**...

Merci aux super(be)s technicien(ne)s de la bactériologie lyonnaise : **Monique, Joëlle, les Laurence, les Nicole, Nadine, Valérie, Anaïs, Faiza, Isabelle (baba), Bernadette, Roxane, Anthony, ChriChri**,... (désolée si je n'ai pas pu noté tous les prénoms !).

Merci à tous les techniciens de jour et de nuit ainsi que tous les OP des quatre sites des LBMMS.

A mes co-internes : **CAG, Christina, Lam Thuy et Alexia B**, vous avez rendu mon internat heureux ! Merci à vous et à **Anatole L, Jean-Victor R, Corentin A, Dorian B, Grégory D, Vincent D, Charlotte P, Camille A, Sarra K**,...

Merci aux pharmaciennes du GHE (pour l'*Intralipid*®) et GHN (pour le *SmofKabiven*®).

Merci à **Marie C** : c'est mon tour de te remercier, tu étais mon unique externe en médecine qui m'étais confiée. Bon courage pour l'ECN ! Merci également à **Typhanie, Faustine et Sofia** pour ce dernier mois de mon internat et le premier de votre 5AHU. Bon courage pour la suite ! Merci également à **Virginie, Andréa, Alice, Youssef et William**.

A ma famille :

Yassine, merci d'être mon mari et de m'avoir épaulé. Tu étais et tu es toujours à mes côtés. Merci également pour avoir supporté mes absences !

Mes chers trésors : **Yousr**, tu es la plus merveilleuse grande fille du monde entier. **Lynn**, tu es la plus merveilleuse petite fille du monde entier et **Majd**, tu es le plus merveilleux garçon du monde entier. Je vous aime profondément ! Merci pour les bisous et les câlins de chaque matin. Ça me donne énormément de force pour affronter tout ce qu'il se trouve en dehors de chez nous.

À **ma mère et mon père**, ma force et ma raison d'être. Vous m'avez appris de respecter les autres, quoiqu'il arrive, les valeurs du travail, d'être forte et ne jamais abandonner. Si tout le monde était comme vous, la vie sur terre saurait nettement mieux. Mais, vous êtes **UNIQUES** et j'ai la grande chance d'être votre fille. Vous vous êtes sacrifiés pour mes frères, sœurs et moi : **Moussa** (Professeur d'Université en Biologie), **Fouad** (Pilote d'avion), **Zina** (Professeur d'Université en Informatique), **Mohamed** (ingénieur en électronique et chef d'équipe), **Nassima** (médecin interniste) et **Khaled** (pharmacien). Je vous aime tous ! Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

À mes **belles sœurs** et mes **beaux-frères** ...

Last but not least, à mon grand maître **Professeur Didier RAOULT**. Vous m'avez tout appris alors que je ne savais pas c'était quoi la recherche. Votre façon unique de travailler, votre respect inégalable aux valeurs du travail ne peuvent que témoigner de la place que vous occupiez mondialement. Si je suis là aujourd'hui c'est en grande partie grâce à ce que vous m'avez enseigné. Je ne vous remercierai jamais assez !

INTRODUCTION

Introduction

L'endocardite infectieuse (EI) correspond à la prolifération au niveau de l'endocarde de microorganismes, généralement bactériens et rarement fongiques (1), suite à une dissémination hémotogène. Il s'agit d'une infection qui cause des dégâts essentiellement valvulaires qui sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes, dominées par le risque d'insuffisance cardiaque et d'embolies d'origine cardiaque.

L'EI est une pathologie relativement rare mais toujours grave (1). En France métropolitaine, son incidence est estimée aux alentours de 30 par million d'habitants et par an, soit environ 2 000 cas annuels (2), et sa fréquence reste stable malgré les méthodes de prophylaxie et la raréfaction du rhumatisme articulaire aigu.

Cette infection demeure létale en l'absence de traitement anti-infectieux adapté associé ou non à une chirurgie. En dépit des progrès diagnostiques, chirurgicaux et médicamenteux, le taux de mortalité des patients atteints d'EI reste élevé avec un taux moyen de 15 à 20 % (3,4–7) et il n'a pas changé depuis ces 30 dernières années (5).

L'EI requiert une hospitalisation prolongée, une antibiothérapie adaptée, à fortes doses, par voie intraveineuse (IV), pendant plusieurs semaines, et une intervention chirurgicale cardiaque dans plus de la moitié des cas. La prise en charge doit être pluridisciplinaire associant des cardiologues, des chirurgiens cardiaques, des infectiologues, des microbiologistes, mais aussi des anatomopathologistes, des anesthésistes-réanimateurs, des internistes, des neurologues, des rhumatologues etc.... À titre d'exemple, une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) hebdomadaire est organisée au sein du CHU de Lyon depuis quatre ans, où la majorité des dossiers d'EI du CHU y est discutée. Le choix des anti-infectieux utilisés, ainsi que la durée du traitement, doivent être adaptés au pathogène impliqué. L'identification rapide de l'agent étiologique est donc critique dans la prise en charge du patient atteint d'EI. Le plus souvent elle est apportée par des outils diagnostiques conventionnels. Les hémocultures, positives dans plus de 90 % des cas, constituent la pierre angulaire du diagnostic microbiologique conventionnel des EI. Actuellement, *Staphylococcus aureus* est le principal germe responsable des EI (3,7,8). L'examen anatomohistopathologique de la valve cardiaque après exérèse chirurgicale (dans environ 50 % des cas d'EI) constitue le « gold-standard » dans le diagnostic des EI (9).

Il arrive, toutefois, que les hémocultures ne fournissent aucune information sur l'agent responsable, nous parlons alors d'EI à hémocultures négatives (EIHN). Cette situation est un véritable challenge pour le clinicien et le microbiologiste. En effet, lorsque le diagnostic des EI est retardé, la morbidité augmente de façon significative.

D'autres outils diagnostiques alternatifs peuvent, alors, être utilisés. Les sérologies spécifiques de germes non cultivables peuvent être précieuses, mais elles ne sont disponibles que pour quelques microorganismes seulement. Lorsque le tissu valvulaire est disponible, son analyse microbiologique par des méthodes conventionnelles (examen direct et culture) est pratiquée. Toutefois, ces dernières peuvent être limitées par l'antibiothérapie préalable, la nature du germe causal, et son inoculum au sein du tissu valvulaire. Le diagnostic des EI nécessite donc de nouvelles méthodes pour identifier l'agent responsable. De nombreuses équipes ont travaillé sur une approche moléculaire du diagnostic à partir des valves cardiaques. La PCR universelle bactérienne (communément appelée PCR 16S), capable d'identifier tout type de bactérie, est la technique la plus décrite dans ce domaine. Elle offre l'avantage d'une sensibilité accrue par rapport à la culture conventionnelle et d'une rapidité dans le diagnostic des EI. Des PCR spécifiques de certains microorganismes sont aussi disponibles.

Malgré tout, encore 5,2 % d'EI restent non documentées d'un point de vue microbiologique (1). Cela pointe la nécessité d'utiliser des outils diagnostiques plus performants.

Dans notre étude, nous nous proposons d'évaluer l'apport d'un kit de biologie moléculaire (UMD ; Molzym, Bremen, Allemagne) permettant la détection de microorganismes bactériens et fongiques, par une approche de PCR universelle à partir des prélèvements humains. Ce kit permet à la fois l'extraction des ADN microbiens après leurs enrichissements dans le prélèvement suite à l'élimination de l'ADN humain, l'amplification par PCR et le séquençage universel (bactérien et fongique) à partir des prélèvements cardiaques (valves, végétations...) de patient opérés au CHU de Lyon dans un contexte d'EI. Étaient inclus uniquement les patients atteints d'EI formellement diagnostiquée par examen anatomohistopathologique mais présentant des hémocultures négatives, des sérologies bactériennes négatives et dont les analyses microbiologiques (culture et/ou PCR universelle et/ou spécifique(s)) réalisées en routine sur ces prélèvements étaient restées négatives.

L'objectif principal de notre étude est de documenter les EIHN sans germe identifié et dont le diagnostic de l'EI a été posé par l'anatomohistopathologique (le gold standard dans ce domaine (9)). Ce document présente les résultats de nos travaux. Une première partie présentera une revue bibliographique sur l'endocardite infectieuse ainsi que son diagnostic microbiologique. La deuxième partie de ce document présentera les résultats de nos travaux sous forme d'un article scientifique. Nous finirons par une discussion.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I. Endocardites infectieuses : Données générales

1. Définition

L'endocardite infectieuse (EI) ou maladie d'Osler est définie comme une infection secondaire à la greffe et à la multiplication d'un agent infectieux, le plus souvent bactérien, sur l'endocarde sain ou préalablement lésé, le plus souvent au niveau d'une valve cardiaque, ou sur une prothèse valvulaire (10) suite à une dissémination hématogène. Les valves les plus fréquemment atteintes sont les valves mitrale et aortique. Cette définition englobe les infections développées sur les malformations cardiaques et sur les sondes de Infective endocarditis: review of 135 cases over 9 years (11,12).

L'atteinte infectieuse de l'endocarde va entraîner des lésions ulcérovégétantes, essentiellement valvulaires, responsables d'un risque important d'insuffisance cardiaque (IC) et d'embolies septiques à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité importantes.

L'EI est une pathologie complexe, associant un processus septicémique et des perturbations hémodynamiques consécutives aux dégâts anatomiques. C'est une maladie relativement rare et toujours grave nécessitant un traitement ainsi qu'une hospitalisation prolongée. En l'absence d'antibiothérapie, combinée ou non à la chirurgie, l'EI reste une maladie létale dont le taux de mortalité reste élevé de 10 à 25 % en milieu hospitalier (5)(8). Nous pouvons distinguer, selon :

- La localisation et la présence ou non de matériel intracardiaque (10) :

- Les EI sur valve native du cœur gauche,
- Les EI sur prothèse valvulaire du cœur gauche,
- Les EI du cœur droit : avec soit une localisation gauche initiale soit à localisation droite exclusive,
- Les EI liées à un dispositif intracardiaque (stimulateur ou défibrillateur cardiaque).

- Le mode d'infection :

- Les EI communautaires,
- Les EI associées aux soins,
- Les EI associées à une toxicomanie par voie IV.

Le diagnostic d'EI doit systématiquement être évoqué devant tout patient fébrile avec un souffle cardiaque nouveau ou modifié, un patient fébrile avec notion de valvulopathie préexistante (rhumatisme articulaire aigu) ou porteur d'une prothèse valvulaire, une IC aiguë fébrile, et devant tout accident vasculaire cérébral aigu fébrile.

Les manifestations cliniques de l'EI sont multiples et diffèrent selon l'agent étiologique et les facteurs de risque sous-jacents, mais aucune n'est suffisamment spécifique et sensible pour permettre de poser le diagnostic (13).

Staphylococcus aureus est, actuellement, le principal microorganisme responsable de l'EI (7,8,14). D'autres microorganismes tels que les streptocoques, entérocoques ou les agents fongiques peuvent causer une EI avec des différences en fonction du terrain du patient (voir *infra*).

Dans environ 70 à 90 % des cas, un agent étiologique est facilement isolé dans les hémocultures. Dans les 10 à 30 % des cas restants, les agents sont rarement isolés, soit qu'il s'agisse de bactéries intracellulaires ou associées aux cellules, soit qu'il s'agisse de bactéries ou d'espèce fongique à croissance lente ou nécessitant des milieux de culture spéciaux, ou de bactéries dont l'identification est difficile (11,15).

2. Historique

C'est en 1646 que fut effectuée la première observation d'un cas d'EI par Lazare Rivière. En 1869, Virchow et *al.* mirent en évidence la présence de bactéries dans les végétations.

La séquence précise des événements conduisant au développement d'une EI sera exposée de manière prémonitoire en 1885 par Sir William Osler, à l'occasion de la présentation de ses trois « *Gulstonian lectures* » (16–18) devant le collège royal des médecins de Londres : « *Whether or not, in a given case, endocarditis will arise, depends greatly on the condition of the valve tissue. In a case of pneumonia or other disease, such as pyaemia, in which we may suppose microbes circulating in the blood, the endothelium of normal valves may be able to resist their invasion, or even if they do lodge and penetrate, the tissue tone lowered, or if as so often seems the case, the valves are diseased, then the micrococci find a suitable nidus, and excite, by their growth, an endocarditis which might be of a the malignant type* ».

A partir de 1890, Louis Pasteur fut un des premiers à proposer de « cultiver » le sang des patients afin de découvrir une bactérie pathogène. En 1900, les hémocultures deviennent le premier test dans le diagnostic des EI. En 1910 Libman et Celler rapportaient leur expérience sur plus de 3 000 hémocultures (19) et affirmaient que « le diagnostic absolu d'EI devait reposer, pour le moment, sur l'étude de la culture du sang ». Un siècle plus tard, les hémocultures conservent toujours un rôle majeur dans le diagnostic des EI.

3. Epidémiologie et facteurs de risque

Le profil épidémiologique de l'EI s'est considérablement modifié au cours des dernières années (15). Dans les années 1940, la maladie touchait principalement le jeune adulte (< 35 ans) porteur d'une valvulopathie préexistante le plus souvent post-rhumatismale, avec seulement 10 % de patients âgés de plus de 60 ans. Les séries récentes montrent que l'EI touche désormais des patients avec une moyenne d'âge de 55 ans, avec près d'un cas sur deux survenant à plus de 60 ans (20–22). Ce changement vient d'une part du vieillissement de la population générale avec par conséquent une augmentation de l'incidence de patients porteurs de prothèse valvulaire cardiaque, et d'autre part d'une diminution de l'incidence des maladies rhumatismales (éradication du rhumatisme articulaire aigu) dans les pays industrialisés (14).

En dépit de l'amélioration de sa prise en charge, l'incidence annuelle de l'EI n'a pas diminué ces 30 dernières années et elle est d'environ 3-10 pour 100 000 personnes (6,8,23,24).

Les principaux facteurs de risque de survenue de l'EI sont :

- **L'âge** (25) et **le sexe** : L'EI est très rare chez l'enfant, elle touche préférentiellement l'homme adulte (sexe-ratio à 2:1) et les patients plus âgés (âge moyen de survenue de 62 ans) : 194 cas/million chez les hommes entre 75 et 79 ans (7,8,10). Cela est lié à l'augmentation des valvulopathies dégénératives liées au vieillissement de la population (7). En dehors des terrains immunodéprimés (cancers, traitements immunosuppresseurs), l'âge des patients est un facteur de risque important et qui a profondément évolué dans le domaine des EI (figure 1).

- **Les antécédents de pathologie cardiaque** (antécédent d'EI, port de pacemaker ou de valve prothétique...) : 53 % des patients sont toujours concernés.

- **La cardiopathie sous-jacente**. Dans l'enquête française de 1999, l'EI survenait sur cœur sain dans 47 % des cas, sur valvulopathie native dans 31 % des cas et sur prothèse valvulaire dans 16 % des cas. Les 6 % restants incluaient des EI sur sondes de pacemaker (figure 2), sur cardiomyopathies ou sur cardiopathies congénitales. Les EI sur prothèses trouvent leur origine, soit dans une contamination *per opératoire* pour

les formes précoces (une incidence de 0,4 à 3 % et une mortalité de 40 à 60 %), soit dans une bactériémie pour les formes secondaires (une incidence de 1 % par an et une mortalité de 20 à 40 %).

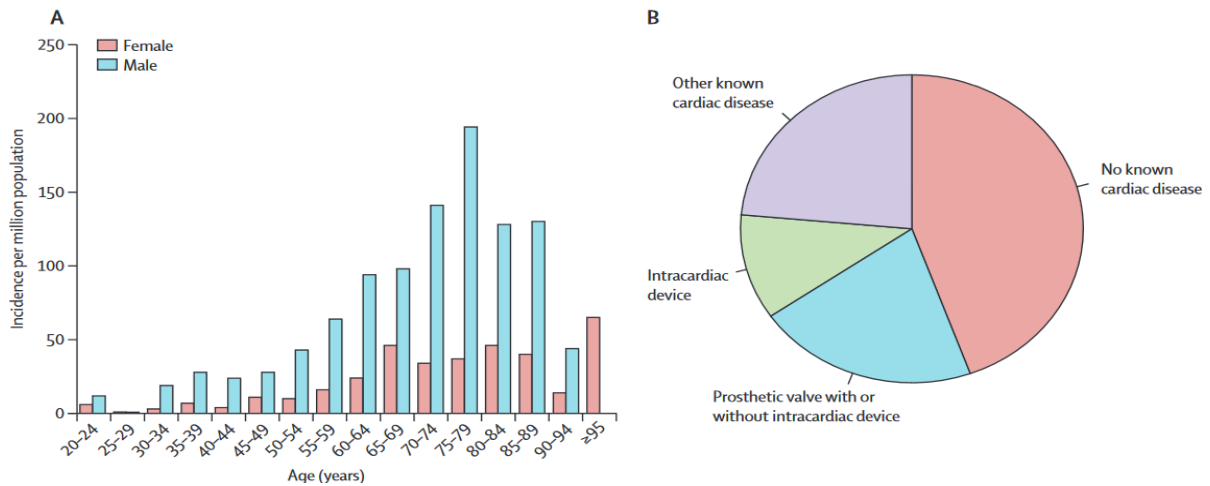


Figure 1. Épidémiologie. Incidence de l'EI selon (A) l'âge et le sexe, et (B) l'antécédent cardiaque antérieur, dans une étude de population française de 497 adultes. L'incidence atteint un sommet de 194 cas par million chez les hommes âgés de 75 à 79 ans, d'après (1).



Figure 2. Végétations sur sondes de pacemaker, d'après (26).

- **Les actes à risque de bactériémie : médicaux** (soins dentaires, digestifs, ORL...) **et/ou invasifs** (les cathéters, les procédures médicochirurgicales) responsables d'EI liées aux soins (27),

Une certaine évolution dans le profil de la pathologie est reportée dans une métaanalyse internationale, de 26 articles publiés entre 1993 et 2003, portant sur 3784 épisodes d'EI (28) ; avec notamment une augmentation des risques parmi :

- **La toxicomanie et la consommation de drogues injectables**, notamment observées chez les sujets jeunes (7).

- **Les patients porteurs de prothèses cardiovasculaires et/ou intravasculaires et/ou de dispositifs intracardiaques** : ces patients ont une incidence d'EI de 3 000/million de patients, soit 6 fois plus de risque qu'en cas de valvulopathie native et 100 fois plus qu'en population générale (4,25),

- **Les personnes exposées aux infections nosocomiales**. L'EI est principalement d'acquisition communautaire (73 % des cas) et touche préférentiellement les valves natives du cœur. Mais, les EI associées aux soins (nosocomiales ou non) occupent dorénavant une place importante : elles représentent plus d'un quart des cas et cela risque de continuer à augmenter, principalement en raison du vieillissement de la population qui nécessite des soins médicaux de plus en plus invasifs (3,24).

- **Les hémodialysés** (25,29,30),

- **Les diabétiques** : constituent jusqu'à 30 % de tous les patients atteints d'EI (31). Le diabète est par conséquent la maladie sous-jacente la plus rencontrée et constitue le facteur de risque le plus fréquent dans la population (3,32).

- **Le microorganisme causal** : actuellement *Staphylococcus aureus* a supplanté les streptocoques oraux et est devenu le principal germe responsable des EI (7,28). Cet agent pathogène représente un facteur de pronostic péjoratif, aussi bien dans les EI d'origine communautaire que dans les EI associées aux soins, notamment à la fréquence des bactériémies qui évoluent vers une EI (3,7).

4. Physiopathologie

4.1. Anatomie cardiaque

D'un point de vue anatomique (figure 3), le cœur est constitué de l'extérieur vers la lumière de trois tuniques tissulaires : le péricarde, le myocarde et l'endocarde. L'endocarde est situé sur la face interne du cœur, directement au contact du sang. La zone la plus atteinte de l'endocarde au cours d'une EI est en règle générale celle des valves cardiaques, surtout si elles sont initialement lésées.

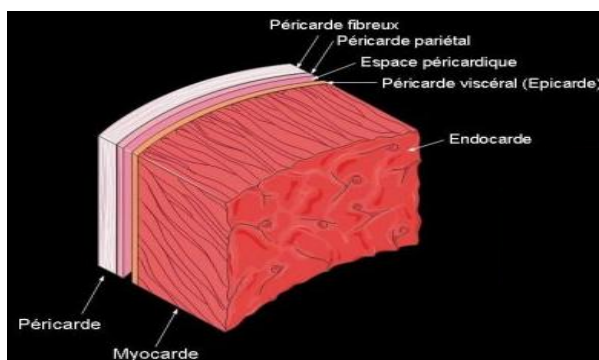


Figure 3. Anatomie des tuniques cardiaques, d'après (33).

Ces valves sont au nombre de quatre (figure 4). Du côté droit du cœur se trouvent : la valve tricuspide entre l'oreillette et le ventricule droit et la valve pulmonaire entre le ventricule droit et l'artère pulmonaire. Du côté gauche du cœur se trouvent : la valve mitrale entre l'oreillette et le ventricule gauche, suivie de la valve aortique entre le ventricule gauche et l'aorte.

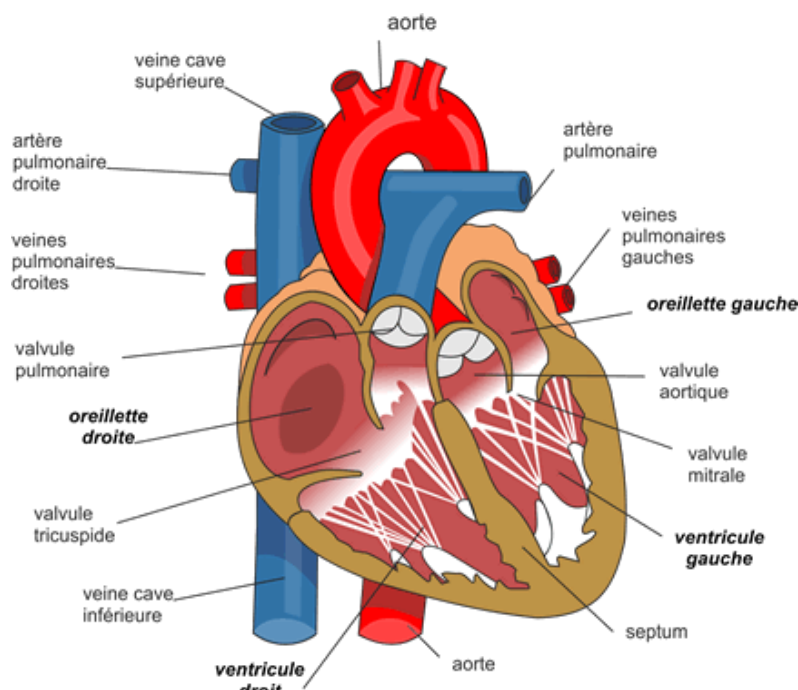


Figure 4. Anatomie cardiaque, d'après (34).

La valve la plus fréquemment concernée est la valve mitrale dans 41 %, suivie de la valve aortique dans 38 % (3) (figure 5).



Figure 5. Valve mitrale infectée (*Staphylococcus aureus*).

4.2. Mécanismes physiopathologiques

La pénétration du microorganisme dans le corps humain est possible via une porte d'entrée. Elle n'est véritablement retrouvée que dans 67 % des cas (10)), et peut être de diverses origines :

- **Buccodentaire** : la plus fréquente (20 à 30 % des EI), à streptocoque le plus souvent (*Streptococcus mitis*, *sanguis*, *salivarius*...), transmis lors de soins dentaires avec saignement,
- **Digestive** : chez le sujet âgé (cancer côlon, cholécystite chronique, etc.), à *Streptococcus bovis*, *Streptococcus gallolyticus* ou entérocoque le plus souvent,
- **Cutanée** : plus rare (plaie, furoncle...), en général à *S. aureus* ou *S. epidermidis*,
- **Urinaire** (chirurgie urétérale, prostatectomie) : à entérocoques ou bacilles à Gram négatif le plus souvent,
- **Iatrogène** : de plus en plus fréquente (cathéters, pacemakers, chirurgie intracardiaque),
- ...

L'histoire naturelle de l'EI peut être décomposée en 4 étapes successives (figure 6) (35).

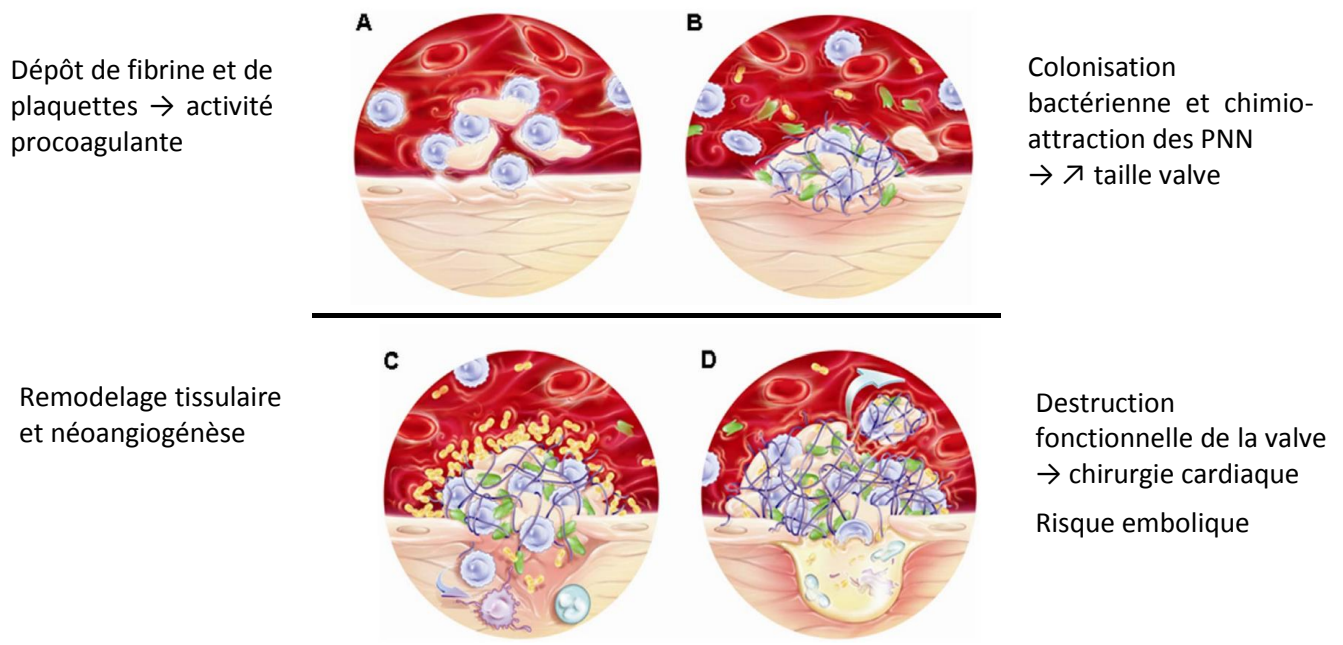


Figure 6. Histoire naturelle de l'EI, d'après (35). **A.** Activité procoagulante qui se traduit par dépôt de fibrine et de plaquettes. **B.** Colonisation bactérienne et chimioattraction de neutrophiles conduisant à l'augmentation de la taille de la végétation. **C.** Remodelage tissulaire et néoangiogénèse conduisant à la destruction fonctionnelle de la valve. **D.** À ce stade, la situation est irréversible et la chirurgie cardiaque est nécessaire.

- La première étape consiste en l'adhérence des bactéries au cours d'une bactériémie, sur les valves préalablement lésées (28), grâce à tout un arsenal de déterminants de surface. Une fois que les microorganismes sont présents dans le sang circulant, ils ont la capacité d'adhérer à l'endocarde valvulaire ou à du matériel intracardiaque grâce à de nombreux déterminants présents à leur surface. En termes de physiopathologie, soit l'endothélium de l'endocarde est préalablement lésé et favorise l'adhésion des microorganismes, soit l'endothélium est non endommagé favorisant les EI dues à *S. aureus* et à d'autres microorganismes intracellulaires (10).

- La deuxième étape consiste en la persistance des bactéries au niveau valvulaire au sein de la végétation qui se développe et protège les bactéries des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. L'agrégation plaquettaire contribue au développement de la végétation.

- La troisième étape aboutit au remodelage tissulaire et la néogénèse. Les conséquences de l'adhérence et de la multiplication des microorganismes sont le développement de lésions infectieuses associant (10,25) :

- Des végétations (amas de fibrine, leucocytes et plaquettes où les microorganismes peuvent survivre) susceptibles de se détacher de la valve et de migrer dans la circulation sanguine (13 à 49 % des cas) entraînant des foyers infectieux secondaires ou des accidents ischémiques. Ces embolies graves, potentiellement infectantes, peuvent survenir à tous les niveaux (système nerveux central, extrémités, viscères abdominaux, squelette ...) et être révélatrices de l'EI (accident vasculaire cérébral, ischémie aigüe d'un membre) ou au contraire être totalement silencieuses dans 20 % des cas (découvertes par exemple lors d'un scanner systématique).

- Le développement d'anévrismes vasculaires, dits « mycotiques », est la conséquence de processus infectieux métastatiques (emboliques et/ou inflammatoires).

- Des anomalies immunologiques est la conséquence de la libération d'antigènes bactériens à partir du foyer septique peuvent être à l'origine de purpura vasculaire, vascularite nécrosante, glomérulonéphrite, présence de complexes-immuns circulants...

- Au cours de la quatrième étape, des lésions de destruction de l'appareil valvulaire, des ulcérations, des abcès et des perforations résultent de la prolifération bactérienne et la sécrétion d'enzymes et des toxines délétères pour l'hôte, au niveau des végétations infectées.

5. Examen clinique

Le diagnostic clinique de l'EI reste difficile car c'est une pathologie systémique de présentation clinique polymorphe. Autant le diagnostic peut être facilement évoqué devant une association de signes cardiaques et infectieux, autant il peut s'avérer difficile devant la prédominance des manifestations systémiques (neurologiques, rhumatologiques, autoimmunes ou cancéreuses) et lorsque la pathologie se révèle par un accident vasculaire cérébral ou un lumbago fébrile.

Dans l'EI aiguë, l'installation est rapide, en quelques jours, d'un tableau bruyant et grave associant un syndrome infectieux aigu et des complications périphériques.

Dans l'EI subaiguë, forme classique de la maladie d'Osler, encore appelée EI lente, l'installation des signes est progressive, sur plusieurs semaines voire plusieurs mois, avant le diagnostic.

5.1. Syndrome infectieux

Un syndrome infectieux avec fièvre est le symptôme le plus constant de l'EI retrouvé dans 86 % des cas (8). Toute fièvre de cause inexplicée durant plus de trois jours chez un patient à risque d'EI est suspecte d'EI jusqu'à preuve du contraire. Elle revêt diverses formes : un décalage fébrile modéré à 38 -

38,5°C, une fièvre en plateau, une fièvre oscillante ou une simple fébricule. Des périodes d'apyrexie sont possibles, soit spontanées, soit provoquées par une antibiothérapie prescrite sans diagnostic.

L'altération de l'état général peut associer de façon variable une asthénie, un amaigrissement, des sueurs et une pâleur.

5.2. Signes cardiaques

L'apparition ou la modification d'un souffle cardiaque est le signe majeur de l'EI. Une EI doit toujours être suspectée devant une fièvre associée à l'apparition ou la modification d'un souffle cardiaque. Devant un syndrome infectieux inexpliqué, l'existence d'un souffle cardiaque permet d'authentifier la localisation de l'infection au niveau de l'endocarde valvulaire et il a une valeur diagnostique considérable, la plus grande valeur étant à l'apparition d'un nouveau souffle ou à la modification d'un souffle connu.

L'association « fièvre et souffle » garde une valeur majeure pour le diagnostic d'EI. Toutefois, il faut noter que l'absence de souffle ne permet pas d'exclure le diagnostic d'EI. L'atteinte de la valve tricuspide est paucisymptomatique (absence de souffle).

Les autres manifestations cardiaques sont moins souvent inaugurales : une IC (toute IC fébrile doit faire évoquer le diagnostic d'EI), plus rarement une péricardite, une insuffisance coronarienne, des troubles de la conduction.

5.3. Manifestations extracardiaques

5.3.1. Manifestations cutanéomuqueuses

Les principales manifestations dermatologiques décrites au cours des EI sont inconstants car ne sont présents que dans 5 à 15 % des cas, mais ils sont d'une grande valeur diagnostiquée. Ils regroupent :

- **Les nodules ou nodosités d'Osler ; également appelés « faux-panaris »** (figure 7a) : sont de valeur diagnostique pathognomonique et doivent être recherchés à l'interrogatoire. Ils s'associent le plus souvent aux EI bactériennes subaiguës, avec une fréquence évaluée entre 10 et 25 %, mais n'ont pas de signification pronostique péjorative (36).

- **Les placards érythémateux palmoplantaires ou érythèmes de Janeway** (figure 7b) : sont plus rares, et sont associés préférentiellement avec les EI aiguës (36).

- **Les hémorragies sousunguéales « en flammèche »** (figure 7c et 7d), en particulier au troisième doigt et de localisation proximale, constituent un signe d'appel classique au cours des EI (10 à 25 %), mais sont peu spécifiques.

- D'autres manifestations dermatologiques ont été rapportées, le plus fréquemment, l'hippocratisme digital (figure 7e), et ponctuellement : le syndrome de Sweet (37), la nécrose distale des extrémités par ischémie aiguë d'origine embolique, le livedo réticulé des membres inférieurs au cours des EI aiguës et l'ecthyma gangrenosum (manifestation cutanée septique classiquement associée à l'EI bactérienne à *Pseudomonas*) (36).

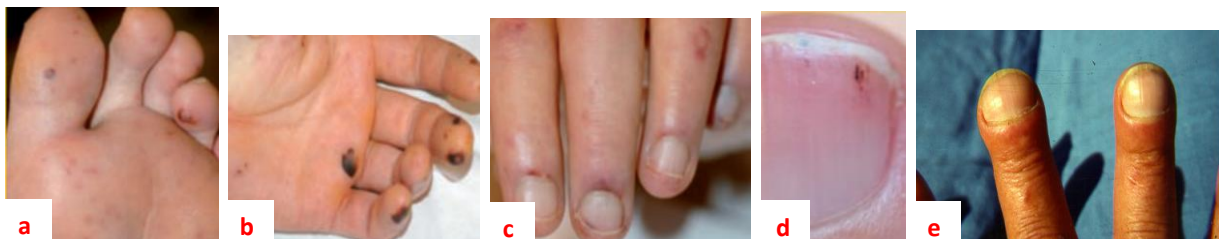


Figure 7. Manifestations cutanéomuqueuses au cours de l'EI subaiguë à *Staphylococcus aureus*, d'après (36). **a.** Nodules (nodosités) d'Osler ou « faux-panaris » : multiples petits nodules de la plante du pied et des pulpes des orteils. Souvent précédé d'une sensation douloureuse, le nodule à centre parfois blanchâtre est

tendu, induré, rond ou ovalaire avec une taille variable (1 mm à plus de 1 cm). Il siège avec prédilection sur les paumes et les plantes plus particulièrement sur les pulpes des doigts et des orteils, sur l'éminence thénar et hypothénar et les bords latéraux des doigts (38). Une atteinte du dos des pieds et des flancs est néanmoins possible (39). Leur évolution est fugace, de quelques heures à quelques jours. **b.** Placards érythémateux palmoplantaires ou érythème de Janeway : macules érythémateuses, purpuriques et hémorragiques de la paume et des pulpes des doigts. Ils diffèrent des nodules d'Osler par leur caractère maculeux, hémorragique, de couleur rouge brun à contour irrégulier, angulaire, non tendu et indolore, mais de même localisation palmoplantaire. Un purpura pétéchial associé est fréquent au niveau muqueux (palais, conjonctives) et cutané (tronc, extrémités, cou), parfois nécrotique et étendu. **c.** Hémorragies filiformes « en flammèche » et érythème purpurique du lit unguéal. **d.** Hémorragies sousunguéales, longitudinales « en flammèche ». **e.** Hippocritisme digital avec hémorragie sousunguéale (40).

5.3.2. Manifestations respiratoires

L'atteinte de la valve tricuspide est paucisymptomatique et le Le diagnostic d'EI du cœur droit doit être évoqué devant une pneumopathie ou bronchopneumopathie à répétition.

Une toux peut être révélatrice. En effet, l'EI de la valve tricuspide chez l'utilisateur de drogues par voie IV se manifeste souvent par une toux et une dyspnée fébrile, témoins d'embolies septiques pulmonaires multiples. Une dyspnée d'aggravation progressive témoigne de l'évolution de l'IC.

5.3.3. Manifestations ophtalmologiques

Des signes évocateurs du diagnostic d'EI, tels le purpura conjonctival, ou les taches de Roth au fond d'œil constituées d'hémorragies associées à des exsudats blanchâtres (figure 8) peuvent être rencontrés.

La tache blanche de Roth, avec ou sans hémorragie autour d'elle, est le signe le plus caractéristique. Elle est constituée par un infiltrat de cellules inflammatoires autour d'un capillaire, et se situe à distance des gros vaisseaux.



Figure 8. Taches de Roth au fond d'œil avec hémorragies rétiniennes, d'après (41)

5.3.4. Autres manifestations

- **Rhumatologiques** : sont fréquentes ; arthralgies, lombalgies ou myalgies. Le diagnostic d'EI doit particulièrement être évoqué devant la présence de spondylodiscite.

- **Neurologiques** : observées de 15 % des cas. Elles constituent parfois le symptôme révélateur de l'EI et ont une valeur pronostique péjorative. Leurs mécanismes sont divers et parfois intriqués, associant phénomènes emboliques, anévrismes artériels, abcès et méningites. Elles peuvent se compliquer d'infarctus et surtout d'hémorragies cérébrales ou cérébro-méningées.

- **Rénales** : il existe des atteintes rénales spécifiques de l'EI telles qu'une protéinurie ou une hématurie isolée mais aussi une insuffisance rénale par atteinte glomérulaire, à distinguer des autres causes possibles d'atteintes rénales au cours de l'EI : des néphropathies interstitielles dues à une toxicité médicamenteuse, une atteinte rénale secondaire à l'IC, un infarctus par embolies rénaux.

6. Examens paracliniques

Dans le diagnostic d'EI, il existe deux types d'examen : d'orientation et de décision.

6.1. Examens d'orientation

Ces éléments sont compatibles avec le diagnostic d'EI quand ils sont présents, mais ne sont pas spécifiques et ils peuvent être absents.

- **La numération formule sanguine** : révèle souvent une anémie normochrome normocytaire et parfois une hyperleucocytose.
- **Le bilan inflammatoire** : décrit une augmentation de la vitesse de sédimentation et du taux plasmatique de protéine C réactive.
- **L'électrophorèse des protéines** : montre une hypergammaglobulinémie polyclonale.
- **L'exploration immunologique** : peut révéler la présence de facteur rhumatoïde, de complexes immuns circulants, de cryoglobulinémie ; notamment dans les formes subaiguës.
- **L'hématurie macroscopique.**
- **La protéinurie.**

6.2. Examens de décision

6.2.1. Examens anatomohistopathologiques

L'examen anatomohistopathologique de la valve cardiaque après exérèse chirurgicale (dans environ 50 % des cas d'EI) constitue le « gold-standard » dans le diagnostic des EI (9).

Après exérèse chirurgicale, les valves cardiaques font l'objet d'une analyse histologique systématique à la recherche de signes d'EI. Elle se définit histologiquement par la présence d'au moins une des trois lésions morphologiques majeures : une végétation, un infiltrat inflammatoire et la détection des microorganismes grâce à des colorations spéciales ou à l'immunohistochimie.

Nous reviendrons amplement sur le détail de ces tests dans la partie consacrée aux techniques d'étude des valves cardiaques « partie destinée à l'anatomopathologie » (voir *infra*).

6.2.2. Examens microbiologiques

La réalisation d'hémocultures est le premier examen de référence dans le diagnostic des EI. La culture des tissus valvulaire est réalisée lorsqu'il y a intervention chirurgicale avec exérèse de la valve infectée. Les sérologies peuvent être demandées d'emblée ou, le plus souvent, lorsque les hémocultures restent négatives. Enfin, plus récemment, des techniques moléculaires ont été mises au point, comme la réalisation de PCR sur sérum ou tissu valvulaire.

Le diagnostic bactériologique des EI est primordial, nous reviendrons amplement sur ce sujet dans une partie consacrée au diagnostic microbiologique des EI (voir *infra*).

6.2.3. Examens d'imagerie

Dès 1975, avec l'arrivée de l'imagerie ultrasons, l'échographie cardiaque est devenue un outil primordial dans le diagnostic d'EI. Des classifications vont alors être proposées afin d'améliorer le diagnostic clinique de l'EI.

L'échocardiographie toujours en première ligne

L'échographie cardiaque, transthoracique (ETT) ou transoesophagienne (ETO), reste la pierre angulaire du diagnostic, de l'évaluation pronostique et de la surveillance sous traitement des patients atteints d'une EI. L'ETT est une échographie classique où le transducteur est passé sur la peau pour voir le fonctionnement du cœur, alors que l'ETO est un examen invasif en mettant la sonde par voie interne pour s'approcher au plus près du cœur et des valves.

Quatre critères majeurs de Duke sont diagnostiqués par l'échocardiographie et sont en faveur du diagnostic de l'EI : les végétations, les perforations valvulaires, l'abcès/les fistules périvalvulaires et les désinsertions de prothèses.

