



HAL
open science

Caractérisations génotypique et phénotypique de souches de *Candida glabrata* développant des résistances aux antifongiques

Cécile Loraux

► To cite this version:

Cécile Loraux. Caractérisations génotypique et phénotypique de souches de *Candida glabrata* développant des résistances aux antifongiques. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01655125

HAL Id: dumas-01655125

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01655125v1>

Submitted on 4 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
U.F.R DES SCIENCES MEDICALES

Année 2017

N°3096

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 septembre 2017

Par Cécile LORAUX

Née le 26 février 1987 à Drancy (93)

**Caractérisations génotypique et phénotypique de
souches de *Candida glabrata* développant
des résistances aux antifongiques**

Directeur de thèse

Docteur ROUGERON Amandine

Jury

Mr le Professeur CAZANAVE Charles (PU-PH), Président

Mme le Professeur LAFON Marie-Edith (PU-PH), Rapporteur

Mr le Professeur NOEL Thierry (PU), Membre

Mme le Docteur ACCOCEBERRY Isabelle (MCU-PH), Membre

Mme le Docteur ROUGERON Amandine (AHU), Directeur

Remerciements

A Monsieur le Professeur CAZANAVE Charles,

Merci d'avoir accepté de me faire l'honneur de présider cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur LAFON Marie-Edith,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse, et pour tes précieux conseils et ton aide dans le service de virologie.

A Monsieur le Professeur NOEL Thierry,

Merci d'avoir accepté d'être membre du jury et de juger ce travail. Veuillez croire en ma très grande reconnaissance.

A Madame le Docteur ACCOCEBERRY Isabelle,

Merci pour ton aide, ton soutien et ta disponibilité pour la réalisation de ce travail.

A Madame le Docteur ROUGERON Amandine,

Merci d'avoir été ma directrice de thèse et de m'avoir guidée dans l'élaboration de ce travail.

A mes parents, mes sœurs, mes tantes et mes grands-parents,
Merci pour votre soutien, votre générosité inconditionnelle et votre amour, sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui.

A mes amis d'enfance, Alaa-Eddine, Alessandra, Aymeric, Carole, Florent, Gaëlle, Naïma, et Vincent, on a grandi ensemble et le mythe de l'étudiante éternelle se termine maintenant. Merci d'avoir toujours été là.

A mes amis de la faculté, Fabien, Laurent, Sarah, Victoire et Vy pour le soutien inébranlable que vous m'avez toujours apportée, les moments partagés et ceux à venir.

A mes autres amies de la faculté qui ont fait le chemin jusque Bordeaux, Claire-Estelle, Pamini et Pauline, sans qui cet internat n'aurait pas été le même. Juste merci.

A mes amis de l'internat, Camille M pour ta bonne humeur et ta gentillesse, Xavier pour ton soutien, tes blagues pendant ces 4 semestres passés ensemble à se voir tous les jours, j'en redemande. Vous êtes mes points d'attache ici. Merci aussi à Cécile, Cindy et Coralie nous n'avons pas fait de semestre ensemble mais pour moi, c'est tout comme.

Merci à Edouard, Inès, Pierre-Yves et Samantha, on a surpassé ce premier semestre ensemble et c'est bien grâce à vous.

A mes autres co-internes de ces 8 semestres notamment Anne-Laure, David, Julien, Laurent, Thibault pour les moments partagés ensemble.

Ainsi que Ranou, Thibaut et Camille C, Hugo pour m'avoir soutenue et supportée durant ces derniers moments difficiles.

A Margot, qui a su me faire passer un semestre Villeneuvois au top, heureusement que tu étais là.

Un merci tout particulier à Aurélie, Claude, Emilie, Fred, Géraldine, Isabelle (encore une fois), Justine, Marius, Philippe et Sylvie pour leur bonne humeur quotidienne dans le service.

A Michel, mon Amoureux, pour ton soutien sans faille. Merci, simplement d'être là, auprès de moi.

Sommaire

1	Introduction.....	10
2	Généralités	11
2.1	Candida glabrata	11
2.1.1	Taxonomie.....	11
2.1.2	Morphologie.....	12
2.1.3	Approche génomique.....	13
2.1.4	Facteurs de virulence.....	15
2.2	Candidoses invasives.....	18
2.2.1	Physiopathologie.....	18
2.2.2	Epidémiologie	22
2.2.3	Diagnostic des candidoses invasives	24
2.2.4	Aspects cliniques des candidoses invasives	32
2.2.5	Pronostic des candidoses invasives	34
2.3	Les antifongiques	35
2.3.1	Cibles des antifongiques	35
2.3.2	Les principaux antifongiques systémiques: historique, pharmacologie et mode d'action	36
2.3.3	Les mécanismes de résistance aux antifongiques.....	41
3	Matériels et méthodes.....	46
3.1	Matériels biologiques et conditions de culture.....	46
3.1.1	Souches de <i>Candida glabrata</i> utilisées et conditions de culture.....	46
3.1.2	Lignée murine de Macrophage J774 (ATCC TIB-67).....	46
3.2	Tests de sensibilité aux antifongiques	47
3.3	Techniques de biologie moléculaire	48
3.3.1	Extraction et purification d'ADN génomique de levures.....	48
3.3.2	Réaction d'amplification de fragments d'ADN par PCR.....	49
3.3.3	Purification des produits de PCR (QiaQuick, Qiagen®).....	51
3.3.4	Séquençage nucléotidique et analyses informatiques	51
3.4	Interaction in vitro Macrophages -Levures Candida.....	52
3.4.1	Infection des macrophages par les levures.....	52
3.4.2	Etude de l'association macrophages-levures par cytométrie en flux	54
3.4.3	Etude de l'internalisation des levures par les macrophages par fluorimétrie classique	54

3.4.4	Etude de la survie des levures.....	55
4	Résultats et Discussion	56
4.1	Détermination des CMI des antifongiques de souches de <i>Candida glabrata</i> par la méthode E-Test.....	56
4.2	Analyse moléculaire des souches de <i>Candida glabrata</i>	58
4.2.1	Génotypage par MLST.....	58
4.2.2	Recherche de mutations dans les gènes <i>FKS1</i> et <i>FKS2</i>	59
4.3	Interaction <i>in vitro</i> Macrophages - Levures <i>Candida</i>	60
4.3.1	Etude de l'association macrophages-levures par cytométrie en flux	60
4.3.2	Etude de l'internalisation des levures par les macrophages par fluorimétrie classique	66
4.3.3	Détermination de la survie des levures.....	69
5	Conclusion et Perspectives.....	71
6	Bibliographie.....	73
7	Annexes	82

Liste des abréviations

5-FC	5-fluorocytosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATF	Antifongiques
BP	Clinical breakpoints
CAS	Caspofungine
CFW	CalcoFluor White
CMI	Concentration minimale inhibitrice
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HS	Hot Spot
IFI	Infection fongique invasive
IL	Interleukine
m/v	Masse pour volume
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionisation Time of flight
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MP	Macrophages
NET	Neutrophil extracellular traps
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
PAMPs	Pathogen associated molecular pattern
Pb	Paires de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PRR	Pattern recognition receptor
TLR	Toll like receptors
TNF	Facteur de nécrose tumorale
UFC	Unités formant des colonies

Liste des figures

Figure 1 (A) Aspect macroscopique <i>Candida glabrata</i> sur milieu Sabouraud; (B) Aspect microscopique <i>Candida glabrata</i> (x1000)	12
Figure 2 Représentation schématique de la phylogénie des espèces de <i>Candida</i> selon (7)	13
Figure 3 Les différentes étapes du séquençage multi- <i>loci</i> selon (13).....	15
Figure 4 Formation du biofilm chez <i>Candida albicans</i> selon (18)	17
Figure 5 Physiopathologie des candidoses invasives selon (24).....	19
Figure 6 Mécanismes et cellules impliqués dans l'élimination des <i>Candida spp</i> selon (27)	21
Figure 7 Les cellules phagocytaires de la défense anti- <i>Candida</i> selon (28)	22
Figure 8 Différentes formes observées lors de l'examen direct des <i>Candida spp.</i> d'après (37):.....	25
Figure 9 Principe de la technologie MALDI-TOF (38).....	26
Figure 10 Principe du MALDI Sepsityper®.....	27
Figure 11 Méthode de microdilution en milieu liquide.....	28
Figure 12 Antifongigramme par méthode E-test® BioMérieux :.....	29
Figure 13 Représentation schématique de l'ADN ribosomal contenant les zones cibles de l'amorce selon (48)	32
Figure 14 Cible des antifongiques selon (60).....	35
Figure 15 Mécanisme d'action de la flucytosine et principaux gènes et enzymes impliqués selon (69).....	37
Figure 16 Mode d'action des dérivés azolés	39
Figure 17 Modélisation cellulaire des principaux mécanismes de résistance aux azolés selon (21)	43
Figure 18 Séquence des « hot spots » de FKS et position de séquences d'acides aminés ayant pour conséquence une résistance aux échinocandines selon (78)	45
Figure 19 Mécanismes de résistance aux antifongiques de <i>Candida glabrata</i>	45
Figure 20 Macrophages de la lignée murine J774 observés au microscope (x200).....	47
Figure 21 Hématimètre de Malassez	53
Figure 22 Détermination des CMI de la caspofungine par des bandelettes E-Test exprimées en mg/L.	56

Figure 23 Récapitulatif dans le temps des souches de <i>Candida glabrata</i> du patient.....	58
Figure 24 Observation au microscope (x630) d'un macrophage infecté par des levures <i>Candida glabrata</i> montrant le marquage spécifique de chaque partenaire de l'infection d'après (81).....	60
Figure 25 Analyse des infections par cytométrie en flux d'après (81)	61
Figure 26 Observation au microscope (x200) des infections entre les macrophages et <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030.....	63
Figure 27 Mesures des interactions macrophages-levures par cytométrie en flux	64
Figure 28 Analyse de la survie des levures intra-macrophagiques au temps 30min, 5h et 24h	67
Figure 29 Histogramme représentant la MIF (Intensité Moyenne de Fluorescence) CFW par macrophage (MP) dans la population de MP Calcéine +, anti-CD16+ pour les différentes souches testées, traitées ou non par la caspofungine (concentration en µg/mL appliquée) aux différents temps d'infection.....	67
Figure 30 Taux de survie des levures intra-macrophagiques après 24 h d'infection.....	70

Liste des tableaux

Tableau 1 Incidence des candidémies en Europe, Etats-Unis, Canada d'après (22)	23
Tableau 2 Répartition des pathologies sous-jacentes de 12039 épisodes de candidémies étudiés sur la période 2004-2010 en France et évolution annuelle moyenne de l'incidence en population générale d'après (36).....	24
Tableau 3 <i>Candida</i> Score d'après (52).....	33
Tableau 4 Approche du diagnostic et de la prise en charge de la candidémie persistante d'après (54).....	34
Tableau 5 Historique, pharmacologie et mécanismes d'action des principaux antifongiques	36
Tableau 6 Compositions des milieux utilisés.....	47
Tableau 7 Breackpoints cliniques de <i>Candida glabrata</i> d'après l'EUCAST (80)	48
Tableau 8 Amorces pour amplification et séquençage par MLST pour l'espèce <i>Candida glabrata</i> d'après (14).....	50
Tableau 9 Paramètres des réactions d'amplification utilisés pour les réactions d'amplification utilisant la <i>GoTaq</i> et la <i>Pfu</i>	50
Tableau 10 Amorces nucléotidiques utilisées pour la recherche de mutations dans les gènes <i>FKS1</i> et <i>FKS2</i>	51
Tableau 11 Détermination des Concentrations minimales inhibitrices (mg/L) par E-Test	56
Tableau 12 Allèles retrouvés en MLST pour CGLA 1402, CGLA 1454 et CGLA 1520.....	58
Tableau 13 Séquençage des gènes <i>FKS1</i> et <i>FKS2</i> de la souche CGLA 1454 et de la souche de référence	59

1 Introduction

L'incidence des infections fongiques invasives est en constante augmentation ces dernières années du fait de l'allongement de la durée de vie des patients et de l'émergence de pathogènes opportunistes, notamment les levures du genre *Candida* au sein du règne fongique.

Candida albicans est l'espèce majoritaire, mais des espèces de *Candida* non *albicans*, telles que *Candida glabrata* sont de plus en plus souvent isolées dans ce contexte.

Les *Candida spp* sont des levures saprophytes retrouvées à l'état commensal chez l'Homme sur la peau et les muqueuses. Le passage de l'état saprophyte à l'état pathogène dépend de la balance entre les capacités de colonisation, les facteurs de virulence des *Candida spp.* et le contrôle des défenses du système immunitaire, tels que les phagocytes macrophages et les granulocytes neutrophiles de l'immunité innée. Ceux-ci constituent la principale défense vis-à-vis des infections fongiques.

Notre travail avait deux objectifs. Le premier était de caractériser génotypiquement par du séquençage et la recherche de mutations des souches de *Candida glabrata* sensibles ou non aux antifongiques. Le deuxième était la caractérisation phénotypique de ces souches avec le suivi qualitatif et quantitatif, *in vitro*, de l'interaction entre les macrophages et les souches de *Candida glabrata* en cytométrie en flux.

Après une première partie composée d'une revue de la littérature portant sur *Candida glabrata*, les candidoses invasives et les différents antifongiques utilisés en thérapeutique humaine, nous exposons dans la deuxième partie de ce manuscrit les résultats des caractérisations génotypique et phénotypique portant sur l'interaction entre les macrophages et les souches de *Candida glabrata* en cytométrie en flux.

2 Généralités

2.1 *Candida glabrata*

Les levures du genre *Candida* sont des micro-organismes eucaryotes de 4 à 10 µm, se reproduisant par bourgeonnement polaire grâce à la formation de blastopores. Certaines espèces produisent des filaments mycéliens sous la forme de pseudomycélium (ou pseudohyphes), voire de mycélium vrai. Ces micro-organismes sont ubiquitaires de l'environnement (sol) et de l'alimentation (produits laitiers, les légumes...). Certaines espèces sont également présentes dans les différentes flores commensales humaines, majoritairement celle du tube digestif, mais aussi au niveau des flores buccale, génitale, urinaire et cutanée.

2.1.1 Taxonomie

Depuis les premiers pas dans la description du genre *Candida* et grâce au développement croissant des méthodes d'identification et d'analyse de biologie moléculaire, ce genre s'est considérablement étoffé et de nombreuses espèces sont régulièrement décrites (1). Le genre *Candida* regroupe plus de 300 espèces, allant de *Candida aaseri* à *Candida zeylanoides* (2).

L'espèce aujourd'hui communément dénommée *Candida glabrata* a été décrite pour la première fois en 1895 par Berlese sous l'appellation « *Cryptococcus glabratus* » (2). Cette espèce étant caractérisée par l'absence de production de filaments mycéliens, elle fût par la suite assignée au genre *Torulopsis* dont les espèces sont caractérisées par l'absence de filaments mycéliens, par Lodder et DeVries en 1938 (3). A la fin des années 1970, les 66 espèces du genre *Torulopsis* ont été reclassées au sein du genre *Candida*, dont *Candida glabrata*. L'ancien genre *Candida* regroupant les espèces formant du pseudomycélium est redéfini pour inclure les espèces pour lesquelles les pseudohyphes sont absents, rudimentaires ou bien développés (4).

Avec le développement de la biologie moléculaire, l'étude des séquences des ARN ribosomiques a démontré que *Candida glabrata* est phylogénétiquement plus proche de *Saccharomyces cerevisiae* que des autres espèces du genre *Candida* (5).

La classification admise pour *Candida glabrata* est ainsi la suivante selon (6) :

Royaume:	Fungi
Division:	Ascomycota
Sous-division:	Ascomycotina
Classe:	Ascomycètes (forme sexuée connue)
Sous-classe:	Hémiascomycètes
Ordre:	Saccharomycétales
Famille:	Saccharomycetaceae
Genre:	<i>Candida</i>

2.1.2 Morphologie

Macroscopiquement, *Candida glabrata* se présente sous la forme de colonies lisses et brillantes, de couleur blanche ou crème (Figure 1A).

Microscopiquement, *Candida glabrata* se présente sous forme de cellules ovoïdes produisant des blastopores ovoïdes de 1 à 4 μm , se multipliant par bourgeonnement. Cette espèce ne peut pas produire de filaments mycéliens (Figure 1B).

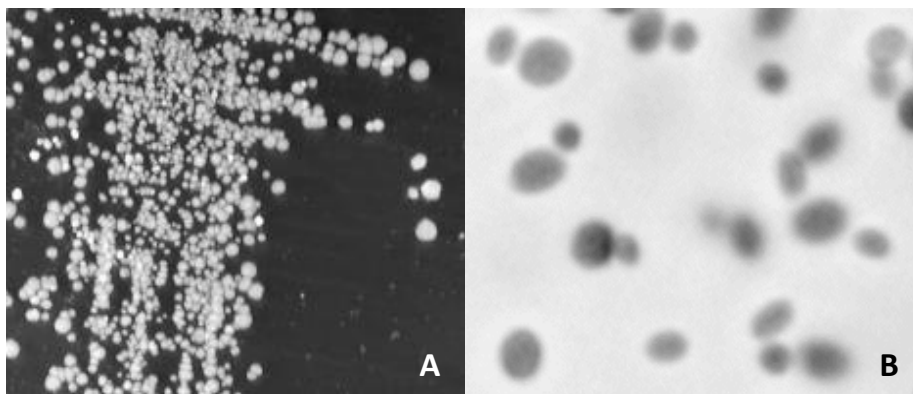


Figure 1 (A) Aspect macroscopique *Candida glabrata* sur milieu Sabouraud; (B) Aspect microscopique *Candida glabrata* (x1000)

2.1.3 Approche génomique

2.1.3.1 Génome

Il existe une grande diversité au sein du genre *Candida*. On distingue des espèces haploïdes, comme *Candida glabrata* et des espèces diploïdes, comme *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*. Leur nombre de chromosomes est variable: 13 pour *Candida glabrata* et 8 pour *Candida albicans* par exemple.

Les levures retrouvées en pathologie humaine sont divisées en deux clades (Figure 2) (7):

- Clade CTG, les levures décodent le codon CUG en leucine au lieu d'une sérine ;
- Clade Whole Genome Duplication, dont fait partie *Candida glabrata*, où le génome des levures a subi une duplication.

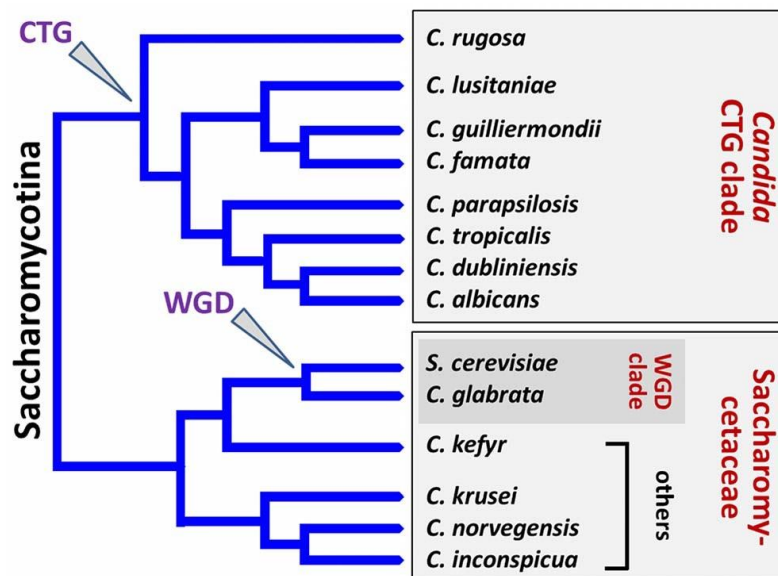


Figure 2 Représentation schématique de la phylogénie des espèces de *Candida* selon (7)

Candida glabrata fait partie des *Candida spp.* dont le génome est entièrement séquencé (8). Il est organisé en 13 chromosomes nucléaires comportant 5283 gènes totalisant 12,3 millions de paires de bases (Mpb) et comportant chacun un centromère.

Le génome mitochondrial de *Candida glabrata* est l'un des plus petits connus chez les Hémiascomycetes, avec une taille d'environ 20000 paires de bases. C'est un

chromosome circulaire comportant 8 gènes codant pour des protéines, 23 gènes codant pour des ARN de transfert et des gènes codant pour les sous-unités des ribosomes mitochondriaux (9).

Le génome mitochondrial de *Candida glabrata* a la particularité d'être non-indispensable, contrairement aux autres levures du genre *Candida*. En effet, la perte totale ou partielle du génome mitochondrial est viable chez *Candida glabrata* et pourrait être même un avantage sélectif sous antifongiques, car cette mutation s'accompagnerait d'une résistance à ces antifongiques par surexpression de protéines d'efflux de type ABC (10).

2.1.3.2 Génotypage

Les méthodes de typage moléculaire reposent sur la variabilité du génome et sont un apport précieux au cours des enquêtes épidémiologiques. En effet, dans un contexte d'infection nosocomiale, il peut être utile de déterminer l'origine de la souche acquise par le patient au cours de son séjour à l'hôpital (11). Dans un contexte de candidose chronique ou récurrente, le typage permet de distinguer le portage chronique d'une même souche de réinfections successives par des souches différentes.

Les méthodes phénotypiques de typage sont aujourd'hui désuètes, et les méthodes génotypiques sont privilégiées.

Pour le typage des espèces de *Candida*, des techniques de séquençage de plusieurs *loci* de génome ont été décrites pour *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* notamment (12).

La technique MLST (pour « *Multi Locus Sequence Typing* ») a été initialement développée en 1998 pour la caractérisation de souches bactériennes, et s'est révélée utile dans l'étude des levures à partir de 2003. Cette méthode est basée sur l'analyse du polymorphisme nucléotidique observé après séquençage de 6 ou 7 *loci* indépendants. Les fragments séquencés sont constitués de 400 à 500 paires de bases. Pour chaque région génomique étudiée, les différentes séquences ADN obtenues correspondent à différents allèles et ceux-ci sont numérotés. La combinaison de l'ensemble des allèles identifiés définit un profil allélique ou séquence type (ST) de la souche étudiée (Figure 3) (13).

