Glycannes fongiques circulant dans le sérum des patients de réanimation. Analyse de l'intérêt clinique et développement de méthodes physico-chimiques de détection/caractérisation

Julien Poissy

▶ **To cite this version:**

Julien Poissy. Glycannes fongiques circulant dans le sérum des patients de réanimation. Analyse de l'intérêt clinique et développement de méthodes physico-chimiques de détection/caractérisation. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S022 . tel-01084810

HAL Id: tel-01084810

https://theses.hal.science/tel-01084810

Submitted on 20 Nov 2014

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 Lille 2 - Droit et Santé

Ecole doctorale de Biologie - Santé de Lille

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : physiologie, biologie des organismes, populations, interactions

Spécialité : Parasitologie-mycologie

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 2014

par Julien Poissy

Glycannes fongiques circulant dans le sérum des patients de réanimation. Analyse de l'intérêt clinique et développement de méthodes physico-chimiques de détection/caractérisation

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs:	**Pr Thierry Calandra**
	Pr Jean-Maurice Mallet
Examinateurs:	**Pr Raymond Robert**
	Pr Daniel Mathieu
	Dr Yann Guérardel
Directeur de thèse:	**Pr Daniel Poulain**

Ce travail a été réalisé au sein :

-De l'INSERM U995-équipe 2

Faculté de médecine, pôle recherche

1, place de Verdun

59045 Lille Cedex

-De l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle

Université des Sciences et Technologies de Lille

Cité scientifique -Bât. C9

59655 Villeneuve d'Ascq

-Du Pôle de réanimation

Hôpital Salengro, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille

2, avenue Oscar Lambret

59037 Lille Cedex

-Du centre de Biologie Pathologie Génétique

Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille

Boulevard du Pr Jules Leclercq

59037 Lille Cedex

Sous la direction du Professeur Poulain

Remerciements

En premier lieu, mes vifs remerciements au Pr Daniel Poulain qui a accepté de m'accueillir dans son unité de recherche et d'encadrer mon travail de thèse, en espérant que cette "dernière" thèse vous donnera satisfaction. Vous avez tout fait pour m'enseigner votre rigueur scientifique et votre probité intellectuelle. Recevez ici l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Au Pr Thierry Calandra. Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse après avoir accepté les différents comités de suivi de thèse malgré vos multiples activités, recevez ici l'expression de ma reconnaissance. Les échanges et les collaborations avec votre équipe sont hautement enrichissants.

Au Pr Jean-Maurice Mallet. Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Pr Raymond Robert. Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Dr Yann Guérardel. Tu me fais l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail, après avoir tenté de m'initier à la complexité de la glycobiologie structurale et de son application aux secrets de la constitution de la bière. Reçois ici l'expression de mes vifs remerciements et de ma gratitude.

Au Professeur Mathieu, l'un de mes maîtres en médecine, et mon maître en réanimation. Vous me faites l'honneur de juger ce travail que vous m'avez poussé à faire, 9 ans après mon stage d'interne dans votre unité, stage qui a rendu mon retour d'Afrique moins "décalé" qu'il aurait pu l'être. Je trouve à vos côtés du sens à nos actions médicales et la sagesse de la pondération et de la prise de recul. Recevez ici l'expression de mon profond respect et de ma gratitude.

Au Professeur Sendid. Vous n'êtes pas dans mon jury, mais avez largement contribué à faire de ce travail ce qu'il est. Je vous en remercie vivement.

A l'ensemble des membres ou ex-membres de l'U995-2, pour leur accueil, leurs échanges et leur aide (et la compassion des co-thésards) : Sébastien Damiens, Samir Jawhara, Laura Choteau, Flavie Courjol, Bernadette Leu, Annick Masset, Thierry Jouault, Chantal Fradin.

Aux membres du Laboratoire de Mycologie-Parasitologie, tout particulièrement à l'indispensable Nadine (ou Caroline? on ne sait plus) François, qui œuvre discrètement, mais sans qui rien ne serait.

Aux différents intervenants du C9 : Nadège Galhem qui a tracé les premiers sillons du tir laser sur le disaccharide et la gamme qui pesait trop lourd (...), Sophie Courtecuisse, Alexandre Méry.

A mes collègues du centre de réanimation: Raphaël Favory, Emmanuelle Jaillette, Marie Kauv, Saad Nseir et particulièrement "maman" Erika Parmentier-Decrucq qui a tout fait pour me permettre d'avoir un peu de temps en gérant tout avec son efficacité légendaire.

Abréviations

Ac: anticorps.

Ag: antigène.

Als: agglutinin like sequence proteins.

BDG: β-D-glucane.

BMT: β-mannosyl-transferase.

CI: candidose invasive.

CLRs: C-lectin type receptors.

DAMPs: damage associated molecular patterns.

ESCMID: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

GPI: glycosyl phosphatidyl inositol.

IDSA: Infectious Diseases Society of America.

MBL: mannose binding lectin.

MLST: multi locus sequence typing.

Mn: mannane.

MTL: mating type locus.

PAMPs: pathogen associated molecular patterns.

PARs: protease activated receptors.

PRRs: pathogen recognition receptors.

Sap: secretory aspartyl protease.

TLRs: Toll like receptors.

RESUME

Introduction : La rapidité du diagnostic de candidémie et de candidose invasive (CI) est cruciale pour permettre l'introduction précoce des antifongiques. Cette dernière est souvent retardée car l' hémoculture, test diagnostique de référence, n'est positive que dans 50% des cas avec un délai de plusieurs jours. Des méthodes complémentaires consistent en la détection sérique de polysaccharides de la paroi des *Candida* : les β-glucanes (BDG) et les mannanes (Man). Nos objectifs étaient de : a) évaluer la signification et l'intérêt clinique de la détection des BDG et des Man en réanimation. b) mettre en perspective cette signification avec celle de la cinétique d'une lectine circulante, la Mannose Binding Lectin (MBL). c) de participer à l'analyse de l'intérêt d'une méthode de spectrometrie de masse (MS) en développement visant à détecter /caractériser des glycannes fongiques circulants.

Matériels et Méthodes : a) Pour l'étude clinique cas-contrôles, la cinétique des BDG/Man par rapport à la candidémie a été évaluée chez 41 patients candidémiques et a été comparée à celle relevée chez 67 patients non candidémiques, hospitalisés dans le même service et chez qui la colonisation était déterminée toutes les semaines. b) Les taux et la cinétique de MBL ont été évalués en Elisa chez 68 patients candidémiques, 82 patients hospitalisés sans candidose invasive, et 70 sujets "sains" donneurs de sang. c) une méthode de type MALDI-MS a été appliquée à des sérums après extraction sélective des glycannes et comparée à des standards.

Resultats : a) au seuil recommandé le BDG est un biomarqueur sensible, précoce, mais peu spécifique pour le diagnostic de candidémie en réanimation. Il ne semble pas affecté par la colonisation mais sa décroissance lente le rend peu utile pour le suivi du traitement. A l'opposé, le Man est un biomarqueur très spécifique mais peu sensible. En changeant les seuils du BDG son utilisation séquentielle avec le Man permet de proposer un algorithme dans le cadre d'une stratégie thérapeutique préemptive. b) Les taux de MBL sont significativement plus élevés chez les patients candidémiques que chez les patients non candidémiques, mais subissent une forte décroissance dans les deux jours qui précédent la candidémie, concomitamment à la circulation de Mn. A l'inverse des taux faibles de MBL semblent être associés à la colonisation. c) La méthode MALDI-MS permet de révéler un signal m/z 365 correspondant à un disaccharide (dont le tréhalose) associé aux CI humaines et expérimentales. Des études préliminaires montrent que ce test semble avoir une bonne sensibilité et une bonne spécificité pour le diagnostic de CI ainsi que pour d'autres infections fongiques.

Conclusion : a) Le BDG est un marqueur sensible, le Man est une marqueur spécifique, leur utilisation conjointe peut permettre un diagnostic précoce des CI et une rationnalisation du traitement antifongique. b) L'analyse de la cinétique de ces biomarqueurs doit intégrer la cinétique de leurs ligands, comme attesté par la cinétique de la MBL et des Mn. c) L'application de la méthode MALDI-MS à la détection/caractérisation des glycannes circulant semble présenter un important potentiel pour se substituer ou complémenter les méthodes diagnostiques actuelles de CI.

ABSTRACT

Introduction : The rapidity of the diagnosis of candidaemia and invasive candidiasis (IC) is crucial to allow the early introduction of antigungal therapy. This one is often delayed because *Candida* yeasts are found in blood culture, the gold standard diagnostic test, in only 50% of cases of IC and several days are needed to have this result. Complementary methods relie on the detection of *Candida* cell wall polysaccharids in the serum, β-glucans (BDG) and mannans (Man). Our objectives were to : a) determine the signification and clinical interest of the detection of BDG and Man in intensive care. b) determine the signification of the kinetic of Mannose Binding Lectin (MBL), in order to understand the relation between the antigenic polysaccharids of *Candida* cell wall and their ligands. c) take part in the analysis of the interest of a mass spectrometry (MS) technic in development which aim to detect/caracterize circulant fungic glycans.

Materials and Methods : a) For the clinical case-control study, the BDG and Man kinetics in relation with candidaemia were evaluated in 41 candidemic patients, and were compared to the kinetics observed in 67 non candidemic patients, hospitalised in the same ward and assessed weekly for yeast colonisation. b) Rate and kinetics of MBL were determined by Elisa on 68 candidemic patients, 82 hospitalized patients without invasive candidiasis, et 70 "helathy" blood donors subjects. c) a MALDI-MS method was applied to sera after selective extraction of glycans and compared to standards.

Results : BDG at the recommanded cut-off is a sensitive and precoce but non specific test for the diagnosis of candidemia in ICU. It does not seem to be affected by the colonisation, but its very slow decrease limits its usefulness for the management of the treatment. At the opposite, Man is very specific but not sensitive. Modulating the cut-off of BDG, it is possible to propose a decisional algorithm for preemptive therapy based on the sequential use of BDG and Man. b) MBL rates are significantly higher in candidemic patients than in non-candidemic ones, but dramatically decreases in the two days before candidemia, on the same time that a circulation of Mn is measured. At the opposite, low levels of MBL seem associated to colonisation. c) MALDI-MS reveals a signal at position m/z 365, corresponding to a dihexose (among which is trehalose), associated to human and experimental IC. In preliminary studies this test seems to have good sensitivity and specificity for the diagnosis of IC as well as for other fungal infections.

Conclusion : a) BDG is a sensitive test, Man is a specific one, and their joint use could be useful for an early diagnosis of IC and a rationalization of the antifungal treatment. b) The analyse of these biomarkers must take into account the kinetics of their ligands, as shown by the respective kinetics of MBL and Mn. c) The application of MALDI-MS method to the detection/caracterisation of circulating glycans seems to present an important potential to replace or complete the current available diagnostic tools of IC.

Sommaire

Introduction 9

Ecobiologie 11

Généralités 11

Approche moléculaire et phylogénie 11

Vie sexuelle et plasticité 14

Espèces rencontrées en pathologie humaine 18

Candida albicans 18

Candida non albicans 20

Pouvoir pathogène/physiopathologie 23

Du côté du pathogène 23

Traversée du mucus 25

Adhésion 26

Filamentation 30

Biofilm 32

Synthèse 34

L'immunité anti C*andida* 36

Les barrières cutanéo-muqueuses 36

La réponse immunitaire innée 37

La réponse immunitaire adaptative 44

Polymorphismes génétiques et prédisposition à l'infection en pratique clinique 48

Synthèse générale 49

Candidoses invasives en réanimation 50

Epidémiologie générale 50

Fréquence et facteurs de risque 50

Répartition des souches et émergence des espèces non *albicans* 53

Problématique de la résistance aux antifongiques 54

Pronostic 56

Principes généraux de traitement 57

Les différentes classes pharmacologiques 58

Schémas thérapeutiques 65

Outils diagnostiques microbiologiques 73

Techniques basées sur la culture 74

Techniques non basées sur la culture 79

Présentation du travail de recherche 87
Objectifs 87
Matériels et méthodes/Résultats 87
Conclusions/perspectives 96
Références 99

Introduction

Les candidoses invasives (CI) sont une préoccupation constante en milieu hospitalier, particulièrement en réanimation. En effet, elles surviennent chez un patient sur 1000, faisant de *Candida* le 4ème microorganisme isolé des hémocultures prélevées en contexte nosocomial [1], et leur fréquence a augmenté ces dernières années [2]. Les levures du genre *Candida* sont ainsi responsables de 17% des infections rencontrées en réanimation [3]. La candidémie est l'une de ses manifestations classiques. L'impact est important avec une morbidité marquée et une mortalité attribuable proche de 50% [4], à l'origine d'une augmentation substantielle des coûts hospitaliers [5-7]. Au sein des services de réanimation, la prévalence des candidémies est de 7/1000 [8], et elles sont associées à une augmentation significative du taux de détresse respiratoire, un allongement de la période de ventilation mécanique, et un allongement de la durée d'hospitalisation, aussi bien au sein de l'unité de réanimation qu'au sein de l'hôpital [9]. La mortalité attribuée à ces candidémies est, de plus, supérieure à celle relevée pour les bactériémies [8].