L'ETT est l'examen de première intention en cas de suspicion d'EI. Il est non invasif et rapidement disponible avec une spécificité à 98 % et une sensibilité à 60 %. Ce manque de sensibilité est pallié par l'ETO qui a une sensibilité proche de 100 % pour la mise en évidence de végétations et d'abcès sur valves natives. Ainsi, en cas de suspicion d'EI, les recommandations européennes préconisent une ETO en complément de l'ETT (2) en cas de :

- forte suspicion clinique avec une ETT négative ou non contributive,
- échogénicité insuffisante (obésité, IRC, déformation thoracique),
- présence de matériel (stimulateur ou défibrillateur implantable) ou prothèse intracardiaque (sensibilité entre 86 et 94 %, spécificité entre 88 et 100 %) (42),
- et pour un bilan lésionnel préchirurgical.

Cependant, l'ETO peut être de réalisation délicate chez le patient en détresse respiratoire ou ayant des troubles de la conscience en ventilation spontanée. Elle souffre de limite sur les valves prothétiques et les lésions périannulaires relativement fréquentes. Ainsi, 20 à 30 % des EI des valves natives et 50 à 60 % des EI des valves prothétiques ne sont identifiées que dans 44 à 80 % des cas. Ce manque de sensibilité est responsable d'un retard diagnostique et thérapeutique impactant directement le pronostic des patients. En plus, l'échocardiographie ne permet pas de distinguer une végétation active d'une végétation séquelle stérilisée, en plus des faux négatifs (2).

Diagnostic positif : apport de l'imagerie multimodalité (42)

L'EI reste un diagnostic difficile et l'échographie cardiaque présente certaines limites pouvant avoir de graves conséquences pronostiques. Dans la perspective d'amélioration du pronostic de cette pathologie par l'amélioration des méthodes diagnostiques, la dernière actualisation publiée fin 2015 des recommandations de la Société Européenne de Cardiologie (European Society of Cardiology ; ESC) (42) a, pour la première fois, intégré les nouvelles techniques d'imagerie multimodalité permettent une meilleure évaluation des structures cardiaques et extracardiaques (2). L'actualisation de ces recommandations, dont la précédente version datait de 2009, est justifiée (entre autres) par le développement de nouvelles techniques d'imagerie multimodalité : le scanner par tomographie par émission de positons au [18F]-Fluorodesoxyglucose (18F-FDG, communément appelé le PET-scanner), la scintigraphie aux leucocytes marqués, le scanner multicoupes, l'échographie transœsophagienne 3D....

- **Le PET-scanner au 18F-FDG** : Depuis l'actualisation des dernières recommandations ESC en 2015, il fait désormais partie intégrante de la réflexion diagnostique comme critère majeur au même titre que l'échographie cardiaque pour les prothèses valvulaires de plus de 3 mois (2). Il peut également compléter le bilan lésionnel en identifiant des foyers extracardiaques, ainsi qu'une potentielle porte d'entrée (cancer digestif ou urinaire, par exemple). Pour l'instant, il est moins pertinent sur les valves natives et les infections sur sondes de matériel intracardiaque.

- **La scintigraphie aux leucocytes marqués** : est encore peu disponible en France car coûteuse et relativement complexe à réaliser. Elle est peu sensible (64 %) mais extrêmement spécifique (100 %) dans les EI sur prothèses. De ce fait, les recommandations ESC 2015 préconisent d'ajouter 2 critères majeurs d'imagerie pour le diagnostic d'EI (tableau 4).

- **Le scanner cardiaque et corps entier** : est désormais recommandé en 1^{re} intention pour évaluer l'extension des abcès ou autres lésions périvalvulaires, non visualisés par l'ETO. C'est un excellent examen pour le diagnostic des lésions périannulaires (sensibilité et spécificité de 100 %) et des végétations valvulaires (> 10 mm). Mais, fait encore défaut dans les perforations valvulaires et les végétations de petite taille. Il permet l'analyse des structures cardiaques valvulaires et extravalvulaires, la recherche d'embolies à distance, la recherche de foyers infectieux secondaires et de la porte d'entrée, et l'étude du réseau coronaire avant la chirurgie cardiaque.

Ces nouveaux critères diagnostiques comportant l'imagerie cardiaque multimodalité ont été intégrés dans les critères diagnostiques de l'ESC 2015 (tableau 3) car ils viennent améliorer la sensibilité de l'échographie cardiaque pour un diagnostic précoce de l'EI, ce qui va permettre une meilleure évaluation des structures cardiaques et extracardiaques et améliorer la prise en charge diagnostique et thérapeutique de l'EI (42).

7. Microorganismes responsables d'EI

7.1. Répartition des microorganismes responsables d'EI

Les données de la dernière étude observationnelle française publiée en 2016 a montré que les staphylocoques, les streptocoques et les entérocoques représentent 80 à 90 % des microorganismes responsables d'EI (tableau 1) (1). Leur prépondérance s'explique par leurs propriétés d'adhérence particulières.

Tableau 1. Proportion des cas d'EI causées par différents microorganismes provenant d'une cohorte française de 497 patients, d'après (1).

Staphylococci
<i>Staphylococcus aureus</i> : 26.6%
Coagulase-negative staphylococci: 9.7%
Streptococci and enterococci
Oral streptococci: 18.7%
Non-oral streptococci: 17.5%
Enterococci: 10.5%
Other: 1.6%
HACEK (haemophilus, aggregatibacter, cardiobacterium, Eikenella corrodens, kingella) microorganisms
1.2%
Candida species
1.2%
Other*
6.0%
Polymicrobial (≥2 microorganisms)
1.8%
No microorganism identified
5.2%
<small>*Includes small numbers of Enterobacteriaceae, <i>Propionibacterium acnes</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Lactobacillus</i> spp, <i>Corynebacterium</i> spp, <i>Coxiella burnetii</i>, <i>Bartonella quintana</i>, <i>Tropheryma whippiei</i>, <i>Gordonia bronchialis</i>, <i>Bacillus</i> spp, <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>, <i>Neisseria elongata</i>, <i>Moraxella catarrhalis</i>, <i>Veillonella</i> spp, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Acinetobacter ursingii</i>, <i>Campylobacter fetus</i>, <i>Francisella tularensis</i>, and <i>Catabacter honakonaensi</i>.</small>

D'autres microorganismes peuvent être retrouvés dans des proportions plus faibles, tels que les bactéries à développement intracellulaire (*Bartonella quintana*, *Tropheryma whippiei*...), les bactéries du groupe HACCEK (cf. ci-dessous), les bactéries des EI zoonotiques (*Coxiella burnetii* provenant des animaux de ferme et domestiques, *Brucella* provenant du bétail, *Bartonella henselae* provenant du chat, et *Chlamydia psittaci* provenant du perroquet et des pigeons), mais également des champignons levuriformes (*Candida*) et filamenteux (*Aspergillus*) (1,10,43,44)... Actuellement, 5,2 % des EI restent sans documentation micorbiologique (1).

Durant les dernières années, l'incidence des streptocoques est restée stable tandis que celle des staphylocoques à coagulase négative et surtout du *S. aureus* a augmenté de façon significative notamment chez les personnes de plus de 70 ans (7). La distribution de ces bactéries est variable en fonction de l'âge du patient (figure 9), du type de la valve (native vs prothétique), de la source d'infection et de ses comorbidités.

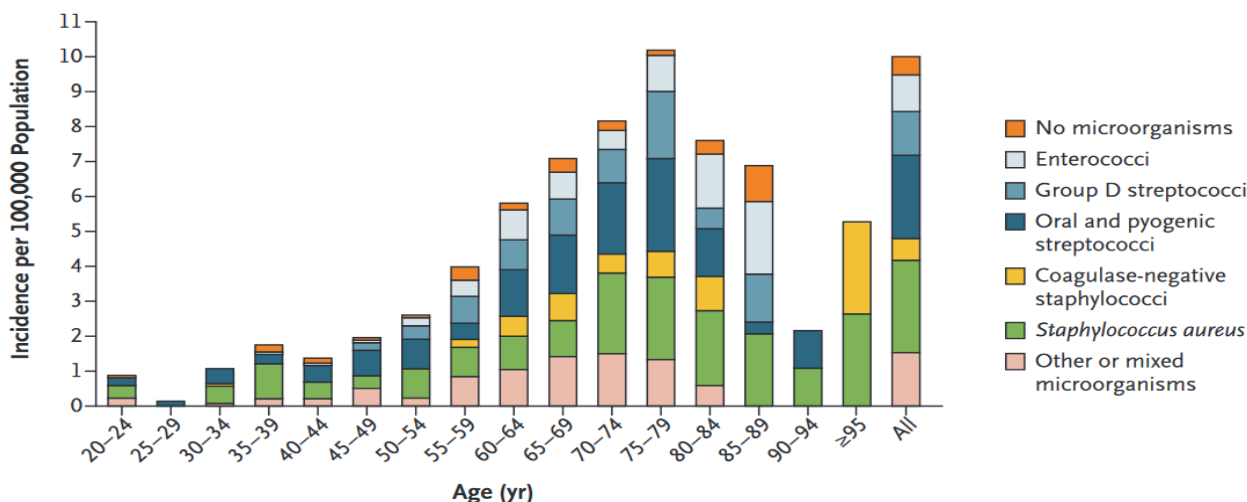


Figure 9. Incidence de l'EI, en fonction de l'âge et du microorganisme causal, d'après (45) adapté de (8).

7.2. Microorganismes bactériens

7.2.1. Staphylocoques

7.2.1.1. *Staphylococcus aureus*

C'est le plus fréquent des staphylocoques et il est, actuellement, le microorganisme le plus fréquemment isolé dans les EI dans les pays développés, entre 26,6 à 44 % selon les études (1,3,8,28).

Une importante disparité géographique existe, notamment entre pays. Ainsi, l'augmentation de la proportion des EI à *S. aureus* a été particulièrement marquée aux États-Unis (28) où les principaux facteurs associés sont l'hémodialyse, le diabète et/ou porteur de matériel intravasculaire (28). Dans d'autres pays, c'est la toxicomanie IV qui constitue la principale cause, suivie par le port de prothèse ou de cathéter IV (4,46,47). Le facteur de toxicomanie IV est vraisemblablement à l'origine des différences importantes de prévalence observées pour *S. aureus* selon les études, en fonction de la population incluse dans celle-ci.

L'EI staphylococcique s'étend au-delà des groupes à risque traditionnels et peut affecter à la fois les valves prothétiques et natives (48). Dans ces dernières, *S. aureus* est le plus souvent en cause lorsque la valvulopathie n'est pas connue (19 %) que lorsqu'elle est connue (4 %).

7.2.1.2. Staphylocoques à coagulase négative

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont des commensaux cutanés (49). Parmi ceux-ci, *S. epidermidis* est l'espèce la plus fréquente (plus de 80 %). Des espèces comme *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* et *S. schleiferi* ne constituent que des cas isolés.

Les SCN constituent les microorganismes les plus communément isolés dans l'EI précoce des valves prothétiques (50,51). Ils provoquent, également, fréquemment une EI valvulaire native liée aux soins (8,52,53).

7.2.2. Streptocoques

7.2.2.1. Streptocoques oraux

L'EI streptococcique causée par le groupe *viridans* (du latin *viridis* qui signifie vert ; se référant à la décoloration caractéristique du milieu de gélose au sang) comportant un grand nombre d'espèces commensales de la cavité buccale et des voies respiratoires hautes. Actuellement, elle représente 18,7 % (1). Ce groupe comprend principalement : *Streptococcus sanguinis* (ex-*S. sanguis*), *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. anginosus*, et dans une moindre mesure *S. mutans* et *S. salivarius*.

7.2.2.2. Streptocoques du groupe D

Ils comprennent plusieurs espèces commensales du tube digestif de l'homme. La porte d'entrée de l'EI à streptocoques du groupe D est une tumeur colique. Son identification impose, par conséquent, la réalisation d'une coloscopie. En France, l'enquête épidémiologique conduite en 1999 a montré l'augmentation des EI à streptocoques du groupe D, qui représentaient 25 % de l'ensemble des microorganismes responsables d'EI (22). Actuellement, elle représente environ 17,5 % (1).

S. bovis est l'espèce la plus souvent identifiée. La classification de ce groupe a évolué ces dernières années et comporte actuellement quatre catégories :

- *S. alactolyticus*,
- *S. infantarius* subsp. *infantarius* ou subsp. *coli* (ex-*S. bovis* biotype II.1),
- *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (ex-*S. bovis* biotype I) ou subsp. *pasteurianus* (ex-*S. bovis* biotype II.2) ou subsp. *macedonicus*,
- et *S. bovis* / *S. equinus*.

7.2.2.3. Ex-streptocoques déficients

Ces bactéries nécessitent les produits métaboliques d'autres bactéries pour leur croissance. Ils ont été reclassés dans deux nouveaux genres : *Abiotrophia* qui comporte une seule espèce ; *A. defectiva*, et *Granulicatella* spp. qui comporte plusieurs espèces dont deux ont été identifiées comme responsables d'EI : *G. adjacens* et *G. elegans*. Ces bactéries peuvent être responsables d'EIHN. *A. defectiva* et *G. adjacens* peuvent être isolés dans la cavité orale et dans les voies digestives et génitourinaires.

Leur identification est difficile car leur croissance lente nécessite une culture prolongée mais qui a été nettement raccourci avec l'amélioration des milieux de culture (54).

7.2.2.4. Streptocoques bêta-hémolytiques

Ce sont les streptocoques des groupes A, B, C et G avec une nette prédominance de *S. agalactiae*. Ces germes sont caractérisés par leur sévérité. De même, les EI à pneumocoque constituent une cause rare mais grave.

7.2.3. Entérocoques

Les entérocoques sont isolés dans 10 % des cas en général (3,8). L'espèce la plus isolée est l'*Enterococcus faecalis* provoquant à la fois une EI sur valve native et prothétique chez des patients âgés ou chroniques (55).

7.2.4. Bactéries à développement intracellulaire obligatoire ou prédominant

7.2.4.1. *Coxiella burnetii*

Ce coccobacille à Gram négatif est un pathogène ubiquitaire responsable en France de 5 % des EI. Il s'agit fréquemment d'EI sur prothèse valvulaire, où il existe une valvulopathie préexistante (15,56,57). C'est l'agent de la fièvre Q qui est une zoonose répandue dans le monde entier, se présentant comme une

maladie aiguë ou chronique. L'EI à *C. burnetii* est la manifestation principale de la fièvre Q chronique (80 % des cas) (58). Son pronostic est assez péjoratif avec une létalité de 25 à 60 % en l'absence de traitement (association hydroxychloroquine et doxycycline sur 18 à 36 mois).

Cette bactérie est transmise lors d'exposition professionnelle, par contact avec les animaux infectés (urine, fèces, placenta) ou par ingestion des produits laitiers contaminés. L'homme peut également se contaminer par voie aérienne à partir des poussières de l'environnement ou des aérosols car cet agent résiste aux conditions extérieures et reste longtemps infectieux en dehors de sa cellule hôte (22,56,59).

7.2.4.2. *Bartonella (ex-Rochalimea) quintana* et *B. henselae*

Ces petits bacilles à Gram négatif intracellulaires facultatives sont responsables de 3 % de toutes les EI (46,58,60-61).

- ***B. quintana*** touche préférentiellement des patients de tout âge vivant dans des conditions socioéconomiques précaires (sans domicile fixe, notamment) sans valvulopathie préalable connue (8,62) et est transmise par les poux de corps. Cette bactérie était responsable de la fièvre des tranchées durant la première guerre mondiale.

- ***B. henselae*** est responsable de la maladie des griffes du chat, une lymphadénite subaiguë parfois suppurée transmise à l'homme par la morsure ou les griffures de chats (surtout ceux de moins de six mois) et par leurs puces. Les chats sont chroniquement bactériémiques et asymptomatiques. La maladie concerne typiquement des hommes âgés avec une valvulopathie sous-jacente souvent en contact avec les chats (61).

7.2.4.3. *Chlamydia* spp.

Son rôle dans les EI est assez peu documenté. Parmi la vingtaine de publications entre 1975 et 2002, *C. psittaci* est considéré comme l'agent étiologique dans onze cas, *C. pneumoniae* dans six cas et *C. trachomatis* dans deux cas. Dans la plupart des cas, le diagnostic était établi par la sérologie (63).

7.2.4.4. *Tropheryma whippelii*

Ce bacille à Gram positif est responsable de la maladie de Whipple ; une infection cliniquement très trompeuse avec des polyarthralgies migratrices et fébriles induisant le clinicien en erreur et l'orientent vers une polyarthrite rhumatoïde avec la prescription de corticoïdes ou d'immunosuppresseurs aggravant l'EI.

T. whippelii constitue une cause de plus en plus décrite d'EI grâce à l'utilisation de la biologie moléculaire. Le premier isolement d'une souche a été effectué en France par Raoult *et al.* en 2000 (71).

7.2.4.5. *Mycoplasma* spp.

Ce sont des bactéries intracellulaires facultatives. Elles n'ont été que très rarement associées à une EI avec huit cas reportés : deux à *Mycoplasma pneumoniae* (64,65), cinq à *M. hominis* (66–70) et un à *Ureaplasma urealyticum* (67). Toutefois, il est important d'identifier cette bactérie car l'évolution de la maladie est fatale sans antibiothérapie adaptée (la doxycycline).

Dans le cas de l'EI à *M. pneumoniae* notamment, la source de l'infection demeure inconnue. Une origine possible de la bactériémie pourrait être la colonisation de l'oropharynx ou des voies respiratoires après une procédure d'intubation.

7.2.5. Bactéries du groupe HACCEK

Haemophilus aphrophilus, *H. paraphrophilus*, *H. parainfluenzae*, *H. influenzae*, *Aggregatibacter (ex-Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella*

corodens, *Kingella kingae* (43,57). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* est l'agent le plus fréquemment rencontré. Ils causent environ 3 % des cas d'EI (43,72).

Ce groupe comprend des petits bacilles à Gram négatif, commensaux des muqueuses oropharyngées (43). Ils partagent quelques caractéristiques épidémiologiques : soins dentaires préalables, infection du sujet jeune ou adulte d'âge moyen, antécédent de cardiopathie avec une préférence pour la valve mitrale.

Ces bactéries présentent une croissance parfois extrêmement lente *in vitro*, pouvant requérir pour leur détection trois à quatre semaines d'incubation des hémocultures, et éventuellement des subcultures sur des milieux riches.

7.2.6. Autres bactéries

- ***Brucella*** est responsable de 1 à 4 % des EI selon la zone géographique concernée. Elle est largement répandue dans le monde, cependant elle a été pratiquement éliminée de la plupart des pays industrialisés (57). En France, la brucellose est une maladie à déclaration obligatoire. Elle se complique d'EI chez 0,3 à 0,6 % des patients. Elle doit être évoquée chez un patient du pourtour du bassin méditerranéen. Du point de vue clinique, les abcès myocardiques sont fréquents. Son diagnostic biologique est confirmé par la sérologie (61).

- Les EI à ***Mycobacterium*** demeurent rares. Elles sont plus volontiers causées par les mycobactéries atypiques à croissance lente, d'origine nosocomiale (73).

- Les ***Legionella*** provoquent des EI essentiellement nosocomiales survenant sur valves prothétiques.

- D'autres bactéries ont été décrites comme causes rares d'EI : **entérobactéries, *Acinetobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Listeria*, *Peptococcus*, corynébactéries, microcoques et propionibactéries...**(57).

7.3. Microorganismes fongiques

7.3.1. Généralités sur l'EI fongique

L'EI fongique est une pathologie infectieuse rare grevée d'un pronostic sombre lié au terrain, au délai diagnostique souvent prolongé, et aux multiples limites des traitements disponibles. Elle représente moins de 2 % du total des EI, comme rapporté dans l'étude prospective observationnelle de l'International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Studies (ICE-PCS) (44), ainsi que dans des études multicentriques réalisées en Italie (74), en France (8), et aux États-Unis (75).

7.3.2. Épidémiologie et facteurs de risque

L'incidence de l'EI fongique est certainement sousestimée du fait de difficultés de mise en évidence du microorganisme responsable. Les caractéristiques de ces patients ont considérablement changé depuis les années 1990, comme l'illustrent les principales séries et revues de la littérature (76–81). Auparavant, surtout observées chez le sujet porteur d'une valvulopathie ou toxicomane IV (76), elles concernent, désormais, principalement le sujet immunodéprimé, soumis à une antibiothérapie prolongée à large spectre ou à des procédures invasives (porteurs de prothèses, cathéter de longue durée, pace maker... (44,82–85).

Entre 1965 et 1995, les caractéristiques des 270 cas d'EI fongique publiées étaient : une nette prédominance masculine (ratio homme/femme : 2,2), une population plutôt jeune (âge moyen : 44,3 ± 14,3 ans) avec des facteurs de risque dominés par une chirurgie de remplacement valvulaire (54 %), l'utilisation

prolongée d'antibiotique(s) à large spectre (48 %), une valvulopathie rhumatismale (24 %), une chirurgie extracardiaque (23 %), une voie veineuse centrale (18 %), un traitement immunosuppresseur (17 %), une immunodépression autre (16 %), un antécédent d'EI bactérienne (13 %) et l'usage de drogues par voie IV (UDIV, 13 %) (76,77).

Entre 1995 et 2000, les 152 cas rapportés d'EI fongique présentaient comme principaux facteurs de risque une chirurgie cardiaque (44,6 %), une voie veineuse centrale (30,4 %), l'utilisation prolongée d'antibiotique(s) à large spectre (20,3 %), tandis que les UDIV ne représentaient plus que 3,9 % des patients atteints d'EI fongique (77).

Entre 2000 et 2010, dans l'étude de l'ICE-PCS portant sur 70 cas d'EI à *Candida* spp., les facteurs de risque les plus fréquemment retrouvés étaient la présence d'une prothèse valvulaire (46 %), d'une valvulopathie connue (26 %) ou d'un antécédent d'EI (26 %) (84). La proportion des EI fongiques rapportées chez des UDIV varie selon les études récentes entre 3,9 et 11 % (84).

L'EI fongique est exceptionnelle en l'absence de facteur de risque. Ainsi, seulement 2 à 3,4 % des cas d'EI fongiques n'étaient associées à aucun des facteurs de risque détaillés ci-dessus (76,77).

7.3.3. Agents étiologiques des EI fongiques

Les champignons les plus fréquents sont représentés par le genre *Candida* (50 à 80 % des cas des EI fongiques) (76,80). Parmi les *Candida* spp. responsables d'EI, *C. albicans* reste le plus courant (30 à 40 % de toutes les EI fongiques), même si les *Candida* non *albicans* (*C. parapsilosis*, *C. glabrata* ou *C. tropicalis*) ont tendance à émerger particulièrement chez les patients préalablement exposés aux azolés (80). Le mécanisme de l'infection est essentiellement lié à la colonisation des cathéters, ou à des épisodes de translocation à point de départ digestif avec fongémie notamment chez le patient neutropénique (86).

Plus rarement, les EI fongiques sont causées par le genre *Aspergillus* (20 à 30 % des cas des EI fongiques), essentiellement l'espèce *A. fumigatus* (deux tiers des EI aspergillaires), alors que *A. terreus*, *A. niger* et *A. flavus* sont plus rarement incriminés. Les EI à *Aspergillus* spp. surviennent essentiellement sur valves prothétiques récemment posées et/ou chez des patients très immunodéprimés, particulièrement dans des contextes d'hémopathies malignes (76,87,88) ou de transplantation d'organe solide (notamment au cours de la phase précoce ; dans les 30 jours suivant la chirurgie). Les EI aspergillaires (essentiellement liées à *A. fumigatus*) sont caractérisées par une très grande agressivité locorégionale avec une invasion de l'endocarde non valvulaire (86).

La littérature scientifique rapporte de plus en plus de cas d'EI fongique à germe rare, du fait de l'amélioration des moyens diagnostiques (tableau 2), citons toutefois les EI à *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* qui restent tout de même rares (environ 6 % des EI fongiques) (76).

Tableau 2. Principaux microorganismes isolés d’EI fongiques (entre parenthèses sont indiquées les anciennes appellations utilisées dans les publications d’EI fongiques), d’après (76,77,89).

Etiologie	Fréquence	Espèces
Candida spp.	53 %	<i>C. albicans</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i> (<i>C. collicusca</i>), <i>C. glabrata</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>), <i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>C. kefyri</i>), <i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>C. krusei</i>), <i>Clavispora lusitanae</i> (<i>C. lusitanae</i>), <i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>C. parakrusei</i>), <i>C. parapsilosis</i> , <i>Pichia anomala</i> (<i>C. pelliculosa</i>), <i>C. tropicalis</i> , <i>C. zeylanoides</i>
Aspergillus spp.	24 %	<i>A. clavatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Emericella nidulans</i> (<i>A. nidulans</i>), <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. ustus</i>
Autres espèces	Plus rarement rencontrées	<i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Acremonium</i> spp. <i>Arniium leporinum</i> , <i>Bipolaris spicifera</i> , <i>Blastochizomyces capitatus</i> , <i>Chrysosporium</i> spp. <i>Conidiobolus</i> spp. <i>Cunninghamella bertholletiae</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Engyodontium album</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i> , <i>Exophiala jeanselmei</i> (<i>Phialophora jeanselmei</i>), <i>Filobasidiella neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i>), <i>Fusarium dimerum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Lecytophora mutabilis</i> (<i>Phialophora mutabilis</i>), <i>Microascus cinereus</i> , <i>Mucor</i> spp., <i>Neosartorya fischeri</i> , <i>Paecilomyces</i> spp. <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium marneffeii</i> , <i>Phaacremonium parasiticum</i> , <i>Phialemonium curvatum</i> , <i>Philaemonium obovatum</i> , <i>Phialophora richardsiae</i> , <i>Pichia anomala</i> (<i>Hansenula anomala</i>), <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Scedosporium</i> spp. <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Setomelanomma rostrata</i> (<i>Dreschlera longirostrata</i>), <i>Trichosporon cutaneum</i> var <i>cutaneum</i> (<i>Trichosporon beigelii</i>), <i>Trichosporon inkin</i>

Les signes cliniques de l’EI fongique ne diffèrent pas significativement de ceux des EI bactériennes (76). Classiquement, l’EI fongique se distingue des EI bactériennes par les caractéristiques suivantes :

- existence de volumineuses végétations « bulky vegetations » (> 1 cm) au moment du diagnostic, friables, toujours chirurgicales et très emboligènes pouvant se compliquer d’embolies massifs des gros vaisseaux (accident vasculaire cérébral, ischémie aiguë de membre, embolie pulmonaire) dans 60 % des cas (90).

- risque majoré de localisations ophtalmiques, parfois découvertes lors du fond d’œil, qui doit être systématique compte tenu de l’impact de la découverte d’une localisation oculaire sur les choix thérapeutiques (diffusion intraoculaire médiocre des échinocandines) ;

- fréquence d’anévrismes mycotiques plus élevée en cas d’EI fongique qu’en cas d’EI bactérienne (91).

- existence de lésions cutanées évocatrices de dissémination, variables selon l’espèce fongique en cause : lésions nodulaires ou maculopapuleuses au cours des EI à *Candida* spp. (figure 10a) ; lésions nécrotico-hémorragiques au cours des EI aspergillaires (figure 10b) (80). Ces lésions cutanées, bien que rares, doivent être systématiquement recherchées, car elles peuvent permettre un diagnostic étiologique par réalisation d’une biopsie cutanée (85).

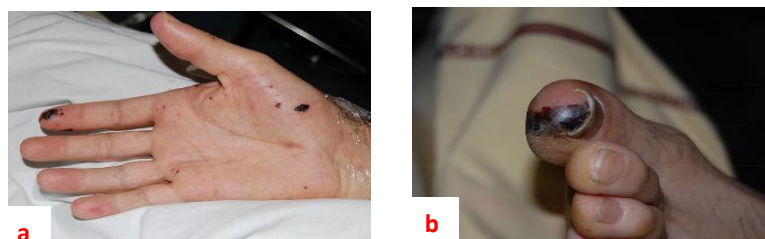


Figure 10. Lésions cutanées au cours d’EI fongique, d’après (85). **a.** EI à *C. albicans* : Lésion maculopapuleuse de la pulpe du 5^{ème} doigt et lésions purpuriques multiples de la pulpe de l’index et de la paume de la main. **b.** EI aspergillaire : lésion nécrotico-hémorragique du gros orteil.

Les complications les plus fréquentes, parfois multiples dans les EI fongiques, sont les phénomènes emboliques, l’IC congestive, le sepsis (77) et les complications du système nerveux central avec des signes neurologiques focaux et non focaux (confusion, convulsions ou troubles de la conscience (76).

8. Classification diagnostique des EI

Face à la difficulté de diagnostic d’EI et la diversité des manifestations cliniques, des classifications diagnostiques ont été proposées. La classification initialement utilisée dans les années 1980 fut celle de von Reyn (92), mais ses critères furent rapidement controversés.

Une nouvelle classification basée sur des critères microbiologiques et d’imagerie fut proposée en 1994 par le Duke University grâce au travail de Durack et *al.* (93). Cette classification était intéressante mais proposait un trop large groupe d’EI dites « possibles ». Afin de limiter ce problème, le groupe de la Duke University proposa en 2000 une modification des précédents critères par l’intermédiaire de Li et *al.* (94). Communément appelée « classification de Duke modifiée », elle s’est imposée comme l’outil de référence pour le diagnostic de l’EI car ses critères ont une bonne valeur diagnostique avec une sensibilité de l’ordre de 80 % et une spécificité voisine de 95 %. Cette classification distingue l’EI « certaine », « possible » ou « exclue ». Les critères à prendre en compte sont des critères pathologiques et des critères cliniques comprenant des critères majeurs et mineurs (tableau 3). Toutefois, ils n’ont que valeur d’orientation et peuvent être pris en défaut dans les EI sur prothèses valvulaires, les EI sans végétation apparente à l’échographie et les EIHN. Cette classification ne remplace donc pas le jugement clinique, si performante soit-elle.

En 2015, l’ESC a rajouté un nouveau critère majeur d’imagerie « la fixation anormale au PET-scanner ou à la scintigraphie des leucocytes marqués autour d’une prothèse valvulaire implantée depuis plus de 3 mois » (42) (tableau 3).

Tableau 3. Critères diagnostiques de DUKE modifiés par Li, remodelés ESC 2015 pour le diagnostic de l’EI, d’après (95) adapté de (42).

Critères majeurs :	
<p>Critères microbiologiques :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Deux hémocultures positives à un micro-organisme typique : <i>Streptococcus viridans</i>, <i>S. bovis</i>, groupe HACCEK, <i>Staphylococcus aureus</i> ou entérocoque communautaire en l’absence de foyer infectieux primitif, ou 2) Autre microorganisme compatible : ≥ 2 hémocultures positives à 12 heures d’intervalle, <u>ou</u> 3 hémocultures positives sur 4 prélevées à 1 heure d’intervalle 3) Hémoculture positive à <i>Coxiella burnetii</i> ou titre IgG phase 1 > 1:800 	<p>Critères d’imagerie :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Echographie cardiaque : végétation(s), abcès périvalvulaire, pseudoanévrisme, fistule intracardiaque, désinsertion/déhiscence de prothèse valvulaire, perforation ou anévrisme valvulaire. 2) Fixation anormale au PET-scanner ou à la scintigraphie des leucocytes marqués autour d’une prothèse valvulaire implantée depuis plus de 3 mois. 3) Abcès ou lésion périvalvulaire typique au scanner cardiaque.
Critères mineurs :	
<ol style="list-style-type: none"> 1) Prédisposition cardiaque (valvulopathie, cardiopathie congénitale) ou toxicomanie intraveineuse 2) Fièvre > 38°C 3) Atteinte vasculaire (clinique ou imagerie) : embolie splénique, pulmonaire ou cérébrale (IRM), hémorragie intracrânienne, anévrisme mycotique, hémorragie conjonctivale, érythème de Janeway 4) Immunologie : glomérulonéphrite, faux panaris d’Osler, nodules de Roth, facteur rhumatoïde 5) Hémocultures positives en dehors d’un critère majeur 	

El certaine : 2 critères majeurs ou 1 majeur et 3 mineurs ou 5 mineurs.

El possible : 1 critère majeur et 1 mineur ou 3 mineurs

Le diagnostic formel d’EI « EI certaine » nécessite l’association de : 2 critères majeurs, 1 critère majeur et 3 mineurs, ou 5 critères mineurs. L’EI est qualifiée de « possible » en cas présence d’un critère majeur associé à un critère mineur, ou l’association de 3 critères mineurs. L’EI est « exclue » quand :

- un autre diagnostic différentiel expliquant les signes cliniques d’EI est retrouvé,
- lors de la disparition des manifestations d’EI par une antibiothérapie dont la durée est ≤ 4 jours,

- l'absence de lésions histologiques d'EI à l'intervention chirurgicale ou à l'autopsie,
- ou à une EI ne répondant pas aux critères de l'EI possible cités ci-dessus.

9. Complications

Les complications de l'EI sont fréquentes et graves, elles peuvent être cardiaques ou extracardiaques. L'identification précoce des patients qui sont à risque élevé de complications peut rendre l'amélioration de son pronostic possible (96).

9.1. Complications cardiaques

Elles représentent la première cause de mortalité au cours de l'EI.

- **L'insuffisance cardiaque (IC)** ; le plus souvent gauche, est la complication la plus fréquente (3,10). Elle est principalement due aux destructions valvulaires causées par l'EI et aux perturbations hémodynamiques qu'elles engendrent, mais elle peut aussi être consécutive aux nécroses myocardiques suite à des embolies coronaires (10). Elle apparaît le plus souvent de manière précoce chez les patients atteints d'EI et lorsqu'elle est présente dès le début de l'hospitalisation, elle est associée à des taux plus élevés de mortalité (10,96),

- **L'insuffisance coronaire** peut être causée par des emboles coronaires, des abcès compressifs et un sepsis grave (10),

- **Les arythmies et les troubles de la conduction cardiaque** (10),

- **Les péricardites septiques** (10),

- **Les abcès intracardiaques** représentent la complication paravalvulaire la plus fréquente et correspondent à une extension de l'infection (3,10).

9.2. Complications extracardiaques

La grande majorité des complications extracardiaques sont liées à la migration d'emboles à partir des végétations. Les complications emboliques surviennent dans 30 à 40 % des cas. Leur incidence est plus élevée au début de l'EI et elle décroît après 2 à 3 semaines d'une antibiothérapie efficace (10,96). Parmi les complications extracardiaques (10) :

- **Les complications neurologiques**, après l'IC, représentent la deuxième cause de mortalité de l'EI. Elles regroupent des accidents vasculaires cérébraux (ischémiques ou hémorragiques), les accidents ischémiques transitoires, les abcès cérébraux, les embolies cérébrales et les méningites,

- **Les anévrismes infectieux mycotiques** : résultent d'une embolisation artérielle septique, dont la localisation la plus fréquente est cérébrale. Ils sont responsables de la dilatation de la paroi des artères pouvant entraîner une rupture aboutissant à une hémorragie très sévère,

- **Les complications rénales**. : dont la forme la plus fréquente est l'insuffisance rénale aigüe. Les causes sont multiples : l'infarctus rénal suite à des emboles, la cause hémodynamique du fait d'une IC ou d'un sepsis grave, la glomérulonéphrite à complexes immuns, la néphrotoxicité de certains antibiotiques (aminosides, vancomycine) et les produits de contraste (iode),

- **Les complications spléniques** sous forme d'infarctus et d'abcès spléniques,

- **Les complications ostéoarticulaires** sont particulièrement fréquentes et correspondent à des arthrites et des spondylodiscites,

- **Les embolies et les anévrismes artériels mycotiques périphériques**,

- **Les complications (embolies) pulmonaires** suite aux EI du cœur droit.

10. Evolution et facteurs pronostiques

Malgré les progrès diagnostiques et thérapeutiques, le pronostic de l'EI demeure médiocre comme en témoigne une morbidité de 50 % des patients nécessitant une prise en charge chirurgicale à la phase aiguë de la pathologie (76,77,97), une mortalité hospitalière de 40 % (98) et des conséquences lourdes sur la qualité de vie (99). Pour les EI fongiques, la mortalité est plus importante en cas d'infection par une moisissure (82,1 %) qu'en cas d'infection par une levure (40,3 %) (77).

L'évolution des caractéristiques de l'EI peut s'expliquer par des changements dans le type et la virulence des microorganismes incriminés ainsi que des changements des populations à risque. L'identification des facteurs de mauvais pronostic permet de reconnaître les patients à haut risque de complication et de mortalité nécessitant une prise en charge plus agressive, à la fois chirurgicale et médicamenteuse.

10.1. Evolution à court terme

Les EI aiguës ont un pronostic plus défavorable. À la phase aiguë, l'IC est la première cause de mortalité de l'EI suivie par les complications neurologiques. Ces dernières se manifestent sous forme d'accidents ischémiques ou hémorragiques (anévrisme mycotique), des abcès cérébraux et des méningites bactériennes.

La morbimortalité de l'EI à court terme reste élevée ; un patient sur cinq décède au cours de son hospitalisation initiale (100). Les facteurs de mauvais pronostic sont :

- **L'âge avancé** (3,10,32) ;
- **Le sexe féminin** : les femmes ont un taux de mortalité hospitalière plus élevé que les hommes (96) ;
- **L'EI sur prothèse valvulaire** : le taux de mortalité hospitalière est plus élevé sur valve prothétique que sur valve native (3,10,32) ;
- **Les germes responsables d'EI** : *S. aureus*, *S. pneumoniae*, et les bacilles à Gram négatif sont le plus souvent responsables de destructions valvulaires avec syndromes septiques graves (3,10,96). D'ailleurs, les EI à staphylocoques sont associées aux taux de létalité les plus élevés. Les agents fongiques sont impliqués dans la formation de végétation très volumineuses, moins accessibles au traitement antifongiques nécessitant presque toujours un traitement chirurgical (3,10,96) ;
- **Les comorbidités** (dont **le diabète**). Les diabétiques ont un taux de mortalité à l'hôpital plus élevé que les patients non diabétiques (96). Cela peut être lié aux effets néfastes de l'hyperglycémie sur la fonction immunitaire (10,31,96) ; et
- **La présence de complications de l'EI** (3,10,96).

Des données échographiques et biologiques peuvent être révélatrices du mauvais pronostic des EI :

- **Les données échographiques** : une fraction basse d'éjection du ventricule gauche (10), la régurgitation sévère d'une valve du cœur gauche (10,100), la dysfonction prothétique sévère (10), l'hypertension pulmonaire (10), l'œdème du poumon (3), les végétations de grande taille (10) principalement sur la valve mitrale (3,96), la mobilité et la taille des végétations (> 1 cm) (96) ;
- **Les données biologiques** : une hypoalbuminémie et un nombre de leucocytes anormaux lors de l'admission confère un risque de décès plus élevé durant l'hospitalisation (100). La concentration moyenne de CRP lors de l'admission était nettement plus augmentée chez les patients qui sont décédés à l'hôpital que chez ceux qui ont survécu. De même, l'élévation de la créatinine a été fortement associée à la mortalité hospitalière (100)...

10.2. Evolution à long terme

L'évolution à long terme, c.à.d survenant à 6 mois après la phase hospitalière initiale, peut correspondre à différentes éventualités ; soit une guérison totale sur le plan infectieux sans séquelles

majeures permettant ainsi d'espérer un pronostic favorable, soit une récurrence de l'EI, soit une aggravation par la survenue de complications (10). La récurrence est définie comme une nouvelle EI due à un microorganisme le plus souvent différent de celui responsable de l'épisode précédent. L'intervalle entre les deux épisodes est généralement supérieur à six mois. Ces récurrences sont plus fréquentes chez les sujets toxicomanes par voie IV, les porteurs de prothèses valvulaires et les hémodialysés (10).

Les principaux facteurs de létalité de l'EI à long terme sont :

- **L'âge** (10) ;
 - **Les comorbidités** (le diabète, l'immunodépression et l'IC) (10) sont des facteurs aggravants. La mortalité des EI prothétique est deux fois supérieure à celle survenant sur valve native. ;
 - **L'implication de plusieurs valves cardiaques**. La localisation aortique se révèle plus souvent responsable d'IC et d'abcès ; elle nécessite plus fréquemment une intervention chirurgicale (100) ;
 - **La présence de végétations** visibles à l'échographie et les régurgitations des valves du cœur gauche (mitrale et aortique) (100) ;
 - **Les anomalies du rythme cardiaque** à l'admission révélées par l'électrocardiogramme (100) ;
 - **La combinaison de deux critères majeurs**, selon les critères de Duke (tableau 3) (94), est associée à une forme plus invasive de l'EI et à une mortalité accrue à six mois ;
 - **La chirurgie**. Pour les patients qui survivent à la période initiale hospitalière, le taux de survie à cinq ans est de 85 % et à dix ans de 75 % (4) ;
- **Les données biologiques** : une hypoalbuminémie et un nombre de leucocytes anormaux lors de l'admission ainsi que l'élévation de la concentration en créatinine sont associés à une mortalité à long terme plus élevée (100).