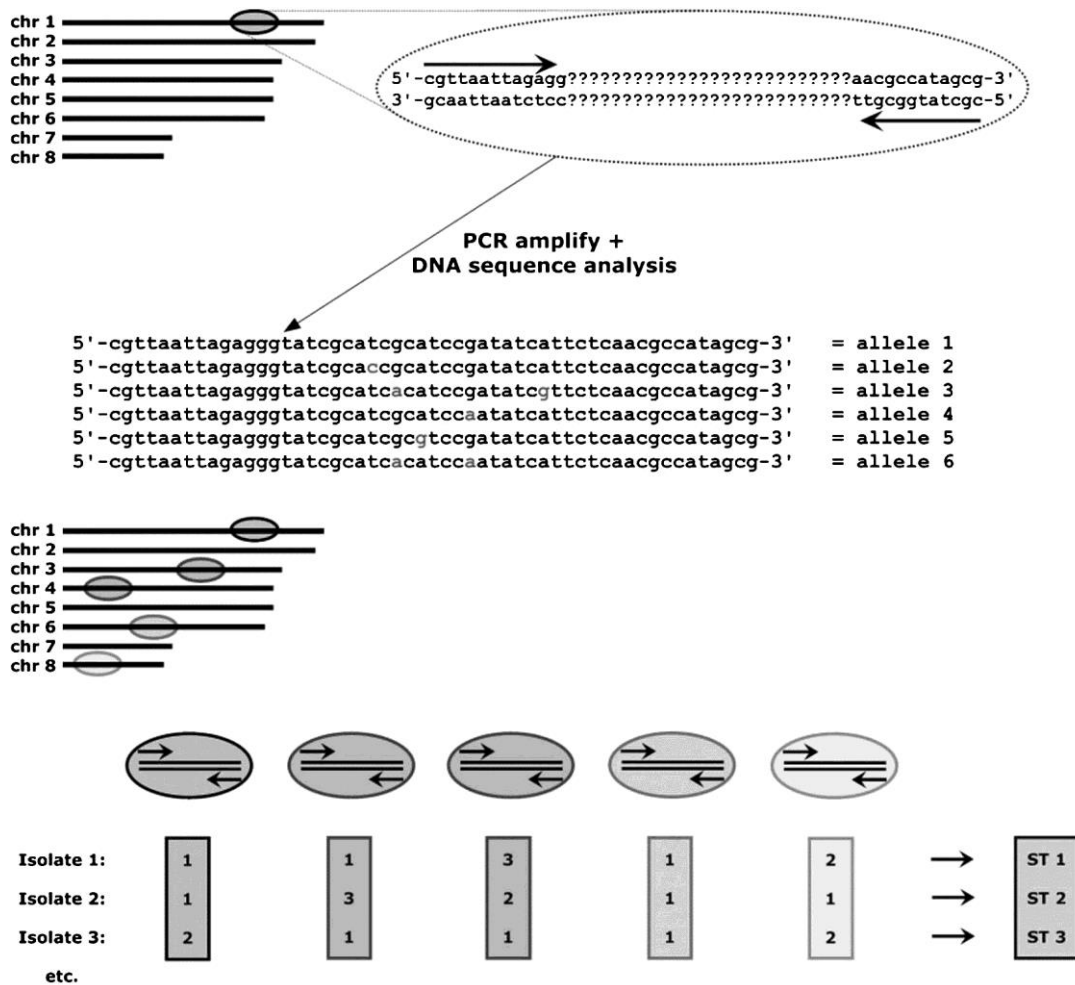


Figure 3 Les différentes étapes du séquençage multi-loci selon (13)

Les cibles génomiques sont amplifiées par PCR et séquencées. Les variants alléliques sont numérotés de façon arbitraire. Une séquence type (ST) est alors une combinaison unique de variants alléliques

Concernant *Candida glabrata*, différents loci ont été analysés par la méthode MLST pour identifier les plus discriminants pour cette espèce, lesquels sont : *FKS* (1,3-Bêta-glucan synthase), *LEU2* (3-Isopropylmalate déshydrogenase), *NMT1* (Myristoyl-CoA), *TRP1* (Phosphoribosyl-anthranilate isomerase), *UGP1* (UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase), et *URA3* (Orotidine-5'-phosphate decarboxylase) (14).

2.1.4 Facteurs de virulence

La virulence des *Candida spp.* est liée à de nombreux facteurs. L'adhérence aux cellules de l'hôte, la sécrétion d'enzymes, le changement de conformation ainsi que la capacité d'adaptation à l'environnement permettent aux *Candida spp.* de coloniser l'hôte et d'être responsables d'infection en affectant leur virulence.

2.1.4.1 L'adhérence aux cellules de l'hôte

Les *Candida spp.* sont capables d'adhérer à différents substrats et tissus par l'intermédiaire d'adhésines et de protéases mettant en jeu des interactions spécifiques de type ligand / récepteur.

Les adhésines sont multiples et diverses et plusieurs d'entre elles interviennent dans le processus d'adhérence. Ainsi, une souche mutée au niveau d'un gène pour une adhésine augmente l'expression d'une autre adhésine.

Une famille de plusieurs gènes *ALS* (pour « *Agglutinin-Like Sequence* »), *Als1p* et *Als3p*, permet l'adhérence de *Candida albicans* aux cellules endothéliales vasculaires et buccales (15). Des adhésines de type lectines ont aussi été identifiées chez *Candida albicans* et *Candida glabrata*. Ces lectines de la paroi fongique se lient à des glycoprotéines de surface des cellules épithéliales contenant du fucose ou du *N*-acétyl-D-glucosamine. Chez *Candida glabrata*, une famille de gènes *EPA* (pour « *Epithelial Adhesin* ») a été caractérisée, et serait impliquée dans l'adhérence aux cellules épithéliales (16).

2.1.4.2 Sécrétion et recrutement d'enzymes hydrolytiques.

Au cours de l'infection, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires. Ces enzymes appartiennent à la famille des aspartyl transférases (*Sapas*), des phospholipases et des lipases. *Candida glabrata* sécrète des hydrolases qui permettent un envahissement des cellules hôtes, telles que des hydrolases facilitant la pénétration des blastopores dans les endothéliums ou encore des protéases type *SAP* (pour « *Secreted Aspartyl Protease* »).

2.1.4.3 La formation de mycéliums vrais et pseudomycéliums.

Les tubes germinatifs, structures intermédiaires entre le blastopore et le mycélium, augmentent l'adhérence aux cellules épithéliales et favorisent la colonisation induisant la propre endocytose du pathogène. La production d'hyphes augmente, par ailleurs, l'invasion et la destruction tissulaire. Cependant, *Candida glabrata* n'est pas capable de croître sous forme mycélienne. Malgré cette observation, il semble que les gènes impliqués dans la transition morphologique chez *Candida glabrata* soient requis pour

maintenir un niveau normal de virulence, notamment les gènes *STE12* et *STE20* codant respectivement pour le facteur de transcription final et un messenger intermédiaire de la voie de signalisation aboutissant à la transition morphologique (17).

2.1.4.4 Formation de biofilm.

Les biofilms sont des groupements de micro-organismes adhérant à une surface produisant une matrice exopolymérique. Ils se forment le plus souvent sur une surface synthétique, comme celle d'un cathéter veineux central ou d'une valve cardiaque.

La formation du biofilm par les *Candida spp.* se décrit en plusieurs étapes (Figure 4). La première est l'adhésion à la surface du support par les cellules à l'état de blastopore. Celles-ci se multiplient alors pour former des micro-colonies constituant la couche basale du biofilm. La deuxième étape est la production de pseudomycélium et de mycélium ainsi que d'une matrice extracellulaire fabriquée par les cellules englobées dans le biofilm. La composition de cette matrice dépend de l'espèce de *Candida* et sa quantité dépend des conditions environnementales. Enfin, la dernière étape entrant dans la formation de biofilm est la communication entre les différentes cellules du biofilm, le «*quorum sensing*». Celui-ci est fondamental dans la dissémination et le développement d'infections à distance (18,19).

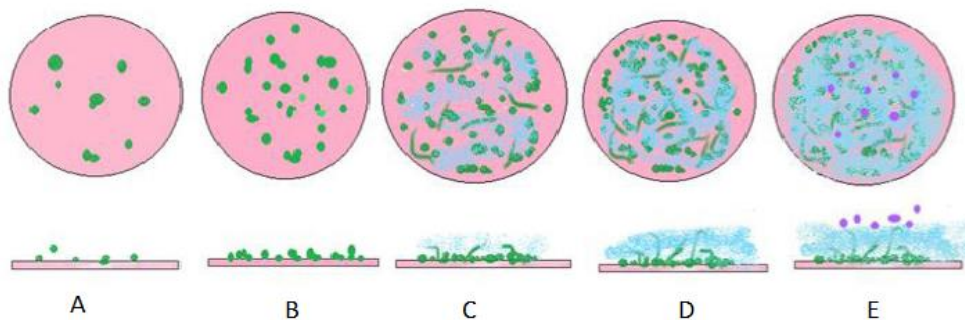


Figure 4 Formation du biofilm chez *Candida albicans* selon (18)

- (A) Adhésion des levures (colonies vertes) à la surface
- (B) Multiplication des levures formant une couche basale de micro-colonies de levures
- (C) Production de pseudomycélium et formation d'une matrice extra-cellulaire (en bleu)
- (D) Développement de la matrice extra-cellulaire
- (E) Production de nouvelles spores (pourpres) par *quorum sensing* permettant ainsi la dissémination

Sa capacité à former des biofilms est le facteur de virulence le plus préoccupant de *Candida glabrata*. Le phénomène d'adhésion est médié par des adhésines épithéliales (EPA) qui ont une structure comparable aux protéines ALS. Les protéines EPA1, EPA6 et EPA7 sont les adhésines les plus importantes dans ce phénomène (20). La formation de biofilm implique aussi 3 autres gènes tels que *SIR4*, *RIF6* et *YAK1* (21).

2.2 *Candidoses invasives*

Le passage du commensalisme à la pathogénicité témoigne d'un déséquilibre entre les défenses de l'hôte et le pouvoir pathogène de la levure. L'espèce *Candida albicans* est l'espèce la plus fréquemment isolée, bien que la mise en évidence de *Candida* non *albicans* soit en augmentation ces dernières années (22).

Dans certains cas, notamment chez les patients fragilisés ou présentant des facteurs de risque bien particuliers, ces champignons peuvent adopter un comportement opportuniste et être à l'origine d'infections plus ou moins sévères. Les infections superficielles atteignant la peau, les ongles et/ou les muqueuses (digestive ou vulvo-vaginale), les plus communes, ont en général une évolution favorable. Les infections profondes, survenant sur des terrains particuliers, présentent une morbi-mortalité élevée.

Toutefois, seules quelques espèces sont impliquées en pathologie humaine ; les plus fréquentes étant *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondi*, *Candida lusitaniae* et *Candida kefyr* (23).

2.2.1 Physiopathologie

Les levures du genre *Candida* font partie de la flore endogène de l'être humain. La colonisation se développe suite à des modifications de l'environnement de cette flore favorisant ainsi la croissance des *Candida* sur les surfaces cutanées et muqueuses (24). Ceci est un prérequis indispensable au développement ultérieur d'une candidose invasive (25). Le risque de développer une candidose invasive est corrélé à l'importance de cette colonisation. L'exposition répétée ou continue à plusieurs facteurs de risque favorise dès lors la survenue de micro-invasions. Les espèces du genre *Candida* vont

pouvoir se transposer à travers la barrière intestinale, qui a ainsi perdu son intégrité. De par ce fait, une dissémination hématogène secondaire est possible. Ces levures peuvent disséminer dans tous les tissus et organes et la pathologie dépendra de l'organe atteint (atteintes hépatosplénique, rénale, ou cutanée, endocardite, endophtalmie...) (Figure 5).

De façon exceptionnelle, une colonisation acquise par voie exogène est possible (transmission manuportée à partir des accès vasculaires ou des solutions hydro-alcooliques) (26).

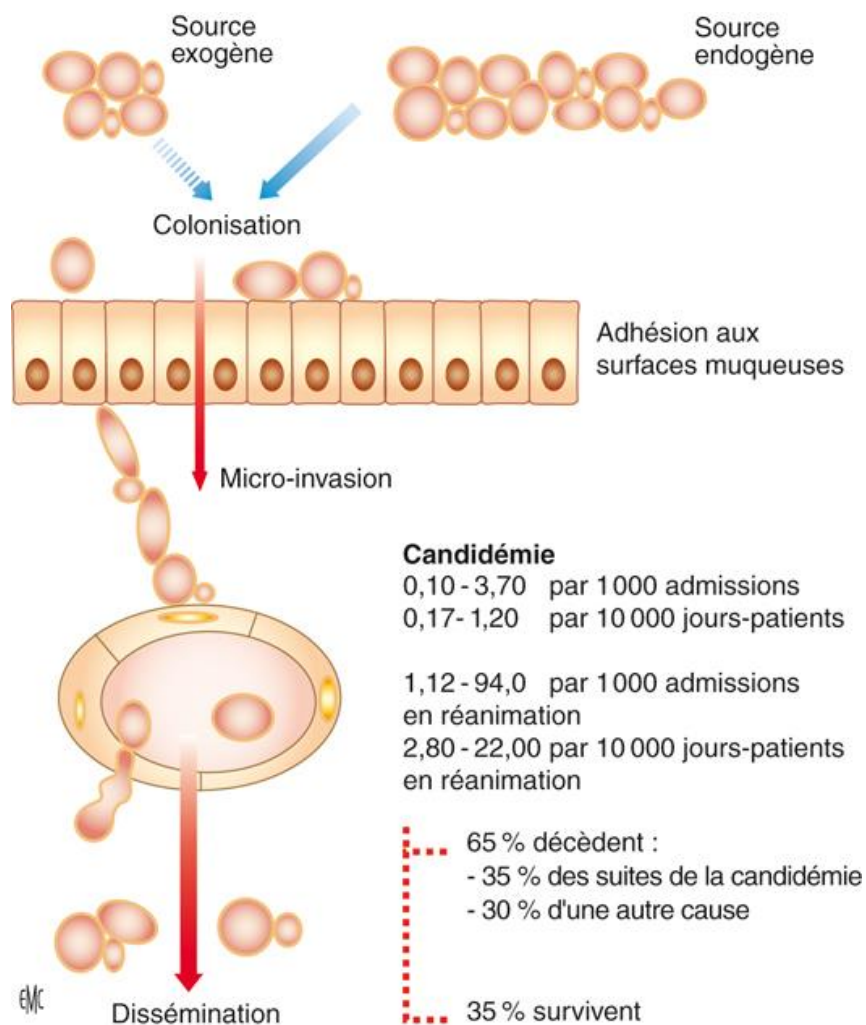


Figure 5 Physiopathologie des candidoses invasives selon (24)

Le développement des candidémies est lié au déséquilibre entre l'expression des facteurs de virulence de la levure et l'activité des facteurs de défense de l'hôte tels que ses cellules immunitaires qui vont reconnaître, contrôler et éliminer les pathogènes et l'intégrité des barrières anatomiques. Ainsi, l'installation de l'infection est très dépendante de l'interaction entre le *Candida* et les cellules immunitaires de l'hôte.

Au cours d'une infection à *Candida*, les cellules phagocytaires des lignées monocytaires et neutrophiles jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme contre ces pathogènes. La lyse des *Candida* dans les phagolysosomes des phagocytes met en jeu des mécanismes oxydatifs et enzymatiques. Les macrophages proviennent de la différenciation des monocytes sanguins et résident dans les tissus. Ils jouent un rôle important dans la détection et la destruction des levures. Ils modulent également la réponse immunitaire par présentation antigénique et sécrétion de cytokine pro-inflammatoire : TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-12 notamment. Cependant, *in vitro*, les *Candida* sont capables de résister aux macrophages. En effet, *Candida glabrata* se multiplie à l'intérieur du macrophage et celui-ci finit par éclater en libérant les levures. L'action des cellules protectrices nécessite la reconnaissance du pathogène par des récepteurs. Ceux-ci appartiennent à la famille des PRR (pour « *Pattern Recognition Receptors* ») ayant pour ligand un ensemble de molécules spécifiques de micro-organismes désignés comme les PAMPs (pour « *Pathogen-Associated Molecular Pattern* ») présents sur les phagocytes. Chaque pathogène présente une PAMP qui lui est spécifique et qui est reconnu par plusieurs PRR. Ces derniers sont à l'origine de cascades de signalisation intracellulaire, aboutissant à une réponse concertée pour la défense de l'hôte. Chez les *Candida spp.*, les PAMPs comprennent principalement des composés de la paroi cellulaire tels que les mannoprotéines, les β -D-glucanes, le mannose et la chitine. Les PRR reconnaissant ces composés fongiques font partie des TLRs (pour « *Toll-Like Receptors* ») et des CLR (pour « *C-Lectin Receptors* ») (27) (Figure 6).

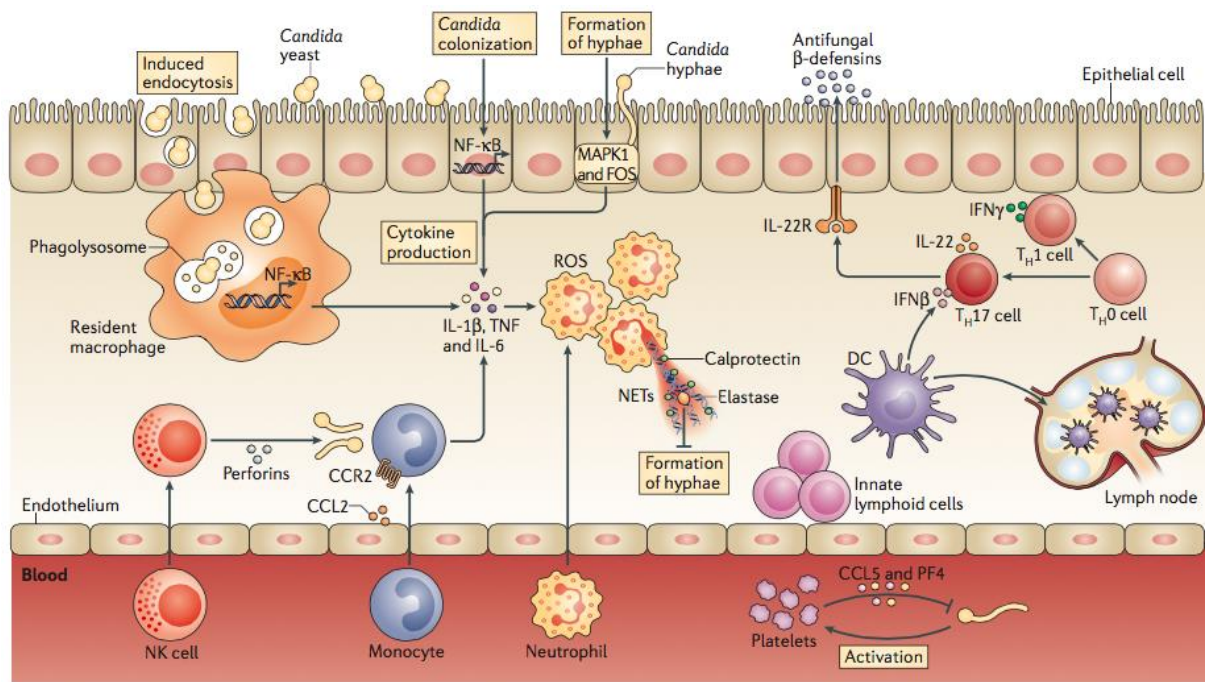


Figure 6 Mécanismes et cellules impliqués dans l'élimination des *Candida spp* selon (27)

L'épithélium fournit une barrière mécanique contre l'invasion des *Candida*. Cependant, les *Candida* peuvent s'endocyter, les cellules épithéliales produire des cytokines et les levures des hyphes, ce qui conduit au recrutement de cellules immunitaires. Les cellules épithéliales peuvent également réagir en produisant des β-défensines qui ont une activité anti-*Candida* directe. Ensuite les MP vont phagocyter *Candida*. Lors de l'invasion, les neutrophiles sont recrutés et phagocytent les levures, produisent des ROS (*reactive oxygen species*) et libèrent des pièges extracellulaires neutrophiles (NET) qui captent les *Candida*. Les monocytes inflammatoires sont également recrutés sur le site d'infection et éliminent les levures. Les cellules dendritiques peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques et contribuer aux réponses adaptées aux cellules T helper. Les cellules lymphoïdes innées ont également la capacité de produire des cytokines pro-inflammatoires et contribuent à la défense antifongique des muqueuses. La dernière étape de l'invasion de *Candida* est une lésion de l'endothélium, permettant l'accès à la circulation sanguine. Les levures activent alors les plaquettes qui ont une activité anti-*Candida* (par production de chimiokines et facteur plaquettaire).

Parmi les TLRs, certains reconnaissent les résidus O-mannosylés de la paroi fongique (TLR4), d'autres les phospholipomannanes (TLR2 et TLR6), les β-D-glucanes (TLR2), ou encore l'ADN fongique (TLR3 et TLR9). Ces TLRs sont principalement impliqués dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (28).

Les CLRs sont des récepteurs calcium-dépendants qui reconnaissent les sucres de la paroi fongique tels que les mannanes (Dectin-2, Dectin-3, Mincle, récepteur au Mannose), la chitine, et les β-glucanes (Dectin-1). Le récepteur au Mannose, principal récepteur des macrophages, participe à l'activation de la réponse pro-inflammatoire. Le récepteur Dectin-1, principalement exprimé sur les monocytes et les macrophages, active la production de cytokines et la formation de synapses phagocytiques qui participent à l'internalisation des levures (Figure 7).

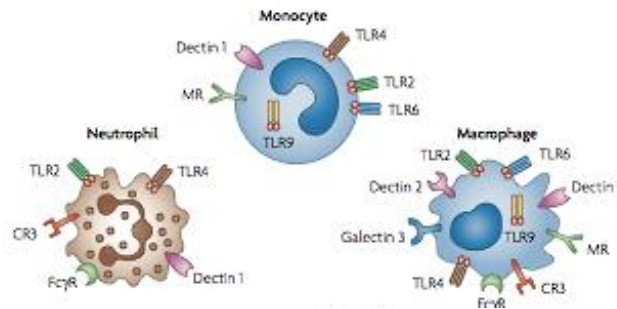


Figure 7 Les cellules phagocytaires de la défense anti-*Candida* selon (28)
 Le neutrophile est représenté en marron avec un noyau polylobé et plusieurs granules cytoplasmiques, le monocyte en bleu avec un pourtour lisse et le macrophage en bleu avec une surface irrégulière. Les PRR spécifiques de chaque type cellulaire sont représentés.

Bien que l'immunité innée soit la principale réponse anti-*Candida*, le rôle de l'immunité adaptative est non négligeable mais limité à la différenciation des lymphocytes CD4⁺ en lymphocytes T helper 1 ou 2 (Th1 ou Th2). Les lymphocytes vont à leur tour produire des cytokines qui vont activer des cellules phagocytaires et des cellules B. L'infection par *Candida albicans* commence généralement par une réponse Th1 protectrice mais rapidement les levures essayent de la moduler vers une réponse Th2 non protectrice associée à une susceptibilité accrue aux infections à *Candida spp*. Après l'élimination des pathogènes, l'inflammation doit être arrêtée en inhibant la réponse immunitaire de type Th1. Ceci est contrôlé par les macrophages sécrétant de l'IL-10 et du TGF induisant la prolifération des cellules Treg (T régulatrices) ainsi que des cytokines pro-Th2 tels que l'IL-4 et l'IL-13.

2.2.2 Epidémiologie

2.2.2.1 Incidence

L'épidémiologie des infections fongiques invasives (IFI) s'est modifiée au cours de ces dernières années. L'incidence mondiale des IFI est en augmentation.

En France, sur la période 2000 – 2010, l'incidence des IFI était de 5,9 cas pour 100 000 habitants dont les candidémies représentaient 43,3% soit 2,5 cas pour 100 000

habitants. Le taux de létalité des candidémies dans cette étude était de 40% (29). Il existe une disparité importante au niveau mondial quant à l'incidence des candidémies. En effet, l'incidence est plus faible en Europe qu'aux Etats-Unis, où elle peut aller de 6 cas pour 100 000 habitants dans la région de l'Iowa, jusqu'à 24 cas pour 100 000 habitants dans la région de Baltimore, ces incidences ayant été déterminées sur la période de 1998 – 2000. En Europe, elle varie de 1,9 cas pour 100 000 habitants en Finlande à 11 cas pour 100 000 habitants au Danemark (Tableau 1) (22).