Le diagnostic positif des CI est difficile et repose traditionnellement sur l'association de signes cliniques non spécifiques à des signes histo-pathologiques et/ou la présence de levures dans un milieu normalement stérile (hémocultures, plèvre, LCR..). La raison principale du pronostic des CI demeurant sombre est la mauvaise performance des techniques microbiologiques conventionnelles, à l'origine d'un défaut de diagnostic ou d'un retard dans l'introduction du traitement antifongique spécifique. Ceci est lié au fait que la sensibilité des hémocultures pour le diagnostic de CI est évaluée à 50%, et que le délai minimum de rendu de positivité est d'au moins 48 heures [10]; 24 à 48 heures supplémentaires sont en outre nécessaires pour l'obtention de l'antifongigramme, et entre deux et cinq jours pour l'identification de l'espèce. Ce délai d'identification a été considérablement réduit avec l'introduction de la spectrométrie de masse, qui a aussi permis d'améliorer la fiabilité de l'identification des espèces [11]. Quelques travaux concernent

actuellement la détermination de la sensibilité aux antifongiques en spectrométrie sans passer par la culture [12]. Ces progrès sont importants à considérer car il est clairement établi que le délai d'introduction du traitement antifongique est corrélé au pronostic [13, 14], mais il reste un temps incompressible entre le moment du prélèvement et la positivité de l'hémoculture dans l'incubateur.

Il est donc nécessaire de disposer d'outils alternatifs aux techniques mycologiques conventionnelles pour améliorer ce délai d'introduction du traitement. Différentes approches diagnostiques non basées sur la culture ont été développées. Ces techniques sont la détection d'antigènes (Ag), d'anticorps (Ac), et/ou d'ADN [15]. Les tests actuellement disponibles en routine et les mieux évalués sont la détection de polysaccharides pariétaux, ou dérivés glycanniques, circulant dans le sérum des patients, ou d'Ac dirigés contre ces polysaccharides. La survenue tardive de la candidose invasive en réanimation [8] rend leur utilisation conceptuellement intéressante car déployable dans le cadre d'une stratégie de screening [16]. Ces biomarqueurs sont recommandés par l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) [17], l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) [18] et dans les recommandations 2012 de la Surviving Sepsis Campaign [19]. Cependant, la place et les performances des tests en réanimation restent imprécises.

Nos objectifs dans ce travail ont consisté d'une part à préciser les performances des tests basés sur la détermination de la glycannémie d'origine fongique chez les malades de réanimation, d'autre part à évaluer une technique en cours de développement visant à déterminer et analyser cette glycannémie par spectrométrie de masse.

Ces travaux seront exposés après une revue générale sur l'écobiologie des *Candida* mise en perspective avec la relation hôte-pathogène, la problématique des candidoses invasives en réanimation et les différents biomarqueurs utilisables comme outils diagnostiques, en nous focalisant plus précisément sur les glycannes.

Ecobiologie

Généralités

Les espèces du genre *Candida* sont nombreuses et se développent dans des niches écologiques variées, mais seul un nombre limité d'entre elles peut coloniser l'homme et/ou être responsable d'infections. Ce sont des champignons levuriformes polymorphes. Les champignons sont des organismes eucaryotes thallophytes hétérotrophes car incapables d'incorporer directement le carbone minéral. *Candida* va donc coloniser son hôte pour y vivre comme saprophyte commensal. La reproduction se fait par bourgeonnement et peut donner naissance à du pseudomycélium. Certaines espèces sont capables de produire du mycélium vrai. Leur taxonomie linnéenne classique est la suivante: règne des Fungi, phylum des Ascomycota, classe des Hémiascomycètes, ordre des Saccharomycétales et famille des Candidaceae. Cette classification a été revisitée ces dernières années grâce aux progrès de la génétique moléculaire qui ont aussi permis de documenter le support génétique de la plasticité et de la variabilité des souches de *Candida*, à l'origine d'une capacité d'adaptation à des environnements variés. Ces données fondamentales ont aussi fourni des clés de compréhension de la physiopathologie de la transition saprophyte commensal/pathogène.

Approche moléculaire et phylogénie

Cette approche moléculaire a surtout été développée pour l'analyse de *Candida albicans,* l'un des principaux pathogènes humains et le second organisme à avoir été séquencé, après la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agit d'un organisme diploïde comportant 30 000 000 de paires de bases correspondant à 6200 gènes, répartis sur 8 chromosomes. Il a été montré que la majorité des espèces du genre *Candida* appartiennent à l'embranchement dit clade CTG, un groupe de levures opportunistes traduisant le codon CTG en sérine et non en leucine [20]. L'autre groupe, s'apparentant d'un point de vue phylogénétique aux *Saccharomyces*, appartient au clade WGD, pour Whole Genome Duplication. Les levures regroupées au sein de ce clade ont subi au cours de leur évolution une duplication complète

de leur génome puis une réduction de leur ploïdie. Dans le groupe CTG on retrouve les espèces *C.albicans*, *C.dubliniensis*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, et *C.lusitaniae*. *C.guilliermondii* et *C.lusitaniae* sont haploïdes, alors que les autres espèces sont diploïdes [21]. Dans le groupe WGD on retrouve *C.glabrata* et *C.krusei*. *C.glabrata* est haploïde. Cette phylogénie est représentée sur la figure 1.

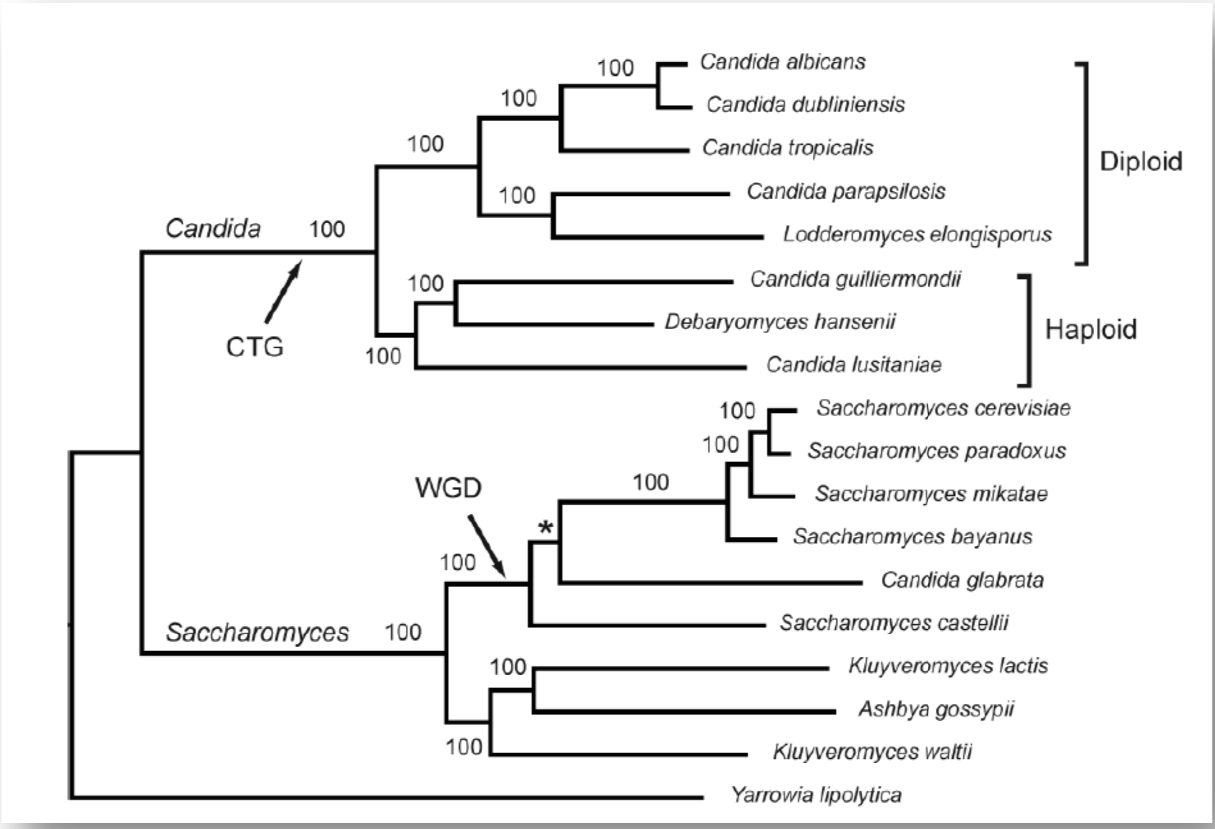

Fig.1: représentation de la phylogénèse de *Candida spp* et *Saccharomyces spp*, ainsi que de leur regroupement en clades. D'après Butler G. et al., réf [21].

Cette phylogénèse moléculaire a pu être affinée par le séquençage de plusieurs loci correspondant à des House Keeping Genes: c'est l'approche dite Multilocus Sequence Typing (MLST). Pour *C.albicans*, cette technique a fait l'objet d'optimisations et de consensus dans le cadres de projets collaboratifs [22, 23]. En combinant l'approche MLST à, d'une part l'analyse de la taille de l'intron sur la région ITS1 (pour internal transcribes spacer

1) de la séquence d'ADN codant pour l'ARNr permettant de classer les levures en trois groupes (typage ABC), d'autre part l'homo ou hétérozygotie du Mating Type Locus (MTL) sur le chromosome 5, il a pu être montré (ou confirmé par rapport à des travaux antérieurs) le fait que chez un individu donné il existe une colonisation stable dans le temps par un type de souche donnée, essentiellement soumise à une reproduction clonale. Ces souches retrouvées en colonisation sont aussi majoritairement celles retrouvées dans les hémocultures prélevées chez des patients candidémiques, ce qui établit un continuum physiopathologique colonisation/infection. Par ailleurs, on peut observer occasionnellement pour ces souches des microvariations, en rapport avec la perte d'hétérozygotie pour le locus MTL [24]. La plus large étude ayant porté sur la phylogénie moléculaire en utilisant les techniques MLST, de typage ABC et de typage du locus MTL a porté sur 1391 isolats de *C.albicans*, issus de toutes les régions géographique du globe [25]. La très grande majorité (96,7%) des souches étudiées a pu être attribuée à l'un des 17 clades définis par MLST. Il existe des spécificités régionales par clade, ainsi que des répartitions différentes du typage ABC et d'homozygotie/hétérozygotie pour le locus MTL. Le clade 1 présente une fréquence de résistance à la 5-fluorocytosine plus élevée que les autres clades, alors que la résistance au fluconazole est plus fréquemment mise en évidence dans les clades 5 et 6, particulièrement pour des souches homozygotes a/a pour le locus MTL. Ces dernières souches étaient majoritairement issues de prélèvements de candidose oro-pharyngée de patients séropositifs pour le VIH, et l'une des explications possible de la fréquence élevée de résistance au fluconazole est la présence d'un gène impliqué dans la régulation d'une pompe à efflux sur le chromosome 5, comme le locus MTL, et donc possiblement lié à ce dernier. Enfin, les arbres phylogéniques construits en analysant un seul locus parmi les sept étudiés en MLST étaient différents entre-eux et très différents de l'arbre construit en MLST. Les différents éléments épidémiologiques relevés par ce travail de phylogénèse moléculaire plaident, selon les auteurs, pour une reproduction clonale mitotique associée à une reproduction sexuée à l'origine de recombinaisons génétiques. Par ailleurs, une telle diversité est pour eux la conséquence du commensalisme de *Candida*, alors en équilibre

adaptatif avec son hôte, et ne devenant pathogène que en situation d'altération des défenses immunitaires de l'hôte.

Cette approche en MLST a pu être appliquée à *C.tropicalis* [26] et *C.glabrata* [27]. Elle est aussi à l'origine de la restructuration de l'espèce *C.parapsilosis*. Celle-ci était divisée en trois groupes: *parapsilosis* I, II et III. Les deux derniers groupes ont des différences génotypiques telles qu'ils correspondent en fait à des espèces à part entière, rebaptisées *orthopsilosis* et *metapsilosis* [28].