11. Traitement, surveillance et prophylaxie

11.1. Traitement

11.1.1. Endocardite Team

Après le « *Heart Valve Team* » encouragé par les dernières recommandations européennes et américaines pour optimiser la prise en charge des pathologies valvulaires, voici l'« *Endocarditis Team* » ; Staff multidisciplinaire au sein d'un centre de référence pour la prise en charge de l'EI. En effet, l'EI est une infection complexe pouvant toucher plusieurs organes (cœur, cerveau, reins, peau et œil entre autres) dont la prise en charge requiert la collaboration d'un Groupe Expert EI composé de plusieurs spécialités médicales, chirurgicales et biologiques. Cette équipe permetta en particulier d'optimiser le traitement antibiotique, la rapidité de la prise en charge chirurgicale si elle est nécessaire et d'améliorer le pronostic de tous les cas graves de l'EI (95). Cette collaboration multidisciplinaire a démontré son efficacité dans plusieurs études récentes. L'équipe du Centre HospitaloUniversitaire (CHU) La Timone à Marseille a notamment démontré qu'en appliquant des protocoles thérapeutiques standardisés, des indications opératoires conformes aux recommandations et un suivi du patient jusqu'à 12 mois après la phase aiguë, la mortalité de l'EI à un an pouvait être réduite de 19 à 8 %, ce qui est significatif (101). Il est, donc, recommandé d'adresser les patients atteints d'EI compliquée dans un centre médicochirurgical disposant de toutes les facilités diagnostiques et thérapeutiques ; chirurgie cardiaque, imagerie multimodalité incluant échographie, scanner, PET-scanner et scintigraphie, et d'un groupe multidisciplinaire d'experts afin d'essayer de réduire progressivement la mortalité (42).

Le prérequis et les responsabilités du Groupe Expert Endocardite sont résumés dans le tableau 5, qui insiste notamment sur la nécessité d'une autoévaluation des pratiques et une publication des résultats de l'équipe, ainsi que sur la participation à des registres multicentriques nationaux et internationaux (42,102).

11.1.2. Antibiothérapie

Le traitement des EI doit être le plus précoce possible, adapté au microorganisme et à sa sensibilité aux antibiotiques, de longue durée et doit être administré par voie pérentérale. L'éradication de la porte d'entrée doit être réalisée chaque fois que possible : extraction et soins dentaires, drainage d'une sinusite chronique, ablation de polypes coliques...

La publication à quelques semaines d'intervalle, en 2015, des révisions des recommandations américaines (103) et européennes (42) (tableau 4), a semé le trouble. Tattevin et Mainardi ont détaillé les principaux changements apportés par ces recommandations, leurs désaccords et les arguments pour et contre qui peuvent aider à sélectionner le meilleur traitement (102).

Tableau 4. Principales antibiothérapies de première ligne dans les recommandations américaines et européennes 2015 de prise en charge des EI, d'après (102).

	2015 American guidelines	2015 European guidelines
Empirical antibiotic therapies	Depend on symptom evolution and epidemiological factors	<u>Community-acquired (severe presentation):</u> ^a ampicillin + (cl)oxacillin + gentamicin <u>Nosocomial:</u> vancomycin + gentamicin + rifampicin ^b
Native valve staphylococcal endocarditis	<u>Methicillin – susceptible:</u> (cl)oxacillin <u>Methicillin – resistant:</u> vancomycin or daptomycin	<u>Methicillin – susceptible:</u> (cl)oxacillin <u>Methicillin – resistant:</u> vancomycine or daptomycin <u>Alternative (in both of the above situations):</u> trimethoprim – sulfamethoxazole + clindamycin
Prosthetic valve staphylococcal endocarditis	<u>Methicillin – susceptible:</u> (cl)oxacillin + gentamicin + rifampicin <u>Methicillin – resistant:</u> vancomycin + gentamicin + rifampicin	<u>Methicillin – susceptible:</u> (cl)oxacillin + gentamicin + rifampicin <u>Methicillin – resistant:</u> vancomycin + gentamicin + rifampicin
Susceptible streptococcal endocarditis	« Two-week regimen »: penicillin G or ceftriaxone + gentamicin (single daily dose) « Four- week regimen »: penicillin G or ceftriaxone	« Two-week regimen »: penicillin G or amoxicillin or ceftriaxone + gentamicin « Four-week regimen »: penicillin G or amoxicillin or ceftriaxone
Susceptible enterococcal endocarditis	<u>Regimen « A »:</u> penicillin G or ampicillin + gentamicin (2 or 3 uptakes/day, 4 to 6 weeks) <u>Regimen « B »:</u> ampicillin + ceftriaxone (6 weeks)	<u>Regimen « A »:</u> amoxicillin (4 to 6 weeks) + gentamicin (single daily dose, 2 to 6 weeks) <u>Regimen « B »:</u> ampicillin + ceftriaxone (6 weeks)

^a Including endocarditis of prosthetic valve implanted > 1 year earlier. ^b Rifampicin is only indicated in the presence of a prosthetic valve and, according to some experts, should be introduced later on (5 to 7 days after antibiotic therapy initiation).

Deux particularités des recommandations européennes (42).

Association triméthoprime–sulfaméthoxazole et clindamycine :

La principale spécificité des recommandations européennes réside dans l'association à haute dose de triméthoprime-sulfaméthoxazole (960 mg/jour de triméthoprime, 4800 mg/jour de sulfaméthoxazole) pendant six semaines avec de la clindamycine (1800 mg/jour) pendant une semaine dans le traitement de l'EI de la valve native à *S. aureus* (42). Cette association a montré son efficacité dans une étude récente réalisée dans un centre unique sur 31 patients (104). Cependant, Tattevin et Mainardi étaient contre (102) car d'une part le cotrimoxazole n'est pas aussi efficace que la vancomycine dans le traitement de la bactériémie de *S. aureus* résistant à la méticilline (105,106), et d'autres part le traitement de l'EI avec la clindamycine pourrait être associé à un risque accru de rechute précoce en raison de la sélection de résistance (107). En outre, l'éventuelle hématotoxicité du cotrimoxazole à forte dose et pendant six semaines n'a pas été mentionnée ni dans la publication originale du schéma thérapeutique (104) ni dans les recommandations (42).

Traitement empirique des EI :

L'autre grande divergence entre ces nouvelles recommandations réside dans le traitement empirique des formes sévères de l'EI aiguë communautaire. Vu la complexité de cette pathologie, les recommandations américaines (103) ne recommandent plus un traitement antibiotique empirique « universel » et préconisent une prise en charge multidisciplinaire et individuelle des patients présentant une suspicion d'EI. Les mises à jour européennes recommandent l'utilisation de la pénicilline A (ampicilline, 12 g/jour) et une pénicilline M (cloxacilline ou oxacilline, 12 g/jour) avec de la gentamicine (3 mg/kg/jour) (42), tandis que celles de 2009 recommandaient d'associer l'amoxicilline-acide clavulanique ou ampicilline-sulbactam (12 g/jour) avec de la gentamicine (3 mg/kg/jour) (108).

Pour Tattevin (102), la modification est basée sur des preuves limitées d'une étude de cohorte rétrospective suggérant que le traitement de la bactériémie à *S. aureus* sensible aux β -Lactamines antistaphylococciques (cloxacilline ou céfazoline, n = 131) serait associé à une meilleure survie par rapport

au traitement avec une association de β -Lactamine - inhibiteur de bêta-lactamase (n = 98) (109). Le bénéfice d'une association de deux doses élevées de pénicillines a peu été étudié, mais plusieurs centres français ont signalé une augmentation de l'insuffisance rénale aiguë causée par des β -Lactamines à forte dose au cours des quelques dernières années chez les patients âgés présentant des comorbidités (102).

Pour Mainardi (102), l'EI sévère aiguë est souvent causée par *S. aureus*. Cette antibiothérapie associant trois médicaments comprenant une pénicilline M a l'avantage de couvrir *S. aureus* et d'éliminer le problème lié à la diffusion potentiellement insuffisante des inhibiteurs de bêta-lactamase dans les végétations. Il est donc très utile de souligner que plus de 90 % des souches de *S. aureus* produisent une pénicillinase. La tolérance d'un schéma de traitement avec deux β -Lactamines est un problème réel, mais il est utile de rappeler que le traitement empirique de l'EI aiguë est habituellement de courte durée car le diagnostic est établi dans les 48 heures dans plus de 95 % des cas.

EI à *S. aureus* et les aminosides :

Les deux mises à jour de 2015 suggèrent de ne plus utiliser des aminosides dans le traitement de l'EI staphylococcique de la valve native, quelle que soit la nature sensible ou résistante de la souche à la méthicilline. Elles recommandent de continuer à utiliser la gentamicine pendant les deux premières semaines de traitement de l'EI staphylococcique sur valve prothétique (110) : 2 ou 3 injections/jour pour les américains et 1 ou 2 injections/jour pour les européens. En effet, l'efficacité des aminosides n'a jamais été prouvée dans l'EI staphylococcique, même lorsqu'elle a été évaluée dans une étude randomisée (111). Par contre, leur effet délétère même administré pendant quelques jours a été bien démontré (112). Cependant, l'ajout de gentamicine à une β -Lactamine ou à un glycopeptide est associé à une bonne synergie *in vitro* conduisant rapidement à une activité bactéricide (110), d'autant plus que les glycopeptides seuls présentent une activité bactéricide lente (113).

Daptomycine et EI staphylococcique résistante à la méthicilline :

Ces deux recommandations suggèrent d'utiliser la daptomycine comme une alternative de première intention dans le traitement de l'EI staphylococcique résistante à la méthicilline avec une dose plus élevée que celle recommandée dans l'autorisation de mise sur le marché ; 10 mg/kg/jour en Europe, et > 8 mg/kg/jour aux États-Unis.

Bien que les études de cohorte aient démontré le bon résultat associé à l'utilisation de la daptomycine dans le traitement de l'EI gauche (114,115), il convient de rappeler qu'elle n'a été approuvée que dans le traitement de l'EI droite, où elle a seulement démontré une non-infériorité par rapport au traitement conventionnel (102,116).

El à streptocoques et les aminosides :

Une seule dose quotidienne de 3 mg/kg de gentamicine est à administrer pour l'El streptococcique. Les aminosides sont utilisés pour obtenir une synergie avec une β -Lactamine ou un glycopeptide (117). Cependant, ils ont une demi-vie biologique d'environ deux heures et une seule administration quotidienne ne permet pas de conserver une concentration sanguine soutenue de gentamicine sur 24 heures. Pour Mainardi, administrer des aminosides deux fois par jour semble avoir plus de sens pour obtenir une synergie prolongée sur 24 heures (102).

El à enterocoque :

Elles peuvent être traitée avec une association de pénicilline (A ou G) et de gentamicine (2-3 injections/jour, 3 mg/kg) pendant quatre à six semaines, ou avec une association de pénicilline A (12 g/jour) et la ceftriaxone (2 g deux fois par jour) pendant six semaines (118,119).

Tattevin et Mainardi pensaient que cette association de deux β -Lactamines devrait être recommandée comme alternative de première intention (102) à la lumière des publications espagnoles suite à des études démontrant une synergie *in vitro* entre l'amoxicilline et les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, ceftriaxone) (120). Cependant, les recommandations américaines n'ont pas pris en considération les publications scandinaves qui suggèrent fortement l'arrêt des aminoglycosides après deux semaines de traitement en favorisant l'association pénicilline-gentamicine pour l'El à entérocoque (102). Les recommandations européennes étaient plutôt plus innovantes sur cette question (42).

Il est à noter, contrairement aux mises à jour de 2009 et aux recommandations américaines de 2015, les mises à jour européennes de 2015 n'ont pas été approuvées par aucune société de maladies infectieuses avant d'être publiées (102).

En cas d'El compliquée, la durée des antibiotiques tient compte de la complication. Elle doit être de 6 semaines pour les abcès hépatiques, entre 6 à 12 semaines pour les spondylodiscites et de 12 semaines pour un abcès cérébral.

Réduire les durées des traitements antibiotiques est un des moyens permettant une réduction globale de la consommation d'antibiotiques. Le Groupe de recommandations de la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF), en se basant sur la littérature récente, des essais randomisés abordant les durées de traitement, des recommandations récentes et de leurs argumentaires, a proposé en 2017 des durées d'antibiothérapie raccourcies pour les infections non compliquées, en choisissant en particulier la borne basse de la fourchette lorsque des intervalles sont proposés dans les recommandations initiales (121). En dehors des localisations secondaires, les suggestions des durées de traitement pour l'El (hors chirurgie) et les infections de stimulateurs implantables (pacemaker ; PM) et défibrillateurs (DAI), sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 5. Durées de traitement suggérées pour l'El non compliquée et les infections sur pacemakers et défibrillateurs (absence d'indication chirurgicale, absence de localisation septique osseuse et articulaire) causée par des bactéries sensibles aux β -Lactamines – El, d'après (121).

Durée de traitement suggérée	El (à l'exception d'intervention chirurgicale) et les stimulateurs cardiaques implantables (PM) et les infections liées au défibrillateur cardiovasculaire implantable (DAI)
1 semaine	Bacériémie non compliquée sur PM ou DAI retirés, à l'exception des bactériémies à <i>S. aureus</i>
2 semaines	Bactériémie non compliquée à <i>S. aureus</i> sur PM ou DAI retirés : monoantibiothérapie avec une pénicilline M IV pour l'El du cœur droit causée par <i>S. aureus</i> sensible à la méthicilline (111,122)
	El non compliquée à streptocoque oral sensible à la pénicilline, si association β -Lactamines en IV + aminoside (gentamicine) (123)
4 semaines	El non compliquée sur valve native
	El sur PM ou DAI retirés
6 semaines	El sur valve prothétique : en raison de la présence de biofilm (121)
	Bactériémie sur PM ou DAI non explantable

PM : pacemaker. DAI : défibrillateur cardiovasculaire implantable

Pour d'autres situations, aucune étude n'a comparé un traitement de 4 semaines avec un traitement de 6 semaines avec des β -Lactamines ; et aucune donnée ne suggère la supériorité du traitement de 6 semaines (121).

Tableau 6. Durées de traitement suggérées pour l'EI non compliquée et les infections sur pacemakers et défibrillateurs (absence d'indication chirurgicale, absence de localisation septique osseuse et articulaire) causée par des bactéries sensibles aux β -Lactamines – EI, d'après (121).

Type of infection	Duration of conventional treatment	Short treatment	Target population for short treatment	Evidence required for a short treatment	Comments
Infective endocarditis			- Absence of secondary infectious localization requiring a longer treatment. - Absence of surgical indication		
Native valve - <i>Streptococci</i> - <i>Enterococci</i> - MSSA	- 4 weeks of β -lactam alone - 4 to 6 weeks of amoxicillin + 2 to 4 weeks of gentamicin - 4 to 6 weeks of penicillin M	- 2 weeks of β -lactam + gentamicin - 4 weeks of amoxicillin + 2 weeks of gentamicin - 4 weeks of penicillin M - 2 weeks of penicillin M alone	- Oral <i>Streptococcus</i> susceptible to amoxicillin - Uncomplicated right-sided IE	- Randomized study (1995) - <u>Expert advice</u> : no data 4 vs 6 weeks aminoglycoside duration: retrospective (cohorts) (2002 and 2013) - <u>Expert advice</u> : no data 4 vs 6 weeks of penicillin M No clinical data supporting the use of aminoglycosides - Randomized studies (1994 and 1996)	- Increased toxicity with aminoglycosides - <u>Alternative</u> : amoxicillin + ceftriaxone for 6 weeks
Prosthetic valves	- 6 weeks			- Expert advice	Biofilm
Pacemaker and implantable cardioverter defibrillator-related bacteremia	- 6 weeks - > 6 weeks, or even treatment that only keeps symptoms at bay	- 1 week after PM or ICD removal, except for <i>S. aureus</i> bacteremia: 2 weeks - 6 weeks	- In the absence of prosthetic valve IE and removal PM or ICD - If no device removal	- Low (miscellaneous studies, case series) - Low (case series)	

IE: infective endocarditis. PM: pacemaker. ICD: implantable cardioverter defibrillator. MSSA: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*.

11.1.3. Traitement antifongique

El à *Candida* spp.

Les polyènes, dont l'amphotéricine B est le chef de file, ont longtemps été proposés comme traitement de premier choix pour la plupart des EI fongiques. Actuellement les recommandations américaines ou européennes préconisent l'utilisation d'amphotéricine B sous forme liposomale ou bien d'une échinocandine (124–128). Cependant dans les séries récentes, et par analogie avec les recommandations sur le traitement des candidoses invasives, les échinocandines (disponibles depuis les années 2000) sont de plus en plus souvent utilisées pour les EI à *Candida* spp. (44,84,129). Ainsi, en 2016, les échinocandines à fortes doses constituent une alternative de premier choix pour le traitement des EI à *Candida* spp. : caspofungine (50 - 150 mg/jour), anidulafungine (100 - 200 mg/jour) ou micafungine (100 - 150 mg/jour) dans les recommandations nord-américaines (130,131), micafungine (200 mg/jour) ou caspofungine (dose de charge de 70 mg, puis 50 - 100 mg/jour) dans les recommandations britanniques (131).

Néanmoins, il est important de souligner qu'en cas de localisation neuroméningée ou oculaire, les échinocandines présentent une mauvaise diffusion (132) conduisant à privilégier leur association avec un azolé, ou une association amphotéricine B et flucytosine dans ces cas particuliers.

Pour le traitement des EI à *Candida* spp., les échinocandines présentent de nombreux atouts :

- une fongicidie rapide sur la plupart des espèces à *Candida* spp., y compris celles résistantes aux azolés,
- une tolérance nettement meilleure que celle des polyènes (133), ce qui permet des traitements prolongés à fortes doses sans difficulté majeure dans la plupart des cas,
- une bonne activité *in vitro* sur le biofilm au sein des végétations et sur les valves prothétiques ou les dispositifs intracardiaques, ce qui renforce leur intérêt en cas d'EI fongique particulièrement lorsque l'ablation du matériel n'a pu être réalisée (chirurgie refusée) (134,135),
- une cible différente de celles des polyènes et des azolés, ce qui fait de cette classe un composant essentiel des associations d'antifongiques à visée synergistique.

Lorsqu'une documentation est obtenue, le choix du (ou des) antifongique(s) tiendra compte de l'espèce de *Candida* identifiée, puis de sa sensibilité aux antifongiques par la réalisation d'un antifongogramme, comme préconisé dans les dernières recommandations de l'IDSA (136). Les patients de réanimation présentent des volumes de distribution augmentés, et parfois une hyperfiltration glomérulaire à la phase initiale du sepsis, ce qui peut conduire à les sous-exposer aux molécules utilisées si ces éléments pharmacocinétiques ne sont pas pris en compte (137). Le schéma thérapeutique sera défini au sein d'une équipe multidisciplinaire comme c'est désormais recommandé pour toute EI (42,103).

EI aspergillaires

En 2017, le voriconazole fongicide sur *Aspergillus* spp. (138) reste le traitement de première intention des aspergilloses invasives et ainsi, par extension des EI aspergillaires. Sa supériorité sur l'amphotéricine B a été clairement démontrée dans le traitement des aspergilloses invasives par un essai randomisé (139).

Durée du traitement antifongique

Même si elle est mal codifiée du fait de la rareté de ces infections fongiques, sûrement sous-estimées, la durée de traitement des EI fongiques doit être prolongée du fait du taux de rechutes élevé (environ 30 %), survenant jusqu'à plusieurs années après le premier épisode et après un traitement médical prolongé (76). Ainsi, les dernières recommandations s'accordent sur une durée minimale de six semaines, qui devra également tenir compte d'éventuelles localisations secondaires, de la vitesse de stérilisation des hémocultures lorsqu'elles étaient initialement positives, et des résultats de la culture des prélèvements peropératoires lorsque les patients bénéficient d'un remplacement valvulaire (76,77,103,130,136).

11.1.4. Traitement chirurgical

L'utilisation de la pénicilline dans les années 1940 a fait chuter la mortalité des EI de 100 % à près de 30 %. La seconde révolution dans le traitement se fera dans les années 1960 avec la chirurgie cardiaque dans les formes d'EI difficiles à traiter.

Actuellement, l'éradication de l'infection comprend une intervention chirurgicale dans 27 à 50 % des patients atteints d'EI (140) et il est réalisé habituellement après réception des antibiotiques (7).

La chirurgie valvulaire est mise en place sur indication hémodynamique lors de l'apparition et/ou l'aggravation d'une IC ne répondant pas à un traitement médical. Elle peut aussi être indiquée lorsque l'infection n'est pas contrôlée malgré une antibiothérapie bien conduite (7). Parfois, ce sont des arguments mixtes à la fois hémodynamique et infectieux qui déclenchent un traitement chirurgical (141).

Les facteurs de gravité conduisant souvent à un geste chirurgical sont la localisation aortique, infection par un staphylocoque, la survenue sur une valve prothétique, un abcès myocardique, une dégradation hémodynamique et/ou une complication embolique. Pour remarque, l'EI est parfois découverte fortuitement au cours d'une chirurgie cardiaque réalisée sur une autre indication.

En dépit du nombre croissant de succès thérapeutiques obtenus par traitement médical seul pour les EI à *Candida* spp., y compris sur valve prothétique (142), la chirurgie cardiaque avec remplacement valvulaire reste un pilier du traitement de toutes les EI fongiques pour la plupart des experts, et doit être systématiquement envisagée et discutée de façon multidisciplinaire, idéalement par « endocarditis team » (42,103).

Les recommandations européennes actualisées en 2015 détaillent peu les EI fongiques, mais préconisent un traitement médicochirurgical du fait d'une mortalité prévisible supérieure à 50 % en cas de traitement médical seul (42). Cette même année, les recommandations de l'AHA et de l'IDSA déclarent qu'une prise en charge chirurgicale des EI fongiques devait être discutée au cas par cas, mais qu'elle ne devait plus être considérée comme indispensable pour les EI à *Candida* spp. compte tenu des succès thérapeutiques obtenus par traitement médical seul avec les échinocandines à fortes doses (103). Fillâtre et *al.* soulignent que ces recommandations relèvent essentiellement d'opinions d'experts, basées sur des données expérimentales, des études observationnelles (séries de tailles limitées) ainsi que par l'expérience, mais que le niveau de preuve reste le plus souvent faible, ce qui suggère que ces recommandations devraient évoluer (85).

La chirurgie cardiaque de remplacement valvulaire reste pourtant, malgré l'absence de preuve, un pilier de tout traitement d'EI fongique, et doit être systématiquement envisagée, pour les raisons suivantes :

- le pronostic des EI fongiques traitées uniquement médicalement est le plus souvent très sombre, avec une létalité de 96 % pour les EI à *Aspergillus* spp. selon la plus grande revue de la littérature médicale sur le sujet (87), et entre 50 et 70 % pour les EI à *Candida* spp. (77,129),
- les rechutes sont fréquentes chez les patients n'ayant pas bénéficié de chirurgie cardiaque, même après des traitements antifongiques prolongés,
- les végétations sont volumineuses au cours des EI fongiques associant à un risque majoré d'événement(s) embolique(s) massif(s), et de difficulté de stérilisation, même avec un traitement antifongique optimisé,
- les cultures de valves peuvent rester positives chez des patients traités par amphotéricine B depuis plus de cinq mois au cours des EI à *Candida* spp. (143) et plus de 20 ans pour les EI aspergillaires (144).

Tableau 7. Recommandations des sociétés savantes pour la prise en charge des EI fongiques, d'après (85)

El fongique	Objet - source des recommandations	Traitement antifongique	Chirurgie cardiaque
EI à <i>Candida</i> spp.	EI - ESC, 2015 (42)	<u>Traitement d'induction</u> : Amphotéricine B liposomale ± flucytosine Ou échinocandines à fortes doses si <i>Candida</i> spp. <u>Traitement d'entretien</u> : Fluconazole au long cours si <i>Candida</i> spp.	Le remplacement valvulaire est nécessaire pour tous les patients
	EI - AHA & IDSA, 2015 (103)	<u>Traitement d'induction</u> : Amphotéricine B , 6 semaines <u>Traitement d'entretien</u> : Azolé à vie (selon antifongigramme)	Le remplacement valvulaire devrait être réalisé dans la plupart des cas
	Infections à <i>Candida</i> – IDSA 2016 (136)	<u>Traitement d'induction</u> : Amphotéricine B liposomale , 3 à 5 mg/kg ± flucytosine 25 mg/kg 4 fois par jour OU Échinocandines forte doses (caspofungine 150 mg/j ou mycafungine 150 mg/j) Réduction du spectre par fluconazole , 400-800 mg/j après négativation des hémocultures pour les espèces sensibles	Remplacement valvulaire recommandé Traitement postopératoire au minimum de six semaines (ou plus si abcès paravalvulaire) En l'absence de chirurgie cardiaque, fluconazole au long cours, 400-800 mg/j.
EI à <i>Aspergillus</i> spp.	EI - ESC, 2015 (42)	Voriconazole - 6 mg/kg IV 2x/jour, puis 4 mg/kg IV 2x/jour - <i>Per os</i> utilisable à 200–300 mg x2/jour	Remplacement valvulaire indispensable à la survie

ESC. European Society of Cardiology. AHA. American Heart Association. IDSA. Infectious Diseases Society of America.

11.2. Surveillance

La surveillance de l'évolution de l'EI est nécessaire longtemps après l'arrêt du traitement, car il n'existe pas actuellement de critères de guérison formelle. Le risque principal est la rechute liée à la persistance de germes au niveau des végétations, sans oublier le risque d'évolution progressive vers l'IC.

La surveillance de l'antibiothérapie comporte deux aspects ; son efficacité et sa toxicité.

- **L'efficacité** englobe plusieurs surveillances :

- **La surveillance clinique** par le suivi de la courbe thermique du patient en dehors de toute prise d'antipyrétiques et/ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. La fièvre peut persister à cause d'une antibiothérapie inadéquate ou de la persistance d'un gîte septique. Elle peut aussi n'avoir aucun rapport avec l'EI, par exemple, une intolérance médicamenteuse, une phlébite au point d'injection, une maladie thromboembolique. Il est également impératif de surveiller la survenue des complications et l'absence de signe clinique embolique.

- **La surveillance cardiologique** par une auscultation biquotidienne permettant de rechercher la modification du souffle cardiaque et l'apparition d'une IC.

- **La surveillance échographique et la taille de la végétation.**

- **La surveillance biologique** par la réalisation des hémocultures poursuivies après la mise en route du traitement, et qui doivent être stériles, et l'évolution de la CRP et du taux des leucocytes.

- **La toxicité** est évaluée à la fois biologiquement (hémogramme, natrémie, kaliémie, créatininémie, bilan hépatique), par la réalisation d'un audiogramme (âge, diabète, antécédants de problèmes auditifs), et par le dosage des antibiotiques. Pour les antibiotiques administrés par voie IV (aminosides, glycopeptides et daptomycine), le dosage doit être réalisé à temps 0 (juste avant l'administration) et 30 minutes après la fin

de perfusion. Pour les antibiotiques administrés per os (β -Lactamines, rifampicine et fluoroquinolones), le dosage doit être réalisé à temps 0 et 3 heures après administration.

La déclaration des accidents graves suite à l'administration des antibiotiques est primordiale.

11.3. Prophylaxie

La prévention de l'EI a longtemps reposé essentiellement sur l'antibioprophylaxie. Depuis plusieurs années, nous assistons à diverses polémiques concernant les mesures prophylactiques des EI d'origine dentaire. La nature des procédures dentaires à l'origine de bactériémies, la définition des patients à risque d'EI, l'efficacité et la nécessité de l'antibioprophylaxie sont également controversées.

Pour prévenir l'EI lors des soins dentaires, l'antibioprophylaxie a été recommandée au début du 20^{ème} siècle aux Etats-Unis, puis s'est généralisée dans la plupart des régions du monde à toute procédure à risque de bactériémie chez tout patient présentant une cardiopathie à risque d'EI (toutes les valvulopathies natives, la plupart des cardiopathies congénitales, les patients ayant un antécédent d'EI et ceux opérés d'une cardiopathie valvulaire ou congénitale) (108,145,146). Après cette phase ascendante, une phase descendante s'est amorcée avec le référentiel français de 2002 par l'association dentaire de France, sous l'égide de la SPILF et la société française de cardiologie, qui a pour la première fois remis en cause le bien-fondé de l'antibioprophylaxie systématique (147,148). En 2006, les indications de l'antibioprophylaxie ont été restreintes dans les recommandations des infectiologues britanniques, puis en 2007 dans les recommandations américaines de l'AHA. En 2008, les recommandations britanniques du National Institute for Health and Care Excellence (NICE) ont supprimé toute antibioprophylaxie, quel que soit le geste et quelle que soit la cardiopathie à risque, du fait de l'absence de preuves de l'efficacité de l'antibioprophylaxie, même chez les sujets à haut risque d'EI (149). En 2009, et 2015, le comité scientifique des recommandations de l'ESC a confirmé la restriction de l'antibioprophylaxie aux seuls patients à haut risque d'EI (tableau 8) et uniquement pour les soins dentaires touchant la muqueuse orale ou gingivale ou la région dentaire périapicale (tableau 9) (42). L'identification de ces sousgroupes à haut risque est justifiée par une incidence

environ 6 fois plus élevée de l'EI que pour les cardiopathies à risque intermédiaire, mais aussi par une morbidité accrue (42).

Tableau 8. Patients à haut risque d'EI pour lesquels une antibioprophylaxie est indiquée avant soins dentaires, d'après (95) adapté de (42).

Recommandations	Classe de recommandations	Niveau de preuve
L'antibioprophylaxie DOIT être réservée aux patients à haut risque d'EI : 1) Porteurs de prothèse valvulaire, incluant les valves implantées par cathéter (TAVI : Transcatheter Aortic Valve Implantation) ou le matériel prothétique utilisé pour une réparation valvulaire 2) Antécédent d'EI 3) Certaines cardiopathies congénitales : - cyanogènes, - traitées avec un matériel prothétique implanté chirurgicalement ou par voie percutanée, jusqu'à 6 mois après la procédure ou à vie en cas de shunt résiduel ou une régurgitation valvulaire.	IIa	C
L'antibioprophylaxie N'EST PAS recommandée dans tous les autres cas de valvulopathie ou de cardiopathie congénitale.	III	C

IIa. Devrait être considéré, car le poids de la preuve/l'opinion est favorable à l'utilisation/à l'efficacité.

III. N'est pas recommandé, car la preuve ou accord général selon lequel le traitement ou la procédure donnée n'est pas utile/efficace et, dans certains cas, peut être nocif.

À l'opposé des recommandations américaines (103), l'ESC ne recommande pas d'antibioprophylaxie chez les patients transplantés cardiaques qui développent une valvulopathie du greffon.

Tableau 9. Procédures à haut risque d'EI pour lesquels une antibiothérapie est indiquée chez les patients à haut risque, d'après (95) adapté de (42).

Recommandations	Classe de recommandations	Niveau de preuve
A) Chirurgie dentaire		
L'antibioprophylaxie doit être réservée aux interventions touchant la muqueuse orale ou gingivale ou la région dentaire périapicale	IIa	C
L'antibioprophylaxie N'EST recommandée pour : - AUCUNE autre intervention incluant : anesthésie locale de tissus non infectés, ablation de suture, radiographie dentaire, mise en place ou ajustage de prothèses ou de matériel d'orthodontie - Après chute de dents de lait ou après traumatisme des lèvres ou de muqueuse buccale	III	III
B) Interventions respiratoires		
L'antibioprophylaxie N'EST recommandée pour AUCUNE intervention respiratoire incluant laryngoscopie, fibroscopie bronchique, nasale, intubation trachéale	III	C
C) Intervention digestives, urogénitales, ETO		
L'antibioprophylaxie N'EST recommandée pour AUCUNE intervention digestive ou urogénitale incluant fibroscopie gastrique, coloscopie, cystoscopie, accouchement par césarienne ou par voie basse et ETO	III	C
D) Interventions cutanées/Tissus mous		
L'antibioprophylaxie N'EST recommandée pour AUCUNE intervention	III	C

IIa. Devrait être considéré, car le poids de la preuve/l'opinion est favorable à l'utilisation/à l'efficacité.

III. N'est pas recommandé, car la preuve ou accord général selon lequel le traitement ou la procédure donnée n'est pas utile/efficace et, dans certains cas, peut être nocif.

La restriction des indications d'antibioprophylaxie est basée sur une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'EI et sur la réévaluation du rapport bénéfice-risque (150). Les points importants sont les suivants :

- 1) suspicion de l'origine buccodentaire dans 13 % des cas d'EI (151),
- 2) mise en évidence de faibles bactériémies quotidiennes à répétition lors de la mastication et du brossage dentaire potentiellement responsables d'EI (151–153),
- 3) absence de lien formel entre les soins dentaires et la survenue d'EI dans les études cas-témoins (154),
- 4) absence de réduction de la prévalence d'EI par une antibioprophylaxie large, qui expose par ailleurs au risque d'anaphylaxie et d'émergence de germes résistants (6,155,156).

Compte tenu du risque de bactériémie, l'antibioprophylaxie doit être systématique avant implantation d'un pacemaker ou défibrillateur, d'une prothèse valvulaire transcathéter ou de toute endoprothèse vasculaire (42) (tableau 10). Les bactéries les plus souvent en cause étant les staphylocoques, il est recommandé d'injecter 1 g de céfazoline IV juste avant la procédure et de renouveler l'injection après 8 à 12 heures en cas de procédure longue et jusqu'à 48 heures après la fin de la procédure (42,157). Par ailleurs, le dépistage du portage nasal de staphylocoques dorés est systématiquement recommandé avant toute chirurgie cardiaque, suivi d'un traitement antibiotique et antiseptique local (mupirocine, chlorhexidine) en cas de prélèvement positif (42).

Tableau 10. Antibioprophylaxie et mesures préventives avant interventions cardiaques et vasculaires, d'après (95) adapté de (42).

Recommandations	Classe de recommandations	Niveau de preuve
Le portage nasal asymptomatique de <i>S. aureus</i> doit être dépisté avant toute chirurgie cardiaque programmée, en vue de traiter les porteurs	I	A
L'antibioprophylaxie est recommandée de manière systématique avant l'implantation d'un pacemaker ou défibrillateur	I	B
L'antibiothérapie périopératoire doit être envisagée avant toute implantation d'une prothèse valvulaire (chirurgicale ou transcathéter) ou implantation de matériel prothétique vasculaire	IIa	C
Tout foyer infectieux doit être stérilisé au moins 15 jours avant une intervention de chirurgie valvulaire ou toute autre implantation de matériel prothétique intracardiaque ou vasculaire, à l'exception des interventions urgentes	IIa	C
Un traitement antiseptique local systématique N'EST PAS recommandé en l'absence de dépistage du portage nasal de <i>S. aureus</i>	III	C

I. Est recommandé/est indiqué. Preuve et/ou accord général selon lequel un traitement ou une procédure donnée est bénéfique, utile, efficace. IIa. Devrait être considéré, car le poids de la preuve/l'opinion est favorable à l'utilisation/à l'efficacité. III. N'est pas recommandé, car la preuve ou accord général selon lequel le traitement ou la procédure donnée n'est pas utile/efficace et, dans certains cas, peut être nocif.

Concernant les modalités pratiques, l'antibioprophylaxie consiste généralement en la prise orale (PO) de 2 g d'amoxicilline (50 mg/kg chez l'enfant) une heure avant le soin ; l'injection IV (même posologie) est également possible. En cas d'allergie aux β -Lactamines, l'alternative peut être la clindamycine, 600 mg en prise orale (20 mg/ kg chez l'enfant) (42).

L'imputabilité des bactériémies quotidiennes de faible intensité conduit à privilégier les mesures d'hygiène, en particulier buccodentaires et cutanées visant à limiter le plus possible les passages de bactéries à travers les barrières cutanéomuqueuses (tableau 11). Tout foyer infectieux dentaire (ou autre) identifié avant une intervention valvulaire cardiaque programmée doit être éradiqué avec respect d'un délai de cicatrisation d'au moins 15 jours avant l'intervention valvulaire (42,158).

Tableau 11. Mesures de prévention non spécifiques devant être idéalement appliquées à la population générale et particulièrement renforcées chez les patients à haut risque concernant les patients à haut risque et à risque intermédiaire d'EI. Recommandations ESC 2015, d'après (95) adapté de (42).

- 1) Hygiène dentaire (brossage biquotidien) et cutanée stricte.
- 2) Suivi dentaire : doit être effectué deux fois/an chez les patients à haut risque, et une fois/an chez les autres, afin de dépister d'éventuelles caries ou autre foyer infectieux.
- 3) Désinfection des plaies.
- 4) Eradication ou diminution des portages chroniques : peau, urine.
- 5) Antibiothérapie curative pour tout foyer infectieux.
- 6) Absence d'automédication par les antibiotiques.
- 7) Mesures strictes d'asepsie pour toute procédure à risque.
- 8) Décourager le piercing et le tatouage.
- 9) Limiter l'utilisation des cathéters de perfusion et des procédures invasives si possible. Favoriser les perfusions périphériques sur les voies centrales, et remplacement systématique des cathéters de perfusion périphérique tous les 3 ou 4 jours.

PARTIE II. Endocardites infectieuses : Diagnostic microbiologique

Le diagnostic microbiologique des EI englobe hémocultures dont la durée d'incubation doit être prolongée, les examens sérologiques qui peuvent compléter ces recherches, et enfin les techniques microbiologiques et anatomopathologiques des valves et des prothèses cardiaques.

1. Hémocultures

1.1. Généralités

Les hémocultures constituent l'outil microbiologique principal du diagnostic étiologique des EI. Elles représentent un critère majeur dans la classification de Duke. Lors de l'EI, la bactériémie est prolongée et constante. Des hémocultures peuvent donc être prélevées à tout moment, en dehors de tout pic fébrile. Trois séries pratiquées sur une période de 24 à 48 heures sont recommandées pour établir le diagnostic d'EI (12,159). Il est capital que les hémocultures soient pratiquées après une antiseptie rigoureuse de la peau et avant toute antibiothérapie afin d'éviter de décapiter le microorganisme causal.

Chaque hémoculture comporte un couple de flacons aérobie et anaérobie contenant un milieu de culture auquel le sang est rajouté : 10 mL pour les adultes, et 5 mL pour les flacons pédiatriques. La quantité de sang prélevée est primordiale dans le rendement de la technique, ainsi un prélèvement de 20 mL de sang augmente le pourcentage de positivité de 30 %, comparativement au volume minimum de 10 mL.

La dilution du sang dans le milieu de culture atténue l'effet de substances à activité antimicrobienne présentes dans le sang des patients (lysozyme, complément, antibiotiques, etc.). La dilution au 1/10 est celle qui donne le meilleur résultat. Le polyanéthol sulfonate de sodium (SPS) ; un anticoagulant souvent utilisé dans les bouillons (concentration de 0,025 à 0,05 %), inhibe aussi ces substances mais il peut aussi interférer sur la croissance de certaines souches comme *Mycoplasma hominis*, *Neisseria* spp., *Peptostreptococcus anaerobius* ou *Streptobacillus moniliformis*. Les résines absorbantes de cations ou le charbon activé présents aussi dans les flacons permettent de neutraliser partiellement des antibiotiques.

Ces prélèvements sont acheminés au laboratoire pour être incubés à 37°C. La plupart des laboratoires sont équipés de systèmes automatisés permettant à la fois l'incubation, l'agitation et la surveillance des flacons d'hémoculture (BacT/ALERT®, Bactec®). La croissance de la bactérie au sein du flacon produit du CO₂ qui acidifie le milieu. Cette baisse du pH est détectée par l'automate à l'aide d'un capteur. Il est important que le laboratoire soit informé de la suspicion diagnostique d'EI afin de prolonger la durée d'incubation des hémocultures. Cette durée varie de deux à quatre semaines selon les laboratoires et permet de détecter les microorganismes à croissance lente. Au laboratoire de bactériologie de l'Institut des Agents Infectieux (IAI) de Lyon, cette durée a été fixée à 14 jours.

La présence chez un patient fébrile de trois hémocultures sur trois ou plus positives pour le même pathogène signe une infection intravasculaire.

Les prélèvements positifs bénéficient d'un examen direct par la coloration de Gram sur une goutte du milieu contenu dans le flacon d'hémoculture, et un état frais (entre lame et lamelle). Il faut aussi effectuer une subculture (un repiquage) sur milieux de culture appropriés. En cas de pousse à la culture sur milieu gélosé solide, nous procédons à l'identification du germe et à la réalisation de son antibiogramme. Enfin, la souche est conservée pour d'éventuelles comparaisons avec d'autres souches isolées chez le même patient.

Classiquement, nous distinguons les endocardites à hémocultures positives et celles à hémocultures négatives.

1.2. Recommandations concernant les hémocultures

1.2.1. Hémocultures sur milieux usuels

Les hémocultures sur milieux usuels permettent dans leur majorité d'isoler les germes responsables d'une grande partie des EI : les streptocoques, les staphylocoques et les entérocoques.

La bactériémie est constante au cours des EI et lorsqu'une série de trois hémocultures (prélevées sur un intervalle de 24 à 48 heures) demeure négative, il faut, le lendemain, prélever une nouvelle série de deux à trois hémocultures, si possible en multipliant les milieux et les techniques (54).

1.2.2. Hémocultures fongiques

Les hémocultures sont les premiers examens aboutissant au diagnostic de candidémie. La candidémie, détectée ou non, est en soi une indication à la réalisation d'une échocardiographie cardiaque et d'un examen du fond d'œil. La positivité de l'un de ces examens a un impact majeur sur le plan thérapeutique et permet pour le premier de poser le diagnostic d'EI (85,136). Parmi 187 épisodes consécutifs de candidémie explorés par échocardiographie, seulement 11 EI ont été diagnostiquées (5,9 %), avec une rentabilité de l'ETT et ETO estimée à 2,9 % et 11,5 % ; respectivement (160).

Pour le diagnostic de candidémie, les recommandations de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID) en 2012 (161), et celles de l'Infectious Diseases Society of America en 2013 (IDSA) (124) préconisent l'inoculation de 60 mL de sang veineux répartis en six flacons de 10 mL (3 flacons aérobies et 3 flacons anaérobies), qui doivent être incubés à 37°C pendant au moins cinq jours.