Tableau 1 Incidence des candidémies en Europe, Etats-Unis, Canada d'après (22)

Continent	Années	Pays/ Région	No de cas/100000/an
Europe	1995-1999	Finlande	1,9
	1991-1994	Norvège	2,0
	2001-2003	Norvège	3,0
	1995-1999	Islande	4,9
	2002-2003	Barcelone	4,9
	2003-2004	Danemark	11,0
Etats-Unis	1998-2003	Iowa	6,0
	1992-1993	San Francisco	7,1
	1992-1993	Atlanta	8,7
	1998-2000	Connecticut	7,1
	1998-2000	Baltimore	24,0
Canada	1999-2004	Calgary	2,8

Ces infections sont principalement des infections nosocomiales, même si les candidémies communautaires ne sont pas exceptionnelles et semblent de plus en plus fréquentes (30). Elles surviennent dans 40% des cas chez des patients hospitalisés dans un service de réanimation (31).

La majorité des candidoses invasives se développent à partir de souches endogènes, c'est à dire dont le patient est déjà porteur, principalement dans le tractus gastro-intestinal et sur la peau (32).

2.2.2.2 Facteurs de risque

Les facteurs de risque des candidoses invasives sont multiples et bien connus. Certains sont associés à la population de patients tels que les patients hospitalisés en réanimation, les grands prématurés, les patients d'hémo-oncologie, les transplantés,

les grands brûlés, ceux ayant subi une chirurgie lourde en particulier digestive ou urologique (33,34). D'autres sont liés à la mise en place de matériel étranger (cathéters vasculaires centraux), d'une antibiothérapie large spectre, d'une corticothérapie, d'une chimiothérapie ou encore d'une nutrition parentérale totale (35). D'autres encore sont liés aux caractéristiques du patient tels que les âges extrêmes de la vie, la présence d'une neutropénie, et la présence de pathologies sous-jacentes (Tableau 2)(36)

Tableau 2 Répartition des pathologies sous-jacentes de 12039 épisodes de candidémies étudiés sur la période 2004-2010 en France et évolution annuelle moyenne de l'incidence en population générale d'après (36).

Facteurs de risque	Candidémies	
	Nombre de cas	% évolution
Hémopathies malignes (HM)	1710	5,8
Avec transplantation de moelle	276	6,4
Avec neutropénie	721	70
HM seule	713	4,4
VIH-SIDA	142	
Greffe d'organes solides	190	7,3
Cancers solides	3683	14,6
Maladies inflammatoires systémiques	178	8,3
Diabète	1123	8,3
Maladie respiratoire chronique	433	4,7
Insuffisance rénale chronique	336	10,3
Autres pathologies	1751	6,4
Non spécifiés	2493	6,3
Total	12039	9,2

« Autres pathologies » inclut les cirrhoses, obésité, pancréatite, insuffisance rénale aigue.
« Non spécifiés » inclut notamment le séjour en réanimation ou chirurgie, âges extrêmes, aucun facteur de risque connu.

2.2.3 Diagnostic des candidoses invasives

Le diagnostic des candidoses invasives est difficile à établir et la culture reste la technique de référence pour affirmer le diagnostic, identifier l'espèce en cause et tester sa sensibilité *in vitro* aux antifongiques. En pratique, l'hémoculture est l'examen le plus pratiqué, mais d'autres sites normalement stériles peuvent être explorés, tels que le liquide péritonéal, la bile, le liquide articulaire ou le liquide céphalo-rachidien, les prélèvements étant guidés par la suspicion de localisation de l'infection. Dans des services à risque tels que la réanimation, des prélèvements superficiels (ORL, urines, selles, voies respiratoires) peuvent être réalisés pour un suivi dynamique de la colonisation.

2.2.3.1 Diagnostic direct

a. Examen direct du prélèvement

La première étape, commune à la plupart des prélèvements à visée mycologique reçus au laboratoire, est la réalisation d'un examen microscopique direct du prélèvement. Il s'effectue soit directement à partir du prélèvement entre une lame et une lamelle à l'état frais, soit après une coloration (May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou imprégnation argentique). Les espèces du genre *Candida* se présentent le plus souvent sous la forme ovulaire plus ou moins bourgeonnante. Selon les espèces, il est possible d'observer des pseudo-filaments prenant naissance à partir des tubes germinatifs (37) (Figure 8).

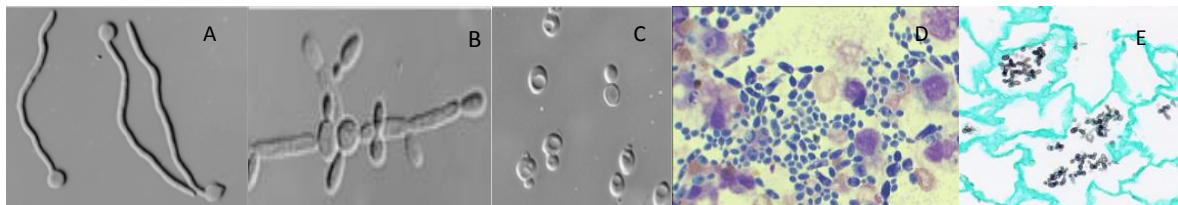


Figure 8 Différentes formes observées lors de l'examen direct des *Candida* spp. d'après (37):
(A;B;C) : Etat frais : (A) forme filamenteuse ; (B) pseudofilament ; (C) forme ovulaire bourgeonnante ; (D) *Candida* spp. avec une coloration par le MGG ; (E) *Candida* spp. avec une coloration par le bleu de toluidine

b. Culture

Les *Candida* sont des levures peu exigeantes et ainsi faciles à cultiver sur la plupart des milieux utilisés au laboratoire. Le prélèvement est alors ensemencé sur une gélose Sabouraud additionnée d'antibiotiques, tels que le chloramphénicol ou la gentamicine, permettant l'inhibition de la croissance bactérienne. Les colonies, après une incubation de 24 à 72 heures à 30°C, prennent un aspect blanc-crème, brillant ou mat selon les espèces, et lisse. Le prélèvement est également ensemencé sur un milieu chromogène de type ChromAgar *Candida*® (Becton-Dickinson) contenant des substrats chromogènes qui confèrent aux colonies qui s'y développent une coloration particulière, variable en fonction de l'espèce.

c. Identification des souches isolées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

Lors de candidoses invasives, la rapidité de l'identification de l'espèce est primordiale pour la prise en charge des patients.

Le récent essor de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (pour « *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of flight* ») a été adapté à l'identification des levures obtenues en culture, permettant de réduire considérablement le délai de réponse au clinicien à seulement quelques minutes.

Une portion de la colonie de levures est déposée sur une plaque métallique, recouverte d'acide formique qui facilite l'extraction protéique, puis d'une matrice composée d'acétonitrile, d'acide trifluoroacétique et d'eau. La plaque ainsi préparée est déposée dans une chambre d'ionisation où elle est soumise au tir d'un laser à azote sur chaque dépôt. Ceci provoque la vaporisation de l'échantillon (désorption) puis l'ionisation des molécules. Les ions en phase gazeuse sont alors accélérés et séparés dans une colonne de vide selon leur masse. Les particules sont détectées en fin de colonne par un détecteur. Pour chaque dépôt, un profil spectral est ainsi obtenu et comparé aux spectres de référence (Figure 9) (38).

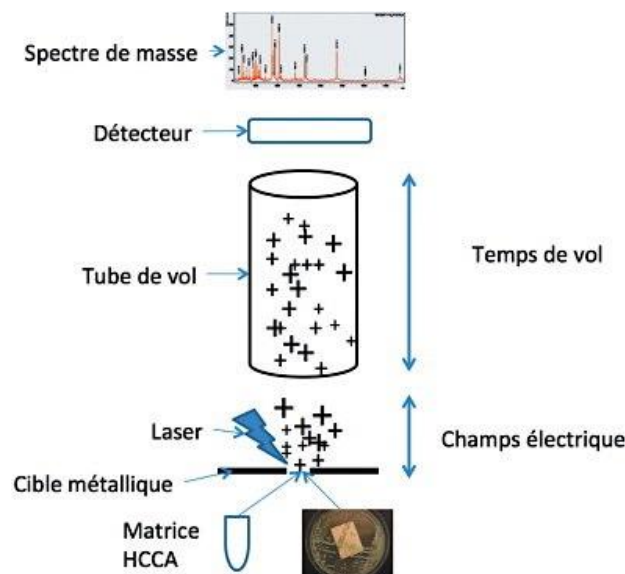


Figure 9 Principe de la technologie MALDI-TOF (38)

Par ailleurs, le MALDI-TOF permet d'identifier les levures directement à partir du flacon d'hémoculture rendu positif par l'automate sans passer par la phase de culture (MALDI Sepsityper®) (Figure 10). L'analyse directe à partir des flacons d'hémoculture a une sensibilité allant de 86,5% pour les espèces de *Candida non albicans* jusqu'à 95,9% pour *Candida albicans*. Une limite de cette technique est l'exhaustivité des banques de données.

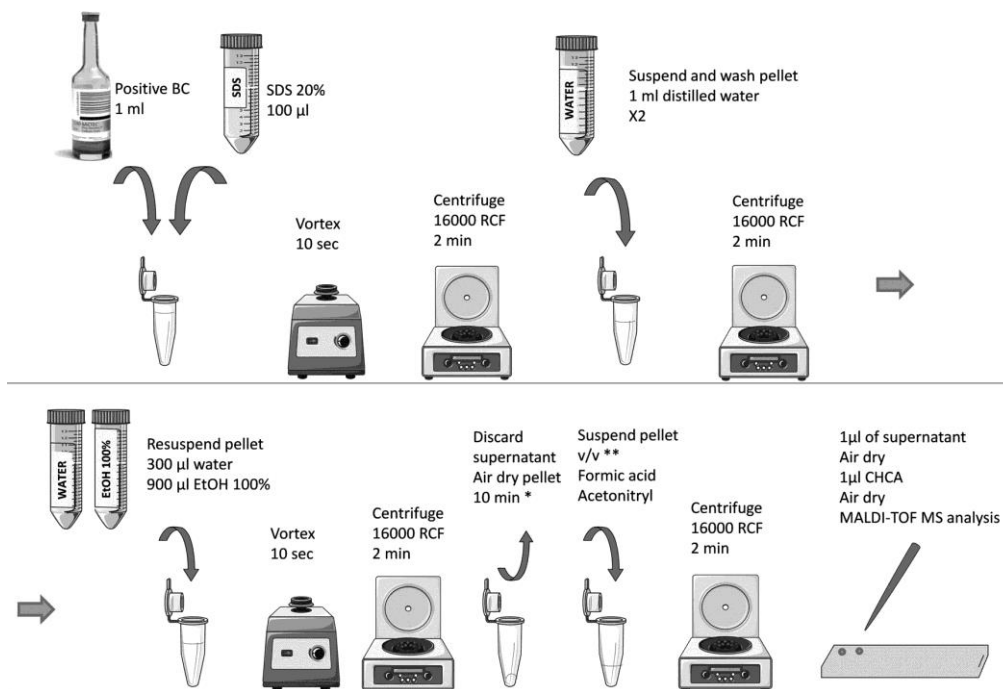


Figure 10 Principe du MALDI Sepsityper®

d. Détermination de la sensibilité *in vitro* des souches identifiées aux antifongiques

L'étude de la sensibilité aux antifongiques a un objectif double : celui de permettre au clinicien d'adapter son traitement antifongique et de suivre l'épidémiologie de la résistance aux antifongiques au sein d'un service clinique ou d'un établissement hospitalier.

Un antifongigramme est réalisé pour toute souche de *Candida* isolée dans un prélèvement profond d'un site normalement stérile, surtout si le patient était au préalable sous un traitement antifongique. Certaines souches sont naturellement moins sensibles à certains antifongiques que d'autres, telles que *Candida glabrata* qui présente très fréquemment une sensibilité diminuée au fluconazole. Il existe plusieurs techniques permettant de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des levures vis à vis des antifongiques.

Méthode de microdilution en milieu liquide

La méthode de microdilution en milieu liquide est la technique de référence pour la détermination des CMI.

Elle a été développée par le CLSI (pour « *Clinical and Laboratory Standard Institute* ») et par l'EUCAST (pour « *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* »). Elle consiste à mettre en présence une suspension de levures calibrée avec des concentrations croissantes de l'antifongique à tester. Chaque cupule est comparée à une cupule témoin sans antifongique (témoin de croissance) (Figure 11). Avec l'étude de la distribution des CMI de souches sauvages, il est possible de calculer la valeur du seuil épidémiologique. La définition d'une souche dite « sensible » ou « résistante » repose ensuite sur la définition des valeurs seuils critiques d'interprétation clinique (BP pour « *Clinical Breakpoints* »). Un BP est défini selon l'ensemble des données pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, microbiologiques et thérapeutiques. Ainsi un isolat de souche présentant une CMI supérieure au BP est considéré comme résistant (40).

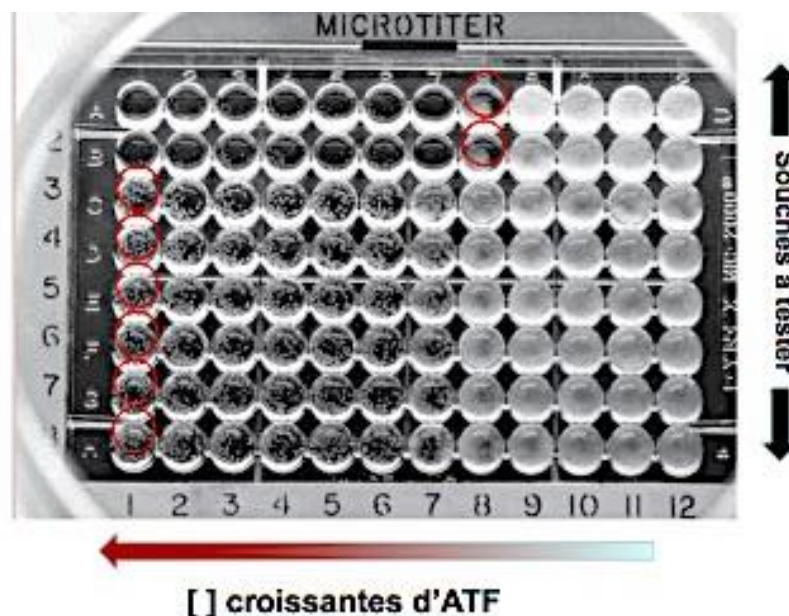


Figure 11 Méthode de microdilution en milieu liquide
Une série de dilution est réalisée dans les colonnes de 1 à 11 où les concentrations d'antifongiques testés sont décroissantes. Les souches à tester sont incubées 24h. La CMI est déterminée par le premier puits où il n'y a pas de croissance visible. Ici pour les souches 1 et 2, la CMI est déterminée par le puits 8, et pour les souches 3 à 8 par le puits 1.

Cette technique de référence est standardisée et reproductible mais trop lourde pour être réalisée en routine. Des techniques plus simples ont été développées mais doivent être parfaitement corrélées à la technique de référence et permettre de détecter les isolats résistants et ainsi correctement catégoriser les isolats sensibles.

Méthode de diffusion en milieu solide : E-test®

La méthode de diffusion en milieu solide avec des bandelettes E-test® (BioMérieux) est la technique la plus utilisée en routine. Les bandelettes sont imprégnées d'un gradient d'antifongique. En pratique, une gélose RPMI (pour « Roswell Park Memorial Institute ») 1640 additionné de MOPS (pour « morpholinepropanesulfonic acid ») est ensemencée avec un inoculum fongique calibré à 0,5 McFarland et incubée pendant 48h. A 24h et à 48h, la CMI est lue sur l'échelle graduée, à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette (Figure 12). Les CMI ne se lisent pas de la même manière en fonction de l'antifongique étudié. En effet, la lecture pour l'amphotéricine B et les échinocandines s'effectue à 100% d'inhibition, ces molécules étant fongicides *in vitro* sur les levures, alors que la lecture des azolés ne tient pas compte de la croissance de petites levures à l'intérieur de la zone d'inhibition liée à l'effet fongistatique *in vitro* des azolés sur les levures (41).

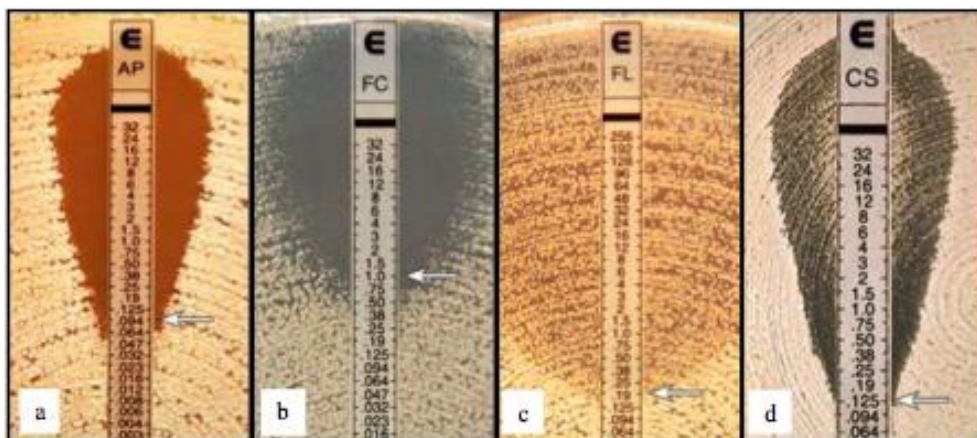


Figure 12 Antifongogramme par méthode E-test® BioMérieux :

- (a) Amphotéricine B : lecture à 100% d'inhibition, soit 0,094 $\mu\text{g/mL}$, (b) 5-FC : lecture à 90% d'inhibition soit 1 $\mu\text{g/mL}$, (c) Fluconazole : lecture à 100% d'inhibition sans tenir compte de l'effet de traîne soit 0,19 $\mu\text{g/mL}$, (d) Caspofungine : lecture à 100% soit 0,125 $\mu\text{g/mL}$

Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

En 2012, une étude a évalué la capacité de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à déterminer la sensibilité à la caspofungine de différentes souches de *Candida* sauvages ou mutées pour le gène *FKS*. Cette technique consiste en la comparaison des spectres obtenus à partir d'une souche cultivée pendant 15 heures en milieu liquide, sans antifongique et additionnée de 8 concentrations différentes de caspofungine (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, et 64 mg/L). Les spectres obtenus pour les concentrations extrêmes, c'est à dire sans antifongique et pour une concentration de 64 mg/L, sont utilisés comme référence et comparés alors aux sept autres spectres obtenus. La concentration pour laquelle le spectre est à la fois le plus proche de celui obtenu pour 64 mg/L de caspofungine et celui sans antifongique, est appelée la concentration de caspofungine qui induit le moins de modification du spectre (MPCC). Cette technique montre une excellente corrélation entre la valeur de la MPCC et les CMI obtenues par méthode de microdilution pour les souches isolées avec un taux de corrélation de 94,1% avec les BPs de référence du CLSI (42).

Cette technique encore expérimentale est très novatrice et pourrait être utilisée par de nombreux établissements, l'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF étant de plus en plus étendue dans les laboratoires hospitaliers.

2.2.3.2 Diagnostic indirect

De par la faible sensibilité des hémocultures (50 à 70%) et le délai de positivité qui peut être long (2 à 8 jours), ont été développées des techniques de détection dans le sang de composants de la paroi cellulaire fongique (mannanes, β -D-glucanes), d'anticorps (anti-mannanes, anti-mycélium) ou de l'ADN (43).

a. Détection de l'antigène mannane et des anticorps anti-mannanes dans le sérum

L'antigène mannane est un constituant de la paroi des *Candida*. Il est l'un des principaux antigènes de *Candida* circulant au cours d'une candidose invasive. Cependant, des études montrent que prises individuellement, les détections de l'antigène mannane et des anticorps anti-mannanes présentent des sensibilités médiocres, de 58% et 59% respectivement, mais que la combinaison des deux techniques augmente considérablement la sensibilité à 83% (44). Ils peuvent être positifs en 6 jours et sont

recommandés dans le diagnostic des candidémies et des candidoses hépatospléniques (45).

b. Détection des β -(1-3)-D-glucanes

Ce biomarqueur est un constituant polysaccharidique majeur de la paroi de nombreux champignons, et circule dans le sang des patients atteints d'infections fongiques invasives. Il n'est pas spécifique du genre *Candida spp.* et peut être retrouvé dans les aspergilloses invasives ou lors d'une pneumocystose chez un immunodéprimé. Il se positive précocement au cours des candidoses invasives.

Dans une méta-analyse de 2011, la spécificité et la sensibilité sont disparates allant respectivement de 56% à 93% et 57% à 97% pour le diagnostic de candidoses invasives. Cette hétérogénéité peut être expliquée, selon cette méta-analyse, par l'hétérogénéité de la population étudiée, de la méthode utilisée, de la définition du seuil de positivité ainsi que de l'administration préalable d'antifongiques ou non dans les différentes études (46). Cependant, il peut exister de nombreux faux positifs (réactions croisées avec des substances iatrogènes telles que les antibiotiques (Pipéracilline-Tazobactam, Amoxicilline +/- Acide clavulanique), l'injection d'immunoglobulines IV, les solutions de nutrition parentérale (gluconate de calcium), réactions croisées avec d'autres champignons pathogènes (*Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum capitatum*...), ou encore avec certains facteurs d'hôte telles que l'allogreffe de moelle osseuse au cours des GVH digestives. La sensibilité est plus faible chez les patients atteints de pathologies hématologiques.

c. Détection de l'ADN des *Candida* par PCR

Les techniques de PCR ont connu un essor important ces dernières années. Elles permettent de réaliser simultanément la détection, l'analyse quantitative et qualitative des ADN amplifiés. En mycologie, cette technique permet d'assurer un diagnostic précoce et donc de suppléer l'hémoculture (47). La méthode par PCR est basée sur sang total. La combinaison d'un couple d'amorces universelles et de plusieurs couples d'amorces ou de sondes spécifiques permet d'envisager la recherche simultanée dans le même échantillon de plusieurs espèces de *Candida*. Les cibles alors visées correspondent à des séquences hautement conservées chez les champignons, entre lesquelles se trouvent des régions variables, telles que les régions ITS 1 et 2 (pour « *Internal Transcribed Spacer* ») situées sur les gènes codant pour l'ARN ribosomal 5,8S,

18S, et 28S (Figure 13) (48). La conservation de ces régions au sein du genre *Candida* permet une utilisation d'un seul couple d'amorces pour la PCR.

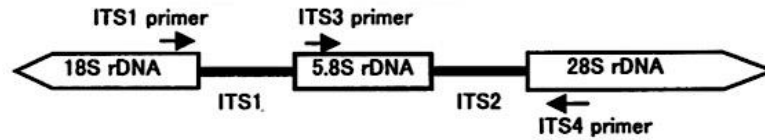


Figure 13 Représentation schématique de l'ADN ribosomal contenant les zones cibles de l'amorce selon (48)

Une méta-analyse réalisée en 2010 montre une sensibilité et une spécificité de 100% lorsque le diagnostic de candidose invasive était fait. Lorsque la candidose invasive restait probable, le taux de positivité de la PCR était de 85% contre seulement 38% concernant les cultures (49).

Plus récemment, la quasi-totalité des espèces de *Candida* pathogènes, à l'exception du complexe *Candida parapsilosis*, ont pu être identifiées grâce à une analyse du polymorphisme de taille de fragment (FSP) des régions ITS1 et ITS2. Les produits de PCR des régions ITS1 et ITS2 amplifiées séparément avec deux ensembles d'amorces : ITS1-ITS2 et ITS3-ITS4, ont ensuite été analysés selon leur taille avec la base de données GenBank (50).

2.2.4 Aspects cliniques des candidoses invasives

Les candidoses invasives sont la première cause IFI. Elles englobent les candidémies et les affections viscérales profondes résultant d'une dissémination hémotogène ou de l'inoculation directe de *Candida spp.* dans un site stérile (51).