Vie sexuelle et plasticité

Jusqu'au début des années 2000, la levure du genre *Candida* était considéree comme ayant une reproduction clonale asexuée. Lors du séquençage de *C.albicans* [29], des gènes codant pour un système de reproduction ont été mis en évidence: ce sont les gènes *MTL* pour mating-type-locus. *C.albicans* sous forme hétérozygote a/α pour ce locus se multiplie par duplication mitotique et est incompétente pour la reproduction sexuée du fait de l'expression d'un co-répresseur. A l'occasion d'une délétion, *Candida* peut devenir homozygote sur *MTL* a/a ou α/α, ce qui peut être considéré comme définissant une identité sexuelle. Un switch du phénotype blanc au phénotype opaque permet alors à la levure du genre *Candida* de devenir compétente pour la reproduction entre souches de sexe opposé, a/a et α/α. Cette reproduction a lieu par la fusion des cellules par l'intermédiaire d'évaginations, appelées "shmoos". Ceci aboutit à une fusion des noyaux [30] au sein d'une cellule alors tétraploïde, permettant une recombinaison génétique. Lors de la naissance des cellules filles, le noyau va se diviser, et les cellules redevenir diploïdes, porteuses d'un matériel génétique original, par perte aléatoire de chromosomes [31], sans cycle méiotique, qui n'a pas encore pu être mis en évidence chez *C.albicans*. On notera que cette perte aléatoire de chromosomes à partir d'une cellule tétraploïde est reproduite *in vitro* dans des conditions de stress environnemental (choc thermique, conditions nutritionnelles...) [31], ce qui peut laisser penser que ce processus est un phénomène adaptatif à une situation de stress. Cette reproduction avec échange de matériel génétique correspond à une

conjugaison « mating ». Elle est associée à l'expression spontanée –génétiquement régulée- de phénotypes alternatifs blanc et opaque (White/opaque –WO switch) influencé par les conditions environnementales [32], et notamment la présence de CO2, de N-acétylglucosamine et de glucose, ce qui correspond aux conditions rencontrées dans le tube digestif [33, 34]. Il ya donc une reproduction sexuée nécessitant une alternance switching-mating. Il est assez intéressant de constater que *C.dubliniensis* est aussi capable de changer de phénotype blanc-opaque et d'avoir une reproduction sexuée. Cette reproduction par mating peut se faire en intra-espèce mais aussi inter-espèce entre *C.albicans* et *C.dubliniensis* [35]. La régulation de ce switching-mating est complexe et fait intervenir de nombreuses voies de signalisation [29] ainsi que la communication entre les cellules de la levure du genre *Candida* par l'intermédiaire de phéromones, dont les gènes codants sont particulièrement bien conservés [21]. L'ensemble de ce processus correspond à une reproduction dite para-sexuée. On remarquera par ailleurs que les souches de *C.albicans* sont aussi capables d'avoir un cycle para-sexuel entre colonies de même sexe lorsqu'elles sont déficientes en protéine Bar-1, protéine "barrière" codée par le gène *BAR-1.* Cette protéine inactive normalement la phéromone α. Deux colonies a/a de même sexe, de phénotype Deltabar 1 déficientes pour Bar-1 peuvent ainsi produire cette phéromone et développer une reproduction para-sexuelle. Il peut même suffire qu'un seul des deux partenaires présente la mutation à l'origine de la perte de Bar-1, voire qu'un "ménage à trois" se mette en place entre deux souches a/a et une souche α/α minoritaire produisant la phéromone α en quantité suffisante pour provoquer un cycle de reproduction para sexuel entre les deux souches a/a. On parle d'hétérothallisme pour la reproduction entre souches de sexe opposé et d'homothallisme pour la reproduction entre souches de même sexe [36]. Les mutants *bar-1* n'ont pas été mis en évidence dans la nature, mais surviennent peut être de manière transitoire. Quoiqu'il en soit, on peut supposer que le mode de reproduction décrit dans le ménage à trois puisse avoir lieu dans des populations dans lesquelles de souches de phénotype varié cohabitent, situation que l'on peut retrouver sur les muqueuses des hôtes ou dans le biofilm [37].

Il apparaît ainsi que la levure du genre *Candida* a un équipement permettant une communication paracrine et autocrine entre les cellules d'une population, aboutissant à l'activation d'un programme de reproduction sexuée original sans méiose, permettant un échange de matériel génétique entre les différentes cellules, offrant ainsi la possibilité d'une diversité et d'une hétérogénéité populationnelle. On entrevoit combien ces mécanismes peuvent être importants pour l'adaptation environnementale.

On remarquera par ailleurs que les cascades d'activation (notamment par phosphorylation des cibles) du switch et de la filamentation sont pour certaines identiques, notamment la voie dite Ras1/AMPc, et sous la dépendance de facteurs environnementaux communs (CO2, N-acétylglucosamine). L'hypothèse soulevée par certains auteurs est que ces deux programmes génétiques régulant le switch et la filamentation, ont subit une co-évolution pour répondre aux signaux émis par les bactéries avec lesquelles la levure du genre *Candida* cohabite au sein du microbiote intestinal [34].

Ces identités sexuelles alternatives a/α, a/a ou α/α n'ont pas qu'un impact sur la reproduction et l'échange de matériel génétique. Il a été montré par exemple que le type de biofilm synthétisé par le levure du genre *Candida* dépendait de la configuration des *MTL*. Ainsi, le biofilm formé par les cellules de configuration a/α est imperméable aux molécules de poids moléculaire compris entre 300 Da et 140 kDa (correspondant au poids des principales molécules antifongiques et des anticorps), faiblement traversé par les polynucléaires neutrophiles humains, et procure une résistance au fluconazole; à l'inverse, le biofilm formé par les cellules de configuration a/a ou α/α est perméable aux molécules de 300 Da à 140 kDa (telle que les phéromones), est traversé par les polynucléaires neutrophiles humains et les cellules qui le produisent restent sensibles au fluconazole. Cette régulation de la synthèse des biofilms est différente selon le typage *MTL*: la synthèse du biofilm a/α est régulée par la voie Ras1/AMPc, alors que la synthèse des biofilms a/a et α/α est régulée par la voie des MAP kinases [38].

On voit donc qu'il existe chez la levure du genre *Candida* une variation phénotypique en fonction des conditions environnementales, que cette variation phénotypique s'accompagne de la possibilité d'échanges de matériel génétique selon une modalité para-sexuelle, permettant une hétérogénéité populationnelle dont on peut penser qu'elle procure un avantage sélectif dans des conditions de pression environnementale variable, que ces variations phénotypiques concernent des caractères aussi variés que le phénotype *MTL* ou la synthèse de biofilm et que ces différents caractères sont régulés par des cascades enzymatiques communes. On peut s'interroger cependant sur le fait que les phénotypes *MTL* homozygotes a/a et α/α soient ceux qui forment un biofilm les exposant le plus aux polynucléaires neutrophiles humains et aux antifongiques. Autrement dit ces phénotypes homozygotes nécessaires au mating mettraient *Candida* en position de vulnérabilité, si on se contente de regarder le biofilm. Ce phénomène est probablement pondéré par le fait que 90% des souches colonisantes et responsables d'infections sont de phénotype a/α et que cette augmentation de perméabilité du biofilm permet la diffusion des phéromones impliquées dans le mating.

Ce switch phénotypique blanc/opaque, préalable indispensable au mating, n'est pas la seule modification phénotypique survenant en réponse à des interactions complexes avec l'environnement de la levure du genre *Candida*. Le switch blastoconidie/forme filamenteuse peut être considéré de la même manière. Nous reverrons cette transition phénotypique dans le chapitre physiopathologie, le passage à la forme filamenteuse étant une étape cruciale dans l'invasion tissulaire. Nous pouvons cependant déjà remarquer que ces deux transitions phénotypiques ont en commun une régulation par la voie Ras1-AMPc, sous l'influence des mêmes signaux environnementaux: CO2, N-acétylglucosamine, température, stress oxydatif... Par ailleurs, il a été montré que la levure du genre *Candida* sous sa forme "blanche" a un profil métabolique fermentant, alors que sous sa forme opaque, le profil métabolique activé est oxydatif [39]. Ces mécanismes adaptatifs sont donc à appréhender dans le cadre d'un système intégré d'adaptation environnementale, les mêmes conditions

semblant donner lieu à la filamentation et au switching/mating, probablement en fonction des allèles du locus MTL. Nous verrons plus loin dans notre exposé comment toute cette plasticité s'exprime au niveau de la paroi de levure du genre *Candida*, interface avec l'hôte, et au niveau des voies métaboliques.

Toute cette organisation génétique permet l'adaptation de *Candida* à son hôte. De nombreuses espèces de *Candida* sont ainsi physiologiquement colonisantes pour l'homme, mais peuvent aussi dans certaines conditions être responsables d'infections. Avant d'envisager la physiopathologie de ces infections, nous allons passer en revue rapidement les différentes espèces de la levure du genre *Candida* rencontrées en pathologie humaine.

Espèces rencontrées en pathologie humaine

Les espèces du genre *Candida* font partie de la flore commensale normale des épithéliums des muqueuses digestives et vaginales. Elles peuvent être responsables de deux types de pathologies: les infections superficielles de ces muqueuses, mais aussi des infections invasives avec dissémination septicémique. Les infections des muqueuses comportent les candidoses vulvo-vaginales et oro-pharyngées. 90% des atteintes génitales sont dues à *C.albicans*, 10% à *C.glabrata*. *C.albicans* reste aussi la première espèce responsable de candidose invasive (CI) mais, nous le reverrons ensuite, les espèces non *albicans* ont émergé ces dernières décennies et sont de plus en plus isolées dans ces infections, représentant près de la moitié des CI dans les grandes séries. Il s'agit de *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*. On trouve aussi plus rarement *C.krusei*, *C.dubliniensis*, *C.guilliermondi*, *C.lusitaniae*, *C.rugosa*, *C.kefyr*, *C.norvegensis*. Les autres espèces sont encore plus rarement rencontrées [40].

Candida albicans

C.albicans est de loin l'espèce la plus fréquemment retrouvée en colonisation, aussi bien chez des sujets sains que chez des sujets ayant une altération des muqueuses. Son habitat naturel est représenté par les muqueuses digestives et vaginales. Bougnoux ME et *al.* ont

analysé la colonisation digestive (orale et/ou fécale) de sujets souffrant de maladie de Crohn, d'apparentés familiaux sains, et de sujets témoins issus de familles sans entérocolopathie. 53% des sujets inclus étaient colonisés par *Candida spp*, dont 88% par une seule espèce. *C.albicans* était retrouvé dans 88% des cas, et au total le portage digestif de *C.albicans* en flore commensale était de 46,5%. Il est intéressant de noter par ailleurs que la prévalence de cette colonisation par *Candida spp* n'était pas statistiquement différente entre les sujets sains et les sujets malades, que ce soit au sein d'une même famille ou en comparant les familles différentes entre-elles [41]. Cette étude a aussi permis de prouver par MLST la possibilité d'une transmission intra-familiale des souches. Celles-ci peuvent présenter dans le tube digestif des recombinaisons mitotiques à l'origine de microévolutions. Cette colonisation digestive préférentielle par *C.albicans* est tout à fait différente chez des patients hospitalisés, notamment en réanimation, où près de la moitié des espèce isolées du tube digestif sont non *albicans* [42, 43].

Nous aborderons un peu plus loin dans cet exposé la physiopathologie des candidoses invasives et de la transition colonisation/infection. Nous pouvons déjà cependant noter que l'une des particularités de *C.albicans* favorisant cette transition est son caractère dimorphique. En effet, *C.albicans* peut adopter des morphologies différentes, en réponse notamment aux conditions environnementales. Elle peut ainsi se développer sous forme de levure blastoconidie, de pseudomycélium ou exprimer un mycélium vrai, aussi appelé forme filamenteuse ou hyphe; on trouve aussi des chlamydospores et des cellules dites opaques comme nous l'avons vu dans le chapitre sur la plasticité. Les formes hyphales et les blastoconidies sont spécifiques de *C.albicans* et *C.dubliniensis*, et les cellules opaques ne sont décrites que pour *C.albicans*. Les autres espèces de *Candida* non *albicans* ne sont retrouvées que sous forme de blastoconidies et de pseudo-hyphe. La blastoconidie est ronde ou ovalaire, mesure de 2 à 4 µm, présente parfois un bourgeon en formation, et a une température optimale de croissance de 37°C. Le pseudomycélium est un assemblage de compartiments cellulaires mis bout à bout, simulant un filament mycélien. On observe un

sillon de constriction à la jonction entre les différentes cellules constituant l'assemblage, cicatrice de la cytokinèse. Pour la forme hyphale, il n'y a pas de sillon de constriction et la cellule fille prend naissance à partir d'un tube germinatif. Le filament est bien constitué de cellules différentes avec leur propre noyau, séparées par des septa constitués de chitine. Les relations entre ces différentes formes ont fait l'objet de multiples controverses. Le concept qui prédomine actuellement est que le pseudo-hyphe est une forme intermédiaire entre la blastoconidie et le filament vrai, et que la mise en jeu progressive des gènes régulant le cycle cellulaire a abouti dans sa forme le plus élaborée à la filamentation, élément clé de l'invasion tissulaire et de la conquête de nouvelles niches écologiques [44]. Nous verrons que cette filamentation est déclenchée par certains stimuli environnementaux et s'accompagne de la mise en jeu de mécanismes moléculaires impliqués aussi dans l'expression du biofilm.