Les critères de Duke modifiés sont couramment utilisés pour classer les EI à *Candida* spp., sans modification des définitions pour les critères majeurs microbiologiques (44,108,160). Pourtant, ces critères de Duke ont été essentiellement construits à partir d'EI bactériennes, alors que le diagnostic des EI fongiques est plus difficile, avec une moins bonne sensibilité (de l'ordre de 50 à 75 % pour les EI à *C. albicans* (161,162) et seulement de 4 % pour les EI aspergillaires (87). Cette moindre sensibilité est à l'origine d'une plus grande proportion d'EI fongiques dont le diagnostic étiologique n'est pas obtenu avant la chirurgie valvulaire, par rapport aux EI bactériennes (85).

La plupart des milieux d'hémocultures actuellement utilisés permettent la croissance de levures du genre *Candida*. Si les hémocultures de routine sont négatives mais que le diagnostic est fortement suspecté, il est souhaitable de réaliser des hémocultures fongiques dont le milieu est optimisé pour la culture des levures (85). L'utilisation de ces milieux qui contiennent des antibiotiques permet un gain de temps pour la détection et l'identification d'espèce, en particulier pour celles à croissance lente (*C. glabrata*). Par ailleurs, ces milieux sont avantageux en cas de septicémies mixtes d'origine bactérienne et fongique. Les inconvénients de ces milieux fongiques sont d'une part un coût plus élevé et d'autre part une quantité de sang nécessaire plus importante. Cependant, la performance diagnostique de ces flacons d'hémoculture ne semble pas être meilleure, en 2016, même si le délai de positivité peut être raccourci de quelques heures pour certaines espèces permettant en théorie un diagnostic un peu plus précoce (85). De manière paradoxale, l'utilisation de flacons d'hémocultures bactériennes possède une meilleure sensibilité pour la détection des candidémies après imprégnation antifongique, de part la présence de charbon ou de résines adsorbantes dans les flacons.

1.2.3. Hémocultures sur milieux spéciaux

Des hémocultures sur milieux spéciaux, comme les flacons Lyse centrifugation Isolator®, agissent en libérant les microorganismes intracellulaires puis en les concentrant avant de les ensemercer sur des milieux plus propices à leur croissance (163). Ces flacons permettent de gagner en sensibilité dans l'isolement des mycobactéries, des bactéries exigeantes (HACCEK, *Bartonella* spp., *Legionella* spp.), des levures de croissance difficile et les champignons filamenteux (85).

Dans le cas d'EIHN, Mainardi *et al.* recommandent au troisième jour d'incubation une coloration de Gram des flacons aérobies et anaérobies et une subculture sur géloses. Les milieux appropriés sont le chocolat-ISOVITALEX pour la culture des bactéries du groupe HACCEK et les géloses Columbia additionnées de 5 % de sang de mouton pour les streptocoques. Les ex-streptocoques déficients peuvent être détectés grâce à une strie de staphylocoques (164).

1.3. EI à hémocultures positives

Les EI à hémocultures positives (EIHP) apportent les renseignements sur le germe responsable en accord avec les critères de la classification de Duke (11,93). Elles fournissent une bactérie cultivable pour déterminer sa sensibilité aux antibiotiques. Pour de nombreux microorganismes, les deux premières hémocultures sont positives dans 70 à 90 % des cas d'EI (28).

Le diagnostic étiologique est donné par les hémocultures dans les 48 heures. L'absence d'isolement bactérien sur les hémocultures en présence d'un tableau clinique compatible avec celui d'EI doit faire envisager le diagnostic d'EIHN. Il est à noter que les bactéries du genre *Abiotrophia* spp. (anciennement streptocoques déficients) et les bactéries du groupe HACCEK peuvent être isolées dans les hémocultures avec les systèmes de culture actuels (11,93).

1.4. EI à hémocultures négatives

Les EIHN sont définies comme les EI certaines pour lesquelles les trois paires d'hémocultures recommandées restent stériles après 48 à 72 heures d'incubation. En premier lieu, des hémocultures complémentaires doivent être réalisées et si elles demeurent négatives 48 à 72 heures après, les étiologies des EIHN doivent être envisagées (54).

Lors de la première étude sur ce sujet par Cannady *et al.* en 1976, 2,5 à 31 % des patients à EI présentaient des hémocultures négatives (165). Selon les études, les EIHN représentent 1,1 à 5,5 % de toutes les EI (22)(4,54,166–168). Selon une étude récente et malgré les progrès diagnostiques et thérapeutiques, aucun microorganisme n'a été identifié dans 5,2 % des EI (1).

Cette situation entraîne un retard évident dans le diagnostic étiologique qui n'est pas sans conséquence. En effet, par comparaison aux hémocultures positives, une augmentation du risque de destruction valvulaire, d'embolies septiques, et surtout de mortalité (169) a été observée. La négativité des hémocultures est donc un sujet d'inquiétude considérable dans la prise en charge des patients atteints d'EI.

Les étiologies des EIHN sont multiples (tableau 12) (54,61).

Par ordre de fréquence, après avoir éliminé l'antibiothérapie préalable, les microorganismes de culture fastidieuse ou encore émergents, nous retrouvons *Coxiella burnetii*, l'agent de la fièvre Q, responsable en France de 30 à 50 % des EIHN (22,56,59).

Bartonella spp. sont responsables en France de 9 à 10 % des cas d'EIHN (46,59,60,62) et son diagnostic est sérologique. Parfois, les techniques de biologie moléculaire (171) et l'hémoculture à la condition de les conserver au moins 45 jours (171) sont utiles pour le diagnostic des EI à *Bartonella* spp..

Le diagnostic étiologique d'une EIHN doit comporter d'abord une sérologie pour *C. burnetii*, *Bartonella* spp., *Brucella* spp. et *Chlamydia* spp.. La durée d'incubation des hémocultures doit être prolongée, ce qui permettra de faire le diagnostic d'EI à *Brucella* spp. *Bartonella* spp., *Legionella* spp., *Abiotrophia* spp. et aux bactéries du groupe HACCEK qui parfois ont une croissance lente et difficile. La sérologie et les antigènes circulants peuvent être aussi utilisés pour le diagnostic d'EI fongique (*Histoplasma capsulatum*), mais c'est la biopsie cutanée d'une lésion secondaire qui donnera souvent le diagnostic définitif des EI fongiques.

L'absence de diagnostic étiologique au terme de ce bilan doit faire envisager l'utilisation de la PCR avec séquençage de l'ADN à partir du sang, mais surtout des valves cardiaques lorsqu'elles sont disponibles

après une exérèse chirurgicale. Cet examen de biologie moléculaire sera orienté sur l'anatomopathologie des valves cardiaques confirmant le diagnostic d'EI et avec l'aide de colorations spéciales (Gram, Giemsa, Whartin-Starry, Gromori-Grocott) permettant la mise en évidence des pathogènes dans la végétation.

Tableau 12. Principales causes de la négativité des hémocultures lors de l'EI, d'après (170)

Etiologies	Microorganismes en cause	Fréquence, porte d'entrée, valvulopathie préexistante ou non	Moyen de diagnostic
EI« décapitée »	- Antibiotique administré avant la réalisation des hémocultures	Première cause d'EIHN	-
Microorganisme de culture difficile	- Bactéries du groupe HACCEK	2 à 3 % des EI Porte d'entrée dentaire et ORL Valves natives	PCR Culture prolongée
	- <i>Bartonella</i> spp	3 % des EI <i>B. quintana</i> : situation de précarité, sans valvulopathie connue <i>B. henselae</i> : sujets immunocompétents, valvulopathie préexistante, contact avec les chats	Sérologie PCR Culture prolongée
	- Ex-streptocoques déficients : <i>Abiotrophia</i> spp. <i>Granulicatella</i> spp.	1 à 2 % des EI Porte d'entrée ORL Valves natives	Culture milieux spéciaux
	- <i>Brucella</i> spp. (<i>B. melitensis</i> +++)	< 1 à 3 % des EI Contamination directe (au contact avec animaux infectés) ou indirecte (ingestion ou inhalation) Valvulopathie préexistante, le plus souvent	Culture prolongée
Microorganisme non cultivable sur milieu usuel	- <i>Coxiella burnetii</i> (Fièvre Q)	3 à 5 % des EI. Zoonose Valvulopathie préexistante/prothèse valvulaire	Sérologie
	- <i>T. whipplei</i> - Mycobactéries - <i>Mycoplasma</i> spp - <i>Chlamydia</i> spp. - <i>L. pneumophila</i>	Exceptionnelle – valve native Rare – prothèse valvulaire	PCR Culture / sérologie Sérologie Sérologie
Mycète	- <i>Candida</i> spp. - <i>Aspergillus</i> spp. - <i>Histoplasma</i> spp. - <i>Penicillium</i> spp., ...	1 à 5 % des EI doivent être suspectés lors d'EI postopératoires, sur prothèses cardiaques et chez les toxicomanes	- <i>Aspergillus</i> et <i>Histoplasma</i> : Culture/ sérologie /histologie - Histologie

1.4.1. EI à hémocultures négativées par une antibiothérapie préalable

C'est la cause principale d'EIHN et elle représente environ 50 % des cas (172). En théorie, les hémocultures doivent être prélevées avant toute mise en place d'une antibiothérapie. Si cela est impossible, une fenêtre thérapeutique doit être pratiquée avant la ponction veineuse. La durée du traitement préalable influence le temps pendant lequel les hémocultures vont rester négatives. En effet, une antibiothérapie menée jusqu'à 15 jours avant la ponction des hémocultures peut négativer le prélèvement (28).

Actuellement, la plupart des laboratoires utilisent des flacons contenant une résine adsorbant les antibiotiques afin de limiter au maximum leurs effets sur la croissance des microorganismes à l'intérieur des flacons d'hémoculture, mais, encore faut-il qu'il ait suffisamment de germes prélevés.

1.4.2. EI à microorganismes fastidieux : « EI à hémocultures souvent négatives »

Ils représentent 15 à 20 % des cas d'EIHN (172). La croissance des microorganismes est lente, ce qui demande des délais de culture plus longs pour leur mise en évidence. En théorie, la durée d'incubation des hémocultures doit être prolongée jusqu'à quatre semaines afin de détecter d'éventuelles bactéries fastidieuses :

- **HACCEK** : représentent 2 à 3 % des cas d'EIHN (72).
- **B. quintana** et **B. henselae** : sont responsables de 9 à 10 % des cas d'EIHN avec prédominance de *B. quintana* (46,60). Elle se développent assez bien dans les systèmes automatisés d'hémoculture mais produisent si peu de CO₂ que le système d'alerte ne détecte aucune croissance (173).
- **Streptocoques déficients** : ***Abiotrophia spp.*** et ***Granulicatella spp.***
- ***Brucella spp.*** : une incubation prolongée des hémocultures est recommandée, mais les systèmes d'hémocultures modernes permettent dans la grande majorité des cas une croissance durant la première semaine.

1.4.3. EI à microorganismes non cultivables sur milieu usuel : « hémocultures toujours négatives »

Ces EI sont dues à des bactéries à développement intracellulaire obligatoire ou prédominant. Elles représentent environ 6 % des EI (1,61).

- ***Coxiella burnetii*, *Chlamydia spp.*** : ce sont des bactéries obligatoirement intracellulaires. Leur culture est donc impossible en milieu acellulaire comme les hémocultures. Leur diagnostic repose sur la sérologie et la biologie moléculaire (9,15,57).
- ***Tropheryma whipplei*** : c'est une cause sous-estimée d'EIHN (61). Sa responsabilité dans l'EIHN a été montrée en 2000 après son isolement par culture d'une valve cardiaque (71). Le diagnostic microbiologique ne peut se faire que par PCR sur valve, exceptionnellement sur le sang et par culture cellulaire au Centre National de Référence (CNR) des rickettsies à Marseille. Il n'est pas possible de cultiver ce germe en routine, et il n'existe pas de sérodiagnostic suffisamment spécifique disponible. La coloration par l'acide périodique de Schiff (PAS) sur des coupes histologiques met en évidence des aspects pathognomoniques de macrophages spumeux à granulations PAS positives (61,174).
- ***Mycobacterium spp.*** : leur diagnostic est apporté par des hémocultures spéciales sur milieu Middlebrook, le diagnostic histologique (coloration de Ziehl-Neelsen) ou des techniques moléculaires.
- ***Mycoplasma spp.*** : selon Brouqui et *al.*, leur rôle dans les EIHN est probablement aussi sousestimée (57). La croissance de *M. hominis* peut être détectée par des systèmes automatisés en l'absence de SPS.
- ***Legionella spp.*** : les automates d'hémocultures sont pris en défaut car le seuil de détection en CO₂ est rarement atteint. Le diagnostic s'appuie sur un repiquage sur milieux spécifiques, la sérologie et les techniques moléculaires.

1.4.4. Agents fongiques

Les EIHN fongiques décrites jusqu'à l'heure actuelle sont dues essentiellement aux genres *Candida* (le plus souvent *C. albicans*) et *Aspergillus*. Les hémocultures fongiques ne sont positives à *Candida* (le plus souvent *C. albicans*) que dans 50 % des cas de candidoses invasives (162) et *Aspergillus* n'est quasiment jamais retrouvé dans les flacons d'hémocultures.

C. albicans se voit essentiellement chez les toxicomanes, les porteurs de prothèses ou de cathéter de longue durée. Les EI aspergillaires sont exceptionnelles et se voient chez les immunodéprimés.

L'EI fongique doivent être systématiquement évoquées dans les EI post-opératoires sur prothèses cardiaques ou survenant chez les toxicomanes (54).

La sérologie, la culture de l'embol et/ou de la végétation, ainsi que la présence de filaments mycéliens en anatomopathologie permettent d'affirmer le diagnostic (175).

1.4.5. Endocardites du cœur droit

Ce sont des EI subaiguës, retrouvées principalement chez les toxicomanes utilisant des drogues par voie IV et chez les patients immunodéprimés. Chez ces patients, les microorganismes seraient retenus au niveau pulmonaire sans atteindre la grande circulation. La présentation clinique peut être trompeuse, notamment en l'absence de souffle cardiaque.

1.4.6. Endocardites murales

Ces EI associées à la présence d'un stimulateur cardiaque (sonde de pacemaker) ou d'une malformation cardiaque congénitale possèdent un foyer infectieux qui demeurerait sous-endocardique. Ainsi, les bactériémies associées à ces EI seraient de faible intensité voire même inexistantes.

1.4.7. Endocardites marastiques

Ce sont des EI fibrinocruoriques sans microorganisme, le plus souvent satellites de cancers profonds (22,56,57,59).

2. Sérologies

Les sérologies sont un outil précieux dans le diagnostic étiologique des EIHN. Une analyse de 63 cas d'EIHN par Lamas et *al.* recommandait la réalisation de sérologies *Bartonella*, *Coxiella* et *Chlamydia* spp. dans les cas certains ou suspects d'EI. Ces techniques leur avaient permis de retrouver un agent étiologique dans 15/63 cas (176).

Raoult et *al.*, en réalisant des sérologies en systématique lors de négativité des hémocultures, ont reclassé 38/427 patients atteints d'EI possible en EI certaine, et 19/261 patients à EI « exclue » en EI « possible » (177). Ces auteurs recommandent de prélever cette batterie de tests sous forme d'un kit EI dès l'admission de patient suspect d'EI en même temps que les premières hémocultures, étant donné le gain effectif sur le coût d'hospitalisation.

Toutefois, il faut se montrer prudent vis-à-vis d'une seule sérologie car il existe des réactions croisées entre espèces de *Bartonella* et *C. burnetii*, *Chlamydia* spp. et *Bartonella* spp. (178). De plus, l'interprétation des tests sérologiques est parfois difficile. Un tiers d'anticorps élevé reflète une exposition à l'organisme sans pouvoir la dater, et n'indique pas forcément qu'il y ait une relation entre le microorganisme et l'EI.

Des techniques automatisées de sérodiagnostic multiplexe utilisant une dilution unique du sérum (plusieurs antigènes bactériens différents testés sur une même lame d'immunofluorescence) ont même été étudiées dans le cadre des EIHN. Cela permet de s'affranchir des lectures opérateur-dépendant (liées à l'expérience). Le résultat est délivré en une heure à partir d'un algorithme d'interprétation (177).

Dans ses recommandations, Mainardi et *al.*, proposent la réalisation de sérologies bactériennes et fongiques lorsque les hémocultures restent négatives après trois jours d'incubation (164). Certaines sont indispensables : *Coxiella burnetii*, *Bartonella quintana*, *B. henselae*, *Chlamydia* spp. (*C. psittaci*, *C. pneumoniae* et *C. trachomatis*) du fait des réactions sérologiques croisées avec *Bartonella*, et *Brucella* spp. (surtout si contexte épidémiologique favorable). D'autres peuvent venir complémentaires : *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Candida* spp. et *Aspergillus* spp..

2.1. Sérologies *Coxiella burnetii*

Le diagnostic d'EI à *C. burnetii* est classiquement apporté par la sérologie ; très spécifique. La culture sur milieu cellulaire est réservée à des laboratoires spécialisés.

Les méthodes de détection proposées sont l'ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), la fixation du complément et l'immunofluorescence indirecte (IFI). Au vu de ses performances, l'IFI est considérée comme le test de référence dans le diagnostic des EI à *Coxiella*. Un titre d'IgG > 1/800 a une sensibilité de 100 % et une valeur prédictive positive de 98 % (15). Des réactions croisées se produisent avec *Chlamydia pneumoniae* (169). En 1996, Fournier et *al.* ont proposé qu'une hémoculture positive à *C. burnetii* ou un titre d'anticorps > 1/800 en IgG phase I (possédant une valeur prédictive positive de 98 %) soient intégrés comme critère majeur à la classification de Duke (56). Cette proposition a été prise en compte dans les critères de Duke modifiés par Li (94).

2.2. Sérologies *Bartonella* spp.

Généralement, les hémocultures à *Bartonella* sont négatives et c'est la sérologie qui établit préférentiellement le diagnostic.

En IFI, un titre d'IgG anti-*B. quintana* ou *B. henselae* \geq 1/800 chez un patient à EI est prédictif à 95,5 % d'une EI à bartonelle (46). Lamas a proposé l'addition de la sérologie positive à *Bartonella* aux critères majeurs de la classification de Duke (176).

2.3. Sérologies *Brucella* spp.

L'isolement de la bactérie dans les hémocultures est utile pour le diagnostic direct des brucelloses aiguës, et la sérologie est utile dans le diagnostic des infections subaiguës et chroniques.

Actuellement, il existe trois techniques sérologiques dont deux tests de dépistage par agglutination directe « sérologie de Wright ou Malte » et « sérologie de Rose Bengale », et une technique d'IFI pour le diagnostic des brucelloses chroniques ou anciennes. En général, le Wright et le Rose Bengale sont positifs au début de l'infection. Le Wright se négative en premier, alors que le Rose Bengale reste positif pendant des années.

Avec la réaction de Wright, il est important de noter la présence des réactions sérologiques croisées avec *Coxiella burnetii*, *Yersinia enterocolitica* O9, *Vibrio cholerae* et *Francisella tularensis*.

2.4. Sérologies *Chlamydia* spp.

La recherche d'une immunité dirigée contre *C. psittaci*, *C. pneumoniae* ou *C. trachomatis* est réalisée par IFI. D'autres techniques existent, comme la fixation du complément ou l'ELISA. Maurin et *al.* ont décrit des réactivités croisées entre *Chlamydia* et *Bartonella* (178). Lamas et *al.* ont proposé l'intégration de la sérologie positive à *C. psittaci* aux critères majeurs de la classification de Duke (176).

2.5. Sérologies *Mycoplasma pneumoniae*

La technique sérologique la plus utilisée est l'ELISA. Les techniques de PCR sur valve cardiaque peuvent être très utiles pour identifier ce microorganisme (67).

2.6. Sérologies *Legionella* spp.

La méthode sérologique la plus utilisée est l'IFI destinée à *Legionella pneumophila*.

2.7. Sérologies fongiques

Pour pallier le défaut de sensibilité des hémocultures pour le diagnostic d'EI fongique, de nouveaux outils diagnostiques (tableau 3) ont été développés et ont fait l'objet de recommandations (161). Ce sont

les sérologies ciblées sur *Candida* spp. et *Aspergillus* spp. qui constituent pour l'heure des outils précieux utilisés de façon quasiroutinière en mycologie clinique.

Pour les infections à *Candida* spp., les tests sérologiques utilisés reposent sur la détection combinée de l'antigène polysaccharidique périétal majeur mannane et des anticorps antimannane, largement exprimés par *Candida* spp. Cette approche mise au point par l'équipe de mycologie de Lille apporte certainement une contribution intéressante pour le diagnostic précoce des candidémies, puisque la sensibilité de ces tests combinés varie, selon les études, entre 80 % (125) et 100 % (179) avec une spécificité de 85 % (125). Pour le diagnostic des EI à *Candida* spp., leur sensibilité a été estimée à 83 % dans une étude prospective française MYCENDO portant sur 30 cas d'EI à *Candida* spp. (129). Cependant, des réactions croisées existent car la sérologie n'est pas spécifique (85). L'intérêt de ces tests sérologiques est une positivité plus précoce de six jours par rapport aux hémocultures mais aussi une valeur prédictive négative importante permettant d'éliminer le diagnostic. À l'heure actuelle, les données disponibles ne sont pas suffisantes pour justifier l'inclusion de ces tests sérologiques combinés en routine chez un patient présentant une suspicion d'EI fongique. Cependant, ils pourraient jouer un rôle dans leur suivi, comme suggéré par l'observation d'une décroissance de l'antigène mannane circulant corrélée au contrôle d'une EI à *C. albicans* (180).

Pour les infections aspergillaires, la sérologie et la recherche de l'antigène galactomannane sont de pratique courante dans le cadre de l'aspergillose invasive, tout en sachant que la sérologie est habituellement négative en cas d'immunodépression. Dans le cadre des EI aspergillaires, deux tests sanguins sont prometteurs : le dosage du β -1,3-D-glucane (BDG) (126), et la recherche d'antigène galactomannane (un polysaccharidique périétal). Cependant, avec ce dernier antigène, des réactions croisées peuvent survenir avec d'autres mycoses invasives ainsi qu'avec certains médicaments (tableau 13) (87,181). Des travaux récents suggèrent que la détection de l'antigène galactomannane dans le sérum a une bonne valeur diagnostique pour l'EI à *Aspergillus* spp. (88). Néanmoins, compte tenu du faible nombre de cas d'EI aspergillaires rapportés depuis le développement de ces deux antigènes, leur performance diagnostique reste très peu documentée dans cette indication (85).

Tableau 13. Les performances analytiques des nouveaux outils diagnostiques dans l'EI fongique, d'après (85).

Tests sanguins	Caractéristiques	Performance diagnostique
Antigène mannane / anticorps antimannane	- Uniquement adapté au diagnostic des infections invasives à <i>Candida</i> spp. (125)	<u>Candidémie</u> : Se : 80 %, Sp : 85 % <u>EI à <i>Candida</i> spp.</u> : Se : 83 % (129)
β 1-3 D glucane	- Antigène panfongique, présent chez la plupart des espèces fongiques pathogènes pour l'homme - Pourrait contribuer au diagnostic de toutes les mycoses invasives	<u>Candidémie (seuil de 80 pg/mL)</u> (126) : Se > 65 %. Sp > 80 % <u>EI à <i>Candida</i> spp.</u> : Se 100 % (129)
Antigène galactomannane	- Constituant majeur de la paroi d' <i>Aspergillus</i> spp. - <u>Réactions croisées</u> : histoplasmosse, blastomycose, scedosporiose, cryptococcose, penicilliose - <u>Faux-positifs</u> : certains antibiotiques (amoxicilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam) et insulines	Validé pour le diagnostic de l'aspergillose invasive du neutropénique Peu évalué dans l'EI à <i>Aspergillus</i> spp.

Se : sensibilité. Sp : spécificité

3. Kit EI au laboratoire de bactériologie de Lyon


Au laboratoire de bactériologie de Lyon, un kit de prélèvement dans le cadre de suspicion ou de diagnostic d'une EI a été mis en place. Il est préparé par le laboratoire de bactériologie et mis à disposition

des services cliniques et comprend 6 flacons d'hémocultures et un jeu de 7 tubes de sang (figure 11) associés à une fiche de renseignements cliniques (figure 12).



Figure 11. Kit d'EI à utiliser en cas de suspicion d'EI, au laboratoire de bactériologie de Lyon.

La fiche de renseignements cliniques (figure 12) concerne le traitement antibiotique antérieur (fenêtre thérapeutique) ou en cours, les facteurs de risque (port d'une prothèse valvulaire) et le mode de vie des patients (contact avec des animaux : chat, chien, bétail ou autre, habitat du patient : urbain, rural, sans domicile fixe).

 Hôpitaux de Lyon	GROUPEMENT HOSPITALIER EST Centre de Biologie et de Pathologie Est - Laboratoire de Bactériologie Renseignements - Tél : 32 96 21 ou 32 96 22 ENDOCARDITE INFECTIEUSE BILAN MICROBIOLOGIQUE
---	--

Utiliser ce kit de prélèvement dans le cadre du diagnostic d'une endocardite infectieuse. Compléter cette fiche et transmettre l'ensemble du bilan au laboratoire de Bactériologie du C.B.P.E. Le bilan complémentaire ne sera réalisé que devant la négativité des hémocultures.

Nom du prescripteur Nom du préleveur : Date de prélèvement : / / <small>Zone obligatoirement remplie par le préleveur (Arrêté du 26/11/99)</small>	Etiquette du patient :
--	-------------------------------

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

Traitement antibiotique au moment du prélèvement : oui non
 Traitement antibiotique antérieur (fenêtre thérapeutique) : oui non
 Patient porteur d'une prothèse valvulaire : oui non
 Patient en contact avec des animaux : oui non
 préciser : chat : chien : bétail : autre :
 Habitat du patient : urbain rural SDF

BILAN MICROBIOLOGIQUE

3 paires d'hémocultures

2 paires de flacons standard
 Les deux premières paires peuvent être réalisées en même temps, la troisième après un intervalle d'au moins une heure (pour conserver un minimum de conformité par rapport aux critères de Duke).

Bilan complémentaire : à prélever mais l'ensemble des tubes sera adressé par le laboratoire de Bactériologie du C.B.P.E. si et seulement si les hémocultures demeurent négatives

- 5 ml tube sec (bouchon rouge) : sérologies *Coxiella*, *Bartonella*, *Brucella*
 Transmis au Centre de Biologie Nord, Laboratoire de Bactériologie, Dr Tigaud (37.19.50)
- 5 ml x 2 tubes héparinate de lithium (bouchon vert) et 1 tube sec de 5 ml (bouchon rouge) : culture de bactéries intracellulaires. Agiter par retournement.
 Transmis au CNR des Rickettsies, Service du Pr Raoult, Marseille (04 91 38 39 94)
- 5 ml tube sec (bouchon rouge) pour sérothèque
- 1 tube EDTA 5 ml (bouchon violet)
 Laboratoire de Bactériologie du C.B.P.E., Pr Vandenesch, (PCR bactériennes)

MERCI DE JOINDRE 5 PLAQUETTES DE 4 ETIQUETTES DANS CHAQUE SAC, EN PLUS DES ETIQUETTES COLLEES SUR LES DIFFERENTS TUBES ET FLACONS.

Version du 12/04/2012
 PR BC 08-FT BC 21.1.2

Figure 12. Fiche de renseignements cliniques en cas de suspicion d'EI, au laboratoire de bactériologie de Lyon.

Le bilan microbiologique est composé de deux sachets plastiques agrafés :

- **Le premier sachet** contient 3 paires d'hémocultures aérobies et anaérobies (6 flacons d'hémoculture), dont les 2 premières pouvant être réalisées en même temps, et la troisième est à réaliser après un intervalle d'au moins une heure dans le but de conserver un minimum de conformité par rapport aux critères de Duke. La durée d'incubation de ces flacons d'hémocultures est prolongée à 14 jours.

- **Le second sachet** contient des bilans complémentaires qui sont à prélever au même temps que les hémocultures, mais qui sera analysé par le laboratoire de bactériologie si et seulement si les hémocultures demeurent négatives. Ce bilan complémentaire comporte :

- **Trois tubes secs** (bouchon rouge, 5 mL). Ces tubes sont centrifugés 15 minutes à 8°C à 3600 tours/minute. Le surnageant (sérum) de chaque tube est récupéré dans un tube à hémolyse.

- Un tube est à laisser à +4°C pour la réalisation, si les hémocultures sont demeurées stériles après 48 heures d'incubation, des sérologies bactériennes (*C. burnetii*, *Bartonella* et *Brucella*...) et/ou fongiques (*Candida* et *Aspergillus*).

- Le sérum du 2^{ème} tube est congelé à -80°C pour un éventuel envoi au CNR des bactéries intracellulaires, Whipple et *Bartonella* à Marseille pour la culture cellulaire.

- Le surnageant du dernier tube est conservé au congélateur à -20°C dans 2 tubes NUNC™ pour la sérothèque.

- **Deux tubes héparinate de lithium** (bouchon vert, 5 mL) avec un tube sec (bouchon rouge, 5 mL) : pour la culture cellulaire des bactéries intracellulaires (*C. burnetii*, *T. whipplei* et *Bartonella*), à envoyer si besoin au CNR de Marseille sur avis biologique. Les tubes héparinés sont à agiter par retournement pour les homogénéiser après prélèvement et à laisser décanter jusqu'au lendemain sur la pailasse. Le surnageant et le culot globulaire sont mis dans un tube à hémolyse et conservés au congélateur à -80°C.

- **Un tube EDTA** (bouchon violet, 5 mL) : pour la PCR bactérienne. Il est centrifugé 15 minutes à 8°C à 3600 tours/minute. Le culot globulaire et le plasma sont conservés séparément au congélateur -80°C.

4. Techniques d'étude des valves cardiaques

Dans le cadre de l'association pour l'Etude et la Prévention de l'EI (AEPEI), Mainardi et *al.* ont détaillé de manière précise les techniques d'étude des valves (aortique, mitrale, tricuspide, pulmonaire, native, mécanique ou biologique) dans leurs recommandations pour l'amélioration du diagnostic étiologique microbiologique et anatomopathologique des valves cardiaques au cours des EI (164). Cette méthode est la même à utiliser pour les végétations, les patches (dacron ou péricardique) et les cordages au laboratoire de bactériologie de Lyon.

Après exérèse chirurgicale et sans rajout de tampon antiseptique, la valve doit être transmise, dans les délais les plus brefs au laboratoire de bactériologie, en totalité dans un pot stérile et sans liquide. Arrivée au laboratoire, s'ensuit alors une phase technique sous hotte avec port de masque. La valve est travaillée dans une boîte de Pétri stérile. Afin de réaliser un examen microbiologique ciblé, un examen macroscopique par le laboratoire d'anatomopathologie doit être réalisé. Il est important de bien disposer et orienter les différents fragments, dans une boîte de pétri stérile, afin de faciliter le travail d'expertise du laboratoire d'anatomopathologie qui repèrera les zones suspectes d'infections (végétations, perforations, calcifications, zones hémorragiques, etc.) devant être analysées, en priorité, par le laboratoire de bactériologie. En moyenne, 2 à 5 fragments d'intérêt, selon la taille du ou des matériels, sont identifiées à l'aide de flèches rouges. Une photographie est réalisée à l'aide de l'appareil photonumérique (figure 13).

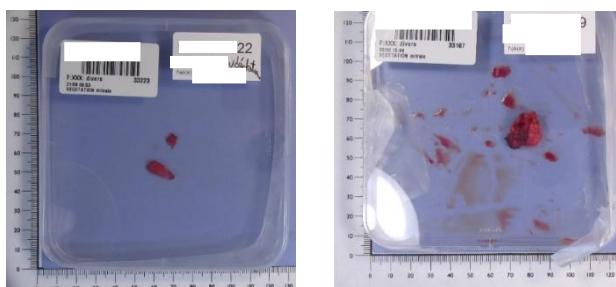


Figure 13. Végétations mitrales de deux patients différents.

4.1. Partie destinée à la bactériologie

A l'aide de la photographie réalisée par le laboratoire d'anatomopathologie, le personnel du laboratoire de bactériologie coupe à l'aide d'un scalpel stérile à usage unique, un fragment de la taille d'une tête d'épingle par zone fléchée. Par ailleurs, il est important de prendre soin de ne pas détruire le tissu, pour chaque zone identifiée, pour ne pas gêner la réalisation de l'examen anatomopathologique sur le restant de la valve à transmettre au laboratoire d'anatomopathologie.

Chaque fragment est ensuite coupé en deux parties. La première moitié de chaque fragment de chacune des localisations (pool de fragments) est transférée dans un tube stérile vide pour la réalisation de l'examen direct (coloration de Gram, toujours sous le PSM, par apposition du fragment) et la culture (164). Sous un PSM « propre », environ 3 à 4 gouttes du bouillon nutritif Schaedler Vitamine K3 0,3 % sont introduites dans le tube contenant le pool de fragments de valve destiné à la culture. Et, à l'aide d'un potter ou pilon à usage unique, les fragments de valve ou de végétation ou assimilé sont écrasés. En cas de valve calcifiée, un mortier pilon en porcelaine stérile sera utilisé afin d'écraser le fragment.

À partir de ce broyat, les milieux suivants sont l'ensemencés :

Milieu ensemencé	Atmosphère	Température	Durée d'incubation
Gélose COS (Columbia au sang, 5 %)	Aérobiose	35 ±2°C	3 jours minimum
Gélose chocolat-isovitalex (PVX)	3-5 % de CO ₂	35 ±2°C	7 jours minimum
Gélose SCS	Anaérobiose	35 ±2°C	2 jours minimum
Gélose SCS	Anaérobiose	35 ±2°C	7 jours minimum
Bouillon Schaedler Vitamine K3 0,2 %	Aérobiose	35 ±2°C	14 jours minimum
Gélose sabouraud pente	Aérobiose (bouchon légèrement dévissé)	30 ±2°C	30 jours minimum
Pour les valves prothétiques BIOLOGIQUES uniquement :			
Milieu BD Mycobacteria growth indicator tube (MGIT)	Automate	35 ±2°C	14 jours

L'autre moitié de chacun des fragments de chacune des localisations est transférée dans autant de tubes NUNC™ CryoTubes Vials (ThermoFischer Scientific®) contenant ou pas 200 µL de TRIzol® (ThermoFischer Scientific®) ; solution permettant la conservation des acides nucléiques ARN et ADN. Ces fragments de valves non destinés à la culture sont congelés à -80°C pour d'éventuelles études ultérieures (culture sur milieu cellulaire et/ou biologie moléculaire). L'utilisation des techniques de biologie moléculaire, en particulier le gène codant pour la PCR bactérienne universelle directement sur le tissu valvulaire a permis d'améliorer nettement le diagnostic des EIHN (182–184).

4.2. Partie destinée à l'anatomopathologie

L'examen anatomopathologique de la valve constitue « le gold-standard » dans le diagnostic des EI (9). Il doit être systématiquement réalisé, après chirurgie, en parallèle de l'étude microbiologique

permettant de confirmer le diagnostic d'EI (164). En pratique, les valves cardiaques sont d'abord fixées dans de la formaline puis incluses dans de la paraffine. Des coupes de 3 à 5 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées.

Les prélèvements tissulaires (valves cardiaques, végétations, embolies des grosses artères ou lésions cutanées) subissent d'abord une analyse macroscopique puis histologique des lésions au moyen d'une coloration standard systématique « hématoxyline éosine safran (HES) ». L'hématoxyline colore les acides nucléiques en bleu puis l'éosine colore l'ensemble de la cellule en rose (57). Cet examen histologique à partir de prélèvements tissulaires constitue un outil diagnostique d'une importance majeure, notamment lorsque l'isolement du microorganisme fongique responsable n'a pu être obtenu par les cultures (93,175). Sa sensibilité est de 95 %, contre 73 % pour la culture, mais elle est de 63 % pour les embolies artérielles (76).

L'examen histologique peut à lui seul confirmer le diagnostic d'EI en démontrant au moins une des trois lésions morphologiques majeures que sont :

- **une végétation** (figure 12) : sont les lésions de base de l'EI. Au point de vue anatomopathologique, ce sont des amas fibrinocruoriques constitués de fibrine, de plaquettes, de macrophages, de polynucléaires neutrophiles, et de bactéries. Anatomiquement, la végétation se présente comme une masse friable grise ou rougeâtre, sessile ou pédiculée, de taille variable (de quelques millimètres à plusieurs centimètres).

- **un infiltrat inflammatoire**. Le tissu valvulaire sous-jacent des végétations est le siège d'une réaction inflammatoire habituellement dense, polymorphe et non spécifique avec néovascularisation précoce. Malgré l'emploi de colorations spéciales, les microorganismes peuvent être souvent le siège de remaniements fibreux et peut contenir des foyers de calcifications. En dépit des distinctions cliniques entre EI aiguës et EI subaiguës, les lésions histologiques observées sont plus similaires que différentes. Cependant, un infiltrat inflammatoire comportant un grand nombre de polynucléaires neutrophiles oriente vers une EI aiguë, alors qu'une inflammation à nette prédominance mononucléée lymphohistiocytaire suggère une EI à microorganismes extracellulaires peu virulents ou à développement intracellulaire obligatoire tels que *Coxiella burnetii*.

- et **une détection de microorganismes** notamment sur coupes histologiques grâce à l'emploi de colorations spéciales ou d'immunohistochimie (185).

L'EI se définit histologiquement par un infiltrat inflammatoire de la valve. Si cet aspect est retrouvé, des colorations supplémentaires doivent être réalisées pour rechercher des microorganismes. La visualisation directe de ces microorganismes est aussi un élément important du diagnostic. Les colorations employées (57) :

- **La coloration de Gram** : elle est basée sur l'organisation de la paroi bactérienne. Les bactéries à Gram positif possèdent une membrane cellulaire et une paroi épaisse, les bactéries à Gram négatif une membrane cellulaire, une paroi fine et une membrane externe. Les bactéries à Gram positif restent colorées par le colorant de Gram après passage dans un solvant organique (coloration violette) alors que les bactéries à Gram négatif se décolorent (coloration rose après contre-coloration). Notons que certaines bactéries comme les mycoplasmes (absence de paroi cellulaire), les spirochètes, les rickettsies et les mycobactéries ne prennent pas le Gram. Les levures apparaissent à Gram positif. Les virus ne sont pas colorés. En outre, la coloration de Gram permet d'observer la forme des bactéries ; en bâtonnets (bacilles), rondes (cocci). La coloration de Gram, si elle ne permet pas une étude cytologique fine, permet de distinguer les polynucléaires des cellules mononucléées, et de juger de leur abondance. Enfin, l'association aux polynucléaires est un critère important à prendre en compte pour l'interprétation du caractère pathogène d'une bactérie (186).

- **L'acide périodique de Schiff (PAS pour periodic-acid-Schiff)** : c'est une coloration non spécifique utilisée essentiellement pour mettre en évidence les levures dans les coupes tissulaires. Les microorganismes sont colorés en rouge. Cette coloration est restée pendant longtemps un des seuls moyens de visualiser la bactérie responsable de la maladie de Whipple car elle permet de mettre en

évidence des histiocytes spumeux PAS-positifs (186). Cependant, elle manque de spécificité car elle colore également les champignons et les amas de microorganismes.

- **La coloration de Grocott-Gomori** : elle permet de mettre en évidence la paroi des champignons. En effet, les glycoprotéines de la paroi fongique subissent d'abord une oxydation puis ils sont révélés par la réduction d'un colorant argentique. Les champignons apparaissent noirs sur un fond vert pâle après déparaffinage des coupes histologiques.

- **La coloration de Giemsa** : est la coloration de base utilisée par les hématologistes car elle permet de bien observer les noyaux et les cytoplasmes des cellules sanguines. Elle permet d'évaluer l'infiltrat inflammatoire au niveau de la végétation en colorant les leucocytes. Elle permet également de mettre en évidence des bartonelles, les parasites circulants intra ou extracellulaires tels les *Plasmodium* spp. ou les leishmanies, et les intracellulaires d'*Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis carinii*, les *Borrelia* et certaines rickettsies (186).

- **La coloration de Warthin-Starry** : il s'agit d'une coloration contenant des sels d'argent, surtout utilisée en histopathologie sur coupes de biopsies tissulaires. Elle permet de mettre en évidence des *Bartonella*, des spirochètes et *Tropheryma whippelii* (186).

- **La coloration de Ziehl-Nielsen** : elle permet de mettre en évidence les mycobactéries.

- **La coloration de Gimenez** : elle permet de mettre en évidence *C. burnetii*, les bartonelles, les rickettsies et *Legionella* spp. Cette coloration permet de colorer en rouge vif par de la fuchsine diluée certains petits bacilles de structure Gram négatif mal colorés par la coloration de Gram. Elle est plus particulièrement utilisée pour mettre en évidence les rickettsies (187).

- **La coloration de Machiavello** : elle est utilisée pour la mise en évidence des rickettsies et des *Chlamydiae*. Ces bactéries intracellulaires sont colorées en rouge par la fuchsine basique sur un fond cellulaire coloré par le bleu de méthylène.

Une technique relativement récente d'immunohistochimie « l'autoimmunohistochimie », particulièrement intéressante dans le cas d'EIHN, a été proposée par Lepidi et al. (188,189). Cette technique permet la détection d'un taux de bactéries supérieur à la culture et similaire à celui de la PCR ADNr 16S sur valves cardiaques (188,190). Son principe est comme suit (figure 14) :

- Les coupes histologiques des tissus valvulaires sont mises en contact avec des anticorps primaires provenant du sérum du patient atteint d'EI. Ainsi, une réaction immunologique antigène-anticorps est formée,

- Ce complexe immunologique est ensuite révélé après ajout d'anticorps secondaire anti-IgG couplés à la peroxydase,

- Par la suite, une réaction de révélation est réalisée à l'aide d'une solution contenant un substrat incolore de la peroxydase. Si la réaction est positive, c.à.d. présence des bactéries au niveau des coupes histologiques, le substrat est dégradé et une coloration apparaît (188).