2.2.4.1 Candidémies

Une candidémie doit être évoquée devant une fièvre résistante à un traitement antibiotique à large spectre et bien conduit chez des patients présentant des facteurs de risque sus cités. Les signes cliniques de candidémie étant peu spécifiques, des scores ont été élaborés pour pallier cette pauvreté clinique et pour sélectionner au mieux les patients de réanimation pouvant bénéficier d'un traitement antifongique préemptif. Le

Candida score pondère par exemple les facteurs de risque et la colonisation selon les critères suivants : présence d'un sepsis sévère, d'un antécédent récent de chirurgie, d'une nutrition parentérale et d'une colonisation multifocale. Si le *Candida* score est inférieur à 3, la candidose invasive est improbable, à l'inverse, s'il est supérieur à trois, les patients sont à haut risque de candidose invasive (Tableau 3) (52).

Tableau 3 *Candida* Score d'après (52)

Paramètres	Score (points)
Sepsis sévère	2
Chirurgie	1
Nutrition parentérale	1
Colonisation multifocale	1

2.2.4.2 *Candidoses abdominales*

Les péritonites secondaires à *Candida spp.* ainsi que les abcès intra-abdominaux représentent une part importante des candidoses invasives. L'isolement de *Candida spp.* dans le liquide péritonéal peropératoire est associé à une plus forte mortalité d'autant plus que la perforation digestive est haute et qu'il existe un antécédent de chirurgie digestive récente (53). *Candida glabrata* est la deuxième espèce de *Candida spp.* la plus fréquemment retrouvée après *Candida albicans* dans les candidoses abdominales.

2.2.4.3 *Candidémies persistantes*

La définition d'une candidémie persistante n'est pas consensuelle. Certains auteurs la définissent comme étant l'isolement continu de la même espèce de *Candida* dans le sang d'un patient déjà connu comme ayant une candidémie. L'incidence des candidémies persistantes dans ce cas est alors élevée (environ 50-90%). D'autres auteurs la définissent comme étant l'isolement de la même espèce de *Candida* dans le sang à un moment spécifique après un traitement antifongique bien mené, pouvant ainsi indiquer un échec thérapeutique. Dans cet autre cas, l'incidence est alors plus faible allant de 10% à 30% (Tableau 4) (54).

Tableau 4 Approche du diagnostic et de la prise en charge de la candidémie persistante d'après (54)

Causes		Moyens	Prise en charge
Facteurs de l'hôte	Altération de l'état général	Aucun	Aucun
	Neutropénie persistante	Aucun	Diminuer la durée de la neutropénie (G-CSF, transfusion...)
Résistance au traitement		Identifier l'espèce de <i>Candida</i> responsable et test de la sensibilité aux antifongiques	Changement d'antifongiques si espèce résistante
Faible concentration sanguine de l'antifongique		Connaître les causes (mauvaise absorption, interactions médicamenteuses...)	Modification de la voie (orale ou parentérale)
Infection profonde (endocardite, thrombophlébite infectieuse)		Echocardiographie, échodoppler, PET-scanner	Traitement prolongé, chirurgie adjuvante
Abscess profond		PET-scan, IRM, scanner, radiographie	Drainage de l'abcès
Infection fongique associée à une prothèse (cathéter ou autres)		Diagnostic rapide de l'infection liée à la prothèse	Ablation +/- changement de prothèse

La comparaison de 84 cas d'épisodes de candidémie persistante à 94 cas de candidémie non persistante a permis d'établir que les facteurs de risque significativement associés aux candidémies persistantes sont la présence d'un cathéter veineux central, d'une tumeur solide, et d'un score APACHE bas. Les traitements antifongiques et les espèces de *Candida* isolées n'étaient pas significativement différents entre les candidémies persistantes et non persistantes. De même, à 30 jours, il n'a pas été retrouvé de différence significative de survie entre les deux groupes (55).

2.2.5 Pronostic des candidoses invasives

Les infections à *Candida* sont associées à un pronostic très péjoratif avec une mortalité très élevée d'environ 37%, pouvant dépasser 50% dans les unités de soins intensifs (USI) (56,57). Dans une étude multicentrique française, les auteurs rapportent une létalité de 40%. Un programme de surveillance active des épisodes de candidémie dans 24 hôpitaux de soins tertiaires de la région parisienne entre octobre 2002 et septembre 2010 a montré une augmentation significative en USI de la mortalité à 30 jours de 41,5%

à 56,9% entre la 1^{ère} et la dernière année ($p = 0,001$) mais aussi de la mortalité précoce (< 8 jours) de 28,7 à 38,8% ($p = 0,03$) (30). Il existe un surcoût hospitalier pour les survivants et la durée de séjour est augmentée lors des candidoses invasives (58). En cela, la prise en charge des candidoses invasives est un enjeu majeur.

Des facteurs pronostiques péjoratifs ont été identifiés, tels que l'intubation avec ventilation mécanique, la présence d'un cancer, une corticothérapie, la présence d'un cathéter artériel, le retard à l'instauration d'un traitement antifongique adéquat. Chez les enfants, s'ajoute comme facteur péjoratif la présence d'une neutropénie (59).

2.3 Les antifongiques

2.3.1 Cibles des antifongiques

Les espèces du genre *Candida* étant des organismes eucaryotes, le nombre de cibles thérapeutiques potentielles est limité. Un antifongique idéal est caractérisé par un large spectre, une activité fongicide plutôt que fongistatique et qui a peu d'action sur la cellule hôte. De ce fait, seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les azolés et les échinocandines (Figure 14) (60).

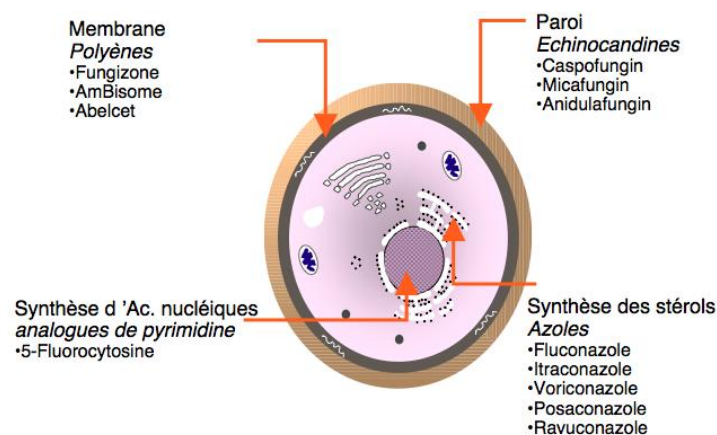


Figure 14 Cible des antifongiques selon (60)

2.3.2 Les principaux antifongiques systémiques: historique, pharmacologie et mode d'action

En fonction de leurs structures chimiques et mécanismes d'action, nous pouvons distinguer plusieurs classes d'antifongiques dont le tableau 5 ci-dessous synthétise les principales données.

Tableau 5 Historique, pharmacologie et mécanismes d'action des principaux antifongiques

Historique	Structure et pharmacologie (annexe 1)	Mode d'action
Fluoropyrimidines	5-fluorocytosine ; 5-fluorouracile	
<ul style="list-style-type: none"> - 1957 : découverte par Duchinsky (61) - 1963 : découverte de l'action antifongique par Grunberg et collaborateurs (62) - 1968 : première utilisation chez l'Homme de la 5-FC (63) 	<ul style="list-style-type: none"> - captée via les cytosines perméases - absorption de la 5-FC rapide - biodisponibilité orale bonne (76%-89%) - bonne diffusion dans tout l'organisme - élimination quasi-exclusivement rénale (64) 	<ul style="list-style-type: none"> - prodrogue transportée dans la cellule fongique par une cytosine perméase puis convertie par la cytosine désaminase en 5-FU - 5-FU converti en 5-fluorouracile monophosphate par l'uridine phosphoribosyl-transférase - 5-FU transformé en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate bloquant la multiplication

cellulaire

- 5-FU métabolisé en 5-fluorouridine et bloque la synthèse protéique (intégration à l'ARN à la place de l'uracile triphosphate)

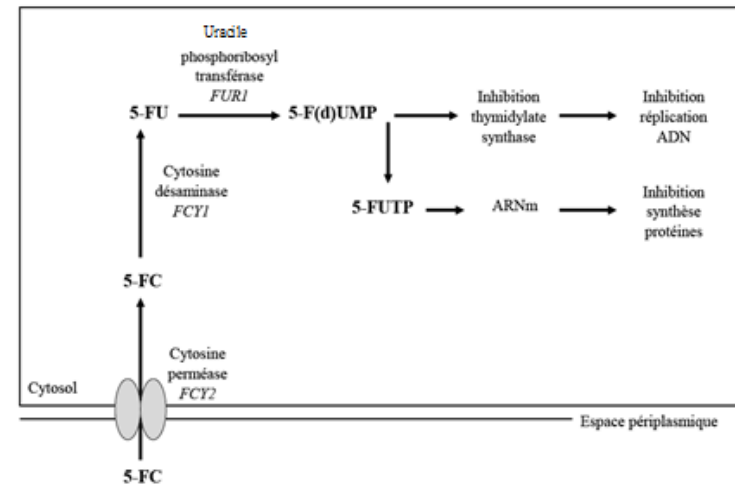


Figure 15 Mécanisme d'action de la flucytosine et principaux gènes et enzymes impliqués selon (69)

Polyènes

Amphotéricine B (1959); nystatine (1950); natamycine

- 1950 : découverte fortuite de la nystatine par Hazen et Brown

- 1959 : découverte de l'amphotéricine B par culture de *Streptomyces nodosus* par Dutcher et collaborateurs

- toxicité sélective aux cellules fongiques mais multiples effets secondaires

- amphotéricine B utilisée par voie systémique en association avec désoxycholate de sodium

- natamycine et nystatine utilisées par voie locale ou orale

- cible : ergostérol

- liaison à la membrane fongique par la bicouche lipidique.

- Association de 8 molécules d'amphotéricine B à 8 molécule d'ergostérol provoquant une fuite de composants intracellulaires et une lyse cellulaire (65)

⇒ Activité fongicide

Azolés

Imidazolés (clotrimazole ; miconazole ; éconazole ; kétoconazole)

Triazolés (fluconazole ; itraconazole ; voriconazole ; posaconazole ; isavuconazole) (66)

- 1944 : synthèse du premier antifongique azolé par Wolley

- Années 1960 : clotrimazole, éconazole et miconazole

- 1981 : développement du kétoconazole par Heeres (67)

- Années 1990 : développement des triazolés (itraconazole ; fluconazole)

- 2000 : apparition voriconazole et posaconazole

- molécules lipophiles

- bonne diffusion cérébrale pour fluconazole et voriconazole

- cible : voie de la biosynthèse de l'ergostérol

- inhibition de lanostérol C14- α -déméthylase codée par *ERG11*

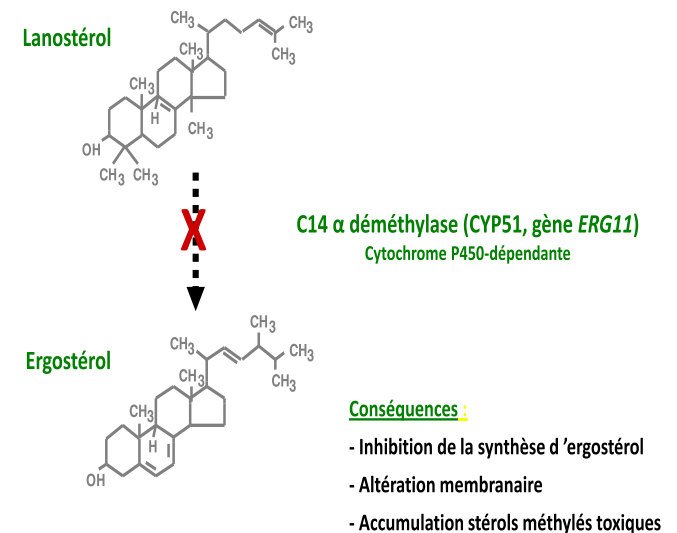


Figure 16 Mode d'action des dérivés azolés

Echinocandines

- 2001 : caspofungine
- 2005 : micafungine
- 2006 : anidulafungine

Caspofungine ; micafungine ; anidulafungine

- dérivés synthétiques de lipopeptides
 - administrées par voie parentérale
 - dégradées par le sang (anidulafungine) ou foie (micafungine et caspofungine)
 - molécules doses dépendantes
 - Inhibiteurs non compétitif de la β (1-3)-glucane synthétase codée par les gènes *FKS*
 - *FKS1* exprimé pendant la phase végétative et *FKS2* exprimé lors de la sporulation
-

2.3.3 Les mécanismes de résistance aux antifongiques

2.3.3.1 Les Fluoropyrimidines

La résistance à la 5-FC est un phénomène relativement fréquent. Cette résistance peut être naturelle (primaire ou intrinsèque), comme chez *Candida tropicalis*, ou acquise (secondaire) par sélection de mutants résistants après exposition à l'antifongique (68).

Du fait du mécanisme d'action complexe de la 5-FC, de nombreux événements peuvent expliquer la résistance à cet antifongique, regroupés en deux catégories. La résistance à la 5-FC peut résulter d'une induction du métabolisme des pyrimidines, entrant alors en compétition avec l'antifongique. Ceci se traduit par une surexpression du gène *CDC21*, codant la thymidylate synthétase (69). La résistance à la 5-FC peut également être la conséquence d'une mutation d'un gène codant pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de la 5-FC. Le mécanisme le plus fréquent dans cette résistance est la mutation du gène *FUR1* (uracyl phosphorybosyl transférase) codant l'UPRT (70).

Chez *Candida glabrata*, la fréquence d'acquisition de la résistance à la 5-FC est, *in vitro*, plus élevée que chez *Candida albicans*, en raison de son caractère haploïde, augmentant la probabilité qu'un événement mutationnel touchant un gène impliqué dans le métabolisme de la 5-FC induise une résistance.

Le mécanisme le plus fréquemment retrouvé à l'origine de la résistance à la 5-FC chez *Candida glabrata* est, comme chez toutes les espèces de *Candida*, la mutation du gène *FUR1*. Cependant il semble que *Candida glabrata* possède d'autres mécanismes de résistance tels qu'une mutation du gène *FCY2*, codant pour la cytosine perméase et ainsi diminuant l'activité du transporteur (71).

2.3.3.2 Les Polyènes

La résistance aux polyènes est rarement mise en évidence chez les éléments fongiques pathogènes. Il s'agit bien souvent d'un blocage par mutation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Mais elle peut aussi être la conséquence d'une altération des stérols membranaires.

Chez *Candida glabrata*, la diminution de la sensibilité aux polyènes peut être due à une mutation du gène *ERG6* codant des enzymes de la voie de la biosynthèse de l'ergostérol. Cependant, la nature de la mutation portée par le gène *ERG6* entraîne une différence dans la persistance ou non de l'activité résiduelle de la stérol méthyltransférase (72).

2.3.3.3 Les Azolés

Du fait du taux de résistance aux antifongiques azolés élevé dans les années 1990, ces mécanismes de résistance ont largement été étudiés et il en résulte quatre principales catégories de résistance (73):

- Une mutation ponctuelle du gène *ERG11* se traduit par une modification de la séquence en acides aminés de la lanostérol 14 α -déméthylase diminuant ainsi l'affinité des azolés pour leur cible (74);
- Une multiplication du nombre de copies de la 14 α -déméthylase, empêchant les azolés d'être en quantité suffisante pour inhiber la conversion du lanostérol en stérol 14 α -déméthylé. Ceci peut être dû à une modification du promoteur, une duplication chromosomique (entraînant une surexpression du gène *ERG11*) ou une augmentation de la demi-vie des ARNm.
- Un blocage de la voie de la biosynthèse de l'ergostérol après l'intervention de l'enzyme codée par *ERG11*. C'est notamment le cas pour *Candida albicans* chez qui la mutation du gène *ERG3* aboutit à une résistance aux azolés. Cette résistance est moins fréquente.
- Une surexpression du système des protéines d'efflux entraînant une diminution de la concentration intracellulaire en antifongique azolé par les pompes CDR1, CDR2, ou MDR1. Cette résistance est la plus fréquente chez le genre *Candida spp.* Chez *Candida albicans* et *Candida glabrata*, ce mécanisme est à l'origine de la résistance aux azolés de mutants *petite* (se caractérisant par une déficience respiratoire), pour qui une surexpression des gènes *CDR1* et *CDR2* a été identifiée, présentant une carence en ADN mitochondrial et régulant à la hausse les gènes transporteurs ABC amplifiant ainsi la résistance de ces souches aux antifongiques azolés (10).

Chez *Candida glabrata*, la mutation la plus fréquente est l'induction de pompes d'efflux, codées par les gènes ABC-transporteurs (*CDR1*, *CDR2* et *SNQ2*) ou MDR appartenant à la superfamille facilitatrice majeure (MFS) conduisant à une diminution de la

concentration de l'antifongique. Le facteur de transcription PDR1 est impliqué dans la résistance aux azolés par une régulation positive des CDR1, CDR2 et SNQ2.

Une étude a montré que le mutant *petite* dans un isolat clinique présentait une association entre sensibilité aux azolés augmentée et une déficience respiratoire. Une origine nucléaire pour la mutation *petite* est alors suggérée (la chaîne respiratoire mitochondriale étant, par analyse en cytométrie de flux et microscopie électronique, fonctionnelle).

De plus, une étude récente a montré que les gènes *CDR1* et *CDR2* sont régulés à la hausse dans les souches résistantes aux azolés, et que les gènes activateurs des acides gras 1 (*FAA1*) y sont plus activés (75).

Chez *Candida glabrata*, la mutation du gène *ERG11* apparaît comme point central dans la résistance aux antifongiques azolés.

Enfin la mutation du gène *AP1* codant pour un facteur de transcription lié aux réponses de stress, augmente la résistance des isolats aux azolés par une surexpression d'ARNm de *AKR* (Figure 17) (21).

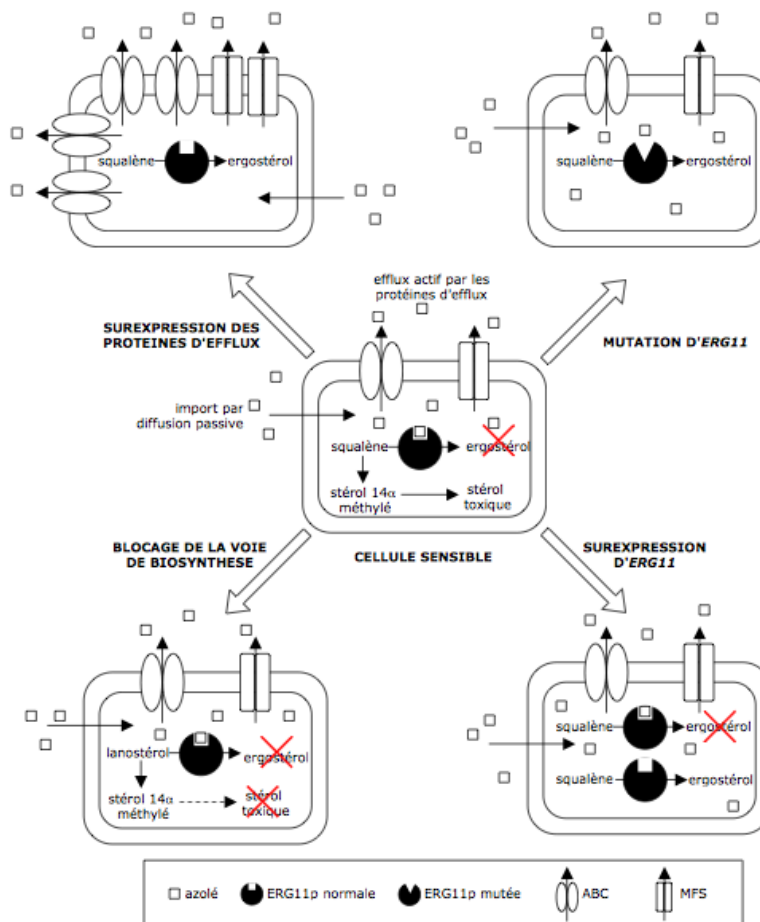


Figure 17 Modélisation cellulaire des principaux mécanismes de résistance aux azolés selon (21)

2.3.3.4 Les Echinocandines

Les échinocandines possèdent une activité fongicide dose dépendante vis à vis du genre *Candida spp.*

Les résistances aux échinocandines sont relativement rares (76).

Actuellement, le mécanisme de résistance acquise aux échinocandines correspond à la présence de mutations au niveau des gènes *FKS* codant pour la cible de la classe d'antifongiques, la $\beta(1-3)$ -glucane synthétase. Il est défini deux régions dont l'intégrité est indispensable à l'activité de l'enzyme, appelées « hot spots » et où les mutations de ces régions entraînent une résistance aux échinocandines (77,78). Ces régions « hot spots » sont *FKS1*, englobant les résidus Phe641-Pro649 et Arg1361 (*Candida albicans* équivalent), et les régions homologues *FKS2* dans *Candida glabrata* (Figure 18). Ces mutations ponctuelles des « hot spots » entraînent des diminutions de la sensibilité de la $\beta(1-3)$ -glucane synthétase, donnant des valeurs de CMI plus élevées (79).

Certaines espèces de *Candida* ont un polymorphisme naturel pour ces gènes comme la famille *Candida parapsilosis* (*Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* et *Candida metapsilosis*) et *Candida guilliermondii* où les valeurs de CMI sont plus élevées naturellement (79).

La résistance aux échinocandines de *Candida glabrata* a augmenté de 4,9% à 12,3%. De plus, cette résistance est souvent associée à une résistance aux antifongiques azolés (21). Les substitutions d'acides aminés les plus importantes du « hot spot » *FKS1* sont retrouvées au niveau du résidu Ser629, et du « hot spot » *FKS2* au niveau des résidus Ser663 et Phe659. De plus l'expression de *FKS2* dépend de la calcineurine et un traitement avec un inhibiteur de calcineurine FK506 peut inverser la résistance de *Candida glabrata* vis à vis des échinocandines (79).

Species	Fks1p				Fks2p			
	Hot spot 1		Hot spot 2		Hot spot 1		Hot spot 2	
<i>C. albicans</i>	641	FLTL S LRDP	1357	DWIR R YTL				
<i>C. dubliniensis</i>	641	FLTL S LRDP	1357	DWIRRYTL				
<i>C. glabrata</i>	625	F L L LSLRDP	1340	DW V RRYTL	659	F L L LSLRDP	1374	DW I RRYTL
<i>C. kefyr</i>	54*	F LTL R LRDP	769*	DW V RRYTL				
<i>C. krusei</i>	655	F L L LS I LRDP	1364	DWIR R YTL				
<i>C. lusitaniae</i>	634*	FLTL S LRDP	**	DWIRRYTL				
<i>C. tropicalis</i>	76	F L T LSLRDP	792	DWIRRYTL				
<i>C. parapsilosis</i>	652	FLTL S LRD A	1369	DWIRRYTL				

Figure 18 Séquence des « hot spots » de *FKS* et position de séquences d'acides aminés ayant pour conséquence une résistance aux échinocandines selon (78)

Un deuxième mécanisme est responsable d'une résistance aux échinocandines, celui d'une réponse au stress adaptatif entraînant une augmentation de la concentration en chitine des parois cellulaires (21) (Figure 19).