Les chlamydospores sont des cellules nucléées sphériques plus larges que les levures, mais avec une paroi plus fine. Elles se développent par bourgeonnement, notamment à partir d'un filament. Leur rôle n'est pas clair [44]. Les cellules opaques sont des cellules présentant un phénotype alternatif aux cellules dites blanches classiques, impliquées dans le mating et la sexualité de *Candida* comme vu plus haut.

Candida non albicans

Parmi les espèce non *albicans* retrouvées en clinique, trois espèces prédominent nettement en fréquence: *C.glabrata*, *C.parapsilosis* et *C.tropicalis*, avec une répartition un peu variable d'un pays à l'autre.

-*C.glabrata*: cette levure est haploïde, non dimorphique. Sa fréquence a augmenté et elle est retrouvée comme espèce colonisante chez 9% des patients colonisés [41], son habitat naturel étant le même que celui de *C.albicans*. Elle peut poser des problèmes en pratique clinique du fait de sa sensibilité diminuée, voire de sa résistance, au fluconazole. C'est l'une des raisons pour laquelle une pré-exposition au fluconazole favorise l'émergence de

C.glabrata en cas de récidive de candidémie [45]. Des souches résistant aux échinocandines et aux polyènes ont aussi été isolées, avec des résistances croisées fluconazole/échinocandines [46, 47]. Cette acquisition de résistance est facilitée par l'haploïdie [40].

-*C.parapsilosis*: cette levure est diploïde [21], non dimorphique. Elle fait partie de la flore commensale normale de la peau et des phanères chez l'homme. Sa particularité principale est sa capacité à produire du biofilm favorisant son adhésion aux plastiques et aux dispositifs médicaux tels que les cathéters [48, 49]. Cette production de biofilm est favorisée par un environnement riche en glucose et en lipides [50]. Tout ceci explique pourquoi *C.parapsilosis* est considérée comme un pathogène émergeant dans les infections associées aux soins, particulièrement chez des patients porteurs de dispositifs intra-vasculaires invasifs et nourris par voie parentérale. A l'inverse, *C.parapsilosis* est réputé être moins virulent que *C.albicans* ou que les autres espèces de *Candida* non *albicans* du fait de sa moindre capacité à adhérer aux muqueuses. Sa sensibilité aux antifongiques est en règle générale conservée, sauf pour les échinocandines vis à vis desquelles des souches résistantes ont été isolées. Cela permet de comprendre pourquoi des patients pré-exposés aux échinocandines en cas de récidive de candidémie vont plus volontiers présenter une infection fongique à *C.parapsilosis* [45].

-*C.tropicalis*: cette levure est diploïde non dimorphique. Elle survit chez l'homme mais n'est pas un saprophyte obligatoire. Elle a été retrouvée majoritairement chez des patients souffrant d'hémopathies, bien que ces données soient anciennes [51].

Les autres espèces non *albicans* isolées en pathologie humaine sont beaucoup plus rares. On retrouve les espèces *C.krusei*, *C.guilliermondii*, *C.lusitaniae* et *C.rugosa*.

-*C.krusei*: les patients souffrant de leucémies, notamment en cas de neutropénie, sont plus à risque que des patients sans hémopathie de développer une candidémie à *C.krusei*, qui reste cependant une espèce rare et peu virulente. Sa particularité est une diminution de la sensibilité au fluconazole et à l'amphotéricine B plus fréquente que pour les autres espèces

[52], ce qui explique pourquoi une pré-exposition au fluconazole va favoriser une récidive de candidémie à *C.krusei* [45].

-*C.dubliniensis*: cette espèce est très proche de *C.albicans* tant sur le plan morphologique que génétique. Elle est aussi dimorphique et peut donc se présenter sous la forme d'un vrai filament. Cependant, elle est très rarement responsable de candidose invasive [40] et elle pose peu de problèmes de résistance aux antifongiques [52].

-*C.guilliermondii*: cette espèce est haploïde non dimorphique. Elle est responsable d'onychomycoses et est exceptionnellement isolée dans les candidémies. Les souches isolées de la peau ont plus fréquemment une sensibilité diminuée au fluconazole que les souches isolées en hémocultures, sensibles dans 85% des cas [53].

-*C.lusitaniae*: cette espèce est haploïde non dimorphique. Sa fréquence a augmenté essentiellement chez les patients pris en charge en oncologie. Sa particularité principale est la possibilité de résistance à l'amphotéricine B. La sensibilité aux azolés et aux échinocandines est cependant conservée [54].

-*C.rugosa*: cette espèce est très rarement rencontrée chez l'homme. Elle est responsable de mastite chez les bovins [40]. Cependant, deux foyers épidémiques de candidémie à *C.rugosa* chez l'homme ont été décrits: à Sao-Paulo en réanimation, où une source environnementale était suspectée mais n'a jamais été identifiée, avec des souches résistant à l'amphotéricine B [55] ; et dans une unité de prise en charge de grands brûlés en Californie où les souches ont été sélectionnées par l'utilisation de la nystatine en traitement prophylactique topique et retrouvées sur un appareil de mesure de glycémie suggérant aussi une possible contamination environnementale [56]. Cette résistance aux antifongiques concerne aussi les azolés avec 60% de résistance, notamment en Amérique latine [57]. Ce double problème de contamination environnementale et de résistance aux antifongiques doit amener à une certaine vigilance concernant cette espèce [40].

Pouvoir pathogène/physiopathologie

Notre problématique étant celle des candidoses invasives, nous n'aborderons pas la physiopathologie des candidoses cutanéo-muqueuses. Elle doit s'appréhender en s'intéressant au pathogène mais aussi à l'hôte. Nous allons schématiquement distinguer ces deux aspects, qui doivent bien sûr se concevoir de manière dynamique et intégrée.

Du côté du pathogène

Le modèle sur lequel ont été établies les différentes étapes de l'infection invasive à *Candida* est celui de *C.albicans*, pour laquelle quatre étapes ont été identifiées, chacune d'entre-elles ayant une traduction histo-pathologique, comme représenté sur la figure 3.

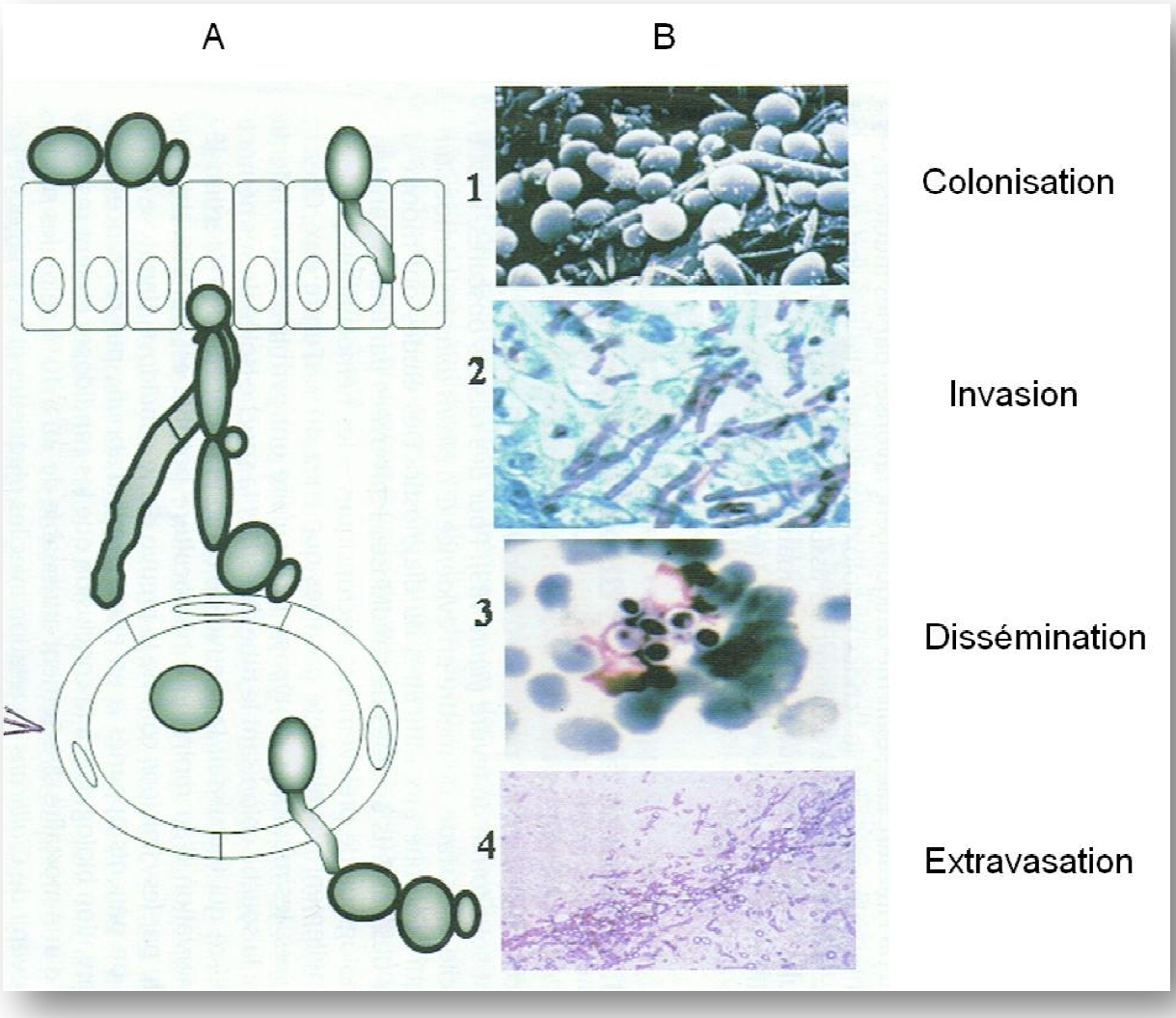

Fig. 3: A) Représentation schématique des différentes étapes de la candidose systémique humaine. B) Illustrations microscopiques. B1: microscopie électronique à balayage, levures dans leur environnement naturel adhérant aux entérocytes en compétition avec les bactéries (crédit photo Pfizer). B2 : microscopie photonique avec coloration de Gomori-Grocott, invasion tissulaire dans un contexte de candidose oesophagienne (collection personnelle Pr Poulain D). B3 : frottis sanguin coloré au Giemsa, levures phagocytées par des polynucléaires neutrophiles circulants (collection personnelle Pr Poulain D). B4: microscopie photonique d'une coupe de foie avec coloration hématoxilline-éosine, PAS, dans un contexte de candidose disséminée (Collection Pr Dupont B).

Schéma effectué par le Pr Poulain, reproduit de la réf [58].

De manière schématique, pour aboutir à ces différentes étapes, la levure du genre *Candida* doit pouvoir adhérer aux cellules épithéliales recouvertes de mucus, puis filamenter probablement en réponse à certaines conditions environnementales, dans un environnement riche en biofilm, ce qui va favoriser l'endocytose et l'invasion tissulaire, puis le passage intravasculaire et la dissémination septicémique par libération d'enzymes lytiques. Le fait que ces étapes se déroulent dans le cadre d'un continuum colonisation-infection est attesté par le fait que les souches isolées dans les hémocultures ont une empreinte génétique identique à celle des souches isolées du tube digestif des patients candidémiques dans plus de 90% des cas, ceci pour des espèces variées (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei* et *C.tropicalis*), témoignant de l'origine endogène de l'infection [59], secondaire à un extravasation sanguine après adhésion des hyphes aux cellules endothéliales [60]. Cette physiopathologie est à distinguer de celle des candidémies sur cathéter, d'origine cutanée, impliquant entre-autres *C.parapsilosis*, où la synthèse du biofilm et l'effraction cutanée vont jouer un rôle prépondérant.