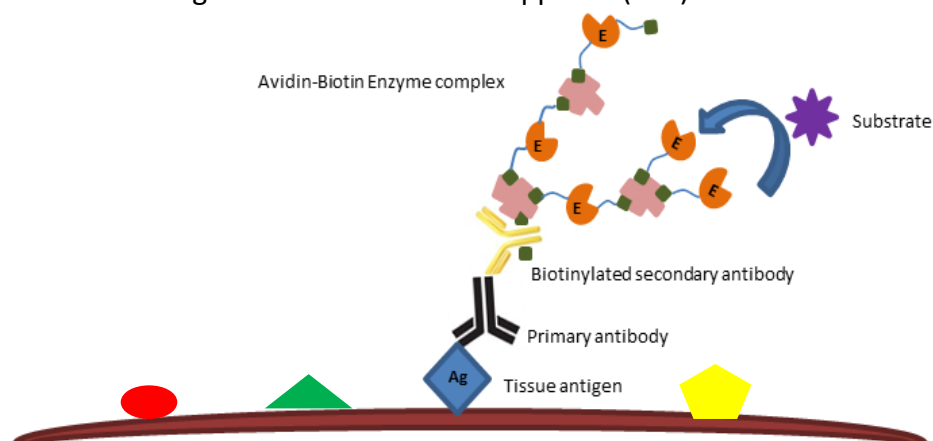


Figure 14. Principe de l'immunohistochimie.

5. Culture cellulaire

Elle est réalisable pour identifier les germes intracellulaires obligatoires ; *C. burnetii*, *T. whipplei*, *C. psittaci*. Des techniques de cultures sophistiquées sur milieu tissulaire réservés à des laboratoires spécialisés. En cas de suspicion d'EIHN, il est possible de transmettre les prélèvements au CNR des rickettsies à Marseille.

Elle est possible à partir du sang hépariné (macrophages, cellules endothéliales et fibroblastes) ou à partir de la valve cardiaque ou assimilés.

6. Biologie moléculaire

Depuis la découverte de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) par Kary Mullis en 1986 (prix Nobel de la chimie en 1993) (191), l'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des maladies infectieuses est croissante. Elles ont, très certainement, révolutionné le diagnostic des EIHN et cette technique est devenue incontournable en biologie cellulaire et moléculaire. Elle est largement utilisée en bactériologie à des fins diagnostiques, pour détecter l'acide désoxyribonucléique (ADN) d'un microorganisme présent dans un échantillon biologique et obtenir son identification par la réaction de séquençage.

6.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. Elle constitue une étape préalable essentielle à la bonne réalisation de la PCR. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement les mêmes étapes : la lyse des membranes cellulaires pour libérer les acides nucléiques, l'élimination des protéines et des autres acides nucléiques (comme les ARN) et la concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

Actuellement, plusieurs kits commerciaux existent et permettent de réaliser rapidement cette étape d'extraction à l'aide des réactifs qui sont prêts à l'emploi.

6.2. Détection et analyse des produits de PCR

En PCR conventionnelle, la technique de PCR est dite en « point final » car ce n'est qu'une fois la réaction de PCR terminée que la détection du produit amplifié est effectuée. Ce produit est constitué d'un ou plusieurs fragments d'ADN contenant la ou les séquences d'intérêt.

Deux méthodes principales sont disponibles pour détecter le(s) produit(s) amplifié(s) : l'électrophorèse en gel (agarose ou acrylamide) et la PCR en temps réel. Contrairement à la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel offre la possibilité de visualiser « en temps réel » la synthèse de l'amplicon. Cela permet de s'affranchir de la réalisation d'un gel d'électrophorèse, étape consommant un temps non négligeable. Une quantification est même possible, ce qui peut être utile à l'interprétation clinique.

Deux approches sont utilisées dans le diagnostic moléculaire des EI : une approche à large spectre « la PCR universelle » et une approche ciblant un microorganisme particulier « la PCR spécifique ».

6.2.1. PCR universelle

La PCR universelle ne s'effectuera qu'à partir d'un prélèvement issu d'un site normalement stérile (liquide céphalorachidien, sérum, valves cardiaques, etc...).

a) PCR universelle bactérienne

Elle est connue, dans la littérature, sous différentes appellations : « PCR universelle », « large spectre », « PCR eubactérienne », « PCR ADNr 16S » et par abus de langage « PCR ARNr 16S ». Elle est capable de détecter l'ADN de presque n'importe quelle bactérie. Elle constitue un outil de biologie moléculaire inestimable pour rechercher une bactérie dans un échantillon biologique. Cette technique peut aussi être utile dans le cas d'une infection à une bactérie indéterminée ou lorsqu'il n'existe pas de PCR spécifique disponible au laboratoire pour une bactérie suspectée.

Chez les bactéries, il existe trois types d'ARN ribosomiaux : les ARNr 5S (codés par gène *rrf*) et ARNr 23S (codés par gène *rrl*) font partie de la grande sous-unité du ribosome et l'ARNr 16S (codés par gène *rrs*) qui fait partie de la petite sous-unité du ribosome. Le principe de la PCR universelle consiste à amplifier un fragment de gène commun à des bactéries. La cible la plus utilisée est le gène codant l'ARN ribosomal 16S. Ces gènes sont organisés en opéron (un opéron est un ensemble de gènes qui sont transcrits à partir du même promoteur). Le nombre de copies d'opéron ribosomal varie en fonction de l'espèce bactérienne. Par exemple, chez *Mycobacterium tuberculosis*, il n'existe qu'une seule copie d'opéron ribosomal par bactérie alors que chez *Escherichia coli*, il en existe sept (21).

Le gène qui code pour l'ARN 16S est composé de séquences nucléotidiques particulièrement conservées (zone de détermination des amorces universelles) chez toutes les bactéries connues à ce jour. Ces séquences encadrent des séquences plus variables dont certaines sont des signatures spécifiques d'espèce bactérienne (figure 15). Ainsi, ces amorces choisies dans les régions conservées permettent d'amplifier les zones variables dont le séquençage aboutira à une identification bactérienne.

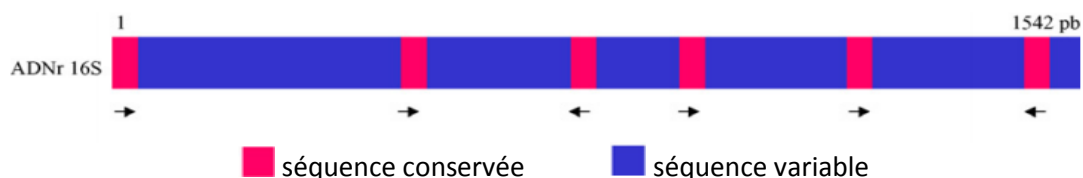


Figure 15. Représentation schématique des alternances de séquences conservées et variables dans les gènes codant pour l'ARN 16S. Les amorces universelles, permettant d'amplifier les gènes codant pour l'ARN 16S de quasiment toutes les bactéries, doivent être localisées dans les régions conservées (indiquées en rouge). Le séquençage du fragment amplifié (indiqué en bleu) est spécifique d'espèce, le plus souvent, d'après (21).

b) PCR universelle « panfongique »

Comme en bactériologie, l'utilisation de PCR universelle est une stratégie potentiellement intéressante pour le diagnostic des infections fongiques (192).

White et *al.* ont décrit, dès 1990, les principales amorces universelles créées pour l'amplification de régions situées sur les gènes codant pour les ARN ribosomiaux des champignons (193). Depuis, ces amorces ont été utilisées dans de nombreuses études (194–203). Les régions d'ADNr codant pour les sous-unités 18S, 5,8S et 28S de l'ARNr sont bien conservées au sein du règne fongique mais au sein de laquelle il existe une variabilité suffisante pour différencier les espèces entre elles, mais aussi suffisamment stable au sein d'une même espèce pour affirmer le diagnostic d'espèce. Ces trois domaines sont séparés par deux régions variables non codantes sujettes à polymorphisme, appelées ITS (Internal Transcribed Spacer) : ITS1 et ITS2 (figure 16).

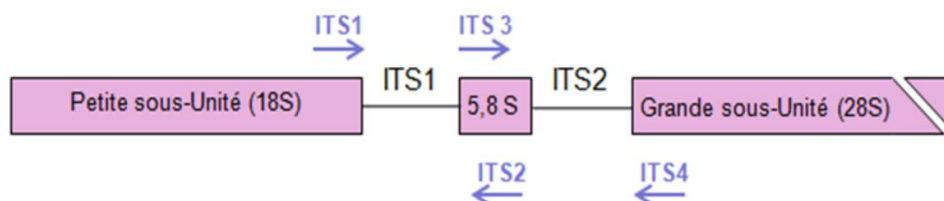


Figure 16. Schéma des régions 18S, 5,8S et 28S de l'ADNr fongique, d'après (193).

Les techniques de PCR les plus utilisées actuellement ciblent les régions ITS1 et ITS2 grâce à des amorces universelles situées sur l'ADN ribosomal. Les régions ITS1 et ITS2, hautement variable, appartiennent au complexe génique codant pour les ARN ribosomiaux qui sont multicopies (supérieure ou égale à 100 copies dans le génome fongique) (197,200,204–208). Lorsque l'analyse de ces régions n'est pas suffisamment discriminante, il est parfois nécessaire d'amplifier et de séquencer d'autres loci comme la région D1/D2 qui correspond à la grande sous-unité de l'ADNr, ou encore des régions de l'ADN mitochondrial (209–211).

6.2.2. PCR spécifique

L'autre approche, à l'opposé de la PCR universelle, est la « PCR spécifique » dont la technique phare est la « PCR en temps réel ». Dans ce type de technique, un gène spécifique de l'espèce microbienne recherchée est ciblé. Cela s'applique à tout tableau clinique typique d'un germe déterminé (e.g. purpura fulminans) ou lorsqu'un germe est fortement suspecté mais non identifié par les méthodes conventionnelles. Outre l'identification d'espèce microbienne impliquée dans l'infection, le gène ciblé par la PCR spécifique peut également concerner un mécanisme de virulence (recherches spécifiques de toxines staphylococciques, du *Clostridium difficile*...) et les mécanismes de résistance (PCR du gène *mecA* pour la détection de la méticillinorésistance de souches de *Staphylococcus aureus*, par exemple...).

Par conséquent, si plusieurs microorganismes différents sont recherchés, plusieurs amplifications spécifiques séparées doivent être réalisées. Des PCR dites « multiplex » ont été mises au point, elles permettent de détecter spécifiquement plusieurs microorganismes au cours d'une seule et même réaction, par exemple, la recherche des gènes de toxines d'*Escherichia coli* entérohémorragiques responsables du syndrome hémolytique et urémique.

6.2.3. PCR universelle/PCR spécifique

La PCR universelle ne présente pas de divergences suffisantes pour discriminer des espèces très proches. En plus, sa sensibilité est souvent moindre que celle d'une PCR spécifique. En effet, lorsque plusieurs germes sont présents soit son identification est impossible à partir de l'électrophorogramme (superposition de signaux correspondant aux séquences de plusieurs germes), soit la quantité d'ADN d'une espèce est prédominante et l'espèce minoritaire reste non détectable. Il est alors nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs génétiques pour permettre la discrimination de ces pathogènes. En outre, la PCR spécifique présente l'avantage évident d'une grande spécificité (environ 100 %). Ainsi, en cas de résultat positif, l'hypothèse clinique est confirmée sans avoir recours au séquençage. Cette technique s'avère donc plus rapide que la PCR universelle et le prélèvement étudié peut être polymicrobien sans que cela interfère avec l'exploitation du résultat. Le principal inconvénient de la PCR spécifique reste son spectre étroit puisqu'elle est incapable de détecter un autre micro-organisme que celui ciblé par ses amorces.

6.3. Exploitation de la séquence

Le séquençage de l'ADN consiste en la détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides constituant le fragment d'ADN à séquencer. C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie spécialisée. Cette étape est précédée par une étape de purification des produits de PCR qui permet l'élimination des amorces, des nucléotides en excès, des enzymes, des sels et des autres impuretés contenus dans l'échantillon à analyser.

La plupart des séquençages d'ADN sont réalisés par la méthode de Sanger qui se base sur les mécanismes de la réplification d'ADN. C'est une méthode par synthèse enzymatique sélective qui utilise la réaction de polymérisation de l'ADN, à l'aide d'une ADN polymérase, capable de synthétiser un brin complémentaire à partir d'un brin matrice et des didéoxyribonucléotides (ddNTP) sur lesquels s'attachent des traceurs fluorescents. Les ddNTP sont des terminateurs de chaîne, une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison s'effectue spécifiquement au

niveau des nucléotides correspondant au ddNTP incorporé dans la réaction. Les traceurs fluorescents permettent de détecter les fragments synthétisés. Ces derniers sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, ce qui permet de repérer la position des nucléotides dans la séquence.

L'électrophorégramme est exploité à l'aide de logiciels (tels que Chromas® ou FinchTV®). Ils permettent de vérifier les fichiers des séquenceurs d'ADN afin de réaliser un « alignement » des séquences d'intérêt. En effet, les réactions de séquences sont réalisées soit avec l'amorce sens, soit avec l'amorce antisens. Le logiciel permet de reverser et compléter une de ces séquences afin de comparer base par base les deux séquences orientées dans le même sens.

La séquence obtenue après correction des erreurs est ensuite exportée par le logiciel dans des banques de données en ligne contenant des moteurs de comparaison avec des séquences de référence et celles déposées par de multiples équipes de recherche à travers le monde. Genbank BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) ou le BIBI (Bioinformatics Bacterial Identification, <https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) (212), par exemple, réalise l'alignement de la séquence avec les séquences existantes et les arbres phylogénétiques proposant l'identification la plus probable (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). L'identification est rendue avec un pourcentage de similitudes entre la séquence présentée et la séquence prototype de la souche. Cependant, il convient d'être prudent car la qualité des séquences fongiques est très variable d'où la nécessité de vérifier l'origine des données à chaque comparaison de séquence (205,213).

D'autres notions sont également à prendre en compte dans l'interprétation des résultats comme la persistance de l'ADN dans un prélèvement. La présence d'un ADN bactérien dans un prélèvement ne signifie pas que la bactérie soit viable. Branger *et al.* ont montré que l'ADN de *S. pneumoniae* pouvait persister sept ans dans une valve sans évidence d'infection (214).

6.4. Avantages et limites de la PCR

6.4.1. Avantages

Dans le domaine de la biologie médicale, la PCR présente donc un grand intérêt. En effet, elle surclasse les délais de culture de certaines limitations biologiques, elle permet l'identification des germes peu ou pas cultivables sur milieu conventionnel et, contrairement à la culture, elle n'est que peu influencée par les antibiotiques.

C'est une méthode très sensible « capable de détecter une très faible quantité de microorganismes. Sa spécificité varie en fonction du gène ciblé.

6.4.2. Limites

L'inconvénient majeur de la PCR reste le risque de contamination qui est majoritairement à l'origine des faux-positifs, c.à.d l'introduction dans le mélange réactionnel d'ADN autre que celui de l'échantillon extrait et aboutissant à une amplification non spécifique. Le diagnostic moléculaire sur prélèvements cliniques, en particulier celui basé sur l'amplification de l'ADNr 16S, nécessite, outre des compétences et connaissances de biologie moléculaire, des locaux adaptés et séparés physiquement et géographiquement de façon à minimiser ces risques de contamination externe (les microorganismes sont omniprésents) et de contamination inter-échantillons. Des procédures standardisées de désinfection doivent être appliquées après chaque utilisation. Il est, cependant, reconnu que même en ayant de très bonnes pratiques de laboratoire, des résultats faussement positifs peuvent être obtenus (certains réactifs commercialisés utilisés pour l'extraction et la PCR sont contaminés).

L'absence de contamination des réactifs sera constatée par l'intermédiaire du témoin négatif qui est incorporé à toute série de PCR. Il ne doit en aucun cas montrer une amplification « faux positif », sinon la série entière doit être rejetée. Le témoin positif constitué du mélange réactionnel auquel est ajoutée une quantité d'ADN microbien connue capable de positiver la réaction de PCR dans des conditions standards de

réaction, est aussi incorporé à toute série de PCR. Il s'avère le garant du bon fonctionnement de la technique. Son amplification ne doit en aucun cas être négative « faux négatif », sinon toute la série entière doit être relancée. Les étiologies des faux négatifs sont diverses : des inhibiteurs de PCR présents dans les liquides biologiques, une erreur de manipulation (mauvaise extraction, mélange réactionnel inadapté, ADN non ajouté, mauvaise conservation des échantillons biologiques), mutation génique au niveau de la zone 3' d'hybridation des amorces. Des résultats faussement négatifs peuvent être également obtenus en cas de prélèvements insuffisants ou présentant un inoculum bactérien faible.

De nombreux contrôles doivent être réalisés. La validité des techniques est reliée à de nombreux facteurs, tels que le principe d'extraction de l'ADN retenu, le fait que la répartition des bactéries dans un prélèvement est inhomogène d'où la nécessité de multiplier les fragments tissulaires analysés et la présence dans certaines extractions d'inhibiteurs de la Taq polymérase rendant invalide le résultat (cela étant relativement rare à partir des tissus cardiaques).

Enfin, malgré sa banalisation, la PCR reste une technique délicate à réaliser, qui nécessite, au-delà du matériel approprié, la présence d'un personnel spécialisé. Elle présente de surcroît un coût non négligeable.

6.5. Application de la PCR en microbiologie

Dans le domaine de la microbiologie, c'est en virologie clinique que la PCR a d'abord été surtout utilisée. Elle s'est révélée en effet une méthode de choix pour l'identification d'agents viraux car elle est plus rapide, plus sensible et présente un meilleur rapport coût/bénéfice que certaines méthodes traditionnelles. Elle est aussi utilisée dans la surveillance de la réponse aux antiviraux grâce à la réalisation de charges virales et géotypages. Pour certaines maladies, elle a même remplacé la culture « gold standard » : virus de l'hépatite C, méningite à entérovirus, encéphalite à herpes simplex virus. Cette méthode permet aussi de suivre la progression de maladies (par exemple, charge virale VIH) ou de typer le virus (par exemple, papillomavirus).

En hygiène hospitalière, elle fournit des informations en cas d'épidémies puisqu'elle permet de typer des souches isolées d'échantillons cliniques, de déterminer s'il y a diffusion clonale, d'identifier les sources de contamination et de vérifier le mode hypothétique de transmission. Elle est aussi utilisée sur les prélèvements d'eau pour rechercher des pathogènes comme *Legionella*.

En bactériologie clinique, la biologie moléculaire s'est montrée particulièrement utile pour détecter l'ADN de bactéries difficiles à cultiver (par exemple, *Mycoplasma*, *Chlamydia*), poussant lentement (par exemple, *Mycobacterium tuberculosis* complexe), ne supportant que très mal la dessiccation (par exemple, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*) ou présents en faible quantité dans l'échantillon clinique dans des contextes d'urgence (méningite par exemple). La PCR ciblant l'ADNr 16S est une application importante pour des souches non identifiées par les méthodes phénotypiques et/ou biochimiques habituelles, ou par la recherche de germes dans des prélèvements normalement stériles. La biologie moléculaire permet aussi de détecter des gènes de résistance aux antibiotiques avec des performances supérieures aux méthodes phénotypiques : méticillinorésistance des staphylocoques, résistance à la vancomycine chez les entérocoques, résistance à la rifampicine de *M. tuberculosis*, etc.

6.6. PCR dans les EI : « revue de la littérature »

L'utilité des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des EI a été démontrée au cours de ces deux dernières décennies, en particulier pour identifier l'agent causal des endocardites certaines à hémocultures négatives, ainsi que pour affirmer ou infirmer une EI classée comme possible selon la classification de Duke.

En dehors de quelques tests spécifiques qui peuvent être réalisés sur le sérum ou le sang, les techniques biomoléculaires utilisées pour le diagnostic d'EI sont réalisées le plus souvent à partir de

prélèvements tissulaires cardiaques chirurgicaux (emboles, tissus cardiaques tels que les valves, les végétations et les tissus prothétiques) (72).

De par leur coût global, les techniques moléculaires utilisées pour le diagnostic des EI (en particulier la PCR ADNr 16S) ne peuvent être réalisées systématiquement en première attention. L'utilité des techniques biomoléculaire dans le diagnostic des EI a été démontrée au cours des deux dernières décennies, en particulier pour identifier l'agent causal des endocardites certaines à hémocultures négatives, ainsi que pour affirmer ou infirmer une EI classée comme possible selon la classification de Duke (61,215,216). L'apport des techniques moléculaires ne doit pas faire oublier l'importance des hémocultures qui doivent être prélevées avant toute antibiothérapie devant toute suspicion d'EI. L'obtention de la bactérie en culture permet de déterminer la sensibilité de celle-ci à divers antibiotiques et de définir son profil de résistance acquise.

6.6.1. PCR universelle dans les EI

La plupart des études moléculaires publiées à ce jour pour détecter et identifier l'agent causal d'une EI sont basées sur l'amplification de l'ADNr 16S (166,182,184,216,217).

6.6.1.1. PCR ADNr 16S sur sang ou sur sérum

En théorie, dans le diagnostic des EI, la PCR universelle devrait être réalisée sur sang circulant car elle présenterait l'avantage de s'adresser à tous les patients, et notamment à ceux qui ne doivent pas subir de chirurgie valvulaire. Cependant, rares sont les auteurs à avoir essayé de l'appliquer aux EI ; Rothman et *al.* sur sang total (218), Gastelis et *al.* sur sérum (219).

Des techniques de PCR en temps réel sur sérum pour *C. burnetii* et *Bartonella* ont pu montrer une sensibilité comprise entre 58 et 65 % pour le diagnostic (15,190). En effet, la PCR sur sang total souffre tout particulièrement de son manque de sensibilité. Des faux négatifs par présence d'inhibiteurs dans le sang (héparine et hème) sont observés. De plus, elle ne permet pas d'affirmer que le pathogène retrouvé dans le sang est bien celui responsable *in situ* de l'EI.

Cette technique peut être limitée par la contamination du prélèvement sanguin lors de la réalisation du prélèvement, par une mauvaise asepsie cutanée ou par la présence de contaminants dans les tubes collecteurs à base d'EDTA ou dans les flacons de chlorhexidine.

6.6.1.2. PCR ADNr 16S sur valves cardiaques

C'est à Goldenberger et *al.* que l'on doit, la première publication concernant la PCR universelle ADNr 16S sur valves sur une série de patients atteints d'EI (217). Au vu de leurs résultats réalisée sur 18 patients présentant une EI, les auteurs concluaient que la PCR universelle était un outil prometteur chez les patients à culture négatives (hémocultures et cultures valvulaires), puisque permettant la détection de germes rares ou non cultivables.

Depuis, différentes séries ont comparé les performances de la PCR universelle à celles de l'histologie, de la culture valvulaire ou encore de l'examen direct. L'étude de Greub et *al.* portait sur deux groupes de patients : 127 cas d'EI et 118 cas sans EI (183) dans le but était d'évaluer la contribution de l'histologie, de la culture et de la biologie moléculaire sur valves dans le diagnostic d'EI. L'histologie est considérée comme la technique de référence du diagnostic d'EI chez les patients nécessitant une chirurgie. Grâce à leur étude, les auteurs ont confirmé que l'histologie est la technique de référence d'EI chez les patients nécessitant une chirurgie au vu de résultats obtenus avec une spécificité de 100 %, une valeur prédictive positive de 100 % et une sensibilité de 63 %. Le choix de la portion de valve à soumettre à l'anatomopathologie influence directement et fortement cette sensibilité, comme elle affecte d'ailleurs la sensibilité des autres techniques.

Selon Breitkopf et *al.* (220), la PCR présente une sensibilité trois fois plus élevée que la culture et l'examen direct par la coloration de Gram directement sur le prélèvement de valve cardiaque dans une série de 52 valves des patients suspects d'EI.

Roverly et *al.* ont montré la relation entre traitement et présence d'ADN bactérien (221). L'ADN bactérien a été retrouvé plus souvent chez 60 % des patients en cours de traitement que chez ceux ayant terminé leur traitement et la chirurgie. L'ADN est éliminé lentement du tissu valvulaire. Aucune corrélation entre la durée de la thérapie et présence d'ADN n'a été retrouvée. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle ils ne recommandaient pas la PCR pour suivre l'efficacité du traitement.

Certaines séries ont témoigné du fait que la PCR universelle permettait d'améliorer la prise en charge des patients. Ainsi, Gauduchon et *al.* en 2003 ont montré que la PCR sur valve, seule, a identifié dans trois cas l'agent causal, dans des contextes d'antibiothérapie préalable ou de bactéries non cultivables (182). Dans trois cas, elle a également contribué à redresser un diagnostic initialement erroné. De même, Podglajen et *al.* ont rapporté que la PCR universelle avait permis d'améliorer la prise en charge dans 19,6 % des cas d'EI certaines de leur étude. Cela concernait pour la majorité des EIHN. Pour exemple, l'identification de *S. gallolyticus* a conduit à la recherche d'une tumeur digestive qui s'est révélée positive. L'identification d'un *Lactobacillus crispatus*, au lieu de *S. agalactiae*, a amené à traiter une porte d'entrée dentaire. L'identification d'*Abiotrophia adjacens* au lieu d'un streptocoque du groupe C a incité le clinicien à prolonger l'antibiothérapie. De même, quatre cas de *Bartonella* ont été découverts grâce à la PCR, aboutissant à l'introduction de gentamicine et au prolongement du traitement.

Malgré une très bonne spécialité de la PCR universelle, il ne faut pas oublier qu'un résultat positif doit toujours être interprété dans son contexte clinique. C'est ce que soulignent Greub et *al.* qui retrouvent 18,7 % de faux positifs dans leur étude (183). Des résultats similaires ont été rapportés par Grijalva et *al.* (20 %) ou Gauduchon et *al.* (13 %).

6.6.1.3. PCR panfongique

Les techniques moléculaires reposent soit sur l'hybridation *in situ* en utilisant des sondes spécifiques, soit sur l'amplification par PCR des gènes codant pour des séquences conservées de l'ARN ribosomal des champignons (ARNr 18S, 28S et 5,8S), suivie de leur séquençage (222). L'amplification des régions situées entre les gènes de l'ARN ribosomal (appelées séquences intergéniques ribosomales) peut être utilisée pour typer les champignons au niveau de la sous-espèce (223). Les techniques de PCR ont montré un intérêt pour l'identification de champignons dans le sang (224) ou au sein de différents tissus.

Dans le cadre des EI fongiques, peu de travaux ont été effectués. Des cas d'EI à *C. albicans* (225,226) et *Aspergillus spp.* (226–229) ont été rapportés. Un cas d'EI à *Histoplasma capsulatum* a été identifié par hybridation *in situ* dans une valve cardiaque (230). Toutefois, les techniques d'hybridation *in situ* sont limitées par la faible densité de microorganismes au niveau des tissus analysés, rendant la sensibilité de la technique faible (230).

6.6.2. PCR spécifiques sur sang, sérum ou valves cardiaques

Nous nous intéresserons à certaines PCR spécifiques ciblant des germes pas ou peu cultivables, responsables d'EIHN. Certaines PCR ont été mises au point sur valves, et d'autres sur sérum ou sang total (*e.g.* détection de *Coxiella burnetii* par Rolain et *al.* lors d'épisodes de fièvre Q (231).

6.6.2.1. PCR *Bartonella spp*

La Scola et *al.* ont démontré que les gènes *gltA* et *rpoB* permettent d'obtenir une identification au niveau de l'espèce des bactéries du genre *Bartonella* (232). Dans le diagnostic rapide d'EI à *Bartonella*, Zeaiter et *al.* en 2003 ont évalué plusieurs techniques de PCR spécifique en temps réel sur sérum et les meilleurs résultats avec une spécificité de 100 % (avec une sensibilité de 58,1 %) ont été retrouvés avec une PCR en temps réel avec des amorces ciblant la riboflavine synthase codée par le gène *ribC* (233).

Lamas en 2003 a utilisé, dans le cadre d'une étude sur les EIHN, une PCR spécifique *Bartonella* sur les valves cardiaques pour confirmer cinq cas de sérologie positive à *Bartonella* spp. (176).

6.6.2.2. PCR *Coxiella burnetii*

Des PCR conventionnelles ont exploité des gènes cibles comme *htpAB*, *icd*, *comI* ou le gène de la transposase (séquence d'insertion *IS 11-11*) présent en multiples copies dans le génome de *C. burnetii*.

Fenollar et *al.* ont montré que la détection moléculaire de *C. burnetii* sur sérum avec une PCR en temps réel ciblant le gène *htpAB* était très spécifique (100 %) avec une sensibilité de 64 % (234).

Lepidi et *al.* ont identifié *C. burnetii* dans des valves cardiaques de patients atteints d'EIHN avec une PCR spécifique ciblant le gène *htpAB* dans 75 % des cas. Le moment du traitement semblait avoir un impact sur l'identification par PCR car *C. burnetii* était détectée dans plus de 80 % des valves excisées avant ou durant la première année de l'antibiothérapie contre 33,3 % après un an de traitement.

6.6.2.3. PCR *Tropheryma whipplei*

La PCR, en temps réel notamment, ciblant des séquences répétées a été développée grâce à la connaissance du génome de *T. whipplei* (71) et montre une amélioration de la sensibilité tout en conservant la spécificité (235).

La PCR Whipple été introduite depuis pour compléter l'examen anatomopathologique (189). Les études publiées sur les EI à *T. whipplei* insistent sur la nécessité, lors d'EIHN et à sérologies négatives, d'évoquer la possibilité d'une infection à cette bactérie, surtout quand une atteinte articulaire antécédente est retrouvée.

6.6.2.4. PCR *Mycoplasma pneumoniae*

En 2004, Fenollar et *al.* recommandaient aux cliniciens de bien considérer les mycoplasmes comme des agents responsables d'endocardite (67). En 2008, Scapini et *al.* ont décrit un cas d'EI à *M. pneumoniae* avec une PCR ciblant le gène *P1 cytoadhésine* négative sur sang total et sérum mais positive sur des colonies obtenues à partir d'un repiquage d'hémocultures sur milieu de Hayflick « maison » (64). La végétation de ce patient n'était pas disponible pour un diagnostic par PCR.

6.6.2.5. Autres PCR

Chlamydia pneumoniae sur valve (236)...

TRAVAIL PERSONNEL : ARTICLE

1 ***MALASSEZIA RESTRICTA*: AN UNDERDIAGNOSED CAUSATIVE AGENT OF BLOOD**
2 **CULTURE-NEGATIVE ENDOCARDITIS**

3
4

5 Linda HOUHAMDI-HAMMOU^{1*}, « author list in progress »

6

7 ¹ Laboratoire de Bactériologie. Institut des Agents Infectieux. Centre de Biologie Nord, Hospices
8 Civils de Lyon. Hôpital de la Croix Rouse. 103 grande rue de la Croix-Rousse. 69317 Lyon cedex
9 04.
10

11 ² Laboratoire de Parasitologie-Mycologie. Institut des Agents Infectieux. Centre de Biologie Nord,
12 Hospices Civils de Lyon. Hôpital de la Croix Rouse.
13

14 ³ Laboratoire d'Anatomo-Pathologie. Centre de Biologie Est, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils
15 de Lyon, Bron.
16

17

18 *Corresponding authors: lhouhamdi@yahoo.fr
19 francois.vandenesch@univ-lyon1.fr
20

21

22 Keywords: Infective Endocarditis, Negative Hemoculture Infective Endocarditis, Blood
23 Culture-Negative Endocarditis, fungal endocarditis, *Malassezia restricta*,
24 Diagnosis, Molecular biology, Grocott-Gomori methenamine silver,
25 autoimmunohistochemistry
26

27

28

29 Abbreviations: IE: Infective endocarditis. BCNE: Blood Culture-Negative Endocarditis.
30 CVC: central venous catheters
31

32 **ABSTRACT**

33 The fungal genus *Malassezia* (formerly known as *Pityrosporum*) comprises lipophilic lipid-
34 dependent yeast species that belong to the normal skin microbiota. They have been mainly
35 associated with benign dermatologic conditions, such as seborrheic dermatitis and pityriasis (tinea)
36 versicolor and dandruff. Noticeably, *M. furfur* has also been-associated with systemic disease in
37 premature infants, neonates in intensive care units and adults receiving intravenous parenteral
38 nutrition therapy. Here we describe three cases of *M. restricta* endocarditis diagnosed during a
39 retrospective molecular investigation of definite blood culture-negative endocarditis (BCNE) in a
40 University Hospital in Lyon, France.

41 **METHODS:** Cardiac valves and vegetations that were explanted from patients with definite
42 BCNE in a cardiac surgery hospital in Lyon from January 1, 2011 to December 31, 2015, had
43 bacterial and fungal DNA extracted. Microorganisms were identified by 16S and 18S PCR
44 sequencing using the Universal Microbe Detection kit (UMD; Molzym, Bremen, Germany). The
45 presence of *M. restricta* in cardiac samples was assessed by Grocott-Gromori and
46 autoimmunohistochemistry staining. Mannan serologic cross-reactions with *Candida albicans*
47 were performed by indirect immunofluorescence screening and immunoelectrophoresis
48 confirmation methods.

49 **RESULTS:** Microbial DNA was detected in all the 16 retrospective BCNE cases. While a
50 bacterial etiology was found in 13 cases (81.25%), the lipophilic lipodependant yeast *M. restricta*
51 was identified in the three (18.75%) other definite BCNE cases. For these three patients, *M.*
52 *restricta* was detected by both molecular technique and histopathologic staining of the excised
53 valves. All these three cases were health care associated in patients with indwelling catheters; two
54 of whom had occurred in severe malnutrition context requiring lipid-containing SmofKabiven®
55 parenteral nutrition. Interestingly, we have also detected a serological cross-reaction between *M.*
56 *restricta* and *C. albicans* anti-mannan antibodies.

57 **CONCLUSIONS:** We report here for the first time *M. restricta* as a causative agent of health care-
58 associated BCNE. Importantly, *M. restricta* infective endocarditis is underestimated and can be
59 serologically misdiagnosed as a *C. albicans* invasive infection due to serological cross-reaction.
60 This is of major therapeutic concern since echinocandins to which *M. restricta* is intrinsically
61 resistant, are one of the reference treatments of *C. albicans*-IE.

62

63

64

65 **Conflict of interest statement:** No conflict of interest.

66 **Financial support:** The research described in this manuscript was not supported by a specific
67 grant.

68

69 INTRODUCTION

70 Infective endocarditis (IE) occurs worldwide and is defined by the infection of a native or
71 prosthetic heart valve, the endocardial surface, or an indwelling cardiac device. Usually caused by
72 bacteria, rarely by fungi, IE is a poor-outcome infectious disease, fatal when left untreated (1).
73 Because treatment must be adapted to the etiologic agent, rapid identification is critical for
74 successful management (2).

75 Blood cultures, that are positive in more than 90% of cases, constitute the cornerstone of IE
76 microbiological diagnosis (3,4). When blood cultures remain negative, blood culture-negative
77 endocarditis (BCNE) is diagnosed with other tools (1,5). Serological testing is used for the
78 detection of fastidious agents, including *Coxiella burnetii*, *Bartonella* species, *Brucella* species,
79 *Legionella pneumophila*, and *Mycoplasma* species (2,6,7). Histological examination (8),
80 autoimmunohistochemistry (9) and broad-range polymerase chain reaction (PCR) can be applied to
81 explanted valvular tissues and vegetations (10,11). Although novel diagnostic and therapeutic
82 strategies have emerged, BCNE diagnosis remains challenging as highlighted by the 5.2% rate of
83 undocumented cases currently as reported by Cahill and Prendergas (1) and one-year IE mortality
84 has not improved and remains at 30%, which is worse than for many cancers (1).

85 In the last decades, the clinical, microbial and epidemiology of IE have noticeably changed. In
86 fact, the rate of health care-associated IE have increased as a consequence of medical progress
87 (12). Therefore, *Staphylococcus aureus* (13,14) and coagulase-negative staphylococci (14–17),
88 most often associated with health-care contact and invasive procedures, have overtaken
89 streptococci as the most common cause of the disease (16).

90 In our study, we evaluated in the context of BCNE, previously explored by a series of “in-
91 house” PCR, the contribution of the Universal Microbial Detection kit (UMD, Molzym, Bremen,
92 Germany) performed on resected cardiac tissue samples of patients who underwent valve surgery
93 at the University Hospital Center of Lyon, France, between 2011 and 2015. This biomolecular kit

94 allows the simultaneous detection of bacteria and fungi using a universal PCR approach, as
95 described elsewhere (18).

96 **CASE REPORTS (figure 1)**

97 **Patient N°1 (BCNE in 2011):** was a 66-year-old man (of a military career) with high blood
98 pressure history, an important not weaned-smoking (1.5 and 2 packages per day) and overweight
99 (body mass index of 25.6 kg/m²). Fifteen months (M-15) before the date of the heart surgery where
100 *M. restricta* was detected in the excited valve (T = 0), he had been operated for an aortic valvular
101 replacement by a mechanical St Jude prosthesis because of aortic insufficiency. The extracted
102 aortic valve was without histological IE signs. On time 0 (date of the heart surgery where *M.*
103 *restricta* was detected in the excited valve), he was admitted to the emergency ward for a cardiac
104 chart revealing a high grade paraprosthetic aortic insufficiency. Transthoracic echocardiography
105 (TTE) was negative but transesophageal echocardiography (TOE) found a marked aortic
106 insufficiency without any abscess, vegetation or paraprosthetic leakage. Surgical treatment was
107 performed with resection of the mechanical valve and placement of a new mechanical aortic
108 prosthesis. Histological examination of the valve concluded to an acute IE; however, the hospital
109 Endocarditis Team considered the scenario as an old and healed IE. Routine microbiological
110 analyses remained negative as well as in-house 16S rDNA PCR performed on the explanted
111 cardiac material. After this period the patient was lost of sight and six years later (Y+6), he was
112 hospitalized for cardio-respiratory arrest without warning signs. IE was suspected with 3 sets of
113 blood cultures growing *Staphylococcus epidermidis* and a *S. haemolyticus*, while TTE was not
114 contributive. Two days later, the patient became febrile (39°C) with an acute respiratory distress
115 episode and polypnia. The neurological evolution was unfavorable, confirmed by several
116 encephalographs. Therapeutics limitation was decided in a collegial staff and he died the same
117 evening. No autopsy was performed. Only one IE kit (combining a set of three blood culture pairs,
118 serological tests for *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. and *Brucella* spp.) was sampled during his
119 hospitalization in 2011 at T = 0, and none in 2017.

120 **Patient N°2 (BCNE in 2013):** was a 72-year-old female (body mass index of 19.9 kg/m²) with a
121 long medical and surgical history including multiple recurrence of breast adenocarcinoma, multiple
122 venous thrombosis episodes and a severe sepsis with methicillin-susceptible *Staphylococcus*
123 *aureus* bacteraemia and hepatic abscess complication five years (Y-5) before the date of the heart
124 surgery where *M. restricta* was detected in the exised valve (T = 0). Two months before (M-2), she
125 presented a left tempoparietal ischemic stroke and SmofKabiven® parenteral nutrition was started
126 for severe malnutrition (3 kg weight loss in 15 days). The TOE showed a massive aortic
127 insufficiency and an aortic valvular replacement was performed by a VASCUTEK ELAN
128 biological prosthesis. Only several scratching lesions were found in the upper right limb,
129 apparently because of insect bite. On T = 0, she was hospitalized for an aortic BCNE and the
130 previous ischemic stroke was considered as a cerebral embolization because a new TOE and a
131 large (9 mm) aorto-mitral trigone abscess. A splenic infarction was objectified by whole body scan.
132 Histological examination of the explanted valve was typical of IE diagnosis with inflammatory
133 infiltrates containing neutrophils, while valve culture and in-house PCR (*Staphylococcus* species
134 and 16S Universal) were negative. Two weeks later (W+2), the patient presented a myocardial
135 infarction with right coronary occlusion with sepsis and had empiric caspofungin therapy. One
136 month following day 0 (M+1), the patient experienced an undocumented septic shock, with an
137 extrapyramidal syndrome, loss of deambulation, aphasia, confusion with appearance of a
138 hypodermic indurated nodule of the right flank. While its routine bacteriological, mycobacterial
139 and *Nocardia* analyses were negative, histological analysis showed a subacute inflammatory lesion
140 with the presence of a lipophagic granuloma of the hypodermis with an inflammatory infiltrate and
141 without sign of malignancy. Two months following day 0 (M+2) a new TOE showed a thickening
142 of 10 mm at the posterior part of the aortic ring. HIV serology and immune exploration were
143 performed to explore the recurrent sepsis but remained negative. Six months following the heart
144 surgery (M+6), therapeutic limitation was decided due to management difficulties of the recurrent
145 sepsis related to the chronic undocumented IE and the contra-indication of surgery due to a notable

146 alteration of the patient general health status. Four days later, she had another sepsis episode and
147 died the morning next. Autopsy was not performed. Two IE kits were sampled during her
148 hospitalization in 2013.