AZOLES

Inhibition compétitive de la lanostérol 14 α déméthylase conduisant à l'épuisement de l'ergostérol, à l'accumulation de précurseurs de stérol et aboutit à la formation d'une membrane altérée



Efflux des antifongiques: *upregulation* des transporteurs - CDR1 CDR2 SNQ2.
Mutation du facteur de transcription - PDR1.
Changements dans la voie de la biosynthèse de l'ergostérol - ERG11

BIOFILMS

Biophages liés
Upregulation des pompes d'efflux
Composition de la paroi cellulaire
Densité cellulaire accrue
Quorum sensing
Matrice extracellulaire
Métabolisme
Réponse au stress

POLYENES

Se lie aux pores d'ergostérol dans la membrane cellulaire, déclenchant un déséquilibre osmotique et finalement la mort cellulaire



Diminution de l'ergostérol.
Modification de la voie de biosynthèse de l'ergostérol - ERG3 ou ERG6.
Résistance croisée avec la classe des azolés

RESISTANCE CROISEE AUX ANTIFONGIQUES

Résistance croisée aux azolés
Résistance croisée Azolés / polyènes
Résistance croisée Echinocandines / amphotéricine B et Echinocandines / Azolés
Résistance croisées Azolés / amphotéricine B
Résistance croisée au prochloraz (antifongique agricole)

ECHINOCANDINES

Inhibition non compétitive de β -1,3-glucane synthase (FKS1 et/ou FKS2), empêchant la synthèse du glucane dans la paroi cellulaire



Modifications de l'affinité concernant la cible FKS1 et FKS2

Figure 19 Mécanismes de résistance aux antifongiques de *Candida glabrata*

3 Matériels et méthodes

3.1 Matériels biologiques et conditions de culture

3.1.1 Souches de *Candida glabrata* utilisées et conditions de culture

Trois souches de *Candida glabrata* (CGLA 1402, CGLA 1454 et CGLA 1520) ont été isolées de prélèvements cliniques successivement reçus au laboratoire de Mycologie et Parasitologie au CHU de Bordeaux pour un patient âgé de 80 ans hospitalisé à la suite d'une colite ischémique digestive nécessitant une prise en charge chirurgicale. Ces souches ont été caractérisées.

Deux souches de référence ont été utilisées en tant que témoins des études d'interaction *in vitro* macrophages – levures : *Candida glabrata* CGLA ATCC 90030 (pour « *American Type Culture Collection* ») et *Candida lusitaniae* CLUS CBS 6936 (ATCC 38533).

Une souche de *Candida lusitaniae* génétiquement modifiée exprimant la mutation delF659 des allèles *FKS* récemment développée dans notre laboratoire pour démontrer l'impact réel de cette mutation a été utilisée.

Les souches de levures sont cultivées sur milieu complet Yeast extract – Peptone - Dextrose (YPD). Les cultures en milieu liquide sont incubées à 35°C sous agitation constante de 230 rpm. Les milieux solides sont obtenus par ajout d'agar 2% (m/v) et les cultures sont incubées à 30°C de 24h à 48h.

3.1.2 Lignée murine de Macrophage J774 (ATCC TIB-67)

Les macrophages J774 sont cultivés (Figure 20), en conditions stériles, dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium complémenté de glucose (cDMEM) (Tableau 6). La culture est réalisée dans des flasques de 25 ou 75 cm², à bouchon ventilé, placées en atmosphère humide dans un incubateur à la température de 37°C et à une concentration en CO₂ de 5%. Le milieu est remplacé tous les deux jours afin de renouveler les nutriments consommés et d'éliminer les cellules mortes.

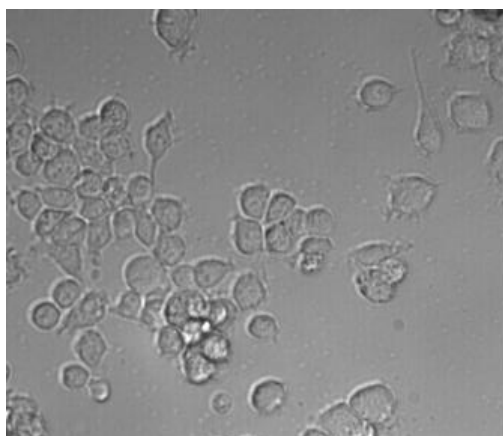


Figure 20 Macrophages de la lignée murine J774 observés au microscope (x200)

Tableau 6 Compositions des milieux utilisés

Milieux de culture	Composition
YPD (Yeast extract-peptone dextrose)	Yeast extract 1% (m/v), bacto-peptone 2% (m/v), D-glucose 2% (m/v), YNB Yeast Nitrogen Base (YNB Difco) sans acides aminés 0,76% (m/v), sulfate d'ammonium 0,5% (m/v)
cRPMI	RPMI 1640 préformulé, D-glucose 2% (m/v), MOPS 65mM, pH 7
cDMEM	DMEM Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Glucose 4,5 g/L Gibco) supplémenté en sérum de veau fœtal à 10% décomplémenté (SVF, Gibco), en pyruvate sodium (1mM) et en antibiotiques (Pnécilline Streptomycine à 100 µg/mL, Gibco), en NaHCO ₃ (2g/L), pH 7,4 et en SVF décomplémenté 10%

3.2 Tests de sensibilité aux antifongiques

Les tests de sensibilité ont été réalisés par diffusion en milieu solide avec des bandelettes E-test® selon les recommandations du fournisseur : amphotéricine B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole, caspofungine, micafungine, anidulafungine (Biomérieux®). Les bandelettes sont déposées sur du milieu RPMI ensemencé à l'écouvillon par une suspension fongique à 0,4 de DO_{600nm}. La lecture visuelle de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en µg/mL est réalisée à 24 heures et 48 heures (Tableau 7). La CMI correspond à l'intersection de l'ellipse d'inhibition avec l'échelle graduée de la bandelette.

Tableau 7 Breackpoints cliniques de *Candida glabrata* d'après l'EUCAST (80)

Antifongiques	Breackpoints cliniques de <i>Candida glabrata</i>	
	sensible si <	résistant si >
Amphotéricine B	1	1
Anidulafungine	0,064	0,064
Caspofungine	cf anidulafungine	
Fluconazole	0,002	32
Isavuconazole	*	*
Itraconazole	*	*
Micafungine	0,032	0,032
Posaconazole	*	*
Voriconazole	*	*

* indique qu'il n'y a pas suffisamment de preuves que l'espèce en question soit une bonne cible pour la thérapie avec le médicament. Une CMI avec un commentaire doit être inscrite

3.3 Techniques de biologie moléculaire

3.3.1 Extraction et purification d'ADN génomique de levures

Environ 1,5 mL de culture stationnaire de levures sont centrifugés 5 min à 2800 g. Le culot obtenu est lavé par 1 mL d'eau stérile avant de recentrifuger les cellules et de reprendre le culot dans 300 mL de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% Triton X-100 et 1 % SDS). Environ 250 mL de billes de verre stériles (diamètre 0,5 mm) et 250 mL d'une solution de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) sont ajoutées avant d'agiter vigoureusement au vortex pendant 3 min. L'émulsion obtenue est centrifugée pendant 10 min à 16000 g. La phase aqueuse supérieure est prélevée puis additionnée de deux volumes d'isopropanol, avant centrifugation 15 min, à 16000 g à 4°C. Le culot d'ADN est lavé par 1 mL d'éthanol 70% avant recentrifugation et séchage du culot. Ce culot d'ADN purifié est repris dans 100 µL d'eau stérile contenant 50 µg/mL de RNase et conservé à -20°C.

3.3.2 Réaction d'amplification de fragments d'ADN par PCR

3.3.2.1 Enzymes utilisées

L'amplification par PCR est effectuée pour le génotypage des souches d'intérêt et pour la recherche de mutations dans les gènes de résistance *FKS1* et *FKS2*.

Les différentes ADN polymérases utilisées sont :

- La GoTaq® (Promega) : cette enzyme ne dispose pas d'une activité 3→5 exonucléase. Son taux d'erreur est environ six fois plus élevé que celui de la Pfu et les amplifiats générés possèdent une adénine supplémentaire en 3'. Cette enzyme est inutilisable pour amplifier des fragments contenant des gènes exprimables, mais est utile pour le criblage des souches. Elle possède un tampon (5X Green Taq®) qui contient du glycérol pour augmenter la densité de l'échantillon ainsi que deux colorants marqueurs de migration, qui permet de déposer directement le produit de PCR sur gel d'agarose.
- La polymérase de haute-fidélité Pfu® (Promega) est utilisée en cas d'échec d'amplification par la GoTaq® : cette enzyme possède une activité 3→5 exonucléase (*proof-reading activity*) lui permettant de corriger les erreurs d'appariement de bases, lui conférant ainsi un faible taux d'erreur. Elle synthétise des produits de PCR dont les bouts sont francs. En raison de sa haute-fidélité, cette enzyme a été choisie pour l'amplification des fragments contenant des gènes codants et exprimables.

3.3.2.2 Génotypage par MLST

L'ADN polymérase GoTaq® a été utilisée pour l'amplification des *loci FKS* (avec les amorces FKSF1 et FKSR1), *LEU2* (avec les amorces LEU2F1 et LEU2R1), *NMT1* (avec les amorces NMT1F1 et NMT1R1), *UGP1* (avec les amorces UGP1F1 et UGP1R1) et *URA3* (avec les amorces URA3F1 et URA3R1) des souches CGLA 1402, CGLA 1454 et CGLA 1520. La polymérase de haute-fidélité (Pfu) a été utilisée pour l'amplification du *locus TRP1* (avec les amorces TRP1F1 et TRP1R1) (Tableau 8) (14).

Tableau 8 Amorces pour amplification et séquençage par MLST pour l'espèce *Candida glabrata* d'après (14)

<i>Locus</i>	Gène	GenBank accession no.	amorce	Séquence d'amorces (5'-3')	Temp d'hybridation (°C)
<i>FKS</i>	1,3-Beta-Glucan synthase	AF229171	FKS1F1	GTCAAATGCCACAACAACAACCT	55,0
			FKS1R1	AGCACTTCAGCAGCGGTCTTCAG	
<i>LEU2</i>	3-Isopopylmalate deshydrogenase	U90626	LEU2F1	TTTCTTGTATCCTCCCATTCTTCA	54,0
			LEU2R1	ATAGGTAAAGGTGGGTTGTGTTGC	
<i>NMT1</i>	Myristoyl-CoA, protein N-myristoyltransferase	AF073886	NMT1F1	GCCGGTGTGGTGTGCCTCCTC	59,0
			NMT1R1	CGTTACTGCGGTGCTCGGTCTCG	
<i>TRP1</i>	Phosphoribosyl-anthranilate isomerase	U31471	TRP1F1	AATTGTTCCAGCGTTTTTGT	50,0
			TRP1R1	GACCAGTCCAGCTCTTTCAC	
<i>UGP1</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridyltransferase	AB037186	UGP1F1	TTTCAACACCGACAAGGACACAGA	57,0
			UGP1R1	TCGGACTTCACTAGCAGCAAATCA	
<i>URA3</i>	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase	L13661	URA3F1	AGCGAATTGTTGAAGTTGGTTGA	53,0
			URA3R1	AATTCGGTTGTAAGATGATGTTGC	

Les mélanges réactionnels suivent les recommandations du fournisseur. Les conditions de réaction de PCR sont réalisées dans un thermocycleur Eppendorf Mastercycler® Gradient. Le programme d'amplification est décrit dans le Tableau 9.

Tableau 9 Paramètres des réactions d'amplification utilisés pour les réactions d'amplification utilisant la *GoTaq* et la *Pfu*

Etapes de PCR	Température d'incubation	Temps d'incubation
Dénaturation initiale	95°C	2 minutes
Dénaturation	95°C	30 secondes
Hybridation des amorces	(T _m amorce-5°C)	30 secondes
Elongation	72°C	1 minute
Elongation finale	72°C	10 minutes

x30 cycles

L'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (1% m/v agarose, 1 g/L de BET) dans du tampon TBE (Tris 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM).

3.3.2.3 Recherche de mutations dans les gènes *FKS1* et *FKS2*

Des réactions de PCR ont été pratiquées pour rechercher les mutations conférant un phénotype de résistance. L'amplification des séquences génomiques contenant les

régions codantes ou une partie des gènes *FKS1* et *FKS2* a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de chaque séquence (Tableau 10).

Tableau 10 Amorces nucléotidiques utilisées pour la recherche de mutations dans les gènes *FKS1* et *FKS2*

	<i>Locus</i>	Amorce	Séquence d'amorces (5'-3')
<i>FKS1</i>	HS1	FHS1-Cgla	GTTGCAGTCGCTACATTGCTA
		RHS1-Cgla	GCGTTCCAGACTTGGGAAAT
	HS2	FCtrlHS2	TGCTGGTATGGGTGAACAGATG
		R-FKS1-HS2	CATTGGCAAGCACC
<i>FKS2</i>	HS1	F-FKS2Cgla-HS1	GCTTCTCAGACTTTCACCG
		R-FKS2Cgla-HS1	CAGAATAGTGTGGAGTCAAGACG
	HS2	F-FKS2Cgla-HS2	TCTTGACTTTCTACTATGCG
		R-FKS2Cgla-HS2	CTTGCCAATGTGCCACTG

3.3.3 Purification des produits de PCR (QiaQuick, Qiagen®)

Ce kit commercial permet la purification de fragments d'ADN de taille comprise entre 100 pb et 10 kb, avec un rendement de 90 à 95%. Le kit comprend une colonne de silice avec une capacité de fixation de 10 g d'ADN et différents tampons. Un premier tampon, riche en sel, permet la fixation de l'ADN à la silice et l'élimination des amorces. Un lavage de la colonne à l'aide d'un deuxième tampon contenant de l'éthanol permet l'élimination des sels. L'ADN est ensuite élué à l'aide de 30 µL de tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), déposé au centre de la membrane, et récupéré par centrifugation après trois minutes d'incubation.

3.3.4 Séquençage nucléotidique et analyses informatiques

Le séquençage nucléotidique est réalisé selon le protocole du kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction® v3.1 (Applied Biosystems) à partir de produits de PCR purifiés (20 ng). Le séquençage est réalisé par la société MWG. L'analyse des chromatogrammes des séquençages nucléotidiques a été effectuée avec le logiciel BioEdit®.

Pour le génotypage MLST, les séquences récupérées ont été comparées à celle de la base de données *Candida glabrata* MLST (<https://pubmlst.org/cglabrata/>) puis entre elles grâce à l'outil MultAlin® développé par l'INRA (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Pour la recherche de mutations de résistance des gènes *FKS1* et *FKS2*, les séquences ont été comparées à celles du génome de référence de *Candida glabrata* avec la base de données *Candida glabrata* disponible sur internet (<http://www.candidagenome.org/>).

3.4 Interaction in vitro Macrophages -Levures Candida

3.4.1 Infection des macrophages par les levures

La veille de l'infection, les macrophages J774 (MP) sont récoltés à l'aide d'un râseau stérile, dénombrés avec un hématimètre de Malassez (Figure 21) et mis en culture dans une plaque stérile de 96 puits à une concentration finale de 2.10^5 MP par puits dans 200 μ L de milieu cRPMI pendant 16 h à 37°C sous 5% de CO₂. Chaque puits est représenté en quintuplat afin d'éliminer les variations aberrantes. Les infections de MP sont analysées au temps 30 min, 5 h et 24 h. Une plaque de 96 puits est préparée pour chaque temps d'incubation. En parallèle, les levures sont cultivées à 35°C sous agitation (180 rpm) dans du milieu YPD contenant 10 μ g/mL de CalcoFluor White (CFW) et +/- additionné de caspofungine (CAS) à différentes concentrations (0,05 μ g/mL ou 5 μ g/mL).

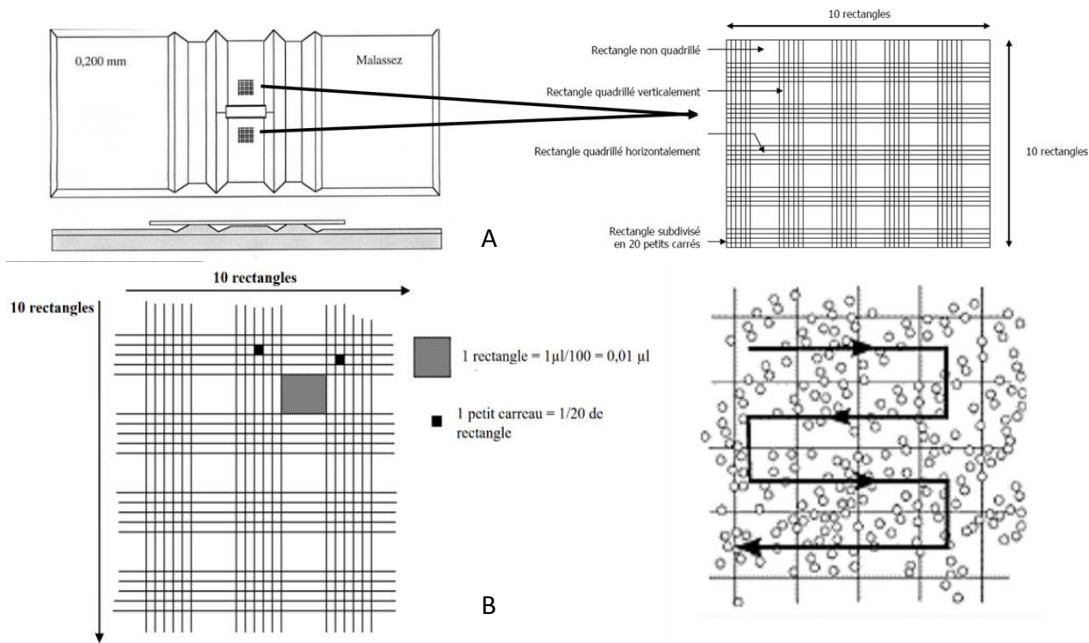


Figure 21 Hématimètre de Malassez

**(A) Exemple de lame en verre avec son quadrillage ;
 (B) Schéma d'une portion de lamelle avec exemple de comptage**

La croissance des levures est suivie par la mesure de la densité optique (DO) des cultures liquides à 600 nm. La correspondance entre une unité d'absorbance et la concentration cellulaire a été déterminée pour chaque espèce de levure. Pour *Candida glabrata* : 1 unité de DO correspond à $2,3 \times 10^7$ CFU/mL (concentration cellulaire de levures par millilitre).

Le lendemain, la concentration en levures est déterminée par la mesure de la DO_{600nm} et est ajustée à une concentration de 1.10^6 cellules/mL, pour un rapport d'infection (MOI) de 1 MP pour 1 levure, dans du milieu RPMI contenant 5 µg/ml de CFW +/- additionné de CAS (0,050 µg/mL ou 5 µg/mL). Pour réaliser l'infection des MP adhésés, le milieu cRPMI est enlevé et remplacé par 200 µL de la suspension de levures marquées au CFW +/- traitées par la CAS. Pour chaque plaque d'infection, plusieurs puits constituent des témoins : des puits contenant des MP seuls dans du milieu RPMI + 5 µg/mL de CFW et des puits contenant chaque souche de levure seule dans du milieu RPMI + 5 µg/mL de CFW +/- CAS. Il a été vérifié au préalable que la CAS additionnée aux suspensions de levures n'altérerait pas la viabilité des MP lors de l'infection. Les infections de phagocytes pour chacune des souches de *Candida* testées ont été répétées en triplicat (81).

3.4.2 Etude de l'association macrophages-levures par cytométrie en flux

A chaque temps d'infection, les 200 μ L de surnageant d'infection contenant des levures sont délicatement éliminés. Les MP sont lavés par 200 μ L de PBS et détachés par traitement avec 50 μ L de trypsine-PBS (Trypsine 0,5 g/L (Sigma), NaHCO₃ 0,58 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0,4 g/L, Glucose 1 g/L, EDTA 0,2 g/L, PBS) pendant 20 min à 37°C. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de 150 μ L de milieu RPMI. Les MP en suspension sont ensuite marqués par 0,2 μ M de calcéine-AM (AcetoxyMethyl ester, Sigma) (excitation / émission : 485 / 520 nm) et par 0,2 μ g d'anticorps anti-CD16-APC® (AlloPhycoCyanine, Beckman Coulter) anti-souris (excitation/émission : 600/630 nm). Les puits correspondant aux levures seules ne sont pas traités par la trypsine mais sont marqués de la même façon que les MP afin de déterminer le bruit de fond de chaque fluorochrome. Le taux de MP associés aux levures et la viabilité des MP sont déterminés en utilisant le cytomètre FACS canto II (Becton Dickinson®), de la plateforme de cytométrie en flux de l'UMR 5164 équipé des filtres permettant la mesure de la fluorescence du CFW, de la calcéine-AM et de l'anti-CD16-APC. Dans chaque puits, un volume constant de 60 μ L est prélevé à un débit de 3 μ L/s. Les données exportées, sont analysées grâce au logiciel FACS Diva® (Becton Dickinson) (81).

3.4.3 Etude de l'internalisation des levures par les macrophages par fluorimétrie classique

Cette analyse permet de suivre l'évolution de la population de levures et de déterminer le taux de levures intra-macrophagiques par l'extinction de la fluorescence des levures libres au bleu trypan (Sigma). Pour chaque plaque de 96 puits, un témoin correspondant à du tampon PBS est ajouté en plus de ceux décrits pour l'analyse par cytométrie en flux. De plus, chaque quintuplat d'infection est dupliqué.

Après observation au microscope à chaque temps d'infection, la plaque est centrifugée 5 min à 2200g et les puits sont lavés par du PBS. Après lavage de chaque duplicat, l'un des puits recevra 200 μ L de PBS pour mesurer la fluorescence totale des levures tandis que le second recevra 200 μ L de PBS supplémenté avec 250 μ g/ml de bleu trypan afin d'éteindre la fluorescence des levures extracellulaires. Après 1 min d'incubation à

température ambiante, la plaque est centrifugée et un lavage au PBS est effectué. Après une dernière centrifugation, les cellules sont reprises dans 200 µL de PBS pour mesure des fluorescences.

L'analyse est réalisée à l'aide d'un fluorimètre Fluostar Optima® (BMG Labtech) avec les longueurs d'ondes d'excitation de 350 nm et d'émission de 460 nm à un gain de 1400. Chaque valeur obtenue correspond à la moyenne d'une matrice de 9 valeurs mesurées dans chaque puits. L'estimation du pourcentage de levures intra-macrophagiques est obtenue par la comparaison de l'intensité de fluorescence des puits éteints au bleu trypan par rapport aux puits repris uniquement dans le PBS (81).

3.4.4 Etude de la survie des levures

Après 24 h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les MP sont récupérés et lysés avec du Triton X-100 0,1% froid pendant 30 min, en agitant au vortex toutes les 5 min. Les levures libérées sont dénombrées par comptage à l'hématimètre de Malassez et 100 levures sont étalées sur gélose YPD en triplicat. Le taux de survie est déterminé par comptage direct des colonies (CFU) après 48 h d'incubation à 30°C (81).

4 Résultats et Discussion

4.1 Détermination des CMI des antifongiques de souches de *Candida glabrata* par la méthode E-Test

Les CMI des trois souches de *Candida glabrata* (CGLA 1402, CGLA 1454 et CGLA 1520) isolées de prélèvements cliniques successivement reçus au laboratoire pour un patient âgé de 80 ans hospitalisé à la suite d'une colite ischémique digestive nécessitant une prise en charge chirurgicale ont été déterminées par bandelettes E-Test (Tableau 11).