Traversée du mucus

La capacité d'adhésion au mucus est variable d'une espèce à l'autre. Elle a été évaluée en cytométrie de flux en utilisant des mucines purifiées d'intestin de lapin marquées par de la fluorescéine. Trois groupes d'intensité d'adhésion décroissante ont ainsi été mis en évidence: *C.dubliniensis*, *C.tropicalis* et *C.albicans* pour le groupe I, *C.parapsilosis* et *C.lusitaniae* pour le groupe II, et *C.krusei* et *C.glabrata* pour le groupe III. Il a ensuite été montré qu'en présence de mucine, l'adhésion de *Candida* à des cellules épithéliales buccales humaines était inhibée, mais restaurée en cas de pré-traitement du mucus par de la pronase ou par une Sap2 recombinante de *C.albicans*, produite chez *S.cerevisiae*, en rapport avec une diminution de la fixation sur le mucus. Cette dernière enzyme est une "secretory aspartyl protease", clivant le squelette protéique du glycopeptide identifié comme le site de liaison au mucus . La traversée du mucus nécessite donc une adhésion au mucus puis une lyse de ce dernier pour libérer l'accès à la surface des cellules épithéliales. Sans

cette phase de lyse, la levure du genre *Candida* resterait piégée dans le maillage du mucus épithélial. Il est intéressant de constater que ces capacités d'adhésion puis de clivage par les Sap ne sont pas altérées par les variations de pH, ce qui peut en partie expliquer pourquoi l'habitat naturel des levures *Candida* est aussi varié que les muqueuses buccales, intestinales et vaginales où le pH peut varier de 5 à 8 [61]. Cette adaptation à des environnements variés implique de nombreux paramètres. En ce qui concerne les Sap, elles peuvent être nombreuses, avoir des conditions optimales d'activité différentes, et des sites d'action variés. Les espèces qui semblent synthétiser de façon significative des aspartyl-proteinases Sap sont *C.albicans* (10 gènes codant), *C.tropicalis* (4 gènes codant), *C.parapsilosis* (2 gènes codant) et *C.dubliniensis* (au moins 9 gènes codant). Les autres espèces, bien que semblant avoir des gènes codant en synthétisent moins. Ces protéines une fois synthétisées peuvent être intégrées dans la membrane cellulaire, intégrées dans la paroi grâce à une ancre GPI (Sap 9 et 10) ou libérées en extra-cellulaire. L'activité protéolytique en rapport avec l'expression des Sap semble plus marquée lorsque les souches sont isolées de patients présentant des infections muqueuses oro-pharyngées ou vaginales que chez des patients porteurs asymptomatiques, témoignant de leur rôle dans la physiopathologie de l'atteinte des épithelia muqueux. En dehors de cette dégradation du mucus, les Sap ont aussi un rôle dans le dommage tissulaire, l'invasion, l'échappement aux mécanismes de défense de l'hôte. Le rôle des Sap dans l'adhésion n'est pas encore clair. Deux hypothèses sont possibles: soit les Sap jouent le rôle d'adhésines en tant que telles, soit elles "préparent" la cible cellulaire en modifiant la conformation des molécules de surface et en altérant l'hydrophobicité [62]. Cette étape d'adhésion aux cellules épithéliales est la suite logique de la traversée de la barrière muqueuse.

Adhésion

Cette étape met en jeu de nombreuses adhésines et des ligands multiples chez l'hôte. Ces ligands se trouvent sur les cellules épithéliales, mais aussi sur les cellules endothéliales, les matrices extracellulaires, les fluides biologiques divers, les matières inertes... L'interaction

entre les levures du genre *Candida* et ces surfaces se fait par l'intermédiaire de la paroi de la levure *Candida*, riche en protéines mais aussi en sucres variés, ou glycannes. Il y a plusieurs façons d'appréhender l'organisation moléculaire de cette paroi. Nous nous focaliserons sur une vision "physiopathologique", qui permet aussi d'introduire les différents antigènes utilisés pour le diagnostic. La paroi est organisée en plusieurs couches [63]: la couche la plus externe comporte des mannoprotéines enzymatiques et structurales et du phosphopeptidomannane, que l'on appellera mannane (Mn), polymère de D-mannose. Les Mn composent 40% du poids de la paroi. Ils forment un édifice moléculaire complexe avec des branchement en α-1,2, α-1,3, α-1,6 et β-1,2, à l'origine de la conformation d'épitopes très variés. Les courtes chaînes de mannose liées en α-1,2 et α-1,3 sont associées aux groupements hydroxyles des sérines et thréonines da la structure protéique. Les chaînes linéaires de mannose liées en α-1,6 ont des branchement latéraux avec des α-1,2 et α-1,3 mannoses. Les épitopes β-1,2 mannosidiques sont prépondérants chez *C.albicans* et *C.glabrata*, et sont liés par des ponts phosphodiester aux chaînes latérales glucidiques. Sur ces mannoprotéines on retrouve aussi des acides sialiques et des lipides, d'où le terme de phospholipomannane employé pour définir certains composants de cette couche externe. La couche de Mn forme ainsi un réseau fibrillaire dense à la surface de la paroi. Dans les parties plus profondes, on retrouve une couche de chitine, polymère linéaire de N-acétyl-D-glucosamine lié en β-1,4, près de l'espace périplasmique. Cette couche de chitine est associée à une épaisse couche de β-glucanes (BDG). Ces BDG sont un polymère de D-glucose liés en β-1,3, avec des ramifications latérales liées en β-1,6. Il constituent le squelette fibrillaire de la paroi, et représentent 50 à 60% de son poids. Ces différentes couches sont reliées entre-elles. Ainsi, les mannoprotéines sont liées aux β-1,6-glucanes par l'intermédiaire d'ancres Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (ancres GPI), et la couche de chitine est attachée aux β-1,3-glucanes, particulièrement sous forme hyphale, ce qui permet de rigidifier l'ensemble. Cette composition de la paroi est à concevoir de manière dynamique, son organisation et sa composition se modulant en fonction des conditions

environnementales [64]. Une représentation schématique de la paroi est reproduite sur la figure 4.

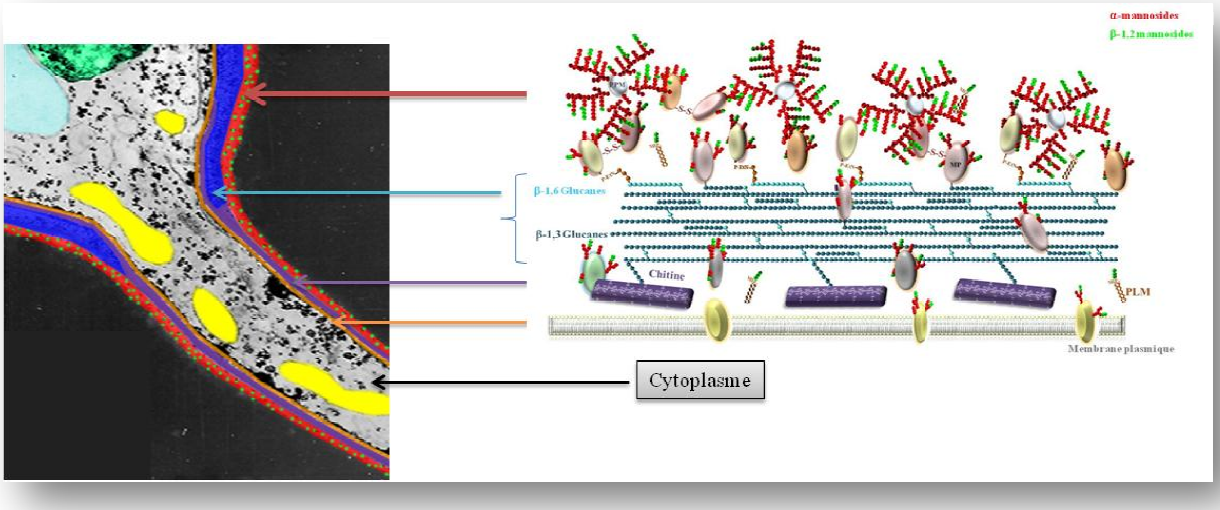

Fig.4: Composition de la paroi de *Candida*. A) coupe de microscopie électronique à balayage coloriée d'une blastoconidie dont nait un tube germinatif (photo Pr Poulain D). B) Représentation schématique de la structure biochimique de la paroi de *Candida* (Dr Fradin C).

Les protéines constituant la paroi sont elles-mêmes glycosylées. La majorité sont des mannoprotéines, représentant 30 à 50% du poids sec de la paroi. On retrouve parmi elles des protéines fixées aux ancres GPI les reliant aux β-1,3-glucanes. D'autres protéines sont liées aux β-1,3-glucanes de façon covalente sans ancre GPI, ce sont les protéines Pir (proteins with internal repeats) [63, 64].

Ces composés glycanniques et protéiques vont jouer un rôle dans l'adhésion. Concernant le phosphopeptidomannane, il a été montré *ex-vivo* et sur modèle murin que c'est la partie mannosidique qui joue le rôle d'adhésine [65]. Différentes expériences d'hydrolyse de la fraction acide stable du phosphopeptidomannane [66], d'inhibition d'adhésion par Ac dirigés contre différents épitopes mannosidiques sur modèle cellulaire Caco-2 [67], ont permis de montrer que les motifs impliqués dans cette adhésion sont les motifs α-1,2 et β-1,2-mannanes. Le rôle des épitopes β-1,2-mannanes dans la virulence a été attestée par l'inhibition de la colonisation intestinale obtenu par l'utilisation d'analogues de synthèse, alors que les analogues α-1,2 étaient sans efficacité sur cette inhibition de colonisation [68]. La

glycolysation des mannoprotéines est donc une étape majeure dans l'adhésion et la virulence. Elle est assurée par des β-mannosyltransférases (BMT). Ces enzymes de transglycosylation sont nombreuses et le jeu de glycosylations successives complexe, aboutissant à une construction en cascade. Expérimentalement, leur dysfonctionnement peut aboutir à une diminution de l'adhésion, aussi bien sur des cellules endothéliales d'aorte de porc [69], que sur des cellules épithéliales buccales humaines ou des supports inertes [70]. Il est intéressant de noter que le dysfonctionnement de ces BMT est aussi associé à une diminution de la virulence sur modèle murin *in-vivo*, ainsi qu'à une anomalie de la filamentation [69]. Cela témoigne bien des relations entre adhésion et virulence et des liens étroits entre les différentes étapes adhésion/filamentation/invasion tissulaire.

Parmi les protéines, on retrouve des Agglutinin-like sequence proteins, ou Als. Ce sont des protéines à ancre GPI, au moins au nombre de 8 et leur configuration est parfaitement établie [64]. C'est leur partie N-terminales qui se fixe à l'antigène ligand. Cette partie est variable, similaire à la partie N-terminale des immunoglobulines, et cette variabilité explique les nombreux ligands possibles en fonction de l'Als [71]. Ainsi Als1p et Als3p se fixent aux cellules épithéliales et endothéliales, Als5p aux protéines des matrices extra-cellulaires. Le fait qu'il y ait plusieurs Als permet des phénomènes de compensation chez les mutants déficients [64].

Candida peut aussi adhérer à son environnement en exprimant non plus des Ag reconnus par les cellules hôtes, mais des récepteurs des antigènes exprimés par l'hôte. Ils peuvent être classés en intégrines et en lectines. Les intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques ou hétérotrimériques [64], composées de sous-unités α et β liées de façon non covalente. Il a été montré que *C.albicans* exprime une *α*5-*β*1-intégrine reconnaissant la fibronectine, glycoprotéine de la matrice extra-cellulaire [72], et une *α*v-*β*3-intégrine reconnaissant la vitronectine [73]. Il est très probable que *C.albicans* exprime aussi des récepteurs de la famille des lectines, c'est à dire des récepteurs dont les

ligands sont des polysaccharides. Ceci a été prouvé chez *C.glabrata*, mais reste putatif chez *C.albicans* [64]

A la surface de la paroi de *Candida* se trouve aussi de longs appendices glycoprotéiques constituant les fimbriae, dont le ligand est le glycosphingolipide lactosylceramide [64].

Il faut préciser que l'expression de ces adhésines est variable en fonction de la morphologie de *C.albicans*. Ainsi l'*α*5-*β*1-intégrine est fortement exprimée sur le tube germinatif [72]. Nous allons voir que d'autres facteurs d'adhésion sont exprimés sur la paroi du mycélium, confirmant le rôle important de la filamentation dans la physiopathologie de la candidose invasive.

Filamentation

La filamentation est un élément clé de l'invasion tissulaire dans la physiopathologie des candidoses invasives, en favorisant l'adhésion et l'invasion tissulaire, comme l'ont montré les études histopathologiques en microscopie électronique effectuées sur un modèle murin d'invasion cutanée [74]. Nous avons reproduit ces photos sur la figure 5 pour illustrer ce phénomène.

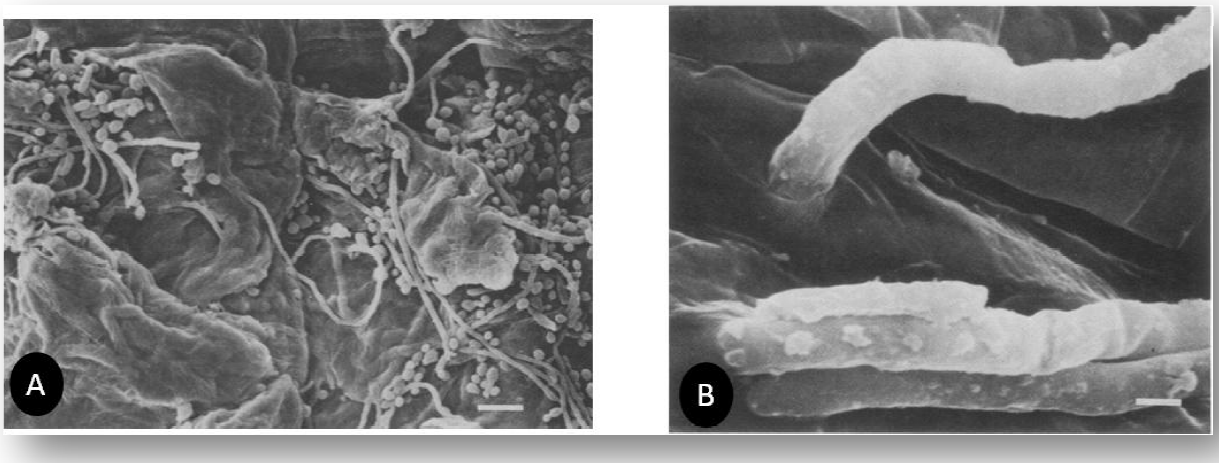

Fig. 5: A) Colonisation de cornéocytes murin par *C.albicans*. On distingue des blastoconidies et des hyphes, pénétrant la couche cornée. B) Grossissement objectivant la pénétration tissulaire par l'extrémité du filament de *C.albicans*. D'après [74].