149 **Patient N°3 (BCNE in 2015):** was a 42-year-old female with an overweight (body mass index of
150 26.8 kg/m²). Ten months (M-10) before the date of the heart surgery where *M. restricta* was
151 detected in the excised valve (T = 0), she had a double aortic and mitral valvular replacement by
152 biological valve for aorto-mitral valvulopathy of rheumatic origin and *Streptococcus anginosus*-IE.
153 Three months later (M-7), she presented with an ischemic stroke and the TOE showed two
154 vegetations (12-14 and 6 mm) on the mitral valve which led to biological mitral valve replacement.
155 At that time, she had a sacral and scalp eschars and SmofKabiven®-parenteral nutrition for a
156 severe denutrition (9 kg weight loss in 2 months). On day 0, TOEs showed vegetations on the
157 mitral valve and the persistence of the 2 images appended to the ring of the mitral prosthesis
158 increasing in size (14 and 9 mm) without paraprosthetic mitral insufficiency with surgical
159 indication for the 3rd mitral valve replacement by a Tridux biological valve. The histological
160 analysis confirmed the IE diagnosis. New Grocott performed on new sections and in-house PCR
161 (16S, mycobacteria, *Bartonella* and Whipple realized on several tissue fragments) performed on
162 the excised valve remained negative. At that time, multiple (cerebral, renal and splenic) systemic
163 embolisms occurred under large antibiotic therapy. No source infection was found and the two
164 eschars were still present. Three months later (M+3), a new TOE showed an increase in the size of
165 previously described vegetation (16 mm) with a new vibrating image (4 mm). In this context, the
166 “Endocarditis Team” of the Lyon Hospital decided to add Caspofungin, which was modified four
167 days later by Amphotericin B combined to 5-fluorocytosine in addition to the antibiotic therapy
168 already used. At that date, eschars were always present. One month later (M+4), a new TOE
169 control showed the complete disappearance of vegetation images. The patient was asymptomatic,
170 had a clear improvement of general health status without sign of cardiac dysfunction, and the
171 cutaneous lesions healed. The “IE Team” decided to stop antibiotics and maintain a prolonged

172 antifungal therapy by fluconazole alone. A new TOE control performed two months following the
173 fluconazole onset showed absence of argument in favor of mitral bioprosthesis vegetation. Four IE
174 kits were sampled during her hospitalization.

175

176 **MATERIALS AND METHODS**

177 *Case definition and patient population.*

178 We evaluated, retrospectively, the patients who had undergone surgery for endocarditis at Louis
179 Pradel Hospital, Lyon, France (Figure 2) from January 1st, 2011 to December 31th, 2015. Patients
180 were considered to have definite blood culture–negative endocarditis (BCNE) if the results of
181 standard blood cultures were negative and if clinical and echocardiographic findings met the Duke
182 Endocarditis Service criteria for the diagnosis of IE with positive histopathologic analysis on the
183 resected heart valves (3). We retrospectively included 16 of the 171 patients with suspected BCNE.
184 Clinical information of each patient was retrieved from patient’s hospital charts. Demographic
185 data, medical history, time of disease occurrence, clinical symptoms at presentation,
186 echocardiographic signs, the valve type, the types of lesions observed during surgery,
187 histopathological observations, antibiotic treatment, outcomes as well as neoplastic or auto-immune
188 diseases were compiled. Thirteen patients with IE positive histological analysis and negative
189 microbiological laboratory routine diagnosis methods were included, in addition to three patients
190 with negative histological analysis but with definite IE according to DUKE criteria (clinical
191 context and echocardiography). These routine methods included blood-cultures incubated 14 days,
192 *Coxiella burnetii*, *Bartonella* and *Brucella* bacterial serologies and in-house PCR performed on
193 resected valves.

194 *16S and 18S rDNA molecular detection analysis.*

195 Microbial DNA was extracted from surgically excised heart valves, and the right flank nodule
196 of patient N°2, using Universal Microbial Detection kit (UMD, Molzym, Bremen, Germany). This
197 biomolecular kit allows the simultaneous detection of bacterial and fungal DNA by a universal

198 (16S and 18S) PCR approach. Heart-valve samples were stored at -80°C after performing routine
199 analyses. Molecular investigations were performed under UV-decontaminated laminar flow and
200 PCR cabinets with standard precautions to avoid DNA contamination. First heart valve portion was
201 cut into small fragments and microbial DNA was extracted according to the protocol supplied by
202 the manufacturer (UMD, Molzym, Bremen, Germany). Amplicons from positive reactions were
203 first purified using MinElute PCR Purification kit (Qiagen, France) before sequencing according to
204 the manufacturer instructions. Bacterial identification was performed by analyzing the obtained
205 16S sequences using “lebibi Quick BioInformatic Phylogeny of Prokaryotes”, a software
206 environment for sequence-based phylogenetic identification of prokaryotes ([https://umr5558-](https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi)
207 [bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi](https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi)) (19). In brief, the method involves a conventional
208 phylogenetic approach combining a supervised consensus extraction from the chromatograph, the
209 construction of an ad hoc reference data set, alignment, selection of the best evolution model, and
210 phylogenetic reconstruction by using a maximum likelihood method (20). Fungal identification
211 was performed by comparison of the 18S UMD sequences, according to the manufacturer
212 instructions (18) and a pair of universal fungal primers *NL1*
213 (*GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG*)/*NL4* (*GGTCCGTGTTTCAAGACGG*) targeting the
214 D1/D2 domain of the 26S DNA (21) using both BLAST software (version 2.0; National Center for
215 Biotechnology Information; available at: <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) (22) and CBS
216 (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICSSequences.aspx?file=all>) databases. This 26S
217 rDNA region is sufficiently variable to allow reliable separation of all known clinically significant
218 yeast species (21). Four valve samples from patients with excluded IE were used as negative
219 controls and three valves of definite IE (two with *Staphylococcus aureus* with positive blood-
220 culture and with CoNS identified by PCR-sequencing, and one with *Tropheryma whipplei* also
221 identified by PCR) were used as positive controls, in addition to the positive and negative controls
222 included in the UMD kit.

223 ***Histological and autoimmunohistochemical (auto-IHC) detection.***

224 As described previously (8), 3-5 μm thickness section were prepared from formalin-fixed,
225 paraffin-embedded excised heart valves from the three patients and the nodule of the right flank for
226 patient N°2. These sections were stained with Grocott-Gomori methenamine silver (GMS) staining
227 and auto-IHC was performed as described previously (9). In brief, each section was incubated with
228 patient's own serum, diluted to 1:100, 1:500 and 1:2000, as the primary source of antibodies. The
229 immunohistologic procedure was performed using a goat secondary antibody directed against
230 human IgG (Fc fragment specific) conjugated to peroxidase (SIGMA-ALDRICH®, MO, USA)
231 diluted to 1:100 and 1:200. For each tissue section, negative and positive controls were performed
232 using the patient serum of an excluded IE and a *Staphylococcus aureus*-IE, respectively.

233 ***Serological analysis.***

234 Only patient N°3 had a *C. albicans* serology prescribed during her hospitalization, which was
235 positive. Therefore, we assessed the potential cross-reactivity for both antigens (Ag) and antibodies
236 (Ab) between *C. albicans* and serum of the three patients (remaining conserved at -20°C from
237 routine blood sampling). Patient N°1 had only one available sampled serum, whereas patient N°2
238 had two, and patient N°3 had four (table 1). The presence of *C. albicans* mannan Ags was assessed
239 by quantitative immunoenzymatic assay using SERION ELISA® antigen *Candida* kit (Institut
240 Virion-Serion, GmbH, Würzburg, Germany), according to the manufacturer's instructions. The
241 presence of Abs was determined simultaneously by screening and confirmation testings. The
242 screening test was performed by indirect immunofluorescence (IFI) using the routine in-house
243 technical protocol demonstrating the binding of the patient Abs (serum diluted to 1/20) on a *C.*
244 *albicans* suspension Ag by means of a fluorescent conjugate (anti-IgG human antiglobulins labeled
245 with fluorescein isothiocyanate). In addition to internal controls, positive and negative controls
246 were used. The confirmation test was performed by immunoelectrophoresis (IEP), as described
247 previously by Graber and Williams (23). In brief, the antigenic proteins separated by
248 electrophoresis in an alkaline medium (pH 8.6) were then immunoprecipitated by the Ab contained

249 in the patient serum to be analyzed and then stained with an acid violet solution, whose excess is
250 eliminated in an acid medium.

251 *Ethics Committee Approval.*

252 According to French law and the Helsinki declaration, this retrospective observational study did
253 not require local institutional review board approval.

254

255 **RESULTS**

256 *Study population and study design.*

257 Flow chart (figure 2).

258 *Molzym molecular detection analysis.*

259 Sixteen cases out of 16 (100 %) were positive. All controls run with each series of experiments
260 (internal, positive, and negative PCR controls) yielded the expected results. Thirteen out of 16
261 cases (81.25%) were 16S-PCR positive and 18S-PCR negative, with bacterial etiology compatible
262 with the IE diagnosis. and the presumed portal of entry based on clinical records. The etiology was
263 monobacterial in five cases: *Enterococcus cecorum*, *Moraxella* spp., *Streptococcus cristatus* and
264 two cases of *Streptococcus mitis*. And it was bacterial coinfection in the other eight patients:
265 *Abiotroiphia defectiva-Neisseria pharyngia* coinfection for one patient, *Streptococcus sineusis-S.*
266 *oligofermentas* for one patient, *Enterococcus faecalis-E. cecorum* for one patient, *Streptococcus*
267 *Oral Taxon-Neisseraia subflava/sicca* coinfection for one patient and *Streptococcus Oral Taxon-S.*
268 *oralis* for four patients. For three patients, the pathologic examination of the valve was not in favor
269 of an IE, but they were included because of the clinical and echocardiographic context. It is known
270 that histological techniques lack sensitivity in the diagnosis of IE, and this may be related mainly
271 to the fragment used to perform these histological analyzes.

272 The three other cases (18.75%) were 18S-positive with *Malassezia restricta* for three patient
273 N°1, 2 and 3. For patient N°2, the same *M. restricta* DNA sequence was also found in her right
274 flank nodule observed one month before her death. Routine, mycobacteria and *Nocardia* culture
275 and 16S rDNA, mycobacteria and *Nocardia* PCR were negative. The histological analysis
276 performed on this nodule was compatible with a *Malassezia* pathological lesion showing a
277 subacute inflammatory lesion with presence of lipophagic granuloma on the hypodermis,
278 associated to an inflammatory infiltrate of numerous polynuclear neutrophils, lymphocytes and
279 histiocytes, without sign of malignancy. On two different tissue fragments, 16S-PCR was negative
280 while 18S-PCR was positive with *M. restricta*.

281 ***Histological and auto-IHC detection of M. restricta in tissues.***

282 Histological techniques were compatible with the presence of *M. restricta* in the cardiac valves
283 from the three patients and in the right flank nodule of patient N°2 (figure 4D). For patients N°1
284 and 2 (figures 3E, 4A and 4B), histological examination using GMS staining of the infected valve
285 was positive. For patient N°1, single rounded or oval yeast-form cells of 2 to 3 µm on long axis
286 were observed (figure 3E). For patient N°2 multiple short unbranched mycelial
287 filaments/pseudohyphae disclosing the invasive character of the yeast, as described elsewhere (24)
288 were observed in her infected heart valve (figures 4A and 4B), with some budding yeasts have
289 been observed (figure 4B).

290 For the auto-IHC, positive reaction with patients' own serum diluted to 1:500 and 1:2000 was
291 observed with the 1:200 dilution of the secondary antibody in valve tissues (figures 3H and 4C)
292 and right flank nodule of patient N°2 (figure 4D).

293 ***Serological cross-reactions between patient sera with C. albicans*** (table 1 and figure 1).

294 No cross-reaction with mannan Ag was detected for the three patients using the SERION
295 ELISA® antigen *Candida* test. However, except with patient N°1, patient N°2 and 3 sera cross-
296 reacted with *C. albicans* Ab with both IFI screening and IEP confirmation testing. For patient N°1,
297 the serological kinetic for Ag and Ab was not possible to assess as only one sample was available.
298 For patient N°2, this serology was negative two months before the heart surgery (M-2) and weakly
299 positive the date of heart surgery (T = 0). For patient N°3, IFI screening Ab was negative seven
300 months before the surgery (M-7), became weakly positive where the heart surgery was performed
301 and subsequently positive three months following the surgery (M+3) and negative four months
302 following the surgery (M+4) when patient was under amphotericin B-fluorocytosin treatment.

303 DISCUSSION

304 In this study, we report the first three adult cases of BCNE caused by *Malassezia restricta*,
305 which, to our knowledge, has not previously been reported.

306 Human pathogens belonging to the genus *Malassezia* (previously known as *Pityrosporum*) are
307 lipophilic lipo-dependent yeasts belonging to the class of Basidiomycetes. They were distinguished
308 from ringworm in 1874 by Louis-Charles Malassez, who described the skin lesions as
309 “furfuraceous” or consisting of flaky particles (25). These fungi lack the ability to synthesize
310 medium and long chain fatty acids and therefore require an exogenous source of these lipids,
311 provided by the sebaceous glands for their growth (26). *Malassezia* species are part of the normal
312 human skin microbiota (27) and *M. restricta*, *M. globosa* and *M. sympodialis* are the most often
313 isolated on human skin. At first, they were best known as fungi of low pathogenicity responsible of
314 superficial cutaneous infections such as pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis, folliculitis and
315 atopic dermatitis. However, their clinical spectrum, involving mainly *M. furfur*, has expanded
316 drastically over the last decades since the original 1981 report of a *Malassezia* fatal pulmonary
317 vasculitis in a premature infant who was receiving total parenteral nutrition via an indwelling
318 central venous catheters (CVC) (28). Today, at least 50 case reports have identified primarily *M.*
319 *furfur*, and secondarily *M. pachydermatis*, as emerging systemic pathogen most frequently in
320 neonates receiving parenteral lipids (29–42) but only a few in adults (38–48). Systemic infections
321 can result in peritonitis (49), pulmonary vasculitis (28), bronchopneumonia (36,50) or pneumonia
322 (51). Despite these larger number of cases of systemic *Malassezia* infections, only four cases were
323 reported to have either endocardial or intracardiac involvement in infants (34,52). In adults, the
324 only reported case of *M. furfur* sepsis with cardiac involvement (fungemia complicated by a
325 pedunculated septic thrombus arising from the superior vena cava and extending into the right
326 atrium) was described, in 2000, in a 45-year-old woman with a history of Crohn’s disease and
327 multiple abdominal surgeries which required long-term total parenteral nutrition with lipids via an
328 indwelling central venous catheter (53).

329 To allow early and rational use of antifungals and to limit the mortality of invasive fungal
330 diseases, it is necessary to prove the reality of the invasive fungal infection. Biologically, this
331 remains difficult, especially for fastidious fungi such as *Malassezia*. Because of their low
332 pathogenicity, *Malassezia* spp. can be mistakenly considered as a contaminant when they are
333 detected (by culture or PCR) in human clinical samples. In our study, we analyzed 23 cardiac valve
334 specimens using UMD Universal molecular kit that allows microbial DNA extraction and
335 amplification (bacteria and fungus) after removing human nucleic acids. Beside the specimens used
336 as positive controls, most of these specimens had been previously investigated by conventional in-
337 house PCR and remained negative. We first found *M. restricta* only in these three valves which is
338 not in favor of DNA contamination as none of the 20 other performed 18S rDNA PCRs was
339 positive, including three definite IE (two caused by *Staphylococcus aureus* and one by
340 *Tropheryma whipplei*) used as positive controls, four excluded IE valves used as negative controls
341 and the 13 bacterial-BCNE tested cases. Invasive fungal diseases (IFD) are classified as “proven,”
342 “probable” and “possible” and their definitions were revised in 2008 (54). “Proven IFD” requires
343 proof of yeast presence by demonstration of fungal elements in diseased tissue either by histo- or
344 cytopathologic microscopic analysis using specific staining (Grocott-Gomorri methenamine silver
345 (GMS) or periodic acid Schiff (PAS)) or by culture (from sterile material or blood) (54). In absence
346 of fungal culture, histopathologic evaluation may be the only means of establishing the diagnosis
347 of IFD and constitutes the gold standard for the IE diagnosis. GMS staining is useful for screening
348 tissue sections containing small numbers of fungi because it provides excellent contrast and usually
349 stains fungi more intensely than the PAS reaction procedures. In our study, histological routine
350 examination revealed neutrophil infiltrates consistent with IE diagnosis for the three patients, and
351 for patient N°2 in the right flank nodule (figure 4D). GMS and auto-IHC staining were also
352 positive (figures 3 and 4).

353 Invasive infections caused by *Malassezia* spp. are certainly underdiagnosed, mainly in adults,
354 and therefore often untreated (55). Underdiagnosis reasons are multiples. Firstly, *M. furfur*

355 symptoms are nonspecific, with fever often as the only manifestation (56). Secondly, *Malassezia*
356 spp. does not grow on routine (blood or agar) culture media unless it is supplemented with fatty
357 acids, such as sterile olive oil (57). To rule out *Malassezia* spp. as the etiologic agent, it must be
358 specifically sought (48). The high rate of *Malassezia* spp. colonization of adult skin, approaching
359 100% in several studies (26,58–61), the common use of total parenteral nutrition with lipids in
360 some categories of patients (neonates, immunocompromised...) (56) emphasize the need to actively
361 search for those infections in routine practices.

362 Although the exact mechanism of catheter-related sepsis due to *Malassezia* spp. is still
363 unknown, many hypotheses endure. The most likely source of infection is the skin of the patient or
364 the health-care provider, which might contaminate the indwelling central venous catheters
365 (34,35,56). As the vast majority of central line infections are thought to be derived from a skin-to-
366 catheter-to-vein route of infection (62), it is not surprising that skin-site colonization precedes and
367 predicts most central line infections (63). Moreover, it has been reported that the samples taken
368 from the indwelling line will likely have a higher *Malassezia* spp. yield than those from peripheral
369 draws (56). However, occasionally such colonization will have no clinical consequences in infants
370 (34). Another hypothesized infection sources include contamination of the infused emulsions or
371 migration from the skin into the catheter (35).

372 Currently, it is well known that the etiology of true culture-negative IE varies with specific risk
373 factors, in addition to geography and epidemiology, for *Coxiella burnetii*, *Bartonella* species,
374 *Brucella* species and *Tropheryma whipplei* (2,17,64). Based on literature review, *Malassezia*
375 systemic infection constituted a health care-associated infection (hospital-acquired) and specific
376 risk factors were parenteral nutrition via an indwelling catheters (51,64). In our study, *M. restricta*
377 BCNE was also health care-associated. It occurred after surgical valvular replacement (two aortics
378 and one mitral), concomitant/or following the use of broad spectrum antibiotic combinations (in
379 the three cases), aggravated by SmofKabiven® parenteral nutrition administered following severe
380 malnutrition and weight loss (in two cases) with presence of catheterization used for parenteral

381 and/or intravenous antibiotic therapies (in the three cases). In the three cases, *M. restricta*-IE was
382 revealed by neurological disorders following embolization. However, as with the patient N°1 who
383 had not received a parenteral nutrition, a case of recurrent episodes of sterile peritonitis on
384 continuous ambulant peritoneal dialysis without parenteral nutrition has already been reported (49).
385 Thus, parenteral nutrition seems not to be the unique portal of entry for *Malassezia* systemic
386 infection.

387 Fungal endocarditis is fatal if left untreated. Successful management of these infections requires
388 the identification of the fungus and the use of appropriate antifungal. *Malassezia* species are
389 susceptible to amphotericin B (48,53) and triazoles antifungal (36), but intrinsically resistant to
390 echinocandins as all Basidiomycetes (65,66). In addition to an effective antifungal regimen, the
391 intravenous catheter must be removed (34–36,53). Currently, high-dose echinocandins are the first-
392 line agents for the treatment of *Candida* endocarditis in the North American and British guidelines
393 (67,68). However, Schleman *et al.* reported that optimal treatment for *M. furfur* fungemia in adults
394 was unclear. In fact, surgical debridement was required in addition to the amphotericin-B therapy
395 and the catheter removal for cure of a *M. furfur* adult fungemia with cardiac involvement. Two
396 cases had their central lines removed, and both recovered, however, three patients whose parenteral
397 lipids were simply discontinued also recovered. Of the three adults who received amphotericin B in
398 addition to stopping the lipid nutrition, one had persistent fungemia and died of a cardiac arrest,
399 and the two other patients—who were treated with amphotericin B died of their underlying diseases
400 while leaving the CVC in place. The patient who did not have an indwelling catheter and did not
401 receive lipid infusions was also treated with amphotericin B and did recover (53). In our study,
402 except patient N°1 who was lost of sight, the two others were treated with antifungal therapy.
403 Patient N°2 who was receiving SmofKabiven® parenteral nutrition died from recurring
404 undocumented IE sepsis under caspofungin therapy and large spectrum antibiotherapy. One month
405 before her death, a right flank nodule containing *M. restricta* was observed. Autopsy was not
406 performed. Favorable clinical evolution was observed for patient N°3 under amphotericin B and 5-

407 fluorocytosine antifungal association switched by fluconazole. At her follow-up visit 3 months
408 following the antifungal therapy onset, the patient continued to show clinical improvement without
409 infection signs, confirmed by TOE.

410 The serological diagnosis of candidiasis is based on the detection of mannan antigens and anti-
411 mannan antibodies. Due to a similarity of mannan antigens among yeasts, cross-reactivity between
412 *Candida albicans* antibodies examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and *M.*
413 *furfur* has been previously reported (69). In our study, no cross-reaction in *C. albicans* mannan
414 antigens detection was observed for our three patients (table 1). However, the sera from patient
415 N°2 and 3 produced a positive antibodies reaction with *C. albicans* antibodies using both IFI
416 screening and immune-electrophoresis confirmation testing (table 1). This cross-reactivity between
417 *C. albicans* and *Malassezia* anti-mannan antibodies has a major impact on medico-therapeutic
418 management of the patients, particularly with regard to the use of echinocandins, as was the case
419 for patient N°2. Echinocandins are, currently, one of the reference treatments for *C. albicans*-IFD,
420 including IE (67,68,70,71), however, they are inactive on *Malassezia* (intrinsic resistance). Indeed,
421 in our cohort, except patient N°1 who was lost to follow-up, the other two patients had antifungal
422 therapy. Patient N°2 who received parenteral nutrition SmofKabiven® died of recurrent
423 undocumented sepsis under caspofungin and broad-spectrum antibiotic therapies. However, a
424 favorable clinical and echocardiographic evolution was observed for patient N°3 treated by
425 amphotericin B and 5-fluorocytosine association modified subsequently by fluconazole. During her
426 control visit, three months following the start of the antifungal therapy, this patient was completely
427 improved clinically without any sign of infection as confirmed by TOE.

428 In conclusion, our three cases highlight that *M. restricta* is an underdiagnosed causative agent of
429 adult BCNE. *M. restricta*-BCNE is health care-associated with a cutaneous source of infection,
430 occurring after a valvular replacement history in patients having catheters, receiving a large
431 spectrum antibiotic drugs with or without-parenteral therapy. In these three cases, *M. restricta*-
432 BCNE was revealed by neurological embolic complications and TOE was the test of choice for its

433 echocardiographical diagnosis. Its identification was possible through PCR analysis and Grocott-
434 stained histological analysis from excised valves. The strong association between *M. restricta* and
435 BCNE demands specific attention to its diagnosis. It seems appropriate to include GMS staining,
436 specific *Malassezia* spp. culture and 18S panfungal PCR in improved algorithms for BCNE
437 diagnosis. This will allow to determine the true incidence and impact of this fungal pathogen. As
438 echinocandins are more and more used in IE settings, *Malassezia* IE diagnosis remains of most
439 importance considering its intrinsic resistance to candins. Treatment regimen generally consists of
440 amphotericin B or azoles associated with flucytosine. Associated measures should include possible
441 removal of intra-venous lines, discontinuation of parenteral nutrition when present and possibly
442 surgical debridement.

443

444 **REFERENCES**

- 445 1. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *Lancet*. 2016;387(10021):882- 93.
- 446 2. Fournier P-E, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta J-P, Arzouni J-P, et al. Comprehensive diagnostic
447 strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect*
448 *Dis*. 2010;51(2):131- 40.
- 449 3. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke
450 criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000;30(4):633- 8.
- 451 4. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke
452 criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000;30(4):633- 8.
- 453 5. Houpikian P, Raoult D. Diagnostic methods. Current best practices and guidelines for identification of
454 difficult-to-culture pathogens in infective endocarditis. *Cardiol Clin*. 2003;21(2):207- 17.
- 455 6. Raoult D, Casalta JP, Richet H, Khan M, Bernit E, Rovey C, et al. Contribution of systematic serological
456 testing in diagnosis of infective endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5238- 42.
- 457 7. Houpikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis
458 of 348 cases. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(3):162- 73.
- 459 8. Lepidi H, Durack DT, Raoult D. Diagnostic methods current best practices and guidelines for histologic
460 evaluation in infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am*. 2002;16(2):339- 361, ix.
- 461 9. Lepidi H, Coulibaly B, Casalta J-P, Raoult D. Autoimmunohistochemistry: a new method for the
462 histologic diagnosis of infective endocarditis. *J Infect Dis*. 2006;193(12):1711- 7.
- 463 10. Greub G, Lepidi H, Rovey C, Casalta J-P, Habib G, Collard F, et al. Diagnosis of infectious endocarditis
464 in patients undergoing valve surgery. *Am J Med*. 2005;118(3):230- 8.
- 465 11. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, et al. Molecular
466 diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and
467 sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86(4):195- 202.
- 468 12. Thuny F, Grisoli D, Cautela J, Riberi A, Raoult D, Habib G. Infective endocarditis: prevention, diagnosis,
469 and management. *Can J Cardiol*. 2014;30(9):1046- 57.
- 470 13. Federspiel JJ, Stearns SC, Peppercorn AF, Chu VH, Fowler VG. Increasing US rates of endocarditis with
471 *Staphylococcus aureus*: 1999-2008. *Arch Intern Med*. 2012;172(4):363- 5.
- 472 14. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Chirouze C, lung B, et al. Preeminence of
473 *Staphylococcus aureus* in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. *Clin Infect Dis*.
474 2012;54(9):1230- 9.
- 475 15. Benito N, Miró JM, de Lazzari E, Cabell CH, del Río A, Altclas J, et al. Health care-associated native
476 valve endocarditis: importance of non-nosocomial acquisition. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):586- 94.
- 477 16. Duval X, Delahaye F, Alla F, Tattevin P, Obadia J-F, Le Moing V, et al. Temporal trends in infective
478 endocarditis in the context of prophylaxis guideline modifications: three successive population-based
479 surveys. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(22):1968- 76.

- 480 17. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, et al. Clinical presentation, etiology,
481 and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on
482 Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Arch Intern Med.* 2009;169(5):463- 73.
- 483 18. Kühn C, Disqué C, Mühl H, Orszag P, Stiesch M, Haverich A. Evaluation of commercial universal rRNA
484 gene PCR plus sequencing tests for identification of bacteria and fungi associated with infectious
485 endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):2919- 23.
- 486 19. Devulder G, Perrière G, Baty F, Flandrois JP. BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *J Clin
487 Microbiol.* 2003;41(4):1785- 7.
- 488 20. Ramulu HG, Groussin M, Talla E, Planel R, Daubin V, Brochier-Armanet C. Ribosomal proteins: toward
489 a next generation standard for prokaryotic systematics? *Mol Phylogenet Evol.* 2014;75:103- 17.
- 490 21. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on
491 nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol.*
492 1997;35(5):1216- 23.
- 493 22. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a
494 new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389- 402.
- 495 23. Graber, P. Williams, C.A. (1955) Methode immuno-electrophoretique d'analyse de milianges de
496 substances antigeniques. *Biophys. Acta*, 17, 67-74.
- 497 24. Huerre M, Michiels JF and Pierre C. Histopathological diagnosis of parasitoses and mycoses, Book.
498 2002, 164 pages.
- 499 25. Malassez L. Note sur le champignon du pityriasis simplex. *Arch Physiol Norm Pathol* 1874; 2:451–464.
- 500 26. Faergemann J, Fredriksson T. Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. *Acta Derm
501 Venereol.* 1980;60(6):531- 3.
- 502 27. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and
503 bacterial communities in human skin. *Nature.* 2013;498(7454):367- 70.
- 504 28. Redline RW, Dahms BB. *Malassezia* pulmonary vasculitis in an infant on long-term Intralipid therapy.
505 *N Engl J Med.* 1981;305(23):1395- 8.
- 506 29. Hassall E, Ulich T, Ament ME. Pulmonary embolus and *Malassezia* pulmonary infection related to
507 urokinase therapy. *J Pediatr.* 1983;102(5):722- 5.
- 508 30. Powell DA, Aungst J, Snedden S, Hansen N, Brady M. Broviac catheter-related *Malassezia furfur* sepsis
509 in five infants receiving intravenous fat emulsions. *J Pediatr.* 1984;105(6):987- 90.
- 510 31. Prober CG, Ein SH. Systemic tinea versicolor, or how far can *furfur* go? *Pediatr Infect Dis.*
511 1984;3(6):592.
- 512 32. Long JG, Keyserling HL. Catheter-related infection in infants due to an unusual lipophilic yeast--
513 *Malassezia furfur*. *Pediatrics.* 1985;76(6):896- 900.
- 514 33. Dankner WM, Spector SA. *Malassezia furfur* sepsis in neonates. *J Pediatr.* 1985;107(4):643- 4.
- 515 34. Alpert G, Bell LM, Campos JM. *Malassezia furfur* fungemia in infancy. *Clin Pediatr (Phila).*
516 1987;26(10):528- 31.

- 517 35. Marcon MJ, Powell DA. Epidemiology, diagnosis, and management of *Malassezia furfur* systemic
518 infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1987;7(3):161- 75.
- 519 36. Tragiannidis A, Bisping G, Koehler G, Groll AH. Minireview: *Malassezia* infections in
520 immunocompromised patients. *Mycoses*. 2010;53(3):187- 95.
- 521 37. Arendrup MC, Fisher BT, Zaoutis TE. Invasive fungal infections in the paediatric and neonatal
522 population: diagnostics and management issues. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(7):613- 24.
- 523 38. Dankner WM, Spector SA, Fierer J, Davis CE. *Malassezia* fungemia in neonates and adults:
524 complication of hyperalimentation. *Rev Infect Dis*. 1987;9(4):743- 53.
- 525 39. Redline RW, Redline SS, Boxerbaum B, Dahms BB. Systemic *Malassezia furfur* infections in patients
526 receiving intralipid therapy. *Hum Pathol*. 1985;16(8):815- 22.
- 527 40. Arnow PM, Kushner R. *Malassezia furfur* catheter infection cured with antibiotic lock therapy. *Am J*
528 *Med*. 1991;90(1):128- 30.
- 529 41. Middleton C, Lowenthal RM. *Malassezia furfur* fungemia as a treatable cause of obscure fever in a
530 leukemia patient receiving parenteral nutrition. *Aust N Z J Med*. 1987;17(6):603- 4.
- 531 42. Wurtz RM, Knospe WN. *Malassezia furfur* fungemia in a patient without the usual risk factors. *Ann*
532 *Intern Med*. 1988;109(5):432- 3.
- 533 43. Garcia CR, Johnston BL, Corvi G, Walker LJ, George WL. Intravenous catheter-associated *Malassezia*
534 *furfur* fungemia. *Am J Med*. 1987;83(4):790- 2.
- 535 44. Barber GR, Brown AE, Kiehn TE, Edwards FF, Armstrong D. Catheter-related *Malassezia furfur*
536 fungemia in immunocompromised patients. *Am J Med*. 1993;95(4):365- 70.
- 537 45. Gidding H, Hawes L, Dwyer B. The isolation of *Malassezia furfur* from an episode of peritonitis. *Med J*
538 *Aust*. 1989;151(10):603.
- 539 46. Myers JW, Smith RJ, Youngberg G, Gutierrez C, Berk SL. Fungemia due to *Malassezia furfur* in patients
540 without the usual risk factors. *Clin Infect Dis*. 1992;14(2):620- 1.
- 541 47. Brooks R, Brown L. Systemic infection with *Malassezia furfur* in an adult receiving long-term
542 hyperalimentation therapy. *J Infect Dis*. 1987;156(2):410- 1.
- 543 48. Bhargava P, Longhi LP. Images in clinical medicine. Peripheral smear with *Malassezia furfur*. *N Engl J*
544 *Med*. 2007;356(24):e25.
- 545 49. Wallace M, Bagnall H, Glen D, Averill S. Isolation of lipophilic yeast in « sterile » peritonitis. *Lancet*.
546 1979;2(8149):956.
- 547 50. Gueho E, Simmons RB, Pruitt WR, Meyer SA, Ahearn DG. Association of *Malassezia pachydermatis*
548 with systemic infections of humans. *J Clin Microbiol*. 1987;25(9):1789- 90.
- 549 51. Baker RM, Stegink RJ, Manaloor JJ, Schmitt BH, Stevens JC, Christenson JC. *Malassezia* Pneumonia: A
550 Rare Complication of Parenteral Nutrition Therapy. *J Parenter Enteral Nutr*. 2016;40(8):1194- 6.
- 551 52. Shek YH, Tucker MC, Viciano AL, Manz HJ, Connor DH. *Malassezia furfur*--disseminated infection in
552 premature infants. *Am J Clin Pathol*. 1989;92(5):595- 603.

- 553 53. Schleman KA, Tullis G, Blum R. Intracardiac mass complicating *Malassezia furfur* fungemia. *Chest*. déc
554 2000;118(6):1828- 9.
- 555 54. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of
556 invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of
557 Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and
558 Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*.
559 2008;46(12):1813- 21.
- 560 55. Jatoi A, Hanjosten K, Ross E, Mason JB. A prospective survey for central line skin-site colonization by
561 the pathogen *Malassezia furfur* among hospitalized adults receiving total parenteral nutrition. *J
562 Parenter Enter Nutr*. 1997;21(4):230- 2.
- 563 56. Marcon MJ, Powell DA. Human infections due to *Malassezia* spp. *Clin Microbiol Rev*.
564 1992;5(2):101- 19.
- 565 57. Marcon MJ, Powell DA, Durrell DE. Methods for optimal recovery of *Malassezia furfur* from blood
566 culture. *J Clin Microbiol*. 1986;24(5):696- 700.
- 567 58. Bandhaya M. The distribution of *Malassezia furfur* and *Malassezia pachydermatis* on normal human
568 skin. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1993;24(2):343- 6.
- 569 59. Roberts SO. *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. *Br J
570 Dermatol*. 1969;81(4):264- 9.
- 571 60. Faergemann J, Aly R, Maibach HI. Quantitative variations in distribution of *Pityrosporum orbiculare* on
572 clinically normal skin. *Acta Derm Venereol*. 1983;63(4):346- 8.
- 573 61. Håkansson C, Faergemann J, Löwhagen GB. Studies on the lipophilic yeast *Pityrosporum ovale* in HIV-
574 seropositive and HIV-seronegative homosexual men. *Acta Derm Venereol*. 1988;68(5):422- 6.
- 575 62. Snyderman DR, Murray SA, Kornfeld SJ, Majka JA, Ellis CA. Total parenteral nutrition-related infections.
576 Prospective epidemiologic study using semiquantitative methods. *Am J Med*. 1982;73(5):695- 9.
- 577 63. Snyderman DR, Gorbea HF, Pober BR, Majka JA, Murray SA, Perry LK. Predictive value of surveillance
578 skin cultures in total-parenteral-nutrition-related infection. *Lancet*. 1982;2(8312):1385- 8.
- 579 64. Holland TL, Baddour LM, Bayer AS, Hoen B, Miro JM, Fowler VG. Infective endocarditis. *Nat Rev Dis
580 Primer*. 2016;2:16059.
- 581 65. Chryssanthou E, Broberger U, Petrini B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive
582 care unit. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 2001;90(3):323- 7.
- 583 66. Ashbee HR. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol*. 2007;45(4):287- 303.
- 584 67. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice
585 Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of
586 America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-50.
- 587 68. Gould FK, Denning DW, Elliott TSJ, Foweraker J, Perry JD, Prendergast BD, et al. Guidelines for the
588 diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the
589 British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(2):269- 89.

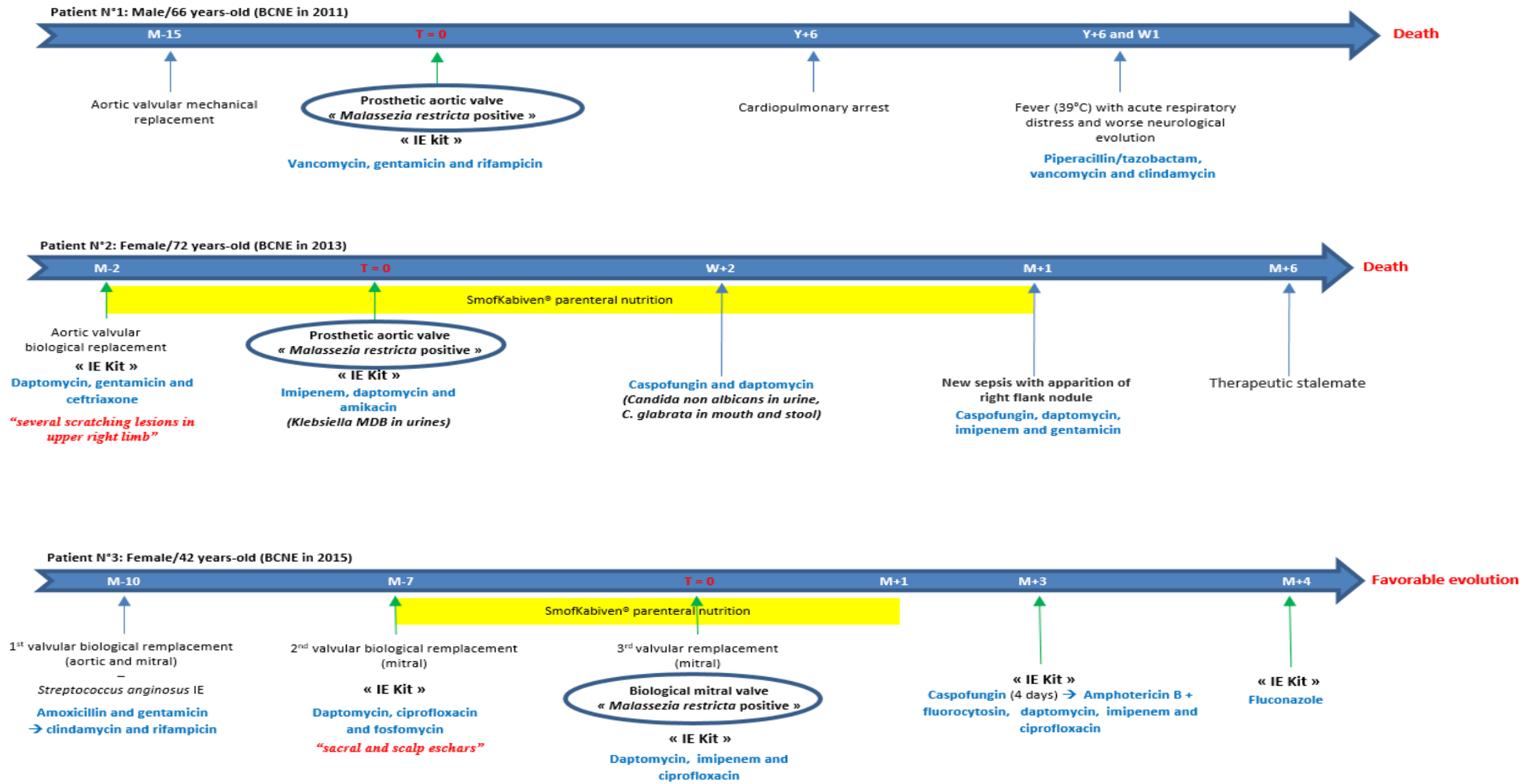
- 590 69. Lintu P, Savolainen J, Kalimo K, Kortekangas-Savolainen O, Nermes M, Terho EO. Cross-reacting IgE
591 and IgG antibodies to *Pityrosporum ovale* mannan and other yeasts in atopic dermatitis. *Allergy*.
592 1999;54(10):1067- 73.
- 593 70. Baddley JW, Benjamin DK, Patel M, Miró J, Athan E, Barsic B, et al. *Candida* infective endocarditis. *Eur*
594 *J Clin Microbiol Infect Dis* I. 2008;27(7):519- 29.
- 595 71. Arnold CJ, Johnson M, Bayer AS, Bradley S, Giannitsioti E, Miró JM, et al. *Candida* infective
596 endocarditis: an observational cohort study with a focus on therapy. *Antimicrob Agents Chemother*.
597 2015;59(4):2365- 73.