Tableau 11 Détermination des Concentrations minimales inhibitrices (mg/L) par E-Test

Antifongiques	Souches de <i>Candida glabrata</i>		
	1402	1454	1520
Amphotéricine B	0,5	0,38	0,75
5-fluorocytosine	0,023	0,023	0,016
Anidulafungine	0,012	2	0,016
Caspofungine	0,094	8	0,125
Micafungine	0,016	2	0,023
Fluconazole	>256	32	>256
Voriconazole	>32	0,5	>32

Les CMI obtenues sont comparées aux BP du référentiel EUCAST déterminant ainsi si les souches sont sensibles ou résistantes aux antifongiques. La souche de référence *Candida glabrata* ATCC 90030 est sensible *in vitro* aux antifongiques (sensibilité diminuée au fluconazole). Les souches cliniques CGLA 1402 et CGLA 1520 sont également sensibles aux antifongiques avec une résistance au fluconazole tandis que la souche CGLA 1454 est résistante aux échinocandines et au fluconazole. (Figure 22).

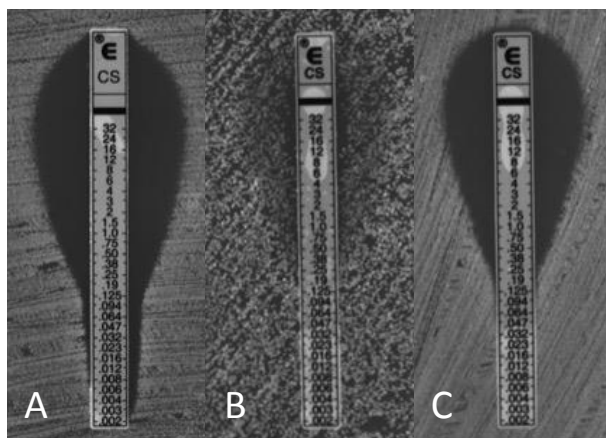


Figure 22 Détermination des CMI de la caspofungine par des bandelettes E-Test exprimées en mg/L.
(A) CGLA 1402 : CMI caspofungine 0,094 ; (B) CGLA 1454 : CMI caspofungine 8 ; (C) CGLA 1520 : CMI caspofungine 0,125

L'utilisation des BPs révisés du CLSI et de l'EUCAST permettent une bonne catégorisation des isolats de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis*. Par contre, avec les BPs proposés par le CLSI, 33,1% des isolats sensibles *Candida glabrata* sont classés intermédiaires et 1,5% des isolats de *Candida glabrata* sont même classés résistants (82). Cette différence s'explique par le fait que les BPs du CLSI sont déterminés à partir de souches d'isolats cliniques recrutés aux Etats-Unis alors que les BPs proposés par l'EUCAST à partir de souches d'isolats cliniques européens. Pour *Candida glabrata*, les CMI mesurées par la méthode Etest® sont plus élevées qu'avec les techniques CLSI et EUCAST. Ainsi, Arendrup et ses collaborateurs ont proposé pour *Candida glabrata* d'utiliser un BP à 0,5 mg/L (initialement à 0,25 mg/L) ou d'évaluer la sensibilité à la caspofungine d'après la CMI obtenue pour l'anidulafungine (82).

Lors de la mise en évidence de *Candida glabrata* CGLA 1402 dans un prélèvement d'abcès, ce site étant normalement stérile, un traitement par caspofungine est initié (J0). Au cours de son hospitalisation, différents prélèvements périphériques successifs sont réalisés (l'ensemble étant localement appelé « une cartographie fongique ») pour évaluer l'ampleur de la colonisation fongique du patient. A J27, la souche CGLA 1454 résistante aux échinocandines est alors isolée d'un prélèvement urinaire. La 5-fluorocytosine est introduite. A J36, devant la persistance de la fièvre et la colonisation fongique importante du patient, la caspofungine est remplacée par de l'amphotéricine B. Le patient sort du service à J64. Un traitement par voriconazole est alors débuté, avec une dose de charge de 400mg pendant 2 jours puis 200mg 2 fois par jour. L'ampleur de la colonisation fongique est régulièrement surveillée. A J107, le patient est de nouveau hospitalisé et la souche CGLA 1520 sensible aux échinocandines est alors isolée d'un prélèvement buccal (Figure 23). Plusieurs souches auraient peut-être dû être collectées à partir de ce prélèvement et leurs CMI pour les échinocandines déterminées afin de s'assurer de l'absence formelle d'une souche de *Candida glabrata* résistante à cette famille d'antifongiques.

De plus, les souches cliniques isolées pour ce patient étaient toutes résistantes aux antifongiques azolés. La souche CGLA 1454 a donc acquis une résistance supplémentaire à une autre famille d'antifongiques. Ces résultats confirment que *Candida glabrata* peut

acquérir une résistance à de multiples agents antifongiques par des événements génétiques indépendants successifs (83).

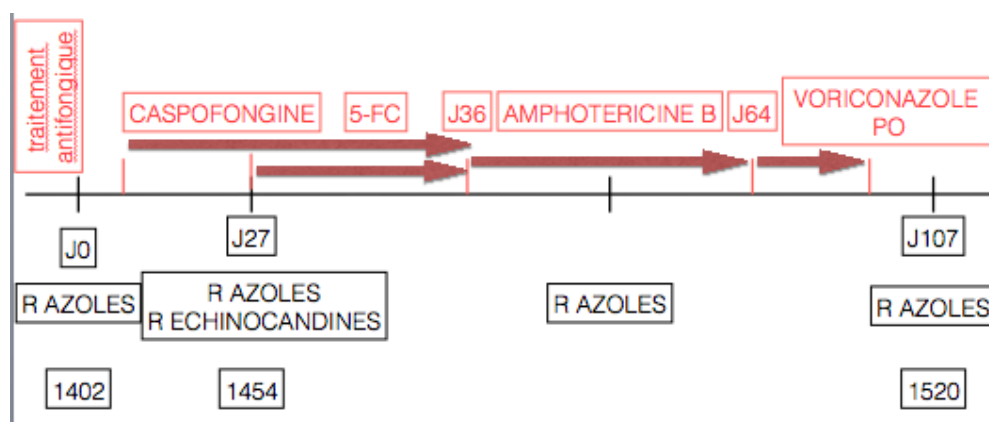


Figure 23 Récapitulatif dans le temps des souches de *Candida glabrata* du patient

4.2 Analyse moléculaire des souches de *Candida glabrata*

4.2.1 Génotypage par MLST

L'analyse moléculaire des souches *Candida glabrata* CGLA 1402, CGLA 1454 et CGLA 1520 a consisté à séquencer 6 *loci* les plus discriminants pour *Candida glabrata* (14).

Les allèles retrouvés par cette technique de MLST sont identiques entre ces trois souches cliniques. Pour les *loci* *FKS1*, *LEU2*, *NMT1*, *TRP1*, *UGP1* et *URA3*, les allèles obtenus sont les 7, 5, 6, 12, 1 et 8, respectivement (Tableau 12).

Tableau 12 Allèles retrouvés en MLST pour CGLA 1402, CGLA 1454 et CGLA 1520

Loci analysés	Souches de <i>Candida glabrata</i>		
	1402	1454	1520
<i>FKS1</i>	7	7	7
<i>LEU2</i>	5	5	5
<i>NMT1</i>	6	6	6
<i>TRP1</i>	12	12	12
<i>UGP1</i>	1	1	1
<i>URA3</i>	8	8	8

Nous avons également vérifié que les séquences étaient rigoureusement identiques en réalisant un alignement multiple grâce au logiciel MultAlin® (annexe 2 : Exemple des

loci URA3 et TRP1). Nous avons ainsi établi que les souches CGLA 1402, CGLA 1454, CGLA 1520 collectées pour le patient correspondent au même génotype.

La perte apparente de la résistance aux échinocandines de la souche CGLA 1520 est probablement la conséquence de la présence de différentes sous-populations dérivées d'un progéniteur commun. Les différents isolats cliniques étant issus du même fond génétique, ceci démontre la capacité élevée de *Candida glabrata* à muter, elle-même facilitée par la nature haploïde de son génome (83) et suggère aussi l'existence d'un *fitness cost* élevé conférée par la résistance aux échinocandines puisque l'interruption de la pression de sélection par le traitement antifongique a entraîné la disparition rapide du clone résistant (84).

4.2.2 Recherche de mutations dans les gènes *FKS1* et *FKS2*

Le séquençage nucléotidique a montré que la souche CGLA 1454 était mutée au niveau des régions HS des gènes *FKS* par rapport à la souche de référence de *Candida glabrata*. La mutation retrouvée dans le HS1 du *FKS1* affecte la phénylalanine en position 659 qui est délétée (DelF659) (Tableau 14).

Tableau 13 Séquençage des gènes *FKS1* et *FKS2* de la souche CGLA 1454 et de la souche de référence

Locus		Séquences des gènes <i>FKS</i>	
		CGLA 1454	Souche de référence
<i>FKS1</i>	HS1	YΔLILSLRDPIR	YFLILSLRDPIR
	HS2	DWVRRYTL	DWVRRYTL
<i>FKS2</i>	HS1	YFFLILSLRDPIR	YFFLILSLRDPIR
	HS2	DWIRRYTL	DWIRRYTL

Dans un travail réalisé en parallèle au laboratoire, cette mutation a été intégrée à une souche de référence de *Candida lusitanae* (CLU 6936) génétiquement modifiée pour réaliser du remplacement d'allèle des gènes *FKS* et mettre en évidence l'impact réel de la mutation sur la résistance aux échinocandines. Cette souche CLU DelF659 a été intégrée à l'étude de l'interaction *in vitro* macrophages – levures.

La délétion de la phénylalanine en position 659 est une mutation de résistance aux échinocandines bien connue pour *Candida glabrata*. Dans un précédent cas rapporté, le patient a été initialement hospitalisé pour un choc septique et traité par antibiothérapie

large spectre et voriconazole. Des prélèvements d'hémoculture positifs pour *Candida glabrata* ont permis d'établir que le patient souffrait d'un épisode de candidémie prouvée à cette espèce. Le voriconazole a alors été remplacé par de la micafungine. Cependant, l'initiation de cet antifongique n'a pas empêché la fièvre de persister et de nouveaux prélèvements d'hémocultures s'avèrent positifs à cette espèce encore par la suite. La caractérisation génotypique de souches isolées de ces prélèvements ont révélé la présence de la mutation DelF659 dans le HS1 du *FKS1* (85).

4.3 Interaction *in vitro* Macrophages - Levures *Candida*

4.3.1 Etude de l'association macrophages-levures par cytométrie en flux

L'analyse quantitative des infections a été réalisée grâce à un modèle d'interaction *in vitro* développé au laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité UMR-CNRS 5234 de Bordeaux. Le suivi quantitatif de l'interaction au cours du temps nécessite d'avoir des marqueurs spécifiques de chaque partenaire de l'infection : CalcoFluor White (CFW) qui lie spécifiquement les β -(1-3)-D-glucanes et la chitine de la paroi des levures, la calcéine-AM marqueur de l'intégrité cellulaire et l'anti-CDC16-APC marqueur spécifique de la membrane plasmique pour les macrophages (81) (Figure 24).

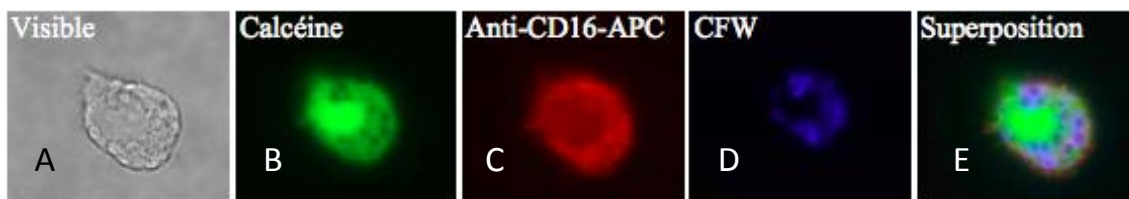


Figure 24 Observation au microscope (x630) d'un macrophage infecté par des levures *Candida glabrata* montrant le marquage spécifique de chaque partenaire de l'infection d'après (81). (A) Observation en lumière blanche; (B) marquage spécifique du macrophage par la calcéine; (C) marquage spécifique du macrophage par l'anticorps anti-CD16-APC; (D) marquage spécifique des levures par le CFW; (E) superposition des trois fluorescences

La détection et la mesure de fluorescence nécessitent d'utiliser un milieu ne contenant pas de rouge phénol. Celui choisi pour notre étude est le RPMI 1640 complété en Sérum de Veau Foetal (cRPMI). Ce milieu a une concentration en glucose proche de celle du sang. L'analyse quantitative de la population de macrophages a été réalisée par cytométrie en flux. Les paramètres d'acquisition du cytomètre de flux ont été réglés de

telle sorte qu'un même volume de 60 μ L soit analysé sur l'ensemble des puits de la plaque.

Le résultat fourni par le cytomètre en flux se présente sous la forme de plusieurs graphiques. Un premier graphique représente l'ensemble des éléments (événements) détectés par l'analyseur en fonction de leur taille (FSC : Forward Scatter) et de leur granulosité (SSC : Side Scatter), qu'ils soient fluorescents ou non. Un histogramme est tracé pour chaque fluorochrome utilisé et les seuils de fluorescence positive pour chacun d'entre eux sont fixés à partir des puits témoins. Pour exemple, pour les fluorescences calcéine et anti-CD16, les bruits de fond de fluorescence sont définis à partir des puits témoins contenant uniquement des levures en présence de chaque fluorochrome et les seuils de fluorescence positifs à partir des puits témoins ne contenant que des phagocytes. Pour chaque population définie à partir des fluorescences, le cytomètre en flux fournit un dénombrement des événements (nombre de structures cellulaires détectées) (Figure 25).

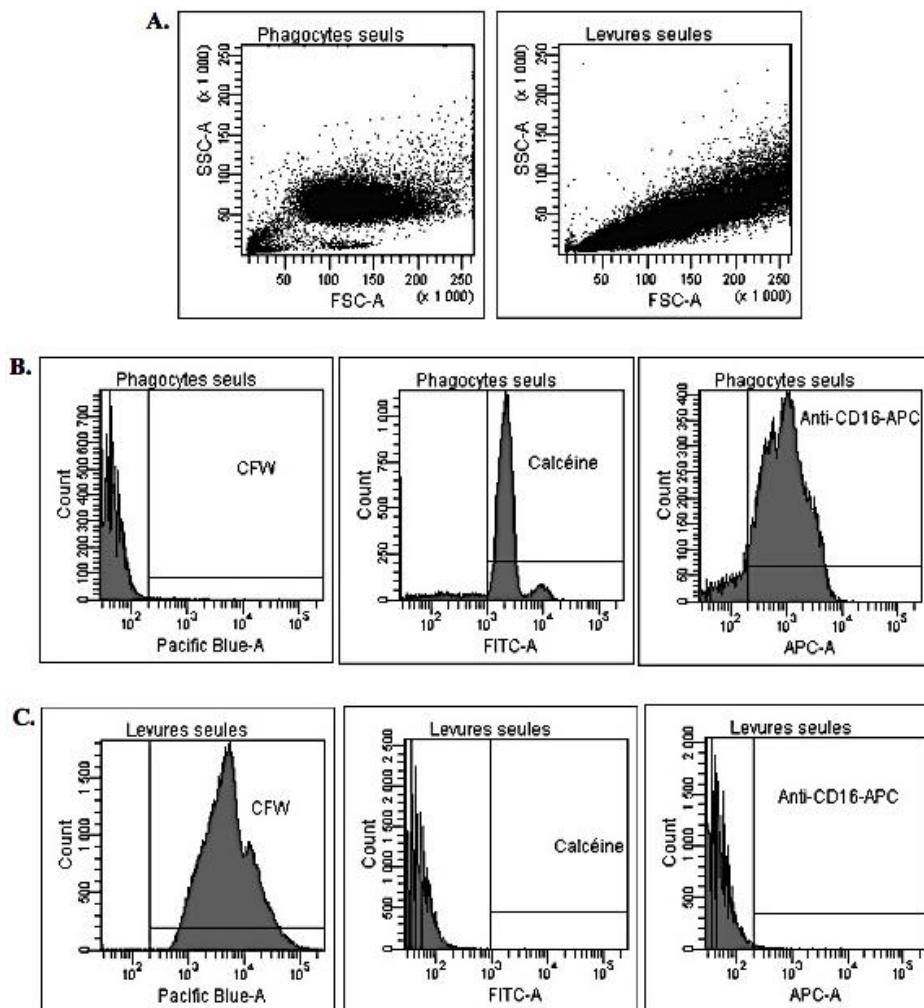


Figure 25 Analyse des infections par cytométrie en flux d'après (81)

(A) Représentation en fonction de la taille (FSC) et de la granulosité (SSC) des événements (structures cellulaires) présents dans un échantillon de phagocytes ou de levures ; (B) Analyse des émissions de fluorescence d'un échantillon contenant uniquement des macrophages ; (C) Analyse des émissions de fluorescence d'un échantillon contenant uniquement des levures

Une structure cellulaire marquée par la calcéine et l'anticorps anti-CD16-APC est un macrophage. En exprimant la fluorescence calcéine en fonction de la fluorescence anti-CD16-APC, nous sélectionnons une population (quart supérieur droit du graphique) correspondant aux cellules doublement marquées pour les deux fluorochromes et donc aux macrophages métaboliquement actifs avec une membrane plasmique intègre. Sachant que pour chaque échantillon, l'analyse est réalisée sur un volume constant de 60 μ L, il est possible de comparer le nombre de macrophages obtenu dans chacun des puits. Ainsi, le pourcentage de survie des macrophages au cours de l'infection a été déterminé par le rapport entre le nombre de cellules doublement marquées obtenues dans les puits d'infection sur le nombre de cellules doublement marquées présentes dans les puits témoins ne contenant que des macrophages.

Les macrophages associés à des levures correspondent à des événements positifs pour les fluorescences calcéine et anticorps anti-CD16-APC mais aussi pour la fluorescence CFW. Après avoir sélectionné la population de macrophages doublement marqués par la calcéine et l'anticorps anti-CD16-APC, l'analyse de la fluorescence CFW de ces événements permet de les séparer en deux sous-populations. Une population qui ne présente aucune fluorescence bleue correspondant aux macrophages seuls et une population positive pour la fluorescence CFW correspondant aux macrophages contenant des levures. Le dénombrement de chaque sous population permet d'estimer le pourcentage de macrophages métaboliquement actifs avec une membrane plasmique intègre associés aux levures. Le pourcentage de survie des MP au cours de l'infection est déterminé par le rapport : [nombre de MP doublement marqués (calcéine+, anti-CD16+) dans les puits d'infection en présence des levures] / [nombre de MP doublement marqués dans les puits témoins ne contenant que des phagocytes] X 100.

Les macrophages J774 ont été infectés par les souches de *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida lusitanae* 6936, CGLA 1402, CGLA 1454 et CLU Delf659 traitées ou non par de la caspofungine à une concentration inférieure (0,05 μ g/mL) et supérieure (5 μ g/mL) à la CMI de la souche sauvage CGLA ATCC 90030 de *Candida glabrata*. Les phénotypes

d'interaction ont été comparés aux temps d'infection 30 minutes, 5 heures, et 24 heures. Les résultats d'interaction entre les différentes souches traitées et non traitées à la caspofungine, sont présentés sous la forme d'histogrammes horizontaux.

La souche de référence ATCC 90030 se comporte différemment aux différents temps d'infection. A T 30min, c'est à dire 30 minutes après le début de l'infection, les levures sont reconnues et phagocytées par les macrophages. Ceux-ci contiennent des levures et il persiste des levures libres dans le milieu.

A T 5h, la population de levures semble être totalement phagocytée, les levures libres dans le milieu sont très rares. Les macrophages sont arrondis et ont un aspect turgescent. La densité des macrophages est comparable à la densité observée en début de l'infection.

A T 24h, les levures libres sont toujours rares. La majorité des macrophages a le même aspect turgescent qu'à T = 5h post-infection, mais une partie de la population a été lysée. Les rares levures libres se retrouvent autour des macrophages dont la membrane plasmique apparaît rompue (81) (Figure 26).

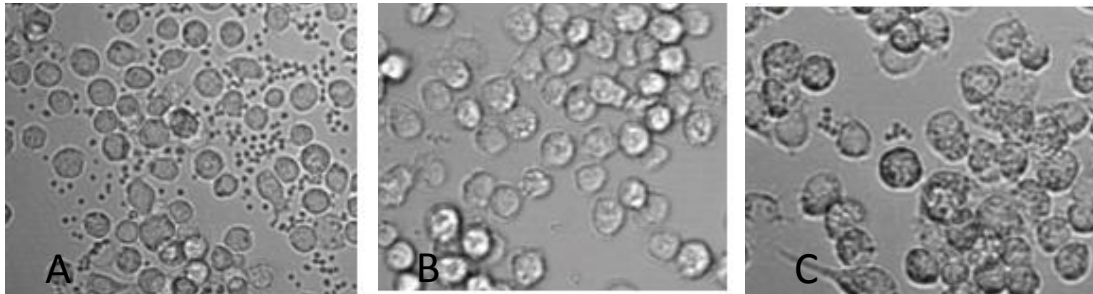


Figure 26 Observation au microscope (x200) des infections entre les macrophages et *Candida glabrata* ATCC 90030

Après (A) T 30min ; (B) T 5h ; (C) T 24h (MOI 1M : 1L) (81)

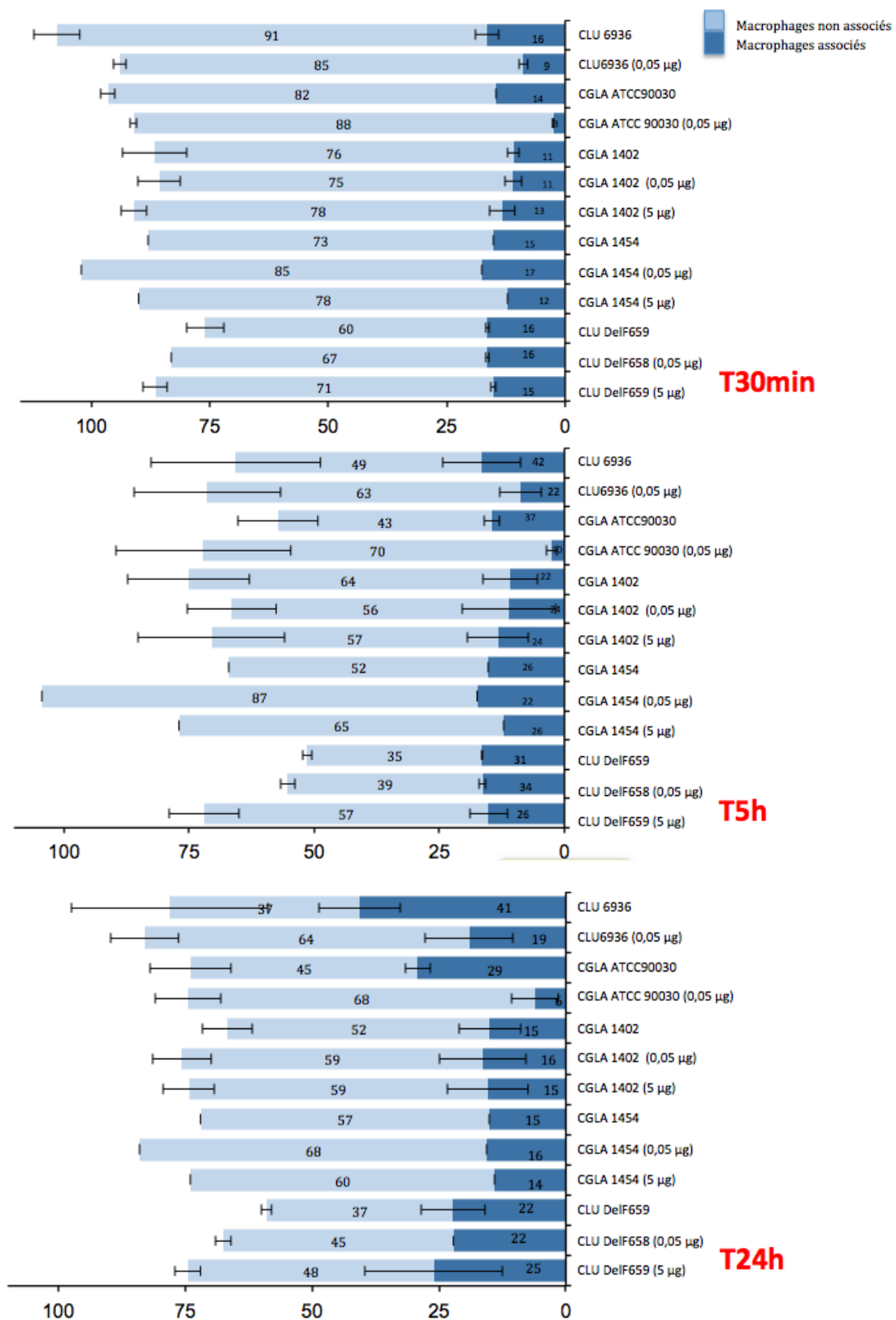


Figure 27 Mesures des interactions macrophages-levures par cytométrie en flux
 Parmi les macrophages en vie, on distingue la proportion des macrophages en phagocytose (zone bleue foncée) de celle des macrophages non associés aux levures (zone bleu clair). (Concentration en caspofungine appliquée en µg/mL)

Après 30 minutes d'infection, le taux de survie des macrophages infectés, pour toutes les souches testées est aux alentours de 80-85% exceptée pour la souche CLU DelF659 pour laquelle le taux de survie est aux alentours de 65%. Après 5 heures d'infection, le taux de survie des macrophages infectés pour toutes les souches testées est d'environ 60%. Globalement, la proportion de macrophages entrés dans la phagocytose augmente au cours du temps pour les souches de référence CGLA ATCC 90030 et CLU 6936, alors que pour les souches cliniques, la proportion de macrophages entrés dans la phagocytose est stable au cours du temps. Pour la souche mutée CLU DelF659, cette proportion est stable entre 30 minutes et 5 heures après l'infection (aux alentours de 15%), et augmente 24 heures après l'infection (22%).