Cette filamentation est contrôlée indépendamment du cycle cellulaire de la blastoconidie [75]. Elle survient en réponse à certaines conditions environnementales perçues par la la levure. Expérimentalement, elle est induite par des conditions de culture à 37°C, la culture sur sérum, ou sur milieu de Lee, milieu synthétique permettant de contrôler la transition levure-mycélium en fonction du pH et de la température. Cette perception environnementale est assurée par des sensors. Si on prend l'exemple des acides-aminés, la présence de certains d'entre-eux induit la synthèse des perméases, protéines membranaires spécialisées dans leur transport, et s'accompagne dans le même temps de l'induction de la filamentation [76]. Ces deux événements sont liés à l'activation du sensor Csyp1, probablement par l'activation de chaînes de phosphorylations communes (voie de la Mitogen Activated Proteinase Kinase et de Protein Kinase A dépendante de l'AMPc). Il y a donc bien une adaptation phénotypique aux conditions environnementales, le tout se concevant une fois de plus dans le cadre d'un système intégré puisque l'activation d'un même sensor provoque des effets aussi variés que la filamentation ou l'expression de transporteurs d'acides aminés. Ce fonctionnement intégré est aussi mis en évidence par le fait que filamentation et virulence sont liées à la présence du gène *INT1*, codant pour une intégrine de surface, les souches de *C.albicans* délétées en *INT1* perdant leur capacité d'adhésion aux cellules épithéliales et leur dimorphisme en conditions expérimentales [77]. Par ailleurs la filamentation s'accompagne de l'expression co-régulée de protéinases, en l'occurrence les Sap4 et 6. Les deux phénomènes sont sous la dépendance des mêmes facteurs de transcription, Tec1 et Egf1 [76], ce dernier ayant un rôle majeur dans l'activation du programme transcriptionnel mis en place lors de la filamentation [78].

La filamentation de *C.albicans* va aussi s'accompagner de l'expression de Hwp1 (Hyphal wall protein) sur la paroi, protéine pariétale spécifique de la phase hyphale [79]. Le gène *HWP1* est activé aussi par la voie Protein Kinase A dépendante de l'AMPc, ceci secondairement aux modifications du cytosquelette qui surviennent pendant la filamentation [80], le facteur de transcription régulant l'expression de *HWP1* étant de nouveau Egf1,

assurant ainsi une régulation commune de l'expression des protéinases, de la filamentation et de la synthèse de Hwp1 [81]. Hwp1 est liée à la couche de β-glucanes par une ancre GPI [82] et joue un rôle majeur dans l'adhésion aux cellules de l'hôte par mimétisme moléculaire [83]. En effet la séquence primaire de Hwp1 contient des domaines riches en proline, configuration décrite dans certaines protéines de mammifères et dans des protéines salivaires [79]. Cela lui permet de se fixer aux cellules épithéliales en détournant une enzyme exprimée par ces cellules, la transglutaminase [84]. Cette interaction Hwp1/transglutaminase permet aussi l'internalisation de la levure, ce qui fait de la filamentation et de Hwp1 des acteurs majeurs dans la physiopathologie de l'invasion tissulaire, à tel point que expérimentalement le poids de Hwp1 comme facteur de virulence favorisant l'invasivité et la mortalité est supérieur à l'immunodépression de l'hôte [85]. On peut par ailleurs noter que ce phénomène de mimétisme moléculaire à l'origine d'une interaction avec la transglutaminase est décrit comme un trigger de la maladie cœliaque [86].

Hwp1 est en outre indispensable à la synthèse du biofilm et permet de maintenir les cellules dans cet environnement extra-cellulaire, aussi bien les blastoconidies que les formes filamenteuses [87]. Hwp1 fait donc le lien entre filamentation et biofilm, processus impliqué notamment dans le développement colonisation/infection de matériel et dans la résistance aux antifongiques.

Biofilm

Le biofilm peut être considéré comme un ciment moléculaire composé d'un réseau matriciel polysaccharidique excrété par les microorganismes (bactéries et champignons) dans lequel ces derniers vont vivre en communauté. Ce concept a renouvelé la compréhension de la physiologie des microorganismes initialement considérés comme des individus uniques indépendants se développant sous forme planctonique. Cette vie en communauté au sein de cette matrice extra-cellulaire va permettre de résister aux agressions physico-chimiques, mais aussi une coopération métabolique entre les individus, ainsi qu'une régulation communautaire de l'expression des gènes. Cet enchâssement au sein du biofilm va aussi

favoriser l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte et la résistance aux anti-infectieux. La constitution du biofilm joue un rôle majeur dans les infections sur matériel [88]. La constitution de ce biofilm suit plusieurs étapes: la levure *Candida* sous forme planctonique va rencontrer un substrat (cathéter, prothèse, sonde, plastique...), et y adhérer. La population fongique va augmenter et cette colonisation va s'accompagner de la production de la matrice extra-cellulaire polysaccharidique. Les colonies de *Candida* vont filamenter, ce qui va accroître la solidité de l'échafaudage cellules/matrice extra-cellulaire. Le biofilm va ensuite maturer et être recouvert d'une couche polymérique. La formation et le rôle du biofilm ont été particulièrement étudiés et caractérisé chez *C.albicans* mais les espèces *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.krusei* et *C.tropicalis* sont aussi capables de produire des biofilms, avec quelques différences architecturales. La régulation moléculaire de la synthèse du biofilm fait appel à des facteurs de transcription et à des voies d'activation similaires à celles impliquées dans l'expression des adhésines, des protéases, de Hwp1 et de glycosidases. On retrouve donc la notion de système intégré et de co-régulation de ces différentes facteurs intervenant dans l'adaptation de la levure du genre *Candida* à son environnement (ou la virulence si l'on se place sur un plan médical) [89].

On notera par ailleurs que la communauté formée au sein du biofilm va être un espace de communication entre les cellules et de régulation coordonnée de leur comportement. L'un de ces modes de communication est le Quorum-Sensing, faisant intervenir une signalisation moléculaire sous la dépendance de la densité cellulaire. Celui de *Candida* fait appel principalement à deux molécules: le farnésol et le tyrosol. De manière schématique, le farnésol va inhiber la synthèse de biofilm et la transition blastoconidie-hyphe, favorisant ainsi la dispersion de blastoconidies à partir d'un biofilm mature. Le tyrosol va à l'inverse stimuler positivement la synthèse de biofilm et la filamentation [90]. Cette communication par le Quorum-sensing fait intervenir d'autres molécules comportant des groupements alcools, et peut aussi avoir lieu entre *Candida* et bactéries. La régulation du biofilm par le Quorum-sensing explique pourquoi après maturation de ce biofilm des zones matricielles vont

secondairement se détacher et permettre la libération de blastoconidies. C'est probablement ainsi que l'on peut expliquer que la colonisation d'un cathéter veineux central va avoir pour conséquence secondaire une candidémie par libération des levures *Candida* à partir du biofilm dans lequel les levures se seront développées à l'abri des anti-infectieux et de la réponse immunitaire de l'hôte. Ce phénomène de régulation coordonnée au sein du biofilm conférant une relative protection vis à vis de la réponse immunitaire de l'hôte et des antifongiques joue aussi un rôle important dans la constitution de certains foyers infectieux secondaires (endocardite, foyers rétiniens...).

Synthèse

Les différentes étapes faisant passer *C.albicans* de commensal à pathogène font donc intervenir adhésion, synthèse d'enzymes protéolytiques, filamentation, synthèse de biofilm et pénétration cellulaire en détournant les transporteurs cellulaires de la cellule hôte par mimétisme moléculaire. Ces différentes étapes font appel à des voies communes d'activation/régulation, amenant à les concevoir dans le cadre d'un système intégré de réponse dont l'une des conséquences peut être la virulence selon des programmes transcriptionnels spécifiques activés en réponse à certaines conditions environnementales. Cette activation doit se concevoir de manière dynamique, comme montré sur la figure 6 proposée par Ramage G. et al.

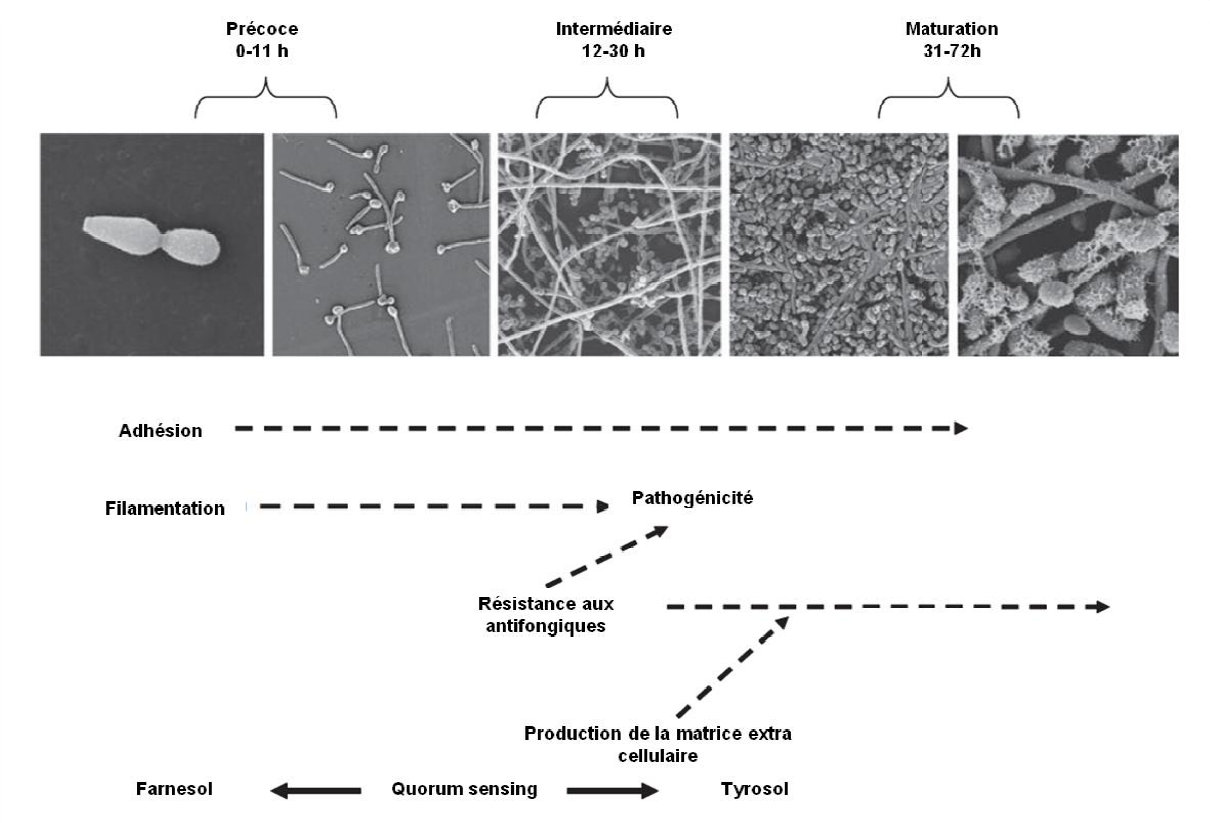

Fig.6: Représentation schématique de la production du biofilm et mise en relation avec les différentes étapes de la transition commensal/pathogène. D'après Ramage G et al. [89].

La régulation coordonnée de ces étapes concerne aussi le mating, et s'explique par la mise en jeu de deux voies de signalisation mettant en jeu des cascades de phosphorylation catalysées par des kinases: la voie de la MAP kinase et la voie de la cAMP-PKA, toutes les deux particulièrement bien conservées [81].

L'environnement qui va déclencher la mise en place de ce programme facilitant le comportement pathogène est celui de l'hôte. Ce dernier va répondre à la présence des levures du genre *Candida*, et il est nécessaire de prendre ce deuxième acteur en compte pour bien comprendre la relation du couple levure/hôte.