598 **FIGURES LEGEND**

599
600
601

602
603
604
605
606

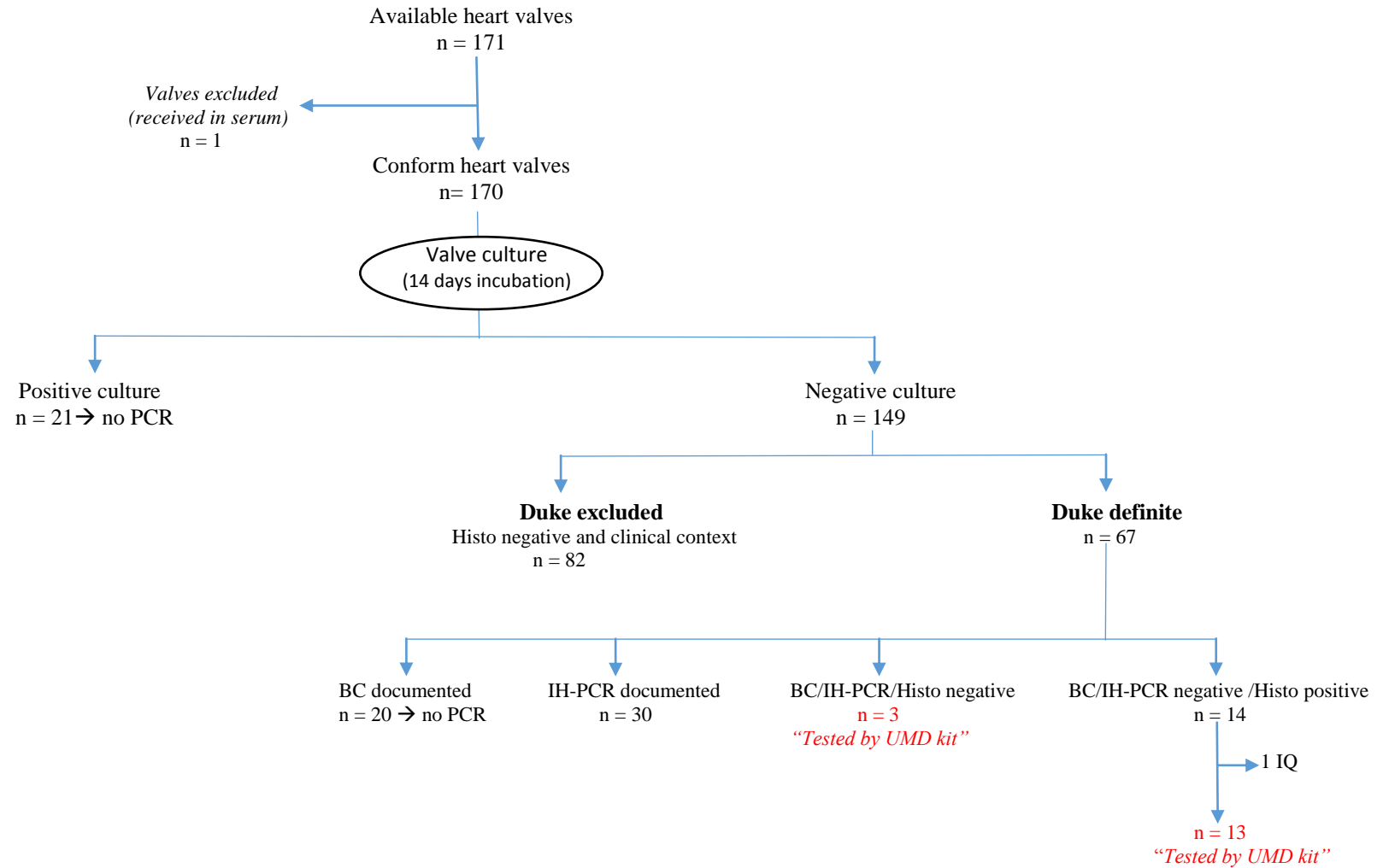
607
608
609
610
611



T = 0: Date of the heart surgery where *Malassezia restricta* was detected in the valve. **BCNE:** Blood Culture-Negative Endocarditis. →: switched by.
M-X: X months before heart surgery performed on T = 0. M+X: X months following heart surgery performed on T = 0.
Y+X: X years following heart surgery performed on T = 0. W+X: X weeks following heart surgery performed on T = 0.

612 **Figure 1.** Clinical history of the three *Malassezia restricta* adult cases of blood culture-negative infective endocarditis.

613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644

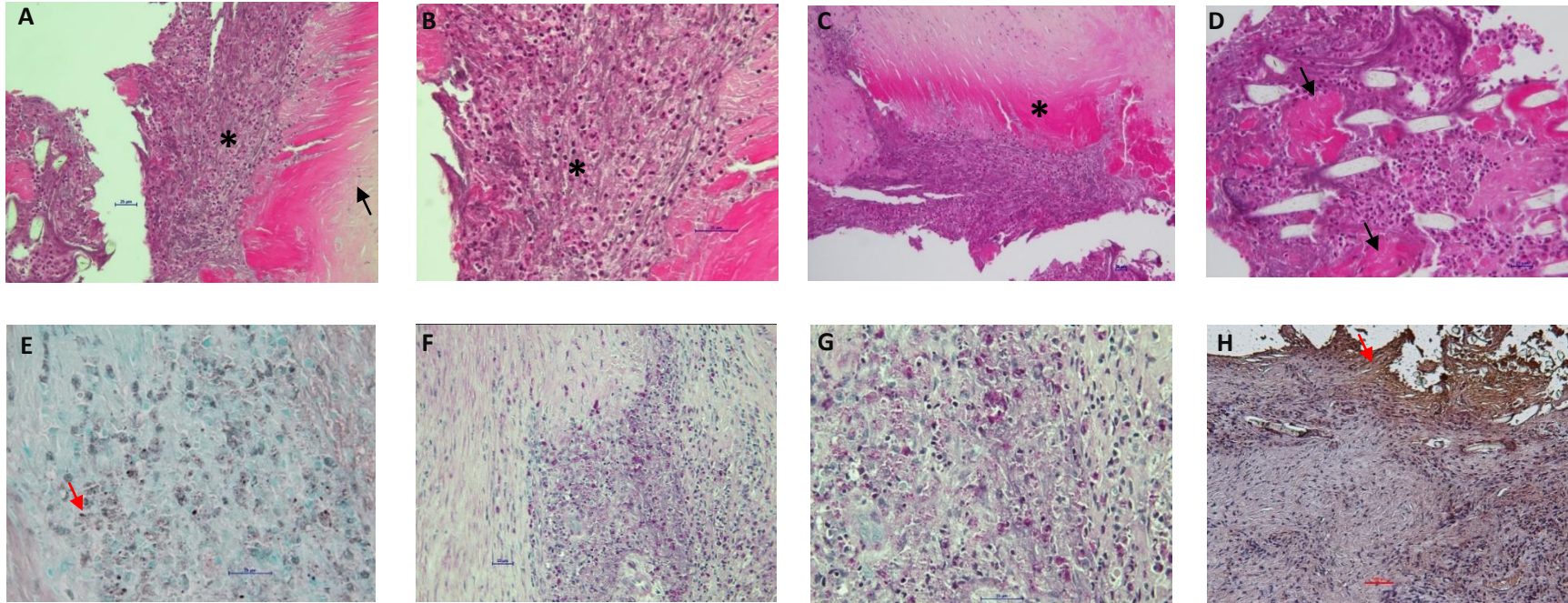


645 **BC:** Blood culture. **Histo:** Histological testing. **IH-PCR:** In-house *Polymerase Chain Reaction*. **IQ:** Insufficient quantity. **UMD:** Universal Microbial Detection biomolecular kit (Molzylm®, Germany).

646

647 **Figure 2.** Flow chart of sample inclusion.

648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658



659 **Figure 3.** Histological examinations of the resected aortic prosthetic valve of **patient N°1** infected with *Malassezia restricta*-blood culture-negative endocarditis.
660 **A** and **B.** Hematoxyline-eosin stain showing superficial vegetations (asterisk) and fibrosis of the connective valve tissue (arrow) (original magnification, x200 (A)
661 and x400 (B)). **C** and **D.** Hematoxyline-phloxine-saffron stain showing the vegetation (asterisk) and calcifications (black arrows) on the valve surface (original
662 magnification, x100 (C), x200 (D)). **E.** Grocott-Gomori methenamine silver stain showing single spherical black yeasts in the valvular vegetation, with some
663 budding cells (red arrow) (original magnification, x400). **F** and **G.** Periodic acid-Schiff stain showing dense fibrocollagenous tissue, sometimes punctuated by
664 macrophagic granulomas. The surface is bristling with fibrinous vegetations, with presence of neutrophilic polynuclear confirmed the existence of
665 fibrinoleucocyte vegetation (original magnification, x 200 (F) and x400 (G)). **H.** Autoimmunohistochemistry using the patient's own serum diluted to 1:500. Note
666 the brown vegetation (arrow) (original magnification, x100).

667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686

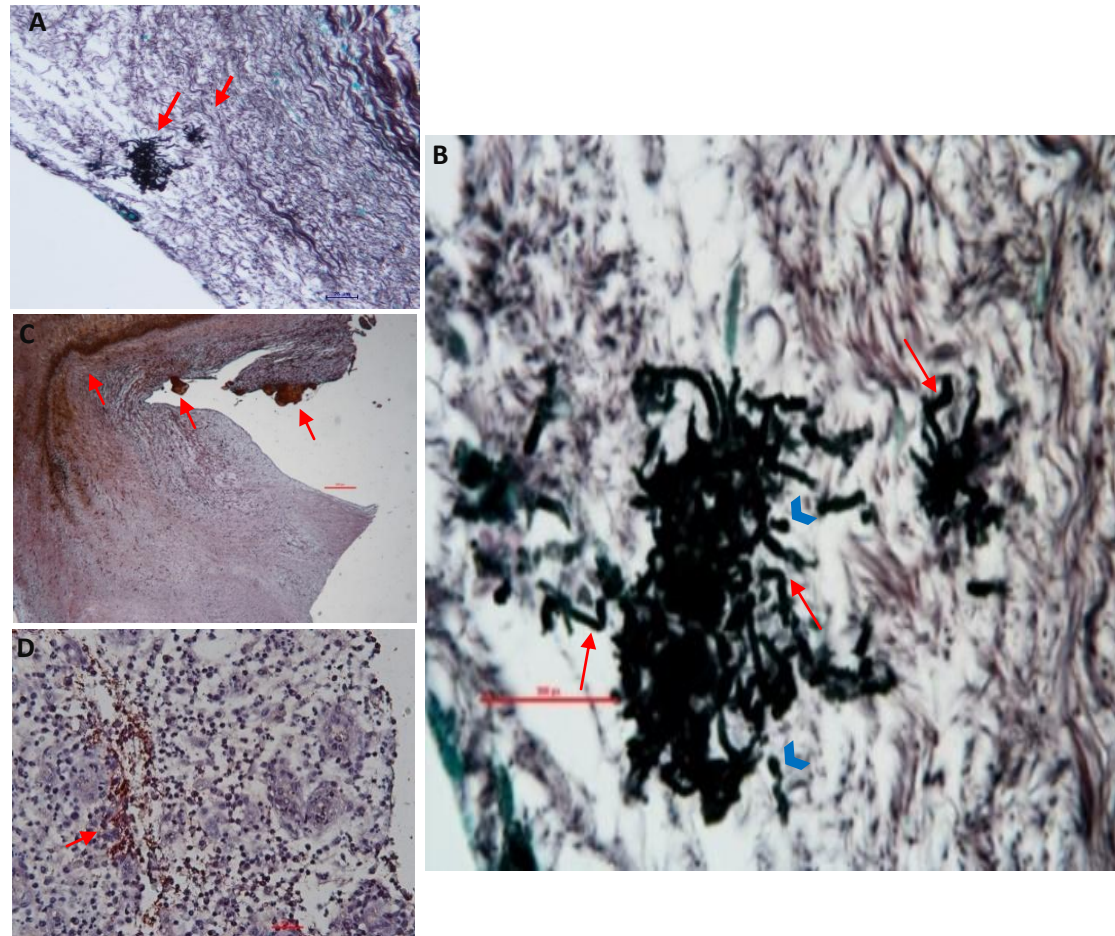


Figure 4. Resected aortic valve (A to C) and right flank nodule (D) of **patient N°2** with *Malassezia restricta* blood culture-negative endocarditis. **A** and **B.** Grocott-Gomori methenamine silver showing fungal elements stained darkly and organized in short pseudohyphae disclosing their invasive character (red arrows), with some budding yeasts (bleu arrowhead) (original magnification, x200 (A) and x1,000 (B)). **C** and **D.** Autoimmunohistochemistry using the patient's own serum diluted to 1:500 in the aortic resected cardiac valve (C) and the right flank nodule developed one month before her death (D). **C.** Note the brown vegetations (red arrows) (original magnification, x25 (C) and x200 (D)).

TABLES LEGEND

Table 1. Results of *C. albicans*-mannan antigens and -antimannans antibodies serological analysis.

	Reference values	Patient N°1	Patient N°2		Patient N°3			
		IE Kit*	IE Kit (M-2)	IE Kit*	IE Kit (M-7)	IE Kit*	IE Kit (M+3)	IE Kit (M+4)
<i>C. albicans</i> antigens (Unit/mL)	Negative: <1.4 Positive: >2.6	0.08	0	0	0.65	0.1	0	0
<i>C. albicans</i> antibodies Screening-IFI (titer)	Positive: ≥160	0	1/80	1/160	1/80	1/160	1/320	1/40
Confirmation-IEP (arc)	Negative: 0 Positive: ≥1	0	2	2	2	2	2	2

*: Date of the heart surgery where *Malassezia restricta* was detected (T = 0 of figure 1). IE: Infective endocarditis.

M-X: X months before heart surgery performed on day 0.

M+X: X months following heart surgery performed on day 0.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

MATERIALS AND METHODS

Malassezia culture from IE kit-blood.

No fragment of cardiac tissue was left after completion of Molzym biomolecular analysis and routine microbiological tests. However, we used the available patients' blood samples (conserved frozen at -80°C) to perform the culture.

Culture was carried out on the three patient blood with presumed BCNE and on six control patients; three with excluded IE and three documented definite IE (two with *Staphylococcus aureus* and one with *Tropheryma whipplei*). None of these six patients had parenteral nutrition during hospitalization and at the time of blood sampling.

Blood samples were inoculated onto CAN2 (chromID, bioMérieux®, Marcy l'Étoile, France) and CHROMAgar™ *Malassezia* (Mast Diagnostic®, France) agars. In order to evaluate a possible bacterial contaminant in blood samples, Colombia blood medium 5% (COS, bioMérieux®) and chocolate (PVX, bioMérieux®) agars were added. All agars, except CHROMAgar™ *Malassezia*, were overlaid with 2 or 3 drops spread in a thin film of sterile olive oil before 5 µL-inoculation on each agar and were incubated seven days at 35°C on aerobic atmosphere and examined daily for growth of yeast-like colonies.

Cultivated strains were identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS, bioMérieux®) and Fungal PCR using both 18S Molzym-primers (237) and a pair of universal fungal primers *NL1* (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG)/*NL4* (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) targeting the D1/D2 domain of the 26S DNA (238). This 26S rDNA region is sufficiently variable to allow reliable separation of all known clinically significant yeast species.

RESULTS

Malassezia IE culture from patient blood.

No *M. restricta* was cultivated from the samples we had retrospectively. However, *M. furfur* grew from all heparinized and dry blood tubes on chromogenic media CHROMagar™ *Malassezia* and the other agars (COS, PVX and CAN2) only when they supplemented with sterile olive oil for the three patients. The growth time was between 8 and 10 days on PVX, between 10 and 13 days on COS and between 13 and 14 days on CAN2. Strikingly, *M. furfur* cultivated on the ordinary bacterial blood agar (COS and PVX) with the simple supplementation of sterile olive oil. Interestingly, *M. furfur* provoked a total hemolysis of the blood contained on COS agar (figure 17).

No *Malassezia restricta* or *M. furfur* was grown in the different culture media of the six controls. Five of these six controls remained negative without bacterial or fungal positive culture on the four cultivated agars, with or without addition of sterile olive oil. *Staphylococcus aureus* positive (1 to 3 colonies) culture on day 4 after incubation on both COS and PVX agars only from the heparinized blood from one of the two *S. aureus*-positive control used.

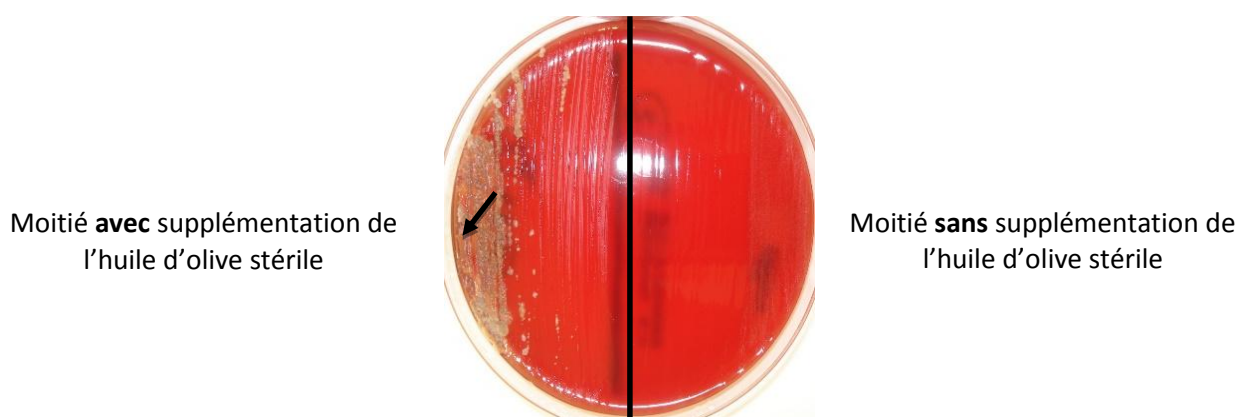


Figure 17. *Malassezia furfur* cultivée sur gélose Columbia au sang 5 % (COS, bioMérieux®, France). Noter l'hémolyse totale du sang contenu dans la gélose par la levure (flèche).

DISCUSSION

L'endocardite infectieuse (EI) correspond à la prolifération de microorganismes, généralement bactériens et rarement fongiques, au niveau de l'endocarde suite à une dissémination microbienne hémotogène. C'est une pathologie peu fréquente mais qui reste létale en l'absence d'une prise en charge médicochirurgicale précoce et adaptée à l'agent causal. Au cours des dernières décennies, ses facteurs de risque, son épidémiologie et son étiologie microbiologique ont évolué. En raison du progrès médical, le taux d'EI associées aux soins et aux procédures invasives a augmenté, et l'espèce *Staphylococcus aureus* est devenue, depuis dix ans en France, le principal germe responsable devant les streptocoques. De nouvelles techniques diagnostiques utilisées au cours des dernières années, en particulier en cas d'EI à hémoculture négative (EIHN) ont contribué à l'amélioration de la prise en charge de cette pathologie. En effet, les outils comme les tests sérologiques, l'auto-immunohistochimie et la biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence des agents étiologiques comme *Tropheryma whipplei* (71), *Bartonella quintana* (62) et *Coxiella burnetii* (15,56,57). En dépit de ces progrès, 5,2 % des cas restent encore à ce jour sans documentation étiologique (1).

L'objectif principal de notre étude rétrospective était d'améliorer le diagnostic microbiologique d'endocardites certaines sans documentation étiologique. Nous avons évalué l'apport d'un kit commercial de biologie moléculaire (Molzym UMD - Universal Microbial Detection, Brême, Allemagne) permettant la détection simultanée de microorganismes bactériens et fongiques, par une approche de PCR universelle ultrasensible, à partir des prélèvements de valves cardiaques de patients atteints d'EIHN.

Cette approche nous a permis d'identifier l'agent étiologique dans 100 % (16/16) des cas de notre série rétrospective comprenant des cas tous déjà explorés par PCR universelle « maison » et revenue négative. Dans 13 cas sur 16, l'étiologie était bactérienne et compatible avec le diagnostic d'endocardite ainsi que la porte d'entrée présumée d'après les dossiers cliniques. L'étiologie était monobactérienne dans cinq cas : *Enterococcus cecorum* (n = 1), *Moraxella spp.* (n = 1), *Streptococcus cristatus* (n = 1) et *Streptococcus mitis* (n = 2). Elle était poly-bactérienne chez les huit autres patients : *Abiotrophia defectiva* avec *Neisseria pharyngia* (n = 1), *Streptococcus sineusis* avec *S. oligofermentas* (n = 1), *Enterococcus faecalis* avec *E. cecorum* (n = 1), *Streptococcus oral* Taxon avec *Neisseraia subflava/sicca* (n = 1) et *Streptococcus oral* Taxon avec *S. oralis* pour les quatre autres patients. Pour trois patients (un avec une infection monobactérienne à *E. cecorum* et deux poly-bactériennes à *S. oral* Taxon avec *S. oralis*), l'examen anatomopathologique de la valve n'était pas en faveur d'une EI, mais ils avaient été inclus en raison des critères cliniques et échographiques. Chez ces trois patients, la discordance entre les résultats anatomopathologiques et microbiologiques pourrait être expliquée par le manque de sensibilité des techniques histologiques dans le diagnostic de l'EI dû à l'aléa d'échantillonnage du fragment utilisé pour réaliser ces analyses histologiques (188).

L'originalité de notre travail réside dans la documentation, pour la première fois, de trois cas d'EI à *Malassezia restricta* ; une levure lipophile lipo-dépendante saprophyte faisant partie, avec *M. globosa* et *M. sympodialis*, du microbiote cutané normal de l'homme (9). Ces champignons étaient surtout connus comme des champignons de faible pathogénie responsables d'infections cutanées superficielles telles que le *pitryiasis versicolor*, la dermatite séborrhéique, la folliculite et la dermatite atopique. Cependant, leur spectre clinique, notamment celui de l'espèce *M. furfur*, s'est considérablement élargi au cours des dernières décennies depuis la description en 1981 d'une vascularite pulmonaire fatale à *Malassezia* chez un nourrisson prématuré ayant reçu une nutrition parentérale totale via un cathéter veineux central (240). Aujourd'hui, au moins 50 cas rapportés ont identifié principalement *M. furfur*, et accessoirement à *M.*

pachydermatis, en tant que pathogène systémique émergent le plus souvent chez les nouveau-nés recevant des lipides parentéraux (241–253) et seulement quelques-uns chez les adultes (239,248,250–258). Les infections systémiques décrites comprenaient une péritonite (259), une vascularite pulmonaire (260), une bronchopneumonie (247,261) ou une pneumonie (262). Malgré ce nombre élevé de cas d'infections systémiques à *Malassezia*, seulement quatre cas d'atteinte endocardique ou intracardiaque ont été rapportés chez les nourrissons (246,263). Chez l'adulte, le seul cas signalé de sepsis associé à une atteinte cardiaque (fongémie compliquée par un thrombus septique pédonculé provenant de la veine cave supérieure et s'étendant dans l'oreillette droite) dû à *M. furfur* a été décrit en 2000 chez une femme de 45 ans atteinte de la maladie de Crohn et ayant reçu une nutrition parentérale totale sur le long terme (264). Sur la base de la revue de la littérature disponible à ce jour, l'infection systémique par *Malassezia* est classiquement associée aux soins et comprend comme facteur de risque spécifique la nutrition parentérale via un cathéter à demeure (262,265). En effet, ces champignons n'ont pas la capacité de synthétiser les acides gras à moyenne et longue chaîne et nécessitent donc pour leur croissance une source exogène de ces lipides, présents par exemple dans les composés de nutrition parentérale (239). Dans notre étude, les trois cas d'infection à *M. restricta* que nous décrivons étaient associés aux soins. Ils sont survenus après un remplacement valvulaire chirurgical, concomitant ou après l'utilisation d'association d'antibiotiques à large spectre (dans les trois cas), aggravé par la nutrition parentérale avec du SmofKabiven®, contenant la source lipidique nécessaire à la croissance des *Malassezia*, administré suite à une malnutrition sévère et une perte de poids (dans deux cas) avec présence de cathétérisme utilisé pour des traitements antibiotiques par voie parentérale et/ou intraveineuse (dans les trois cas). Dans les trois cas, elle s'est révélée par des troubles neurologiques consécutifs à une embolisation. Comme pour le patient N°1 qui n'avait pas reçu de nutrition parentérale, un cas d'épisodes récurrents de péritonite stérile sur dialyse péritonéale continue ambulatoire sans nutrition parentérale a déjà été rapporté (259). Bien que le mécanisme exact de ces infections systémiques associées aux cathéters soit encore inconnu, de nombreuses hypothèses subsistent. La source la plus probable de l'infection est la peau humaine, du patient ou du personnel de soins de santé, qui pourrait contaminer les cathéters veineux centraux (246,266,267). Une autre hypothèse stipule que la source d'infection pourrait être due à la contamination des nutriments parentéraux avec des *Malassezia* de la peau avant de contaminer le cathéter (266).

Étant donné le caractère faiblement pathogène décrit des *Malassezia*, il était primordial de prouver la réalité des trois cas d'EIH de notre série. Pour rappel, nous avons analysé 23 valves cardiaques issues de patients atteints d'EI certaine à hémoculture négative et de patients contrôles par une approche de PCR « universelle » ultra-sensible utilisant le kit commercial Molzym-UMD qui permet la détection simultanée de microorganismes bactériens et fongiques. Après élimination de l'ADN humain du prélèvement, les ADN microbiens étaient extraits puis amplifiés par PCR et séquencés. Nous avons détecté l'espèce *M. restricta* uniquement dans trois valves de trois patients, les PCR ADNr 18S réalisées sur les 20 autres valves étaient négatives. Ces 20 valves comprenaient trois cas d'EI bactérienne certaine (deux à *Staphylococcus aureus* et une à *Tropheryma whippelii*) utilisés comme contrôles positifs, quatre valves d'EI exclue utilisées comme contrôles négatifs et 13 autres cas testés d'EIH dont l'étiologie retrouvée était bactérienne. *M. restricta* a été également retrouvée dans le nodule de flanc droit du patient N°2 un mois avant son décès par un sepsis récidivant non documenté.

De façon à étayer l'étiologie fongique de ces trois cas d'EI à *M. restricta*, nous avons réalisé des analyses anatomopathologiques, indispensables au diagnostic d'infections fongiques invasives (IFI)

« prouvée ». En effet, une IFI « prouvée » nécessite la démonstration d'éléments fongiques dans le prélèvement tissulaire par analyse histo- ou cyto-pathologique en utilisant une coloration spécifique (Grocott-Gomori méthenamine argentique (GMS) ou acide périodique de Schiff (PAS)) ou par culture (à partir de matériel stérile ou sang) (175). En l'absence de culture du champignon (nous n'avions plus de prélèvement disponible), l'examen histologique de nos prélèvements a révélé la présence d'infiltrats de neutrophiles confirmant le diagnostic d'EI pour les trois patients et la présence des levures au GMS dans les valves cardiaques (figures 3E et 4B de l'article). La coloration d'autoimmunohistochimie était également positive (figures 3H, 4C et 4D de l'article). L'ensemble de ces résultats permet d'exclure l'hypothèse d'une contamination et conforte le diagnostic d'EIHN à *M. restricta*. Nos résultats soulèvent donc la question du sous-diagnostic probable d'EI à *Malassezia* et en conséquence, l'absence de traitement adapté (268). En effet, les symptômes de cette infection systémique sont non spécifiques, la fièvre étant souvent la seule manifestation rapportée (267). Deuxièmement, *Malassezia* spp. ne cultive pas sur les milieux gélosés utilisées en routine, à moins d'être supplémentés d'une source d'acides gras, tels que l'huile d'olive stérile (269). Enfin, du fait de leur faible pathogénicité, les *Malassezia* peuvent être considérées à tort comme des contaminants lorsqu'elles sont détectées (par culture ou PCR) dans les échantillons cliniques humains.

L'endocardite fongique quelle que soit l'étiologie, est létale si elle n'est pas traitée. Sa prise en charge nécessite l'identification du champignon et l'utilisation d'un antifongique approprié. Les espèces de *Malassezia* sont sensibles à l'amphotéricine B (239,264) et aux triazoles antifongiques (247), mais intrinsèquement résistantes aux échinocandines comme tous les Basidiomycètes (270,271). Le diagnostic des infections invasives à *Candida albicans* repose, entre autres, sur la détection sérologique par la recherche des antigènes et anticorps. En raison de la similarité des antigènes mannane entre les différentes espèces de levures, une réactivité croisée entre les anticorps de *C. albicans* analysés par dosage immuno-enzymatique (ELISA) avec *M. furfur* a été précédemment rapportée (272). Aucune réaction sérologique croisée impliquant les antigènes mannanes n'a été détectée. Cependant, pour les patients N°2 et 3, une réaction croisée avec les anticorps antimannanes a été observée avec *C. albicans* en utilisant à la fois le test de dépistage (immunofluorescence, IFI) et le test de confirmation d'immuno-électrophorèse (IEP) (tableau 2 de l'article). Cette séro-réactivité croisée entre *C. albicans* et *Malassezia* a un impact majeur sur la prise en charge médico-thérapeutique, notamment en ce qui concerne l'utilisation des échinocandines, comme pour le patient N°2. Actuellement, les échinocandines constituent un des traitements de référence pour les IFI à *C. albicans*, y compris l'EI (44,84,131,136). Mais, les échinocandines sont inactives sur les *Malassezia* (résistance intrinsèque). En effet, dans notre cohorte, à l'exception du patient N°1 qui était perdu de vue, les deux autres patients ont bénéficié d'un traitement antifongique. Le patient N°2 qui avait reçu une nutrition parentérale SmofKabiven® est décédé d'un sepsis récidivant non documenté sous caspofongine et une antibiothérapie à large spectre. Un mois avant sa mort, un abcès du flanc droit contenant *M. restricta* a été observé. L'autopsie n'a pas été réalisée pour déterminer la cause de cette EIHN non documentée. Une évolution clinique et échocardiographique favorable a été observée pour la patiente N°3 traitée par l'association antifongique amphotéricine B et 5-fluorocytosine modifiée par la suite par du fluconazole. Lors de sa visite de contrôle, trois mois après le début de l'antifongothérapie, cette patiente s'est totalement améliorée cliniquement sans aucun signe d'infection avec une confirmation échographie transœsophagienne (ETO). En plus de l'utilisation d'un antifongique efficace, le cathéter intraveineux doit être retiré (246,247,264,266).

Les *Malassezia* sont des levures lipophiles lipo-dépendantes, et par conséquent leur croissance *in vitro* doit être complétée par des agents lipidiques présents en particulier dans l'huile d'olive. La méthode la plus utilisée, dans la littérature, consiste à rajouter l'huile d'olive sur les milieux Sabouraud contenant du cycloheximide (actidione) ou à utiliser un milieu plus spécialisé comme la gélose de Dixon qui contient du mono-oléate de glycérol (239,247,249,273). Dans notre étude, nous avons cultivé *M. furfur*, mais pas *M. restricta*, à partir du sang des kits EI prélevés sur tubes héparinés et congelés à -80°C. La signification clinique de la culture de *M. furfur* à partir du sang des trois patients n'est pas claire. Cela a été déjà également rapporté par Alpert et al. (246). A ce jour, nous n'avons pas d'explication et il nous semble nécessaire d'explorer ce point. En revanche, nous avons signalé pour la première fois la possibilité de cultiver *M. furfur* sur les géloses au sang utilisées en routine dans le laboratoire de bactériologie (COS et PVX à 35°C en atmosphère aérobie) avec une simple supplémentation de 2 à 3 gouttes d'huile d'olive stérile par gélose. De manière surprenante, *M. furfur* a provoqué une hémolyse complète de la gélose au sang, comme *S. aureus*. Pour rappel, ces géloses ont été utilisées uniquement pour vérifier l'éventuelle pousse concomitante de bactéries dans le sang prélevé qui ne pourraient pas être détectées sur des géloses mycologiques (contenant des antibiotiques) utilisées ; CAN2 ou CHROMagar® *Malassezia*.

En conclusion, nos trois premiers cas d'EIHN à *M. restricta* que nous décrivons montrent que cette levure est un agent étiologique sous-diagnostiqué des EIHN. D'après notre étude, l'EIHN causée par *M. restricta* est associée aux soins, avec une porte d'entrée cutanée, survenant après un remplacement valvulaire chez les trois patients avec de multiples cathéters et la notion de nutrition parentérale avec du SmofKabiven® pour deux patients. La documentation microbiologique a été possible par la PCR panfongique ADNr 18S et par l'analyse histologique en utilisant la coloration argentique de Grocott-Gomori à partir de valves excisées. La forte association entre *M. restricta* et l'EIHN exige une attention particulière pour son diagnostic. Nos données confirment qu'il semble fortement approprié d'inclure la coloration GMS, la PCR panfongique et éventuellement la culture spécifique de *Malassezia* spp., en tenant compte de ses particularités culturelles dans des algorithmes décisionnels pour le diagnostic des EIHN. Cela permettra de déterminer réellement l'incidence et l'impact de cet agent pathogène. Enfin, nous avons également démontré une réaction sérologique croisée entre les anticorps anti-mannanes des *Malassezia* et ceux de *C. albicans*. Cette séro-réaction croisée présente un impact médico-thérapeutique majeur. L'EIHN à *M. restricta*, naturellement résistante aux échinocandines, pourrait être mal diagnostiquée comme une infection fongique invasive à *C. albicans* dont les échinocandines constituent un des traitements de référence. Le schéma thérapeutique associe l'amphotéricine B ou des azolés associés à la flucytosine, comme mentionné dans les recommandations européennes des EI. Les mesures associées doivent inclure l'ablation des cathéters et éventuellement, le cas échéant, l'arrêt de la nutrition parentérale avec le débridement chirurgical.

CONCLUSION

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE LYON

8, avenue Rockefeller – 69373 Lyon Cedex 08
Téléphone : 04.78.77.714.98 – Fax : 04.78.77.72.81

Thèse soutenue par **Madame Linda HOUHAMDI**

L'endocardite infectieuse correspond à la prolifération de microorganismes, généralement bactériens et rarement fongiques, au niveau de l'endocarde suite à une dissémination microbienne hémotogène. C'est une pathologie peu fréquente mais qui reste létale en l'absence d'une prise en charge médicochirurgicale précoce et adaptée à l'agent causal. Au cours des dernières décennies, ses facteurs de risque, son épidémiologie et son étiologie microbiologique ont été modifiés. En raison du progrès médical, le taux d'endocardites associées aux soins et aux procédures invasives a augmenté, et l'espèce *Staphylococcus aureus* est devenue le principal germe responsable. De nouvelles techniques diagnostiques utilisées au cours des dernières années, en particulier en cas d'endocardites infectieuses à hémoculture négative, incluant des tests sérologiques, l'auto-immunohistochimie et les analyses par biologie moléculaire, ont contribué à l'amélioration de la prise en charge de cette pathologie. En dépit de ces progrès, 5,2 % des cas restent encore à ce jour sans documentation étiologique. Ces endocardites sont généralement plus graves. L'identification rapide de l'agent étiologique est à la fois primordiale et critique pour une meilleure prise en charge thérapeutique de chaque patient.

L'objectif principal de notre travail a consisté à améliorer le diagnostic microbiologique de ces endocardites. Nous avons évalué l'apport d'un kit de biologie moléculaire (Molzym UMD-Universal Microbial Detection, Brême, Allemagne) permettant la détection simultanée de microorganismes bactériens et fongiques, par une approche de PCR universelle, à partir des prélèvements de valves cardiaques de patients atteints d'endocardite infectieuse à hémoculture négative. Ce kit permet l'extraction des ADN microbiens après leurs enrichissements suite à l'élimination de l'ADN humain dans le prélèvement, l'amplification des acides nucléiques par *Polymerase Chain Reaction* et leur séquençage.

Cette approche nous a permis d'identifier l'agent étiologique dans 100 % (16/16) des cas de notre série rétrospective d'endocardites certaines sans diagnostic étiologique. Dans 13 cas sur 16 (81,25 %), l'étiologie était bactérienne compatible avec le diagnostic d'endocardite. L'originalité de notre travail réside dans la documentation, pour la première fois, de trois cas (18,75 %) d'endocardites infectieuses à *Malassezia restricta* ; une levure lipophile lipo-dépendante saprophyte faisant partie du microbiote cutané de l'homme. Ces trois cas étaient principalement associés aux soins et à l'utilisation de dispositifs intravasculaires, dont deux sont survenus chez des patientes en dénutrition sévère ayant nécessité une nutrition parentérale avec du SmofKabiven®. Nous avons également démontré une réaction sérologique croisée entre les anticorps anti-mannanes de cette levure et ceux de *Candida albicans*. Cette séro-réaction croisée présente un impact médico-thérapeutique majeur. En effet, l'endocardite infectieuse à *Malassezia restricta*, naturellement résistante aux échinocandines, pourrait être mal diagnostiquée comme une infection fongique invasive à *Candida albicans* dont les échinocandines constituent un des traitements de référence.

Le Président de la thèse,

Nom :

R. F. MOREMY

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



Professeure C. VINCIGUERRA



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *Lancet*. 2016;387(10021):882-93.
2. Oliver L, Deux JF, Cottureau AS, Lim P, Ternacle J. L'imagerie multimodalités dans l'endocardite infectieuse. *Cardiologie pratique*. 2016. Disponible sur: <https://www.cardiologie-pratique.com/journal/article/0014338-limagerie-multimodalites-dans-lendocardite-infectieuse>. Consulté le 21 janvier 2017.
3. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, *et al*. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 2009;169(5):463-73.
4. Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Béguinot I, Bouvet A, Briançon S, *et al*. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA*. 2002;288(1):75-81.
5. Fedeli U, Schievano E, Buonfrate D, Pellizzer G, Spolaore P. Increasing incidence and mortality of infective endocarditis: a population-based study through a record-linkage system. *BMC Infect Dis*. 2011;11:48.
6. Duval X, Delahaye F, Alla F, Tattevin P, Obadia J-F, Le Moing V, *et al*. Temporal trends in infective endocarditis in the context of prophylaxis guideline modifications: three successive population-based surveys. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(22):1968-76.
7. Revest, Doco-Lecompte, Hoen, Alla, Selton-Suty, Duval. *Epidémiologie de l'EI en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2013;10:89-94.
8. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Chirouze C, lung B, *et al*. Preeminence of *Staphylococcus aureus* in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. *Clin Infect Dis*. 2012;54(9):1230-9.
9. Lepidi H, Durack DT, Raoult D. Diagnostic methods current best practices and guidelines for histologic evaluation in infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am*. 2002;16(2):339-361, ix.
10. Delahaye F. Endocardite infectieuse. *EMC - Cardiologie*. 2012;7(1):1-32.
11. Sandre RM, Shafran SD. Infective endocarditis: review of 135 cases over 9 years. *Clin Infect Dis*. 1996;22(2):276-86.
12. Bayer AS, Bolger AF, Taubert KA, Wilson W, Steckelberg J, Karchmer AW, *et al*. Diagnosis and management of infective endocarditis and its complications. *Circulation*. 1998;98(25):2936-48.
13. Delahaye F, Delahaye JP. Endocardite bactérienne : étiologie, physiopathologie, diagnostic, évolution, pronostic, principes du traitement. *Rev Prat*. 1992;8:1035-44.
14. Tleyjeh IM, Abdel-Latif A, Rahbi H, Scott CG, Bailey KR, Steckelberg JM, *et al*. A systematic review of population-based studies of infective endocarditis. *Chest*. 2007;132(3):1025-35.
15. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):518-53.
16. Osler W. The Gulstonian Lectures, on Malignant Endocarditis. *Br Med J*. 1885;1(1262):467-70.
17. Osler W. The Gulstonian Lectures, on Malignant Endocarditis. *Br Med J*. 1885;1(1263):522-6.
18. Osler W. The Gulstonian Lectures, on Malignant Endocarditis. *Br Med J*. 1885;1(1264):577-9.
19. The etiology of subacute infective endocarditis by E. Libman and H. L. Celler. *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 140, 1910. *Am J Med Sci*. 1973;266(1):44-52.
20. Dhawan VK. Infective Endocarditis in Elderly Patients. *Curr Infect Dis Rep*. 2003;5(4):285-92.

21. Hoen B. [Infective endocarditis: epidemiology and diagnosis]. Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Francaise Médecine Interne. 2007;28 Suppl 1:S22-26.
22. Hoen B, Selton-Suty C, Lacassin F, Etienne J, Briançon S, Leport C, *et al.* Infective endocarditis in patients with negative blood cultures: analysis of 88 cases from a one-year nationwide survey in France. Clin Infect Dis. 1995;20(3):501-6.
23. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, *et al.* Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. Arch Intern Med. 2009;169(5):463-73.
24. Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Béguinot I, Bouvet A, Briançon S, *et al.* Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. JAMA. 2002;288(1):75-81.
25. Tleyjeh IM, Abdel-Latif A, Rahbi H, Scott CG, Bailey KR, Steckelberg JM, *et al.* A systematic review of population-based studies of infective endocarditis. Chest. 2007;132(3):1025-35.
26. Tattevin P. 16ème journées Nationales d'Infectiologie. 2015. Infections sur pace-maker / défibrillateurs implantables : peut-on traiter en gardant le matériel? Site consulté le 21 janvier 2017 : <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI15/2015-JNI-EI-PM.pdf>.
27. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, *et al.* Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. Ann Intern Med. 2002;137(10):791-7.
28. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. Lancet. 2004;363(9403):139-49.
29. Labriola L, Jadoul M. Haemodialysis is a major risk factor for infective endocarditis. Lancet. 2016;388(10042):339-40.
30. Abbott KC, Agodoa LY. Hospitalizations for bacterial endocarditis after initiation of chronic dialysis in the United States. Nephron. 2002;91(2):203-9.
31. Kanafani ZA, Kourany WM, Fowler VG, Levine DP, Vigliani GA, Campion M, *et al.* Clinical characteristics and outcomes of diabetic patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(12):1477-82.
32. Luk A, Kim ML, Ross HJ, Rao V, David TE, Butany J. Native and prosthetic valve infective endocarditis: clinicopathologic correlation and review of the literature. Malays J Pathol. 2014;36(2):71-81.
33. Servier Médical Art : <http://www.sosinf.org/wp-content/uploads/2009/12/valves-small.jpg>. Consulté le 21 février 2017.
34. <http://www.cardiodiac.net/FonctionnementCoeur.htm>. Fédération française de cardiologie. Association de lutte contre les maladies cardiovasculaires : Consulté le 21 janvier 2017.
35. Benoit M, Thuny F, Le Priol Y, Lepidi H, Bastonero S, Casalta J-P, *et al.* The transcriptional programme of human heart valves reveals the natural history of infective endocarditis. PloS One. 2010;5(1):e8939.
36. D. Bessis. Endocardite infectieuse. La Lettre de l'Infectiologue. 2010 (Service de dermatologie, hôpital Saint-Éloi, CHU de Montpellier): <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/16363.pdf>. Consulté le 22 janvier 2017.
37. Gould KP, Jones JD, Callen JP. Sweet's syndrome in a patient with enterococcal subacute bacterial endocarditis. J Am Acad Dermatol. 2004;50(5):798-9.
38. Gunson TH, Oliver GF. Osler's nodes and Janeway lesions. Australas J Dermatol. 2007;48(4):251-5.