Pour les souches CGLA ATCC 90030 et CLU 6936 non traitées, la proportion de MP engagés dans la phagocytose varie de 15% après 30 min d'infection à environ 35% après 24 h. Pour les souches CGLA 1402 et CGLA 1454 non traitées, environ 15% des MP sont engagés dans la phagocytose après seulement 30 min d'infection et cela est stable jusqu'à 5 heures après l'infection (environ 11% pour CGLA1402, 15% pour CGLA 1454). La souche mutée CLU DelF659 agit de la même façon que les isolats cliniques (environ 16%).

En présence de CAS (0,05 µg/mL), pour les souches de référence CGLA ATCC 90030 et CLU 6936, la proportion de MP engagés dans la phagocytose est respectivement trois fois moins importante aux différents temps d'infection (T30 min: 3%, T5h: 3%, T24h: 6%) et deux fois moins importante aux différents temps d'infection (T30 min: 9%, T5h: 9%, T24h: 19%).

Le traitement par la CAS n'a pas autant d'impact lorsque les MP sont infectés avec les souches CGLA 1402 (CMI= 0,125), CGLA 1454 (CMI =16) et CLU DelF659. Pour la souche CGLA 1402, le pourcentage de MP associés aux levures ne diminue que très peu aux temps T 5h et T 24h quelle que soit la concentration de CAS (0,05 µg/mL et 5 µg/mL) (CAS 0,05 µg/mL: T 5h: 11% ; T 24h: 16% et CAS 5 µg/mL: T 5h: 13% ; T 24h: 15%). Pour la souche CGLA 1454, le pourcentage de MP associés aux levures reste aussi stable aux temps T 5h et T 24h quelle que soit la concentration de CAS (CAS 0,05 µg/mL: T 5h : 17% ; T 24h : 12% et CAS 5 µg/mL: T 5h: 16% ; T 24h: 14%). Pour la souche CLU DelF659, le pourcentage de MP associés aux levures est stable voire légèrement augmenté à T 24h quelle que soit la concentration de CAS (CAS 0,05 µg/mL: T 5h: 16% ; T 24h: 22% et CAS 5 µg/mL: T 5h: 15% ; T 24h: 22%) (Figure 27).

Le faible taux de macrophages engagés dans la phagocytose des souches cliniques CGLA 1402, CGLA 1454 et CLU DelF659 traitées par la caspofungine est un résultat surprenant suggérant que les macrophages ne perçoivent plus la présence de la levure. Toutefois, cette interprétation doit être confirmée par la mesure de la masse fongique internalisée dans les macrophages.

4.3.2 Etude de l'internalisation des levures par les macrophages par fluorimétrie classique

La fluorescence totale en CFW des levures en présence des macrophages a été mesurée au cours de l'infection. Le bruit de fond de fluorescence, correspondant à l'intensité mesurée pour les puits témoins contenant uniquement des macrophages en présence de CFW, a été soustrait. Ainsi, nous avons pu comparer les facteurs de multiplication des souches de *Candida glabrata* en présence des macrophages à T 5h et T 24h par rapport au T 30min. Après quenching au Bleu Trypan, la fluorescence CFW obtenue correspondait à la population de levures contenue dans les macrophages. La comparaison de cette fluorescence à celle obtenue précédemment pour l'ensemble de la population de levures permet d'estimer le pourcentage de levures phagocytées.

A T 30min, environ 75% des levures issues des trois souches de *Candida glabrata* étudiées ont survécu (CGLA ATCC: 72% ; CGLA 1402: 73% ; CGLA 1454: 84,5%).

A T 5h et T 24h, le pourcentage de levures toujours vivantes malgré l'interaction avec les macrophages diffère suivant les souches étudiées. Celui-ci ne se modifie pas pour la souche de référence CGLA ATCC 90030 dont le pourcentage reste aux alentours de 70% (T 5h: 79% ; T 24h: 73%). Pour la souche CGLA 1402, 30% des levures ont été tuées dans les 24 heures suivant l'interaction avec les macrophages (T 5h: 43% ; T 24h: 39%). Pour la souche CGLA 1454, le pourcentage de levures vivantes reste stable aux alentours de 80% (T 5h: 67% ; T 24h: 87%) (Figure 28).

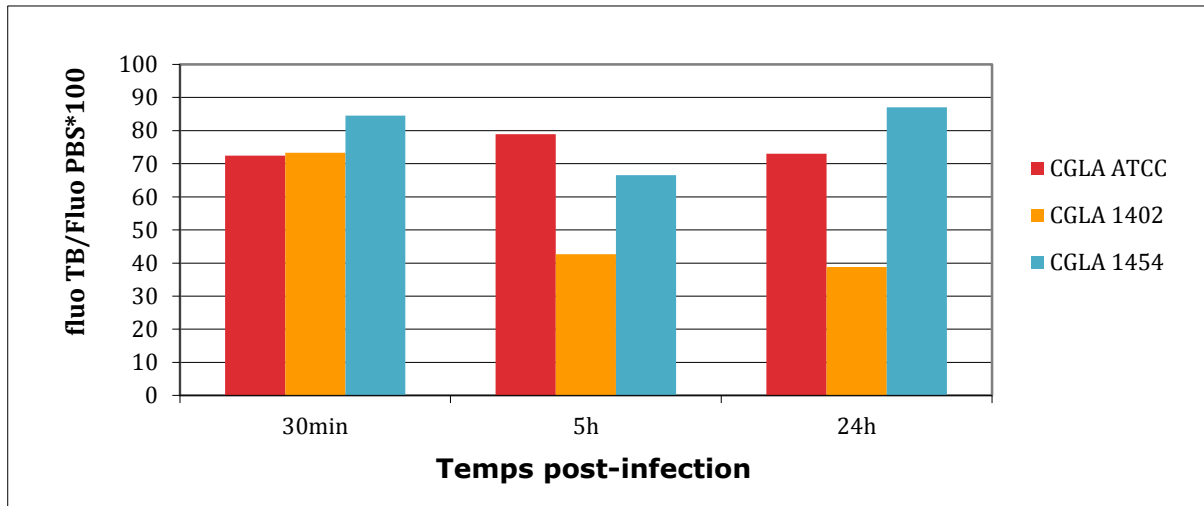


Figure 28 Analyse de la survie des levures intra-macrophagiques aux temps 30min, 5h et 24h

La quantité de levures ingérées par les macrophages peut également être estimée par l'analyse de la MFI (pour « Mean Fluorescence Intensity ») mesurée au cours de l'étude de l'association macrophages-levures par cytométrie en flux. Il s'agit de l'intensité moyenne de fluorescence CFW par MP dans la population de MP Calcéine+, anti-CD16+ (Figure 29).

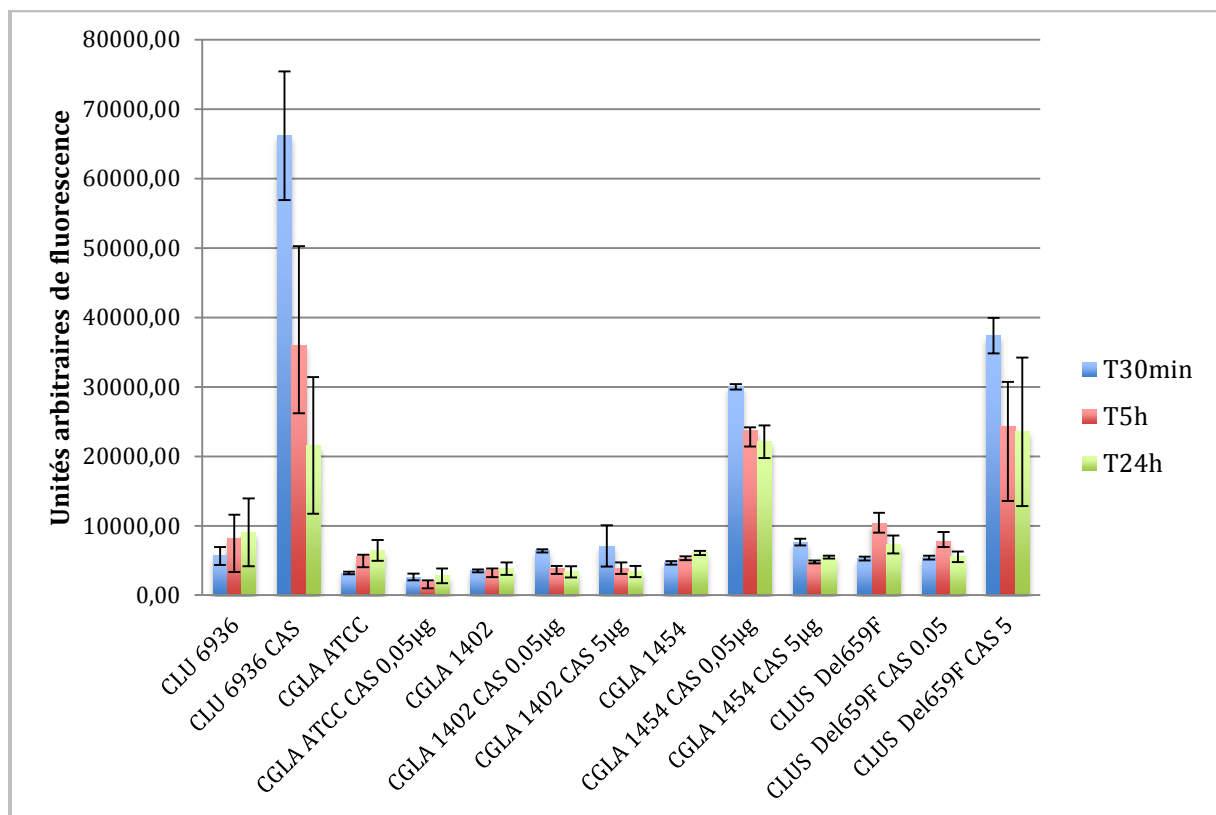


Figure 29 Histogramme représentant la MIF (Intensité Moyenne de Fluorescence) CFW par macrophage (MP) dans la population de MP Calcéine +, anti-CD16+ pour les différentes souches testées, traitées ou non par la caspofungine (concentration en µg/mL appliquée) aux différents temps d'infection.

En absence de caspofungine et à T 24h, on observe une masse fongique ingérée par les macrophages similaire pour les souches étudiées, légèrement plus importante pour les souches de *Candida lusitaniae* CLU 6936 et CLU DelF659. En présence de caspofungine à la concentration 0,05 µg/mL et à T 24h, on observe une augmentation significative de la masse de levures intra-macrophagiques, pour la souche CGLA 1454 ainsi que pour la souche CLU 6936. Pour les autres souches, la MFI diminue en présence de caspofungine 0,05 µg/mL et à T 24h. A la concentration de caspofungine de 5 µg/mL, il n'y a pas d'augmentation significative de la MFI pour CGLA 1402. Les MFI de CGLA 1454 et CLU 6936 pour une même concentration de caspofungine redeviennent similaires à celles de ces souches sans traitement. Concernant CGLA ATCC 90030, il n'y a pas d'augmentation significative de la masse de levures intra-macrophagiques. La MFI de CLU DelF659 à T 24h et à cette concentration de caspofungine augmente de façon significative (Figure 29).

Nos résultats ont montré que le traitement des levures par la caspofungine se traduisait par une stabilité du taux de macrophages en phagocytose pour les souches cliniques alors que, pour les souches de référence, le traitement se traduisait par une diminution significative des macrophages en phagocytose. L'intégration de la mutation de la souche clinique CGLA 1454, responsable du phénotype de résistance aux échinocandines de *Candida glabrata*, à *Candida lusitaniae* induit une stabilité du taux de macrophages en phagocytose.

De plus, le traitement par caspofungine augmente de façon significative la masse fongique internalisée de la souche clinique présentant un phénotype de résistance à cet antifongique, pour de faible concentration. En ce qui concerne les souches de référence, la masse fongique internalisée en présence de caspofungine est plus faible que sans antifongique. Pour la souche clinique présentant un phénotype de sensibilité aux échinocandines par bandelette E-Test, la masse fongique internalisée par les macrophages est sensiblement stable en présence ou absence de caspofungine. Lorsque la concentration de caspofungine augmente, la masse fongique internalisée dans les macrophages de la souche clinique résistante est sensiblement égale à celle en l'absence de caspofungine.

En d'autres termes, pour la souche clinique résistante aux échinocandines, autant de macrophages phagocytent plus de levures à des faibles concentrations de caspofungine.

Il semblerait que la caspofungine agit de deux façons sur les levures avec une incidence directe sur les mécanismes de reconnaissance par les macrophages : un décapage des β -D-glucanes de la paroi avec pour conséquence une meilleure exposition des PAMPs, et une réponse au stress avec synthèse accrue de chitine (86).

4.3.3 Détermination de la survie des levures

In vivo, la phagocytose des levures par les macrophages et les neutrophiles aboutit à la destruction éventuelle des levures. La viabilité des levures internalisées est donc un paramètre qui a été quantifié. La méthode consiste à isoler et à lyser des macrophages après 24 h d'interaction avec des levures, puis à récupérer les levures intramacrophagiques, et à les dénombrer à l'hématimètre de Malassez pour en étaler 100 sur du milieu complet YPD. Le pourcentage de survie correspond au nombre de colonies obtenu par rapport aux 100 levures étalées initialement. Les étalements ont été réalisés en duplicat.

Concernant la souche de référence CGLA ATCC 90030, la présence de caspofungine diminue de façon significative le taux de survie des levures tout comme pour la souche CGLA 1402. En revanche, la souche clinique résistante à la caspofungine CGLA 1454 présente un taux de survie significativement plus élevé que les deux autres souches pour une concentration de caspofungine équivalent à 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (91% de taux de survie à T 24h), mais ce taux n'est pas différent des deux autres souches quand la concentration de caspofungine est de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ceci semble démontrer que la résistance à la caspofungine confère un avantage sélectif en termes de survie dans nos conditions expérimentales pour des concentrations faibles d'antifongiques (Figure 30).

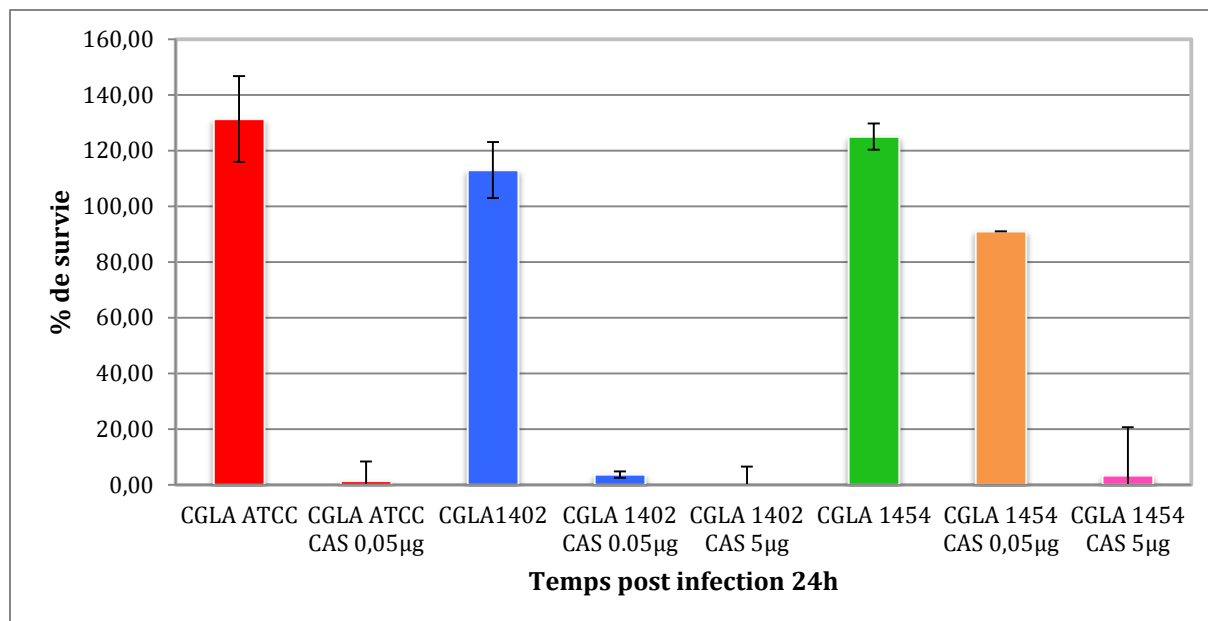


Figure 30 Taux de survie des levures intra-macrophagiques après 24 h d'infection

Concernant la survie des levures intra-macrophagiques, nous avons montré que la résistance phénotypique à la caspofungine retrouvée par bandelette E-Test était en lien avec une survie des levures plus importante lors de concentration faible de caspofungine. Par contre, à concentration élevée de caspofungine, le taux de survie des levures intra-macrophagiques est similaire à la souche sensible.

Nous avons ainsi montré le lien entre la résistance phénotypique aux échinocandines retrouvée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice de *Candida glabrata* et la différence d'interaction avec les macrophages, se comportant différemment que les souches cliniquement sensibles. Le fait que *Candida glabrata* puisse survivre dans les macrophages pose la question de la source des nutriments utilisés par les levures pour leur multiplication. On peut se demander si les levures utilisent leur propre métabolisme pour survivre ou si elles détournent les éléments nutritifs des macrophages.

5 Conclusion et Perspectives

L'augmentation du nombre des situations d'immunodéficience au cours de ces dernières décennies a créé un terrain favorable au développement des infections fongiques. Parmi les agents responsables de ces infections, les levures du genre *Candida* occupent une place prépondérante. En outre, l'utilisation croissante des antifongiques a modifié le profil des espèces rencontrées en clinique, en favorisant les espèces qui sont le moins sensibles. C'est le cas de *Candida glabrata* qui se place aujourd'hui au deuxième rang parmi les espèces responsables de candidose, toutes formes cliniques confondues, alors qu'elle était considérée il y a 20 ou 30 ans comme non pathogène. On sait aujourd'hui que cette espèce possède des facteurs de virulence qui lui sont propres (adhésines, hémolysine, protéases, ...) et qu'elle détermine un taux de mortalité élevé chez les patients atteints de candidose profonde ou systémique. De plus, *Candida glabrata* présente une sensibilité aux antifongiques azolés plus faible que la plupart des autres espèces du genre *Candida*. Enfin, la survenue d'isolats cliniques de *Candida glabrata* résistants aux antifongiques est de plus en plus souvent rapportée, suggérant une plus grande propension à développer une résistance aux antifongiques. Concernant la résistance aux échinocandines, sa prévalence globale chez *Candida glabrata* est de l'ordre de 8 à 13% selon les centres (87).

Au cours de candidémies, les cellules phagocytaires de l'immunité innée, macrophages et polynucléaires neutrophiles jouent un rôle essentiel dans l'élimination des levures *Candida glabrata* par des mécanismes multiples comme par exemple la phagocytose. L'identification des mécanismes de virulence de *Candida glabrata* ou de défense de l'hôte nécessite d'avoir accès à une analyse qualitative et quantitative des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de l'interaction entre les levures et les macrophages.

Nous avons voulu savoir si la résistance aux échinocandines retrouvée par la détermination de la CMI en bandelette E-Test induisait une interaction différente avec les macrophages et se traduisait par un gain de virulence dans ce modèle.

Ce travail a mis en évidence que le traitement par caspofungine induisait une augmentation de la masse fongique internalisée par les macrophages et une augmentation de la survie des levures *Candida glabrata* lorsque celles-ci développent une mutation à type de délétion DelF659 sur le HS1 du gène *FKS1* et devenaient ainsi

résistantes aux échinocandines. De plus, lorsque la pression de sélection disparaît, aucune souche résistante n'est isolée.

Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée, en parallèle des macrophages. De nouveaux mécanismes mis en œuvre par ces polynucléaires ont été décrits tels que la formation de filaments extracellulaires composés d'ADN, histones et de protéines, appelés NET, se liant aux bactéries et levures, les piégeant et évitant ainsi une dissémination bactérienne et fongique. Il serait intéressant d'étudier l'interaction des levures avec ces neutrophiles dans le même modèle expérimental et de comparer la production de NET par les neutrophiles en présence de *Candida glabrata* afin de s'informer sur les stratégies utilisées pour contrer les attaques des neutrophiles.

Enfin, le modèle *in vitro* d'infection par les macrophages avec des levures serait utile pour étudier les mutants et identifier les gènes intéressants pour démêler les mécanismes moléculaires fongiques impliqués dans l'interaction avec les macrophages et les neutrophiles. Ces différentes interactions pourraient être mises en parallèle des mutations du gène *FKS*, gène responsable de la résistance aux échinocandines. La paroi fongique étant impliquée dans l'interaction avec l'hôte, les souches génétiquement modifiées portant des mutations dans le gène *FKS1* pourraient être utilisées pour des expériences *in vitro* ou *in vivo* visant à étudier le rôle direct ou indirect que peuvent jouer les mutations *FKS* lors de l'interaction des isolats résistants de *Candida glabrata* avec les cellules immunitaires de l'hôte.