L'immunité anti C*andida*

Nous avons vu comment la levure du genre *Candida* peut dans certaines conditions passer de commensal à pathogène en activant certains programmes favorisant la virulence. Nous allons voir comment l'hôte peut essayer de rétablir l'équilibre avec la levure. Il est possible de considérer la relation hôte-*Candida albicans* comme un modèle de la complexité des relations hôte-pathogène dans le sens où les déséquilibres entre ces deux acteurs peuvent être liés soit à un défaut dans la capacité à développer une réponse immunitaire, soit au contraire au fait que la réponse immunitaire est inappropriée par son intensité et devient délétère pour l'hôte [91]. A cette notion s'ajoute le fait qu'une réponse pro-inflammatoire va déclencher une réponse anti-inflammatoire compensatrice, exposant l'hôte à un état d'immunodépression relative secondaire (CARS), en rapport avec des modifications épigénétiques dont l'impact peut être prolongé. Ces différentes notions d'équilibre/déséquilibre pro/anti-inflammatoire/CARS correspondent à la compréhension actuelle de la physiopathologie du sepsis et du choc septique [92], considérant que la réponse immunitaire de l'hôte peut permettre la destruction de l'agent pathogène mais peut aussi être responsable de dommages tissulaires chez l'hôte. La qualité de cette réponse immunitaire dépend d'une bonne coordination entre la réponse innée et la réponse adaptative, la première éduquant la seconde. Le premier niveau de mise en place de cette réponse va se situer au niveau des barrières cutanéo-muqueuses.

Les barrières cutanéo-muqueuses

Elles constituent une zone d'interface et de régulation avec l'environnement microbiologique. Pour éviter que cette relation avec l'environnement ne soit délétère pour l'hôte, ces surfaces cutanéo-muqueuses vont avoir un rôle de barrière physique mais aussi biologique et chimique. Au niveau de la muqueuse digestive, la barrière physique peut être schématisée par la présence, de la superficie vers la profondeur, de couches successives de défenses. La première couche est constituée du mucus glycoprotéique, d'un gradient d'IgA et de peptides antimicrobiens; la deuxième couche est constituée des cellules épithéliales; la

troisième couche est constituée par les cellules lymphocytaires intra-épithéliales et les cellules sentinelles M; la quatrième ligne de défense physique est la lamina propria, tissu conjonctif contenant les cellules nécessaires à la mise en place des processus immunitaires, dont les cellules lymphocytaires regroupées au sein des follicules lymphoïdes et des plaques de Peyer. Les lymphocytes intra-épithéliaux présentent quelques particularités par rapport aux lymphocytes T (LT) classiques: ils expriment un récepteur TCR mais plus restreint que celui des LT, et ils sont en permanence pré-activés, ce qui leur permet lors d'une stimulation antigénique de synthétiser immédiatement leurs cytokines sans passer par une phase d'expansion clonale, assurant ainsi le recrutement rapide des cellules impliquées dans l'immunité innée [93]. Les interactions moléculaires et les échanges métaboliques entre les cellules épithéliales et les microorganismes vont favoriser l'implantation de certains d'entre-eux, constituant le microbiote, sélectionnés par le fait que l'échange entre les deux parties hôte/pathogène est bénéfique pour les deux. Il existe ainsi un effet de compétition entre le microbiote que l'on peut considérer comme physiologique et des microorganismes dont l'implantation serait délétère pour l'hôte [93]. Le système immunitaire doit être en mesure de distinguer flore commensale de microorganismes pathogènes [94], afin que la réponse inflammatoire soit adaptée et ne devienne pas préjudiciable à l'hôte [95, 96]. Cette réponse va être déclenchée par la reconnaissance de motifs moléculaires dans un premier temps dans le cadre de la réponse immunitaire innée.

La réponse immunitaire innée

Le système immunitaire inné a pour fonction de répondre rapidement et de manière non spécifique à l'agression, puis d'éduquer le système immunitaire pour préparer une réponse spécifique soutenue, durable et qui sera plus rapidement mise en œuvre en cas de nouvelle exposition à l'agent infectieux. Globalement, la mise en jeu de cette réponse immunitaire innée nécessite la reconnaissance de motifs moléculaires, Microbial Associated Molecular Patterns (MAMPs), ou Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) lorsqu'on s'intéresse plus spécifiquement aux microorganismes pathogènes, par des récepteurs

essentiellement cellulaires mais aussi circulants, les Pathogen Recognition Receptors (PRRs). Les PAMPs sont des motifs conservés exprimés par les pathogènes mais pas par les eucaryotes supérieurs. La reconnaissance des PAMPs par les PRRs va aboutir à l'activation de voies de signalisation intracellulaire dont la résultante va être la libération de cytokines et l'apprêtement d'antigènes en vue de leur présentation aux cellules du système immunitaire adaptatif. Les cellules effectrices intervenant dans cette réponse immunitaire anti *C.albicans* n'ont pas de spécificité reconnue pour l'instant par rapport à celles mises en œuvre dans la réponse dirigée contre les bactéries (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles, mais aussi cellules épithéliales et cellules endothéliales). Nous nous attacherons donc à présenter les spécificités qui concernent la nature moléculaire des antigènes reconnus et des récepteurs impliqués. Les PAMPs sont situés sur la paroi de *Candida*, et nous avons vu que cette dernière était très riche en polysaccharides. Les PRRs membranaires principalement impliqués sont les Toll-Like-Receptors (TLRs) et les C-Lectin-type Receptors (CLRs). La MBL est un récepteur lectinique circulant impliqué aussi dans la reconnaissance des glycannes de *Candida*. Les NODs (nucleotide oligomerization domain receptors), PRRs intra-cellulaires, sont peu impliqués dans l'immunité anti *Candida* [97].

Les TLRs jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire innée en reconnaissant les PAMPs [98]. Ils sont aussi capables de reconnaître des antigènes de l'hôte libérés lors de l'agression des cellules, les Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs). Ils informent donc le système immunitaire de l'hôte soit qu'un microorganisme est présent, soit que des dommages cellulaires ont eu lieu. Ils sont tous constitués d'une protéine transmembranaire unique. Leur domaine extracellulaire comporte un domaine riche en répétition de leucine, et leur domaine intracellulaire est composé du Toll/IL-1receptor ou domaine TIR. Ils sont présents à la surface de la cellule au niveau de la membrane cytoplasmique (TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10) ou en intracellulaire (TLRs 3, 7, 8, 9). Le domaine TIR recrute des adaptateurs médiant la signalisation intracellulaire, eux-mêmes régulés par des

boucles de contrôle pour éviter une réponse inflammatoire trop marquée [99]. Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMPs de *Candida* sont essentiellement TLR2 reconnaissant le phospholipomannane, TLR4 reconnaissant les résidus O-mannosylés, et TLR6 et TLR9 reconnaissant l'ADN fongique. TLR2 peut aussi reconnaître les β-glucanes en collaboration avec dectin-1 et TLR6. Les deux voies effectrices impliquées sont activées respectivement par la recrutement de MYD88 et de TRAM/TRIF. TRAM va recruter IRF3, facteur de transcription régulant positivement la synthèse d'interféron. La voie MYD88 va recruter le facteur de transcription NF-κB stimulant la synthèse de cytokines et ayant un effet anti-apoptotique. TLR2 va enclencher une réponse plutôt anti-inflammatoire, alors que TLR4 va enclencher une réponse plutôt pro-inflammatoire. L'activité des TLRs est couplée à celle des Proteases-activated-receptors (PARs) et régulée par ceux-ci. Ces récepteurs couplés à la protéine G sont activés par des protéases, fongiques ou de l'hôte. Les protéases de l'hôte sont activées lors des dommages cellulaires secondaires à la réaction inflammatoire déclenchée par la présence d'un microorganisme, et sont à l'origine de la libération des DAMPs, aussi libérés lors de l'apoptose (espèces réactives de l'oxygène, radicaux libres, protéine HMGB1 pour High-Mobility Group Box 1 protein-protéine intra-cytoplasmique stabilisant la formation du nucléosome-, acide urique, ATP...). Ces récepteurs PARs vont réguler la réaction inflammatoire déclenchée par les TLRs, pour éviter qu'elle ne devienne délétère pour l'hôte. De la même manière les DAMPs sont aussi reconnus par le récepteurs des produits avancés de glycation RAGE, dont l'activation peut aboutir à une réaction pro-inflammatoire forte (HMGB1) ou à l'inverse à une réponse anti-inflammatoire (protéine S100). Un dialogue et une coopération coordonnée entre ces différents récepteurs est donc nécessaire pour avoir une réponse immunitaire harmonieuse ne se limitant pas à la destruction de l'agent pathogène mais permettant un rétablissement de l'homéostasie [97, 99-103].

Les CLRs sont des récepteurs protéiques comportant des sites de reconnaissance des sucres. Les CLRs transmembranaires chez l'homme sont : dectin-1, dectin-2, DC-sign, le

récepteur au mannose, galectin-3. Dectin-1 est le principal récepteur des β-glucanes. Il induit la production de cytokines pro et antiinflammatoires, en fonction du type de cellule activée. Cette production se fait par l'intermédiaire de deux voies de signalisation intra-cellulaire: la voie Spleen Tyrosine Kinase-Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 9 (voie SYK-CARD9), et la voie dépendante de RAF. Ces deux voies sont synergiques et aboutissent à la synthèse du facteur de transcription NF-κB qui va déclencher la transcription des cytokines et avoir un effet antiapoptotique. La voie SYK-CARD9 a aussi un effet d'activation de l'inflammasome NLRP3, complexe protéolytique permettant la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 par action d'une caspase sur les pro-IL-1β et pro-IL-18. Dectin-2 reconnaît le mannose, en particulier les dérivés β-mannosylés. En se couplant à FcRγ, elle stimule la libération de NF-κB par l'intermédiaire de la voie SYK-CARD9. Mincle reconnaît aussi le mannose mais est plus spécifiquement exprimé par les macrophages et active la même voie. Le récepteur au mannose et DC-SIGN reconnaissent des motifs mannosylés et jouent un rôle dans la phagocytose des cellules de *Candida* non opsonisées, permettant la procession des antigènes et leur présentation aux lymphocytes T. Nous le reverrons ensuite, mais nous pouvons déjà signaler que ces deux récepteurs induisent une réponse Th17. Le récepteur au mannose n'active pas de voie de signalisation en lui-même et collabore avec Dectin-1 et les TLRs pour la synthèse de cytokines. Ces récepteurs font donc le lien entre immunité innée et immunité acquise. DC-SIGN recrute la voie dépendante de RAS/RAF et aboutit à l'activation de NF-κB [97, 100-102]. Galectine-3 reconnaît les β-mannosides [104] et semble activer la voie MYD-88. Plusieurs revues générales ont synthétisé ces différentes vois de reconnaissance et d'activation, avec de petites variations de l'une à l'autre [97, 100-102, 105]. Nous reproduisons sur la figure 7 l'un de ces schémas récapitulatifs.

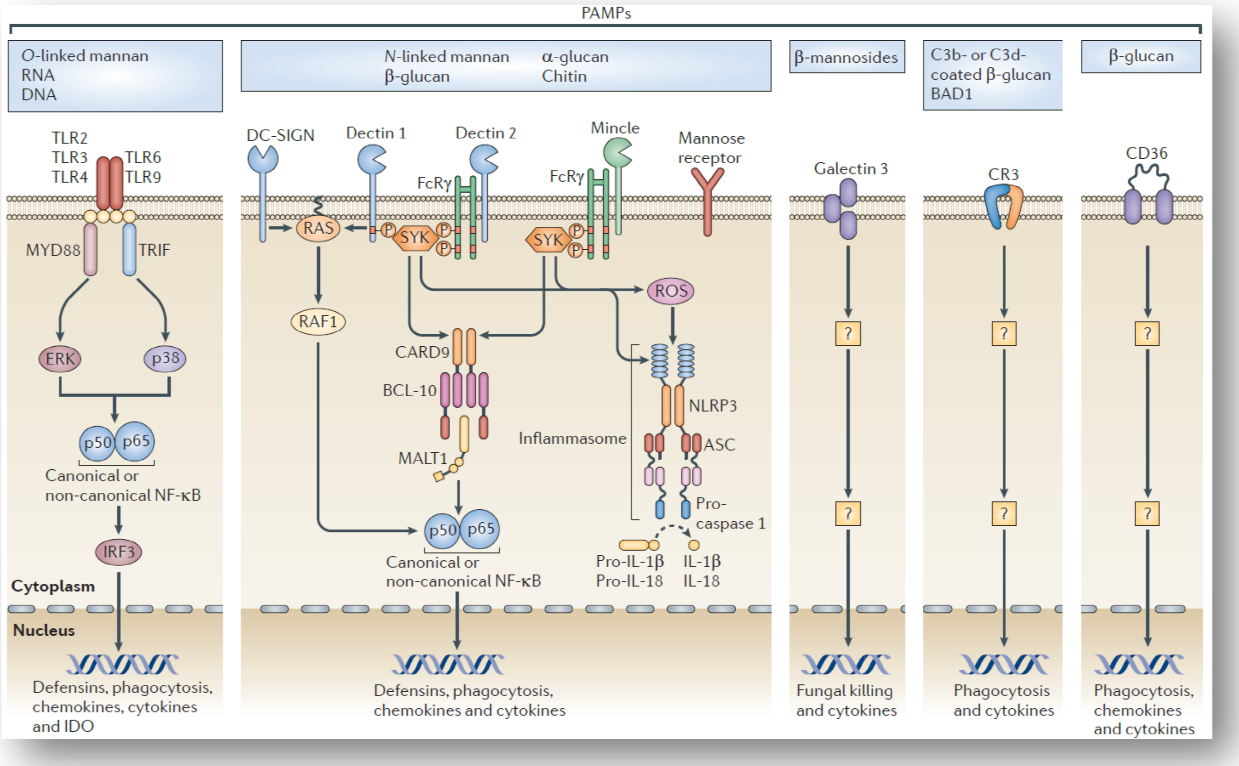

Fig. 7: schéma général récapitulatif de la reconnaissance des PAMPs de Candida par les PRRs de l'hôte. Reproduit de la référence [100].