39. Watanakunakorn C. Osler's nodes on the dorsum of the foot. *Chest*. 1988;94(5):1088-90.
40. <http://www.respir.com/doc/abonne/base/HippocratismDigital.asp>. Consulté le 27 janvier 2017.
41. <http://ophtalmologie.pro/endocardite-infectieuse-aigue/>. Consulté le 23 janvier 2017.
42. Aytekin S, Miro JM, Plonska-Gosciniak E, Zamorano JL, Nihoyannopoulos P, *et al*. Endocardites infectieuses. *Eur Heart J*. 2015;36(44):3075-128. <http://microbiologiemedicale.fr/physiopathologie-et-diagnostic-des-infections/plan-bacteriemie/le-cas-particulier-des-endocardites/>. Consulté le 25 août 2017.
43. Das M, Badley AD, Cockerill FR, Steckelberg JM, Wilson WR. Infective endocarditis caused by HACEK microorganisms. *Annu Rev Med*. 1997;48:25-33.
44. Baddley JW, Benjamin DK, Patel M, Miró J, Athan E, Barsic B, *et al*. *Candida* infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(7):519-29.
45. Hoen B, Duval X. Clinical practice. Infective endocarditis. *N Engl J Med*. 2013;368(15):1425-33.
46. Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, Mainardi JL, Marrie TJ, Bruneel F, *et al*. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80(4):245-51.
47. van der Meer JT, Thompson J, Valkenburg HA, Michel MF. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands. II. Antecedent procedures and use of prophylaxis. *Arch Intern Med*. 1992;152(9):1869-73.
48. Durante-Mangoni E, Bradley S, Selton-Suty C, Tripodi M-F, Barsic B, Bouza E, *et al*. Current features of infective endocarditis in elderly patients: results of the International Collaboration on Endocarditis Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 2008;168(19):2095-103.
49. Chu VH, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Pappas PA, Jones P, *et al*. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis--a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. *Heart Br Card Soc*. 2009;95(7):570-6.
50. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):870-926.
51. López J, Revilla A, Vilacosta I, Villacorta E, González-Juanatey C, Gómez I, *et al*. Definition, clinical profile, microbiological spectrum, and prognostic factors of early-onset prosthetic valve endocarditis. *Eur Heart J*. 2007;28(6):760-5.
52. Chu VH, Woods CW, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Pappas PA, *et al*. Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):232-42.
53. Chu VH, Cabell CH, Abrutyn E, Corey GR, Hoen B, Miro JM, *et al*. Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: report of 99 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin Infect Dis*. 2004;39(10):1527-30.
54. Mainardi JL. Endocardites à hémoculture négative. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2007;389(1):42-5.
55. Nigo M, Munita JM, Arias CA, Murray BE. What's New in the Treatment of Enterococcal Endocarditis? *Curr Infect Dis Rep*. 2014;16(10):431.
56. Fournier PE, Casalta JP, Habib G, Messana T, Raoult D. Modification of the diagnostic criteria proposed by the Duke Endocarditis Service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis. *Am J Med*. 1996;100(6):629-33.
57. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(1):177-207.

58. Raoult D. Etiological diagnosis of blood-culture-negative endocarditis. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2006;24(5):295-6.
59. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M, Marrie TJ, Etienne J, Cosserat J, *et al*. Diagnosis of 22 new cases of Bartonella endocarditis. *Ann Intern Med*. 1996;125(8):646-52.
60. Raoult D, Fournier P-E, Vandenesch F, Mainardi J-L, Eykyn SJ, Nash J, *et al*. Outcome and treatment of Bartonella endocarditis. *Arch Intern Med*. 2003;163(2):226-30.
61. Célard M, Tristan A, Boisset S, Vandenesch F. [New microbiologic diagnostic techniques in infective endocarditis]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2008;57(2):78-80.
62. Drancourt M, Mainardi JL, Brouqui P, Vandenesch F, Carta A, Lehnert F, *et al*. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men. *N Engl J Med*. 1995;332(7):419-23.
63. Odeh M, Oliven A. Chlamydial infections of the heart. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11(10):885-93.
64. Scapini JP, Flynn LP, Sciacaluga S, Morales L, Cadario ME. Confirmed *Mycoplasma pneumoniae* endocarditis. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(10):1664-5.
65. Popat K, Barnardo D, Webb-Peploe M. *Mycoplasma pneumoniae* endocarditis. *Br Heart J*. 1980;44(1):111-2.
66. Hidalgo-Tenorio C, Pasquau J, López-Checa S, López-Ruz MA. [Endocarditis due to *Mycoplasma hominis*]. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2006;24(7):470-1.
67. Fenollar F, Gauduchon V, Casalta J-P, Lepidi H, Vandenesch F, Raoult D. *Mycoplasma* endocarditis: two case reports and a review. *Clin Infect Dis*. 2004;38(3):e21-24.
68. Dominguez SR, Littlehorn C, Nyquist A-C. *Mycoplasma hominis* endocarditis in a child with a complex congenital heart defect. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(9):851-2.
69. Blasco M, Torres L, Marco ML, Moles B, Villuendas MC, García Moya JB. Prosthetic valve endocarditis caused by *Mycoplasma hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(8):638-40.
70. Cohen JI, Sloss LJ, Kundsinn R, Golightly L. Prosthetic valve endocarditis caused by *Mycoplasma hominis*. *Am J Med*. 1989;86(6 Pt 2):819-21.
71. Raoult D, Birg ML, La Scola B, Fournier PE, Enea M, Lepidi H, *et al*. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med*. 2000;342(9):620-5.
72. Podglajen I, Mainardi JL. Apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des endocardites infectieuses. *Réanimation*, 2007. 16 (3) : 193-199.
73. Bouchiat C, Saison J, Boisset S, Flandrois JP, Issartel B, Dauwalder O, *et al*. Nontuberculous Mycobacteria: An Underestimated Cause of Bioprosthetic Valve Infective Endocarditis. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2(2):ofv047.
74. Falcone M, Barzagli N, Carosi G, Grossi P, Minoli L, Ravasio V, *et al*. Candida infective endocarditis: report of 15 cases from a prospective multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2009;88(3):160-8.
75. Bor DH, Woolhandler S, Nardin R, Bruschi J, Himmelstein DU. Infective endocarditis in the U.S., 1998-2009: a nationwide study. *PloS One*. 2013;8(3):e60033.
76. Ellis ME, Al-Abdely H, Sandridge A, Greer W, Ventura W. Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. *Clin Infect Dis*. 2001;32(1):50-62.
77. Pierrotti LC, Baddour LM. Fungal endocarditis, 1995-2000. *Chest*. 2002;122(1):302-10.

78. Ellis M. Fungal endocarditis. *J Infect.* 1997;35(2):99-103.
79. Rubinstein E, Lang R. Fungal endocarditis. *Eur Heart J.* 1995;16 Suppl B:84-9.
80. Varghese GM, Sobel JD. Fungal endocarditis. *Curr Infect Dis Rep.* 2008;10(4):275-9.
81. Rubinstein E, Noriega ER, Simberkoff MS, Holzman R, Rahal JJ. Fungal endocarditis: analysis of 24 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1975;54(4):331-4.
82. Joly V, Belmatoug N, Leperre A, Robert J, Jault F, Carbon C, *et al.* Pacemaker endocarditis due to *Candida albicans*: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1997;25(6):1359-62.
83. Kurup A, Janardhan MN, Seng TY. *Candida tropicalis* pacemaker endocarditis. *J Infect.* 2000;41(3):275-6.
84. Arnold CJ, Johnson M, Bayer AS, Bradley S, Giannitsioti E, Miró JM, *et al.* *Candida* infective endocarditis: an observational cohort study with a focus on therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):2365-73.
85. Fillâtre P, Revest M, Tattevin P. El fongiques : mise au point (update). *Réanimation.* 2016; 25:348–360.
86. Paterson DL, Dominguez EA, Chang FY, Snyderman DR, Singh N. Infective endocarditis in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1998;26(3):689-94.
87. Kalokhe AS, Roupheal N, El Chami MF, Workowski KA, Ganesh G, Jacob JT. *Aspergillus* endocarditis: a review of the literature. *Int J Infect Dis.* 2010;14(12):e1040-1047.
88. Rivière S, Lortholary O, Michon J, Bougnoux M-E, Mainardi JL, Sendid B, *et al.* *Aspergillus* endocarditis in the era of new antifungals: major role for antigen detection. *J Infect.* 2013;67(1):85-8.
89. Gilbert HM, Peters ED, Lang SJ, Hartman BJ. Successful treatment of fungal prosthetic valve endocarditis: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1996;22(2):348-54.
90. Lefort, J.C. Gantier, O. Lortholary *et al.* Endocardites fongiques. *Réanimation* 13 (2004) 197–204.
91. Zedtwitz-Liebenstein K, Gabriel H, Willinger B, Ehringer H, Polterauer P, Graninger W. Prosthetic valve endocarditis due to *Candida tropicalis* complicated by multiple pseudoaneurysms. *Infection.* 2001;29(3):177-9.
92. Von Reyn CF, Levy BS, Arbeit RD, Friedland G, Crumpacker CS. Infective endocarditis: an analysis based on strict case definitions. *Ann Intern Med.* 1981;94(4 pt 1):505-18.
93. Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. *Am J Med.* 1994;96(3):200-9.
94. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, *et al.* Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2000;30(4):633-8.
95. Monin JL. Endocardite : recommandations ESC 2015. *Cardiologie pratique.* 2016. cardiologie-pratique.com/journal/article/0012378-endocardite-recommandations-esc-2015. Consulté le 06 janvier 2017.
96. Chu VH, Cabell CH, Benjamin DK, Kuniholm EF, Fowler VG, Engemann J, *et al.* Early predictors of in-hospital death in infective endocarditis. *Circulation.* 2004;109(14):1745-9.
97. Que Y-A, Moreillon P. Infective endocarditis. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(6):322-36.
98. Diz Dios P. Infective endocarditis prophylaxis. *Oral Dis.* 2014;20(4):325-8.

99. Verhagen DWM, Hermanides J, Korevaar JC, Bossuyt PMM, van den Brink RBA, Speelman P, *et al.* Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder among survivors of left-sided native valve endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2009;48(11):1559-65.
100. Wallace SM, Walton BI, Kharbanda RK, Hardy R, Wilson AP, Swanton RH. Mortality from infective endocarditis: clinical predictors of outcome. *Heart Br Card Soc.* 2002;88(1):53-60.
101. Botelho-Nevers E, Thuny F, Casalta JP, Richet H, Gouriet F, Collart F, *et al.* Dramatic reduction in infective endocarditis-related mortality with a management-based approach. *Arch Intern Med.* 2009;169(14):1290-8.
102. Tattevin P, Mainardi JL. Analysis of the 2015 American and European guidelines for the management of infective endocarditis. *Med Mal Infect.* 2016;46(8):406-10.
103. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, *et al.* Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation.* 2015;132(15):1435-86.
104. Casalta J-P, Zaratzian C, Hubert S, Thuny F, Gouriet F, Habib G, *et al.* Treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis with high doses of trimethoprim/sulfamethoxazole and clindamycin-Preliminary report. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(2):190-1.
105. Paul M, Bishara J, Yahav D, Goldberg E, Neuberger A, Ghanem-Zoubi N, *et al.* Trimethoprim-sulfamethoxazole versus vancomycin for severe infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: randomised controlled trial. *BMJ.* 2015;350:h2219.
106. Markowitz N, Quinn EL, Saravolatz LD. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infection. *Ann Intern Med.* 1992;117(5):390-8.
107. Watanakunakorn C. Clindamycin therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. Clinical relapse and development of resistance to clindamycin, lincomycin and erythromycin. *Am J Med.* 1976;60(3):419-25.
108. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, *et al.* Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J.* 2009;30(19):2369-413.
109. Paul M, Zemer-Wassercug N, Talker O, Lishtzinsky Y, Lev B, Samra Z, *et al.* Are all beta-lactams similarly effective in the treatment of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteraemia? *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(10):1581-6.
110. Sande MA, Johnson ML. Antimicrobial therapy of experimental endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 1975;131(4):367-75.
111. Ribera E, Gómez-Jimenez J, Cortes E, del Valle O, Planes A, Gonzalez-Alujas T, *et al.* Effectiveness of cloxacillin with and without gentamicin in short-term therapy for right-sided *Staphylococcus aureus* endocarditis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 1996;125(12):969-74.
112. Cosgrove SE, Vigliani GA, Fowler VG, Abrutyn E, Corey GR, Levine DP, *et al.* Initial low-dose gentamicin for *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis is nephrotoxic. *Clin Infect Dis.* 2009;48(6):713-21.
113. Grohs P, Kitzis M-D, Gutmann L. In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):418-20.

114. Carugati M, Bayer AS, Miró JM, Park LP, Guimarães AC, Skoutelis A, *et al.* High-dose daptomycin therapy for left-sided infective endocarditis: a prospective study from the international collaboration on endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6213-22.
115. Kullar R, Casapao AM, Davis SL, Levine DP, Zhao JJ, Crank CW, *et al.* A multicentre evaluation of the effectiveness and safety of high-dose daptomycin for the treatment of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(12):2921-6.
116. Fowler VG, Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME, *et al.* Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med.* 2006;355(7):653-65.
117. Béraud G, Le Moal G, Elsendoorn A, Tattevin P, Godet C, Alfandari S, *et al.* A survey on the use of gentamicin in infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(7):1413-8.
118. Fernández-Hidalgo N, Almirante B, Gavalda J, Gurgui M, Peña C, de Alarcón A, *et al.* Ampicillin plus ceftriaxone is as effective as ampicillin plus gentamicin for treating *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2013;56(9):1261-8.
119. Pericas JM, Cervera C, del Rio A, Moreno A, Garcia de la Maria C, Almela M, *et al.* Changes in the treatment of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis in Spain in the last 15 years: from ampicillin plus gentamicin to ampicillin plus ceftriaxone. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(12):O1075-1083.
120. Mainardi JL, Gutmann L, Acar JF, Goldstein FW. Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(9):1984-7.
121. Wintenberger C, Guery B, Bonnet E, Castan B, Cohen R, Diamantis S, *et al.* Proposal for shorter antibiotic therapies. *Med Mal Infect.* 2017;47(2):92-141.
122. DiNubile MJ. Short-course antibiotic therapy for right-sided endocarditis caused by *Staphylococcus aureus* in injection drug users. *Ann Intern Med.* 1994;121(11):873-6.
123. Francioli P, Ruch W, Stamboulian D. Treatment of streptococcal endocarditis with a single daily dose of ceftriaxone and netilmicin for 14 days: a prospective multicenter study. *Clin Infect Dis.* 1995;21(6):1406-10.
124. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, *et al.* A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis.* 2013;57(4):e22-121.
125. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C, Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(6):R222.
126. Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1-->3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1650-9.
127. Azoulay E, Guigue N, Darmon M, Mokart D, Lemiale V, Kouatchet A, *et al.* (1, 3)- β -D-glucan assay for diagnosing invasive fungal infections in critically ill patients with hematological malignancies. *Oncotarget.* 2016;7(16):21484-95.
128. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, *et al.* ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl 7:19-37.

129. Lefort A, Chartier L, Sendid B, Wolff M, Mainardi J-L, Podglajen I, *et al.* Diagnosis, management and outcome of *Candida* endocarditis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;18(4):E99-109.
130. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(5):503-35.
131. Gould FK, Denning DW, Elliott TSJ, Foweraker J, Perry JD, Prendergast BD, *et al.* Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(2):269-89.
132. Ripp SL, Aram JA, Bowman CJ, Chmielewski G, Conte U, Cross DM, *et al.* Tissue distribution of anidulafungin in neonatal rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2012;95(1):89-94.
133. Kuse E-R, Chetchotisakd P, da Cunha CA, Ruhnke M, Barrios C, Raghunadharao D, *et al.* Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet.* 2007;369(9572):1519-27.
134. Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, *et al.* In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3591-6.
135. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1773-80.
136. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62(4):e1-50.
137. Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med.* 2009;37(3):840-851; quiz 859.
138. Martin MV, Yates J, Hitchcock CA. Comparison of voriconazole (UK-109,496) and itraconazole in prevention and treatment of *Aspergillus fumigatus* endocarditis in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(1):13-6.
139. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, *et al.* Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002;347(6):408-15.
140. Alla F, Bannay A, N'loga J, Carreaux JP. Evaluation of the benefit of early valve surgery in the treatment of infective endocarditis. Contribution of propensity analyses. *Ann Cardiol Angéiologie.* 2008;57(2):98-101.
141. Dzudie A, Mercusot A, de Gevigney G, Delahaye F. Timing and indications for surgical intervention in infective endocarditis. *Ann Cardiol Angéiologie.* 2008;57(2):93-7.
142. Lye DCB, Hughes A, O'Brien D, Athan E. *Candida glabrata* prosthetic valve endocarditis treated successfully with fluconazole plus caspofungin without surgery: a case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(11):753-5.
143. Utley JR, Mills J, Roe BB. The role of valve replacement in the treatment of fungal endocarditis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1975;69(2):255-8.
144. Escande W, Fayad G, Modine T, Verbrugge E, Koussa M, Senneville E, *et al.* Culture of a prosthetic valve excised for streptococcal endocarditis positive for *Aspergillus fumigatus* 20 years after previous *A fumigatus* endocarditis. *Ann Thorac Surg.* 2011;91(6):e92-93.

145. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, *et al.* Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 2007;116(15):1736-54.
146. Okell CC, Elliott SD Bacteraemia and oral sepsis with special reference to the aetiology of subacute endocarditis. *Lancet* 1935; 226: 869–72.
147. Danchin N, Duval X and C. Leport. Révision de la conférence de consensus de la prophylaxie de l'endocardite infectieuse. *Med Mal Infect*, 2002;32 :562-95.
148. Prophylaxie de l'endocardite. Révision de la conférence de consensus de mars 1992. *Recommandations 2002*. 2002 ;(32) :533-41.
149. NICE : National Institute for Health and Clinical Excellence : Prophylaxis against infective endocarditis. 2008 . <http://www.nice.org.uk/CG064>. Consulté le 21 janvier 2017.
150. F. Delahaye. Prophylaxie de l'endocardite : un retour aux antibiotiques ? *Cardiologie pratique*. 2016. <http://www.cardiologie-pratique.com/journal/article/0013731-prophylaxie-de-lendocardite-un-retour-aux-antibiotiques>. Consulté le 06 janvier 2017.
151. Tomás Carmona I, Diz Dios P, Limeres Posse J, González Quintela A, Martínez Vázquez C, Castro Iglesias A. An update on infective endocarditis of dental origin. *J Dent*. 2002;30(1):37-40.
152. Roberts GJ. Dentists are innocent! « Everyday » bacteremia is the real culprit: a review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children. *Pediatr Cardiol*. 1999;20(5):317-25.
153. Vieira Colombo AP, Magalhães CB, Hartenbach FARR, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog*. 2016;94:27-34.
154. Guntheroth WG. How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis? *Am J Cardiol*. 1984;54(7):797-801.
155. Thornhill MH, Dayer MJ, Forde JM, Corey GR, Chu VH, Couper DJ, *et al.* Impact of the NICE guideline recommending cessation of antibiotic prophylaxis for prevention of infective endocarditis: before and after study. *BMJ*. 2011;342:d2392.
156. Dayer MJ, Jones S, Prendergast B, Baddour LM, Lockhart PB, Thornhill MH. Incidence of infective endocarditis in England, 2000-13: a secular trend, interrupted time-series analysis. *Lancet*. 2015;385(9974):1219-28.
157. de Oliveira JC, Martinelli M, Nishioka SAD, Varejão T, Uipe D, Pedrosa AAA, *et al.* Efficacy of antibiotic prophylaxis before the implantation of pacemakers and cardioverter-defibrillators: results of a large, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009;2(1):29-34.
158. Khan O, Shafi AMA, Timmis A. International guideline changes and the incidence of infective endocarditis: a systematic review. *Open Heart*. 2016;3(2):e000498.
159. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Bolger AF, Levison ME, *et al.* Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. *Circulation*. 2005;111(23):e394-434.

160. Fernández-Cruz A, Cruz Menárguez M, Muñoz P, Pedromingo M, Peláez T, Solís J, *et al.* The search for endocarditis in patients with candidemia: a systematic recommendation for echocardiography? A prospective cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(8):1543-9.
161. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, *et al.* ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl 7:9-18.
162. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the « missing 50% » of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis.* 2013;56(9):1284-92.
163. Bille J, Edson RS, Roberts GD. Clinical evaluation of the lysis-centrifugation blood culture system for the detection of fungemia and comparison with a conventional biphasic broth blood culture system. *J Clin Microbiol.* 1984;19(2):126-8.
164. Mainardij.L., Vandenesch F., Casalta J.P., N'guyen J., Benoit C., Tissot-Dupont H., *et al.* Recommandations pour le diagnostic microbiologique et l'étude anatomo-pathologique des valves cardiaques au cours des endocardites infectieuses (dans le cadre de l'A.E.P.E.I.). *Bull. Soc. Fr. Microbiol.,* 1995, 10 : 12-15.
165. Cannady PB, Sanford JP. Negative blood cultures in infective endocarditis: a review. *South Med J.* nov 1976;69(11):1420-4.
166. Houpikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(3):162-73.
167. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, *et al.* Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine (Baltimore).* 2007;86(4):195-202.
168. Werner M, Andersson R, Olaison L, Hogevis H. A clinical study of culture-negative endocarditis. *Medicine (Baltimore).* 2003;82(4):263-73.
169. Houpikian P, Raoult D. Diagnostic methods. Current best practices and guidelines for identification of difficult-to-culture pathogens in infective endocarditis. *Cardiol Clin.* 2003;21(2):207-17.
170. Endocardite infectieuse. <http://microbiologiemedicale.fr/physiopathologie-et-diagnostic-des-infections/plan-bacteriemie/le-cas-particulier-des-endocardites/>, consulté le 25 août 2017.
171. Brouqui P, Lascola B, Roux V, Raoult D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med.* 1999;340(3):184-9.
172. Naber CK, Erbel R. Infective endocarditis with negative blood cultures. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30 Suppl 1:S32-36.
173. Tierno PM, Inglima K, Parisi MT. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) henselae* bacteremia using BacT/Alert blood culture system. *Am J Clin Pathol.* 1995;104(5):530-6.
174. Wendler D, Mendoza E, Schleiffer T, Zander M, Maier M. *Tropheryma whippelii* endocarditis confirmed by polymerase chain reaction. *Eur Heart J.* 1995;16(3):424-5.
175. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813-21.

176. Lamas CC, Eykyn SJ. Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. *Heart Br Card Soc.* 2003;89(3):258-62.
177. Gouriet F, Samson L, Delaage M, Mainardi J-L, Meconi S, Drancourt M, *et al.* Multiplexed whole bacterial antigen microarray, a new format for the automation of serodiagnosis: the culture-negative endocarditis paradigm. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;14(12):1112-8.
178. Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(9):2283-7.
179. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, *et al.* Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2002;51(5):433-42.
180. Venditti M, De Bernardis F, Micozzi A, Pontieri E, Chirletti P, Cassone A, *et al.* Fluconazole treatment of catheter-related right-sided endocarditis caused by *Candida albicans* and associated with endophthalmitis and folliculitis. *Clin Infect Dis.* 1992;14(2):422-6.
181. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1):129-33.
182. Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, Célard M, Benito Y, Lepidi H, *et al.* Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):763-6.
183. Greub G, Lepidi H, Rovey C, Casalta J-P, Habib G, Collard F, *et al.* Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. *Am J Med.* 2005;118(3):230-8.
184. Podglajen I, Bellery F, Poyart C, Coudol P, Buu-Hoï A, Bruneval P, *et al.* Comparative molecular and microbiologic diagnosis of bacterial endocarditis. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(12):1543-7.
185. Morris AJ, Drinkovic D, Pottumarthy S, Strickett MG, MacCulloch D, Lambie N, *et al.* Gram stain, culture, and histopathological examination findings for heart valves removed because of infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2003;36(6):697-704.
186. Woods GL, Walker DH. Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(3):382-404.
187. Gimenez DF. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol.* 1964;39:135-40.
188. Lepidi H, Coulibaly B, Casalta JP, Raoult D. Autoimmunohistochemistry: a new method for the histologic diagnosis of infective endocarditis. *J Infect Dis.* 2006;193(12):1711-7.
189. Lepidi H, Fenollar F, Dumler JS, Gauduchon V, Chalabreysse L, Bammert A, *et al.* Cardiac valves in patients with Whipple endocarditis: microbiological, molecular, quantitative histologic, and immunohistochemical studies of 5 patients. *J Infect Dis.* 2004;190(5):935-45.
190. Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. Quantitative analysis of valvular lesions during *Bartonella* endocarditis. *Am J Clin Pathol.* 2000;114(6):880-9.
191. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
192. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):465-84.

193. White TJ., Burns T., Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White. San Diego editors. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, Orlando, Florida; 1990. p.315–322.
194. Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, Towler HM, Matheson MM, *et al.* Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. J Clin Microbiol. 2000;38(8):2902-8.
195. Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. J Clin Microbiol. 2001;39(8):2873-9.
196. de Aguirre L, Hurst SF, Choi JS, Shin JH, Hinrikson HP, Morrison CJ. Rapid differentiation of *Aspergillus* species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 2004;42(8):3495-504.
197. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(8):2860-5.
198. Machouart M, Larché J, Burton K, Collomb J, Maurer P, Cintrat A, *et al.* Genetic identification of the main opportunistic Mucorales by PCR-restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol. 2006;44(3):805-10.
199. Martin C, Roberts D, van Der Weide M, Rossau R, Jannes G, Smith T, *et al.* Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. J Clin Microbiol. 2000;38(10):3735-42.
200. Kumar M, Shukla PK. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. J Clin Microbiol. 2005;43(2):662-8.
201. Playford EG, Kong F, Sun Y, Wang H, Halliday C, Sorrell TC. Simultaneous detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* species by reverse line blot hybridization. J Clin Microbiol. 2006;44(3):876-80.
202. O'Sullivan CE, Kasai M, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Kelaher AM, *et al.* Development and validation of a quantitative real-time PCR assay using fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Aspergillus fumigatus* in experimental invasive pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5676-82.
203. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, *et al.* Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Microbiol. 2000;38(6):2302-10.
204. Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kähkölä P, Anttila VJ, Malmberg H, Richardson M, *et al.* Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. J Clin Microbiol. 2000;38(11):4186-92.
205. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ. Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. J Clin Microbiol. 2005;43(5):2092-103.
206. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, *et al.* Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. J Clin Microbiol. 2007;45(2):380-5.
207. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol. 2006;44(3):693-9.
208. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. J Clin Microbiol. 2005;43(10):4943-53.

209. Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36(6):1634-41.
210. Mahé S, Duhamel M, Le Calvez T, Guillot L, Sarbu L, Bretaudeau A, *et al.* PHYMYCO-DB: a curated database for analyses of fungal diversity and evolution. *PLoS One.* 2012;7(9):e43117.
211. Souza ACR, Ferreira RC, Gonçalves SS, Quindós G, Eraso E, Bizerra FC, *et al.* Accurate identification of *Candida parapsilosis* (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2310-4.
212. Devulder G, Perrière G, Baty F, Flandrois JP. BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1785-7.
213. Hall L, Wohlfiel S, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):622-6.
214. Branger S, Casalta JP, Habib G, Collard F, Raoult D. *Streptococcus pneumoniae* endocarditis: persistence of DNA on heart valve material 7 years after infectious episode. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4435-7.
215. Millar BC, Moore JE. Current trends in the molecular diagnosis of infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23(5):353-65.
216. Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R, Ruef C, Böttger EC, Altwegg M. Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. *Clin Infect Dis.* 2003;37(2):167-72.
217. Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2733-9.
218. Rothman RE, Majmudar MD, Kelen GD, Madico G, Gaydos CA, Walker T, *et al.* Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis.* 2002;186(11):1677-81.
219. Gatselis N, Malli E, Papadamou G, Petinaki E, Dalekos GN. Direct detection of *Cardiobacterium hominis* in serum from a patient with infective endocarditis by broad-range bacterial PCR. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):669-72.
220. Breitkopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation.* 2005;111(11):1415-21.
221. Röver C, Greub G, Lepidi H, Casalta J-P, Habib G, Collart F, *et al.* PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):163-7.
222. Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, *et al.* Molecular diagnosis of infective endocarditis--a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(9):673-80.
223. Radford SA, Johnson EM, Leeming JP, Millar MR, Cornish JM, Foot AB, *et al.* Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. *J Clin Microbiol.* 1998;36(5):1294-9.
224. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol.* 1998;36(5):1169-75.
225. Posteraro B, Valentini P, Delogu A, De RG, Boccacci S, Sanguinetti M, *et al.* *Candida albicans* endocarditis diagnosed by PCR-based molecular assay in a critically ill pediatric patient. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(2):145-7.
226. Grijalva M, Horváth R, Dendis M, Erny J, Benedík J. Molecular diagnosis of culture negative infective endocarditis: clinical validation in a group of surgically treated patients. *Heart Br Card Soc.* 2003;89(3):263-8.

227. Kanda Y, Akiyama H, Onozawa Y, Motegi T, Yamagata-Murayama S, Yamaguchi H. *Aspergillus* endocarditis in a leukemia patient diagnosed by a PCR assay. *Kansenshogaku Zasshi*. 1997;71(3):269-72.
228. McCormack J, Pollard J. *Aspergillus* endocarditis 2003-2009. *Med Mycol*. 2011;49 Suppl 1:S30-34.
229. Badiie P, Alborzi A, Shakiba E, Ziyaeyan M, Pourabbas B. Molecular diagnosis of *Aspergillus* endocarditis after cardiac surgery. *J Med Microbiol*. 2009;58(2):192-5.
230. Chemaly RF, Tomford JW, Hall GS, Sholtis M, Chua JD, Procop GW. Rapid diagnosis of *Histoplasma capsulatum* endocarditis using the AccuProbe on an excised valve. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2640-1.
231. Rolain J-M, Raoult D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever. *QJM Mon J Assoc Physicians*. 2005;98(8):615-617.
232. La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the Bartonella paradigm. *Trends Microbiol*. 2003;11(7):318-21.
233. Zeaiter Z, Fournier P-E, Greub G, Raoult D. Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):919-25.
234. Fenollar F, Fournier PE, Raoult D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):4919-24.
235. Fenollar F, Fournier P-E, Robert C, Raoult D. Use of genome selected repeated sequences increases the sensitivity of PCR detection of *Tropheryma whippelii*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):401-3.
236. Gdoura R, Pereyre S, Frikha I, Hammami N, Clerc M, Sahnoun Y, *et al*. Culture-negative endocarditis due to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):718-20.
237. Kühn C, Disqué C, Mühl H, Orszag P, Stiesch M, Haverich A. Evaluation of commercial universal rRNA gene PCR plus sequencing tests for identification of bacteria and fungi associated with infectious endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):2919-23.
238. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol*. 1997;35(5):1216-23.
239. Bhargava P, Longhi LP. Images in clinical medicine. Peripheral smear with *Malassezia furfur*. *N Engl J Med*. 2007;356(24):e25.
240. Faergemann J, Fredriksson T. Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. *Acta Derm Venereol*. 1980;60(6):531-3.
241. Hassall E, Ulich T, Ament ME. Pulmonary embolus and *Malassezia* pulmonary infection related to urokinase therapy. *J Pediatr*. 1983;102(5):722-5.
242. Powell DA, Aungst J, Snedden S, Hansen N, Brady M. Broviac catheter-related *Malassezia furfur* sepsis in five infants receiving intravenous fat emulsions. *J Pediatr*. 1984;105(6):987-90.
243. Prober CG, Ein SH. Systemic tinea versicolor, or how far can furfur go? *Pediatr Infect Dis*. 1984;3(6):592.
244. Long JG, Keyserling HL. Catheter-related infection in infants due to an unusual lipophilic yeast--*Malassezia furfur*. *Pediatrics*. 1985;76(6):896-900.
245. Dankner WM, Spector SA. *Malassezia furfur* sepsis in neonates. *J Pediatr*. 1985;107(4):643-4.
246. Alpert G, Bell LM, Campos JM. *Malassezia furfur* fungemia in infancy. *Clin Pediatr (Phila)*. 1987;26(10):528-31.

247. Tragiannidis A, Bisping G, Koehler G, Groll AH. Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. *Mycoses*. 2010;53(3):187-95.
248. Dankner WM, Spector SA, Fierer J, Davis CE. *Malassezia* fungemia in neonates and adults: complication of hyperalimentation. *Rev Infect Dis*. 1987;9(4):743-53.
249. Arendrup MC, Fisher BT, Zaoutis TE. Invasive fungal infections in the paediatric and neonatal population: diagnostics and management issues. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;15(7):613-24.
250. Redline RW, Redline SS, Boxerbaum B, Dahms BB. Systemic *Malassezia furfur* infections in patients receiving intralipid therapy. *Hum Pathol*. 1985;16(8):815-22.
251. Arnow PM, Kushner R. *Malassezia furfur* catheter infection cured with antibiotic lock therapy. *Am J Med*. 1991;90(1):128-30.
252. Middleton C, Lowenthal RM. *Malassezia furfur* fungemia as a treatable cause of obscure fever in a leukemia patient receiving parenteral nutrition. *Aust N Z J Med*. 1987;17(6):603-4.
253. Wurtz RM, Knospe WN. *Malassezia furfur* fungemia in a patient without the usual risk factors. *Ann Intern Med*. 1988;109(5):432-3.
254. Garcia CR, Johnston BL, Corvi G, Walker LJ, George WL. Intravenous catheter-associated *Malassezia furfur* fungemia. *Am J Med*. 1987;83(4):790-2.
255. Barber GR, Brown AE, Kiehn TE, Edwards FF, Armstrong D. Catheter-related *Malassezia furfur* fungemia in immunocompromised patients. *Am J Med*. 1993;95(4):365-70.
256. Gidding H, Hawes L, Dwyer B. The isolation of *Malassezia furfur* from an episode of peritonitis. *Med J Aust*. 1989;151(10):603.
257. Myers JW, Smith RJ, Youngberg G, Gutierrez C, Berk SL. Fungemia due to *Malassezia furfur* in patients without the usual risk factors. *Clin Infect Dis*. 1992;14(2):620-1.
258. Brooks R, Brown L. Systemic infection with *Malassezia furfur* in an adult receiving long-term hyperalimentation therapy. *J Infect Dis*. 1987;156(2):410-1.
259. Wallace M, Bagnall H, Glen D, Averill S. Isolation of lipophilic yeast in « sterile » peritonitis. *Lancet*. 1979;2(8149):956.
260. Redline RW, Dahms BB. *Malassezia* pulmonary vasculitis in an infant on long-term Intralipid therapy. *N Engl J Med*. 1981;305(23):1395-8.
261. Gueho E, Simmons RB, Pruitt WR, Meyer SA, Ahearn DG. Association of *Malassezia pachydermatis* with systemic infections of humans. *J Clin Microbiol*. 1987;25(9):1789-90.
262. Baker RM, Stegink RJ, Manaloor JJ, Schmitt BH, Stevens JC, Christenson JC. *Malassezia* Pneumonia: A Rare Complication of Parenteral Nutrition Therapy. *J Parenter Enteral Nutr*. 2016;40(8):1194-6.
263. Shek YH, Tucker MC, Viciano AL, Manz HJ, Connor DH. *Malassezia furfur*--disseminated infection in premature infants. *Am J Clin Pathol*. 1989;92(5):595-603.
264. Schleman KA, Tullis G, Blum R. Intracardiac mass complicating *Malassezia furfur* fungemia. *Chest*. déc 2000;118(6):1828-9.

265. Holland TL, Baddour LM, Bayer AS, Hoen B, Miro JM, Fowler VG. Infective endocarditis. *Nat Rev Dis Primer*. 2016;2:16059.
266. Marcon MJ, Powell DA. Epidemiology, diagnosis, and management of *Malassezia furfur* systemic infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1987;7(3):161-75.
267. Marcon MJ, Powell DA. Human infections due to *Malassezia* spp. *Clin Microbiol Rev*. 1992;5(2):101-19.
268. Jatoi A, Hanjosten K, Ross E, Mason JB. A prospective survey for central line skin-site colonization by the pathogen *Malassezia furfur* among hospitalized adults receiving total parenteral nutrition. *J Parenter Enteral Nutr*. 1997;21(4):230-2.
269. Marcon MJ, Powell DA, Durrell DE. Methods for optimal recovery of *Malassezia furfur* from blood culture. *J Clin Microbiol*. 1986;24(5):696-700.
270. Chryssanthou E, Broberger U, Petrini B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 2001;90(3):323-7.
271. Ashbee HR. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol*. 2007;45(4):287-303.
272. Lintu P, Savolainen J, Kalimo K, Kortekangas-Savolainen O, Nermes M, Terho EO. Cross-reacting IgE and IgG antibodies to *Pityrosporum ovale* mannan and other yeasts in atopic dermatitis. *Allergy*. 1999;54(10):1067-73.
273. Bergbrant IM, Igerud A, Nordin P. An improved method for quantitative culture of *Malassezia furfur*. *Res Microbiol*. 1992;143(7):731-5.

SERMENT DE GALIEN

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

HOUHAMDI - HAMMOU Linda

Amélioration du diagnostic microbiologique des endocardites infectieuses à hémoculture négative avec la description des trois premiers cas adultes dus à *Malassezia restricta*.

Th. D. Pharm., LYON 1, 2017, 117 p.

RESUMÉ

L'endocardite infectieuse correspond à la prolifération de microorganismes, généralement bactériens et rarement fongiques, au niveau de l'endocarde suite à une dissémination microbienne hémotogène. C'est une pathologie peu fréquente mais qui reste létale en l'absence d'une prise en charge médicochirurgicale précoce et adaptée à l'agent causal. Au cours des dernières décennies, ses facteurs de risque, son épidémiologie et son étiologie microbiologique ont été modifiés. En raison du progrès médical, le taux d'endocardites associées aux soins et aux procédures invasives a augmenté, et l'espèce *Staphylococcus aureus* est devenue le principal germe responsable. De nouvelles techniques diagnostiques utilisées au cours des dernières années, en particulier en cas d'endocardites infectieuses à hémoculture négative, incluant des tests sérologiques, l'auto-immunohistochimie et les analyses par biologie moléculaire ont contribué à l'amélioration de la prise en charge de cette pathologie. En dépit de ces progrès, 5,2 % des cas restent encore à ce jour sans documentation étiologique. Ces endocardites sont généralement plus graves. L'identification rapide de l'agent étiologique est à la fois primordiale et critique pour une meilleure prise en charge thérapeutique de chaque patient.

L'objectif principal de notre travail a consisté à améliorer le diagnostic microbiologique de ces endocardites. Nous avons évalué l'apport d'un kit de biologie moléculaire (Molzym UMD - Universal Microbial Detection, Brême, Allemagne) permettant la détection simultanée de microorganismes bactériens et fongiques, par une approche de PCR universelle, à partir des prélèvements de valves cardiaques de patients atteints d'endocardite infectieuse à hémoculture négative. Ce kit permet l'extraction des ADN microbiens après leurs enrichissements suite à l'élimination de l'ADN humain dans le prélèvement, l'amplification des acides nucléiques par *Polymerase Chain Reaction* et leur séquençage.

Cette approche nous a permis d'identifier l'agent étiologique dans 100 % (16/16) des cas de notre série rétrospective d'endocardites certaines sans diagnostic étiologique. Dans 13 cas sur 16 (81,25 %), l'étiologie est bactérienne compatible avec le diagnostic d'endocardite. L'originalité de notre travail réside dans la documentation, pour la première fois, de trois cas (18,75 %) d'endocardite infectieuse à *Malassezia restricta* ; une levure lipophile lipo-dépendante saprophyte faisant partie du microbiote cutané de l'homme. Ces trois cas sont principalement associés aux soins et à l'utilisation de dispositifs intravasculaires, dont deux sont survenus chez des patientes en dénutrition sévère ayant nécessité une nutrition parentérale avec du SmofKabiven®. Nous avons, également, démontré une réaction sérologique croisée entre les anticorps anti-mannanes de cette levure et ceux de *Candida albicans*. Cette séro-réaction croisée présente un impact médico-thérapeutique majeur. L'endocardite infectieuse à *Malassezia restricta*, naturellement résistante aux échinocandines, pourrait être mal diagnostiquée comme une infection fongique invasive à *Candida albicans* dont les échinocandines constituent un des traitements de référence.

MOTS CLÉS : endocardite infectieuse, endocardite infectieuse à hémoculture négative, étiologie, endocardite fongique, *Malassezia restricta*, diagnostic, biologie moléculaire

JURY **Présidente :** Madame MORFIN-SHERPA Florence, PU-PH
 Membres : Madame WALLON Martine, PU-PH
 Madame BOUCHIAT-SARABI Coralie, MCU-PH
 Monsieur FERRY Tristan, PU-PH
 Monsieur VANDENESCH François, PU-PH

DATE DE SOUTENANCE : Mercredi 08 novembre 2017

ADRESSE DE L'AUTEUR : 37, Rue Saint-NESTOR – 69008 LYON