6 Bibliographie

1. Taieb F, Méchaï F, Lefort A, Lanternier F, Bougnoux M-E, Lortholary O. [Management of candidemia and invasive candidiasis]. *Rev Med Interne*. mars 2011;32(3):173- 80.
2. Anderson Harry Warren. Yeast-Like fungi of the Human intestinal tract. *The journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press. oct 1917;341- 86.
3. Lodder J. *Torulopsis* or *Cryptococcus*? *Mycopathologia*. mars 1938;1(1):62- 7.
4. Yarrow David, Meyer Sally A. Proposal for amendment of the diagnosis of the genus *Candida* Berkhout nom. cons. *Int J Syst Bacteriol*. oct 1978;28(4):611- 5.
5. Barns Susan M, Lane David J, Sogin Mitchell L, Bibeau Claude, Weisburg William G. Evolutionary Relationships among Pathogenic *Candida* Species and Relatives. *J Bacteriol*. avr 1991;173(7):2250- 5.
6. Bialková A, Subík J. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiol (Praha)*. sept 2006;51(1):3- 20.
7. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. Heitman J, éditeur. *PLoS Pathog*. 26 sept 2013;9(9):1003550.
8. Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, et al. Genome evolution in yeasts. *Nature*. 1 juill 2004;430(6995):35- 44.
9. Koszul R, Malpertuy A, Frangeul L, Bouchier C, Wincker P, Thierry A, et al. The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (Torulopsis) glabrata*. *FEBS Lett*. 16 janv 2003;534(1- 3):39- 48.
10. Sanglard D, Ischer F, Bille J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2001;45(4):1174- 83.
11. Wright WL, Wenzel RP. Nosocomial *Candida*. Epidemiology, transmission, and prevention. *Infect Dis Clin North Am*. juin 1997;11(2):411- 25.
12. Odds FC, Jacobsen MD. Multilocus Sequence Typing of Pathogenic *Candida* Species. *Eukaryot Cell*. 1 juill 2008;7(7):1075- 84.

13. Klaassen CHW. MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol.* juill 2009;47 Suppl 1:S27-33.
14. Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J Clin Microbiol.* déc 2003;41(12):5709- 17.
15. Zhao X. *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology.* 1 juill 2004;150(7):2415- 28.
16. De Las Peñas A, Pan S-J, Castaño I, Alder J, Cregg R, Cormack BP. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev.* 15 sept 2003;17(18):2245- 58.
17. Calcagno A-M, Bignell E, Warn P, Jones MD, Denning DW, Mühlischlegel FA, et al. *Candida glabrata* STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Mol Microbiol.* nov 2003;50(4):1309- 18.
18. W G, D X, S S. In Vitro Models to Study *Candida albicans* Biofilms. *J Pharm Drug Dev* [Internet]. juin 2015 [cité 22 mars 2017];3(3). Disponible sur: <http://www.annepublishers.com/full-text/JPDD/2-301/In-Vitro-Models-to-Study-Candida-Albicans-Biofilms.php>
19. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* déc 2006;9(6):588- 94.
20. Castaño I, Pan S-J, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B, Cormack BP. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol.* févr 2005;55(4):1246- 58.
21. Rodrigues C, Rodrigues M, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata* Biofilms: How Far Have We Come? *J Fungi.* 1 mars 2017;3(1):11.
22. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* 1 janv 2007;20(1):133- 63.
23. Johnson EM. Rare and emerging *Candida* species. *Curr Fungal Infect Rep.* sept 2009;3(3):152- 9.

24. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. nov 2003;3(11):685- 702.
25. Eggimann P, Pittet D. Candidémie et candidose généralisée. *EMC - Anesth-Réanimation*. janv 2010;7(1):1- 25.
26. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, et al. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. mai 1998;31(1):289- 96.
27. Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, Kullberg B-J, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 21 sept 2015;15(10):630- 42.
28. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. janv 2008;6(1):67- 78.
29. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010. *Emerg Infect Dis*. juill 2014;20(7):1163- 9.
30. The French Mycosis Study Group, Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, et al. Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002–2010). *Intensive Care Med*. sept 2014;40(9):1303- 12.
31. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, et al. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. *J Clin Microbiol*. 1 avr 2004;42(4):1519- 27.
32. Nucci M, Anaissie E. Revisiting the Source of Candidemia: Skin or Gut? *Clin Infect Dis*. 15 déc 2001;33(12):1959- 67.
33. Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in

critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006):
Crit Care Med. mai 2009;37(5):1612- 8.

34. Holley A, Dulhunty J, Blot S, Lipman J, Lobo S, Dancer C, et al. Temporal trends, risk factors and outcomes in *albicans* and *non-albicans* candidaemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. Int J Antimicrob Agents. juin 2009;33(6):554.1-554.7.

35. Talarmin J-P, Boutoille D, Tattevin P, Dargère S, Weinbreck P, Ansart S, et al. Épidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'Ouest de la France. Médecine Mal Infect. déc 2009;39(12):877- 85.

36. Bitar D, Lortholary O, Dromer F, Coignard B, Che D. Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI 2001-2010 : incidence, létalité et tendances. bulletin épidémiologique hebdomadaire; avr 2013.

37. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. juill 2004;12(7):317- 24.

38. Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. Mycoses. nov 2016;59(11):678- 90.

39. Blondiaux N, Gaillot O, Courcol R-J. [MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille]. Pathol Biol (Paris). févr 2010;58(1):55- 7.

40. Rex JH, Clinical and Laboratory Standards Institute, éditeurs. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; oct 2008. 25 p. (Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute).

41. Abbes S, Trabelsi H, Amouri I, Sallemi H, Nej S, Fatma C, et al. Methods for studying the in vitro susceptibility of *Candida spp.* to antifungals. Ann Biol Clin (Paris). oct 2012. 11-12;(6):635–642.

42. De Carolis E, Vella A, Florio AR, Posteraro P, Perlin DS, Sanguinetti M, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. J Clin Microbiol. juill 2012;50(7):2479- 83.

43. 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 Off Publ Infect Dis Soc Am.* mai 2013;56(9):1284- 92.
44. 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.* déc 2010;14(6):R222.
45. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2012;18 Suppl 7:9- 18.
46. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 mars 2011;52(6):750- 70.
47. McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 mars 2008;46(6):890- 6.
48. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol.* oct 2001;39(10):3617- 22.
49. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR Diagnosis of Invasive Candidiasis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol.* 1 févr 2011;49(2):665- 70.
50. Khodadadi H, Karimi L, Jalali-Zand N, Adin H, Mirhendi H. Utilization of size polymorphism in ITS1 and ITS2 regions for identification of pathogenic yeast species. *J Med Microbiol.* 9 janv 2017;
51. 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. 15 juin 2008;46(12):1813- 21.
52. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the “*Candida* score” for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: A prospective multicenter study: Crit Care Med. mai 2009;37(5):1624- 33.
53. Bassetti M, Marchetti M, Chakrabarti A, Colizza S, Garnacho-Montero J, Kett DH, et al. A research agenda on the management of intra-abdominal candidiasis: results from a consensus of multinational experts. Intensive Care Med. déc 2013;39(12):2092- 106.
54. Nucci M. Persistent Candidemia: Causes and Investigations. Curr Fungal Infect Rep. mars 2011;5(1):3- 11.
55. Park BJ, Colombo AL, Guimaraes T. Evaluation of the clinical significance of persistent candidemia: results from a prospective study (abstract). In Chicago, Illinois; avr 2007.
56. Velasco E, Bigni R. A prospective cohort study evaluating the prognostic impact of clinical characteristics and comorbid conditions of hospitalized adult and pediatric cancer patients with candidemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. nov 2008;27(11):1071- 8.
57. Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. J Clin Microbiol. sept 2011;49(9):3300- 8.
58. Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. juill 2006;25(7):419- 25.
59. Cohen Y. Facteurs pronostiques des infections à *Candida*: un enjeu pour améliorer la prise en charge et diminuer la mortalité des patients. Réanimation. oct 2008;(4):4- 6.
60. Dannaoui E. Principaux antifongiques systémiques. Mécanismes d’action et de résistance, spectre, indications. DIU Stratégie thérapeutiques en Maladies infectieuses; mai 2007.
61. Duschinsky R, Plevin E, Heidelberger C. The synthesis of 5-Fluoropyrimidines. J Am Chem Soc. août 1957;79(16):4559- 60.

62. Grunberg E, Titsworth E, Bennett M. Chemotherapeutic activity of 5-Fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1963;161:566- 8.
63. Tassel D, Madoff MA. Treatment of *Candida* sepsis and *Cryptococcus* meningitis with 5-fluorocytosine. A new antifungal agent. *JAMA.* 21 oct 1968;206(4):830- 2.
64. Cutler RE, Blair AD, Kelly MR. Flucytosine kinetics in subjects with normal and impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther.* sept 1978;24(3):333- 42.
65. Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol.* août 2005;68(2):151- 62.
66. Rybak JM, Marx KR, Nishimoto AT, Rogers PD. Isavuconazole: Pharmacology, Pharmacodynamics, and Current Clinical Experience with a New Triazole Antifungal Agent. *Pharmacotherapy.* nov 2015;35(11):1037- 51.
67. Fromtling RA. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin Microbiol Rev.* avr 1988;1(2):187- 217.
68. Normark S, Schönebeck J. In vitro studies of 5-fluorocytosine resistance in *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 1972;2(3):114- 21.
69. Polak A. 5-Fluorocytosine-current status with special references to mode of action and drug resistance. *Contrib Microbiol Immunol.* avr 1977;4:158- 67.
70. Hope WW, Taberner L, Denning DW, Anderson MJ. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2004;48(11):4377- 86.
71. Vandeputte P, Pineau L, Larcher G, Noel T, Brèthes D, Chabasse D, et al. Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. *Mycopathologia.* janv 2011;171(1):11- 21.
72. Vandeputte P, Tronchin G, Bergès T, Hennequin C, Chabasse D, Bouchara J-P. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2007;51(3):982- 90.
73. Sanglard Dominique. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* nov 2002;20(9):462- 70.

74. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiol Read Engl*. oct 1999;145 (Pt 10):2701- 13.
75. Farahyar S, Zaini F, Kordbacheh P, Rezaie S, Falahati M, Safara M, et al. Expression of Efflux Pumps and Fatty Acid Activator One Genes in Azole Resistant *Candida Glabrata* Isolated From Immunocompromised Patients. *Acta Med Iran*. juill 2016;54(7):458- 64.
76. Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol*. juin 2008;25(2):101- 6.
77. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. juin 2013;56(12):1724- 32.
78. Perlin DS, Shor E, Zhao Y. Update on Antifungal Drug Resistance. *Curr Clin Microbiol Rep*. juin 2015;2(2):84- 95.
79. Perlin DS. Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clin Infect Dis*. 1 déc 2015;61(suppl 6):S612- 7.
80. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs [Internet]. mars 2017. Disponible sur:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_8.1_March_2017.pdf
81. Dementhon K, El-Kirat-Chatel S, Noël T. Development of an In Vitro Model for the Multi-Parametric Quantification of the Cellular Interactions between *Candida* Yeasts and Phagocytes. Davis D, éditeur. *PLoS ONE*. 30 mars 2012;7(3):32621.
82. Arendrup MC, Pfaller MA, the Danish Fungaemia Study Group. Caspofungin Etest Susceptibility Testing of *Candida* Species: Risk of Misclassification of Susceptible Isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* when Adopting the Revised CLSI Caspofungin Breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 juill 2012;56(7):3965- 8.
83. Chapeland-Leclerc F, Hennequin C, Papon N, Noel T, Girard A, Socie G, et al.

Acquisition of Flucytosine, Azole, and Caspofungin Resistance in *Candida glabrata* Bloodstream Isolates Serially Obtained from a Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipient. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mars 2010;54(3):1360- 2.

84. Imbert S, Castain L, Pons A, Jacob S, Meyer I, Palous M, et al. Discontinuation of echinocandin and azole treatments led to the disappearance of an FKS alteration but not azole resistance during clonal *Candida glabrata* persistent candidaemia. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. juill 2016 [cité 29 oct 2016]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X16302634>

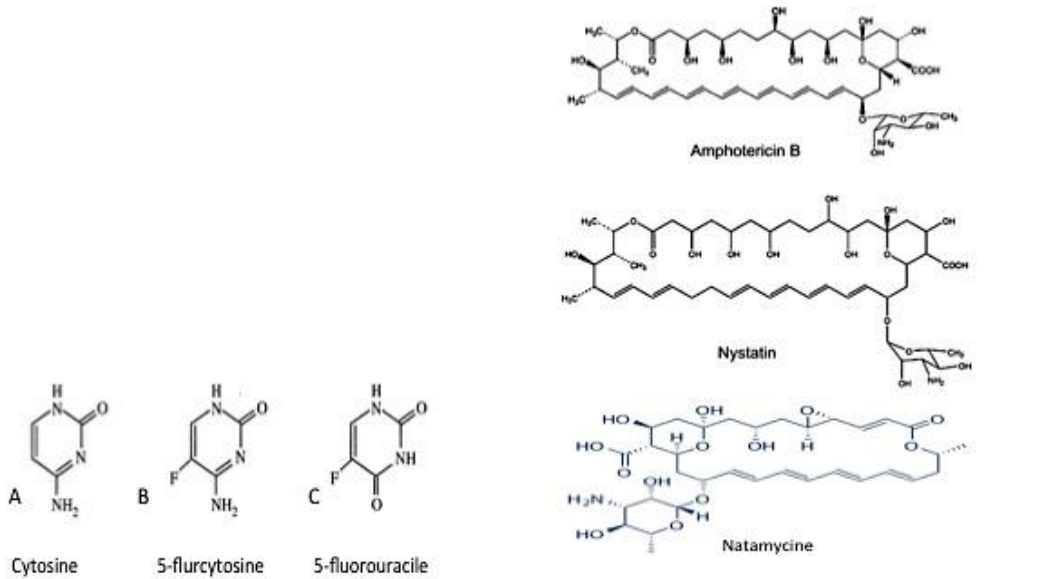
85. Cleary JD, Garcia-Effron G, Chapman SW, Perlin DS. Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to an *FKS1* mutation developed during candidemia treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2008;52(6):2263- 5.

86. Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Elevated Chitin Content Reduces the Susceptibility of *Candida* Species to Caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 2013;57(1):146- 54.

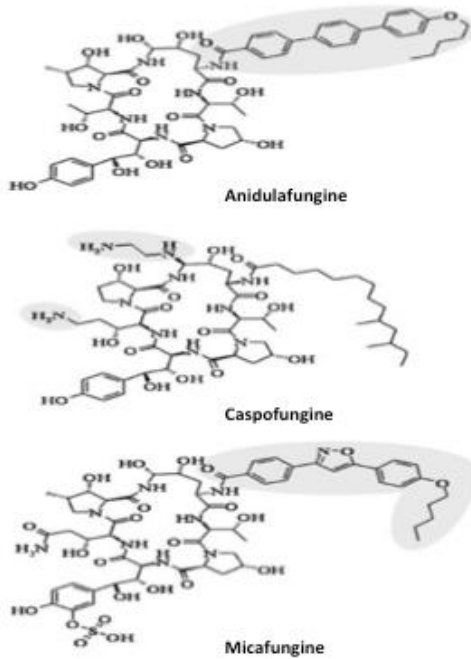
87. Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad Sci.* sept 2015;1354:1- 11.

7 Annexes

Annexe 1: Structure des molécules d'antifongiques

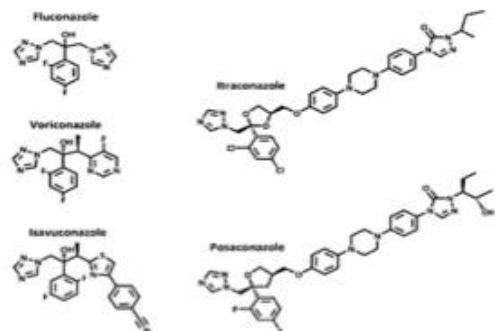


Les FLUOROPYRIMIDINES



Les ECHINOCANDINES

Les POLYENES

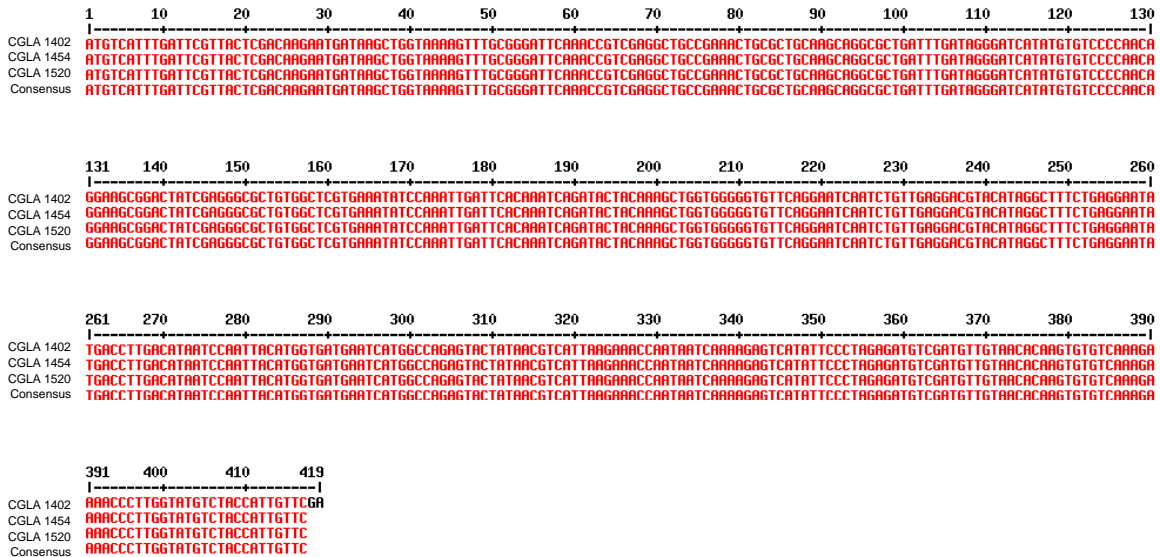


Les AZOLES

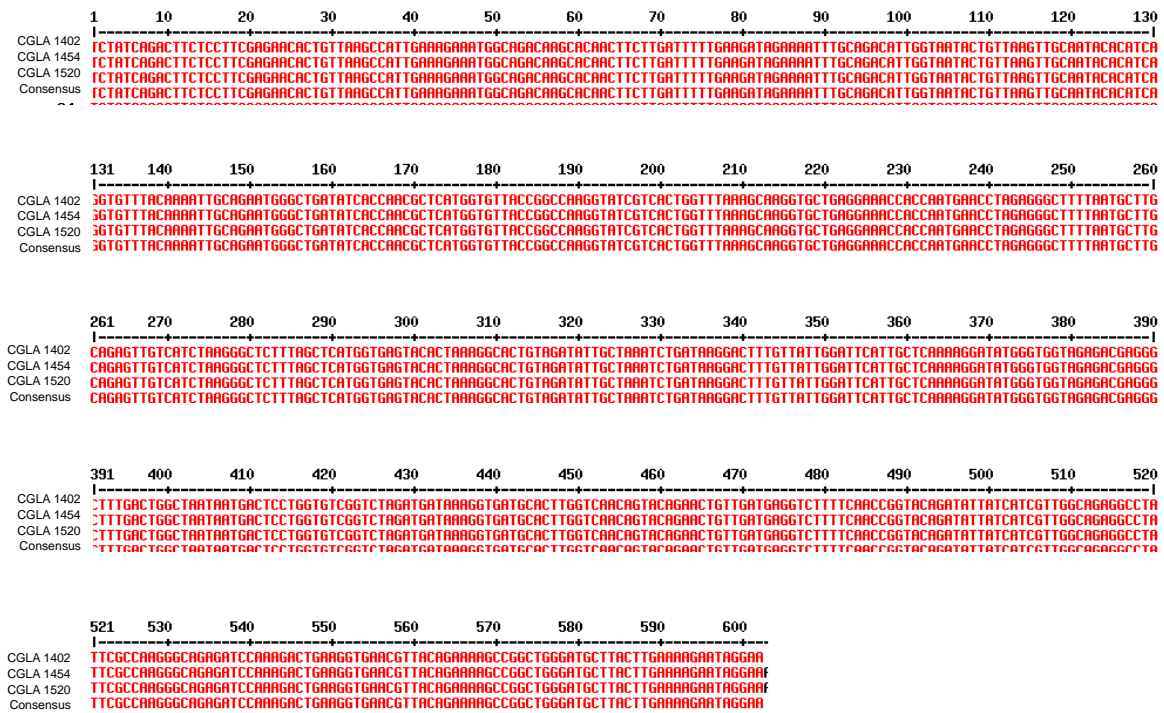
Annexe 2 : Exemple des loci TRP1 ou URA3 analysés par alignement multiple par

MultAlin®

Locus TRP1



Locus URA3



Serment d'Hippocrate

« Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me le demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque. »

Genotypic characterization of *Candida glabrata* strains developing antifungal resistance

Candida glabrata, which ranks the second among agents of systemic candidiasis, is characterized by less susceptibility to azoles and it seems that an acquired resistance to azole, polyene, and pyrimidin analog drugs is more frequent in this species due to the haploid nature of its genome. Importantly, all of the *Candida glabrata* isolates were undistinguishable by genotyping analysis. We studied, *in vitro*, the phenotypic characterization of interaction between these strains and macrophages, which constitute the main defense against candidiasis, with or without caspofungin treatment, by flow cytometry. Echinocandin treatment led to the emergence of a FKS1 DelF659 alteration and echinocandin resistance. Concerning *Candida glabrata* strains which developed resistance to echinocandins and therefore, this mutation, we concluded that many macrophages phagocytate more yeasts in the presence of a low concentration of caspofungin. We also concluded that the survival of resistant yeasts was higher when concentration of caspofungin was low but became the same to the sensitive strains at high concentrations.

Finally, the clinical isolate recovered after discontinuation of the echinocandin treatment was sensitive and seemed to demonstrate a high cost fitness conferred by resistance to echinocandins. This suggests that a more restricted use and/or a discontinuous administration of echinocandins may limit the spread of clinical resistance to this class.

Caractérisation génotypique de souches de *Candida glabrata* développant des résistances aux antifongiques

L'espèce *Candida glabrata*, qui se situe au deuxième rang parmi les agents de candidose invasive, présente la particularité d'être peu sensible aux azolés et d'avoir une fréquence élevée de développement de résistance aux antifongiques du fait du caractère haploïde de son génome. Après s'être assurés que les souches de *Candida glabrata* reçues successivement au laboratoire et issues du même patient étaient issues du même génotype, nous avons analysé, *in vitro*, le phénotype d'interaction entre ces souches et les macrophages, principaux effecteurs de la défense anti-*Candida* avec ou sans caspofungine par cytométrie en flux. La mutation de résistance aux échinocandines affectait la phénylalanine en position 659 qui était déléetée. Concernant les souches de *Candida glabrata* présentant une résistance aux échinocandines et donc cette mutation, en cytométrie en flux, autant de macrophages phagocytèrent une plus grande quantité de levures en présence d'une faible concentration de caspofungine. Nous avons aussi montré que la survie des levures résistantes était plus importante lors de faible concentration de caspofungine mais redevenait identique à celle des souches sensibles à forte concentration. Enfin, l'isolat clinique retrouvé après arrêt du traitement, était sensible aux échinocandines et ceci semblait mettre en évidence un *fitness cost* élevé conféré par la résistance aux échinocandines. Ceci suggère en outre qu'une utilisation discontinue des échinocandines limiterait l'émergence des résistances à cette classe d'antifongiques.

Discipline : Médecine spécialité Biologie médicale

Mots-clés : *Candida glabrata*, macrophages, cytométrie en flux, résistances, échinocandines

Université de Bordeaux U.F.R des SCIENCES MEDICALES
146 Rue Leo Saignat
Case 16 – Espace Santé
33076 BORDEAUX