L'expression de ces différents récepteurs va varier en fonction du type de cellule impliquée. Sur les monocytes sont exprimés TLR2, 4, 6 et 9, Dectin-1 et le récepteur au mannose. Sur les macrophages on décrit TLR2, 4, 6, Dectin-1 et 2, Galectin-3 et le récepteur au mannose. Sur les polynucléaires neutrophiles on retrouve TLR2, TLR4 et Dectin1. Sur les cellules dendritiques intervenant dans la présentation antigénique aux lymphocytes on retrouve TLR2, TLR4, Dectin-1, Dectin-2, DC-Sign et le récepteur au mannose [101]. De ce fait, l'équilibre entre les différentes voies effectrices va dépendre de chaque type cellulaire.

La principale lectine circulante impliquée dans la réponse immunitaire innée anti-*Candida* est la Mannose-Binding-Lectin (MBL), dont le rôle central est lié à l'activation du complément par la voie des lectines [106]. Elle correspond à un multimère de chaînes polypeptidiques, chacune étant constituée d'une région N-terminale riche en cystéine, d'un domaine collagéneux, d'un domaine constitué d'hélices α et de la région C-terminale se fixant à son

ligand selon une liaison calcium-dépendante. La sous-unité circulante de base est trimérique, les chaînes peptidiques étant reliées entre-elles par leur région riche en collagène et par des ponts disulfures entre les régions N-terminales [107]. Ces trimères, synthétisés majoritairement au niveau hépatique, vont s'associer en polymères de taille variable lors de leur circulation dans le sérum [108]. La MBL est capable de se fixer sur *Candida*, aussi bien sous forme blastoconidie que sous forme hyphale [109]. La reconnaissance des résidus mannose par la MBL va provoquer la libération du complexe C4bC2a, ou C3 convertase, en collaboration avec les MBL-associated serine proteases (MASPs 1 et 2). Le clivage de C3 va permettre la constitution du complexe C3bC4bC2a, ou C5 convertase. Le C5b ainsi libéré va s'associer aux fractions 6, 7, 8 et 9 pour former le complexe d'attaque membranaire (C5b-9), qui en s'insérant dans les membranes cellulaires, va créer des pores à l'origine de la lyse de la cellule [110]. Les fractions C3 et C4 vont aussi agir comme opsonines favorisant la phagocytose. La MBL en tant que telle a aussi un rôle dans la facilitation de la phagocytose [106] par fixation sur le récepteur aux collectines. Une fois dans le phagosome, elle va coopérer avec les TLR2 et 6 en modifiant la voie de signalisation MYD88, pour aboutit à une amplification de la réponse pro-inflammatoire [108].

D'autres lectines circulantes sont impliquées dans la reconnaissance des pathogènes et l'activation du complément, mais leur rôle spécifique dans la réponse anti *Candida* est moins étudié ou non établi, en dehors du surfactant, exerçant un effet de piégeage physique au niveau pulmonaire [111],

Il existe donc tout un panel de récepteurs capables de reconnaître les différents antigènes exprimés sur la paroi de *Candida*, notamment polysaccharidiques, et d'initier une réponse immunitaire innée non spécifique. La régulation entre les différentes voies d'activation pour limiter et contrôler cette réponse est complexe. La mécanistique de ces voies commence à être bien décrite, mais il est assez difficile de les appréhender dans un cadre global, notamment si on essaye de prendre en compte les co-infections bactériennes et virales qui complexifient la réponse et la régulation. Leur implication en terme de

protection/susceptibilité aux infections a été établie en utilisant des modèles animaux. Les données les plus élaborées concernent les TLR. Les souris TLR2 KO présentaient une surmortalité dans un modèle d'infection intraveineuse et intra-péritonéale, rapportée à une diminution de synthèse de cytokines/chimiokines par les macrophages, entraînant un défaut de recrutement des polynucléaires neutrophiles alors que la phagocytose par les macrophages *in-vitro* était conservée [112]. Cette altération de la réponse immunitaire innée immédiate était par contre sans impact sur la capacité à développer une réponse acquise secondaire soutenue [113]. A l'inverse, en utilisant une autre souche de *C.albicans* et des souris à fond génétique différent, les animaux TLR2 KO mourraient moins que les souris sauvages, ceci en rapport avec une capacité à circonscrire l'infection secondairement à une diminution de la synthèse d'IL-10, au profit de la synthèse d'IFNγ [114], l'IL-10 étant connue comme ayant un effet anti-inflammatoire délétère [115, 116]. Concernant TLR4, il a été montré sur modèle murin qu'il ne jouait pas un rôle majeur dans l'immunité anti-*Candida* puisque les souris TLR4 KO étaient capables de développer une réponse adaptative Th1 [117]. Cependant, expérimentalement, les blastoconidies de *C.albicans* induisent la sécrétion d'IFNγ après reconnaissance par TLR4, alors que les hyphes induisent la sécrétion d'IL-10 après reconnaissance par TLR2 [118], cette capacité de *Candida* à orienter la réponse vers une réponse adaptative Th2 dépendant des IL-4 et IL-10 étant concordante avec d'autres données expérimentales [105]. D'ailleurs, en analysant des cohortes cliniques, il a été montré chez l'homme que les polymorphismes *TLR4* Asp299Gly et Thr399Ile, liés entre-eux, sont associés à la survenue de candidémies, en lien avec une réponse immunitaire basée sur la sécrétion d'IL-10 [119]. Cette balance IFNγ/IL-10 est aussi décrite dans la candidose cutanéo-muqueuse chronique, mais l'association à un polymorphisme des TLR est moins évidente. L'effectif étudié dans cette dernière étude était cependant trop petit pour pouvoir conclure autrement que par des hypothèses [120]. Concernant Dectin-1, un polymorphisme de type SNP à l'origine d'un codant stop prématuré est responsable d'un défaut d'expression membranaire de ce récepteur, et donc d'un défaut de reconnaissance des β-glucanes, cependant sans impact en terme de sensibilité aux candidoses invasives [121]. Ces

différents travaux donnent des pistes de compréhension de la mécanistique de la réponse immunitaire innée anti *Candida* et des facteurs de susceptibilité génétique à l'infection, mais les résultats parfois contradictoires en fonction des modèles utilisés montrent que l'effet de ces PRRs ne peut probablement pas être compris de façon isolée mais doit prendre en compte l'ensemble du fond génétique, de l'hôte et de la souche infectante. Cependant, l'identification des polymorphismes génétiques prédisposant aux candidoses invasives pourrait permettre d'identifier des cibles thérapeutiques éventuelles [122], ou des sous-groupes de population à risque. Par ailleurs nous avons vu que certains polymorphismes prédisposant aux candidoses invasives sont inducteurs d'une réponse Th2 préférentielle. La compréhension de l'implication de l'immunité innée dans la reconnaissance de *Candida* est donc indissociable de l'analyse de l'immunité adaptative.

La réponse immunitaire adaptative

Cette réponse immunitaire intervient dans un second temps mais est préparée par le système immunitaire inné qui éduque les cellules de la réponse adaptative, ou acquise, à reconnaître des antigènes spécifiques, si bien que sa mise en œuvre en cas de réintroduction de ces antigènes sera plus rapide et plus efficace. On distingue classiquement deux volets dans cette réponse secondaire: une réponse à médiation cellulaire et une réponse à médiation humorale.

La réponse à médiation cellulaire fait intervenir des effecteurs cellulaires variés, correspondant à des lymphocytes T de phénotype spécialisé différent. On distingue ainsi les Lymphocytes T helper de type 1 (Th1) ,de type 2 (Th2), de type 17 (Th17), mais aussi les cellules T régulatrices (Treg), et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Cette spécialisation cellulaire s'effectue à partir de LT CD4+ indifférenciés (Th0). Elle est liée à la présentation aux lymphocytes T d'antigènes par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA), à la mise en place de molécules co-stimulatrices et à l'ambiance cytokinique du milieu biologique [123]. La polarisation Th1 est stimulée par Il-12 et Il-18 [105, 123] et est à l'origine de la sécrétion d'IFNγ. Cette

réponse Th1, pro-inflammatoire, joue un rôle majeur dans la clairance de *Candida*, mais doit encore une fois être contrôlée pour ne pas être délétère. La polarisation Th2 est stimulée par Il-4, IL-10 et Il-13 [100, 105, 123], et est réputée être délétère dans la défense anti-*Candida*. Nous avons d'ailleurs évoqué le fait que *Candida* était capable d'orienter la réponse inflammatoire vers une réponse Th2 lorsqu'il filamente [105]. Il est aussi établi que plus la concentration de blastoconidies va être élevée en co-culture avec des macrophages murins, plus la sécrétion d'IL-10 va être importante [124]. Il y a donc des arguments pour penser qu'à partir d'une population critique, *Candida* va être capable d'orienter la réponse inflammatoire à son profit, ce qui va favoriser l'expression de phénotypes invasifs, et enclencher un cercle vicieux de réponses immunitaires défavorables pour l'hôte. L'orientation différentielle de la polarisation Th en fonction de la morphologie de *Candida* pourrait être en rapport avec une expression différente des polysaccharides de la paroi entre blastoconidie et hyphe [97]. Ces éléments sont analysés expérimentalement de façon isolée et sont à prendre avec prudence pour ce qui concerne leur implication en clinique. La polarisation Th17 est quant à elle sous l'influence de Il-23, Il-1β, Il-6 et TGF-β [123], mais aussi de la prostaglandine E2 synthétisée après la reconnaissance des mannanes et β-glucanes [125]. Elle aboutit à la sécrétion d'IL17, IL21 et IL22. l'IL-17A est impliquée dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles, et la réponse Th17 amplifie la réponse Th1. La réponse Th17 est considérée comme indispensable à la réaction immunitaire dirigée contre *Candida* [105, 123]. Cependant, elle doit aussi être contrôlée. En effet, la persistance d'une réponse Th17 est à l'origine de manifestations inflammatoires pouvant devenir délétères dans la lutte contre l'infection. Elles sont aussi incriminées dans la survenue de pathologies auto-immunes et allergiques variées [126], en particulier du fait du déclenchement de la réponse Th17 en réponse à la présence des microorganismes présents dans le tube digestif [127]. Les cellules Treg vont intervenir pour réguler ces différents phénotypes, en produisant de l'IL-4, de l'IL-10 et du TGF-β, ce qui va avoir pour effet d'inhiber les réponses Th1 et Th17. Elles ont donc un rôle dans la limitation des processus pro-inflammatoires et peuvent jouer un rôle aussi bien bénéfique que délétère [128], en fonction du moment de l'infection où elles sont

déclenchées [123]. On pourra remarquer par ailleurs que *C.albicans* intervient activement dans l'équilibre Th17/Treg, ce qui lui permet d'induire sa propre tolérance, phénomène important pour autoriser sa présence dans le tube digestif de son hôte comme commensal sans entraîner de réaction inflammatoire colique [129]. Au final, une fois de plus, la lecture de ces différentes voies prises expérimentalement de façon isolées, peut les faire concevoir comme étant soit délétères soit bénéfiques. Elles s'enchevêtrent en réalité dans un réseau complexe de régulations et c'est leur bonne coordination qui va aboutir à une réponse appropriée qui devra être secondairement contrôlée. La mauvaise coopération soit quantitative soit temporelle pourra aboutir à une défaut de réponse, à une réponse exacerbée ou à une immunodépression secondaire, chacun de ces phénomènes faisant le lit d'une susceptibilité à l'infection initiale, à une infection secondaire [130] ou à des manifestations auto-immunes et c'est le bon équilibre entre chacune de ces modalités de réponse qui aboutira à la guérison [102]. Les lymphocytes T exprimant le récepteur T δγ sont aussi capables en présence de *C.albicans* de produire de l'IFNγ et de l'IL-17 [131]. Une fois de plus, ils semblent être aussi bien incriminés dans la protection anti *Candida* que dans la susceptibilité à l'infection en fonction du type de modèle animal utilisé [123]. Les relations entre ces différents phénotypes lymphocytaires et leur régulation a été résumée par Van de Veerdonck FL, et reproduit sur la figure 8. On y voit le rôle des cellules présentatrices d'antigènes dans l'interface immunité innée/acquise puisque ce sont elles qui vont polariser le phénotype lymphocytaire en fonction des cytokines qu'elles vont synthétiser.

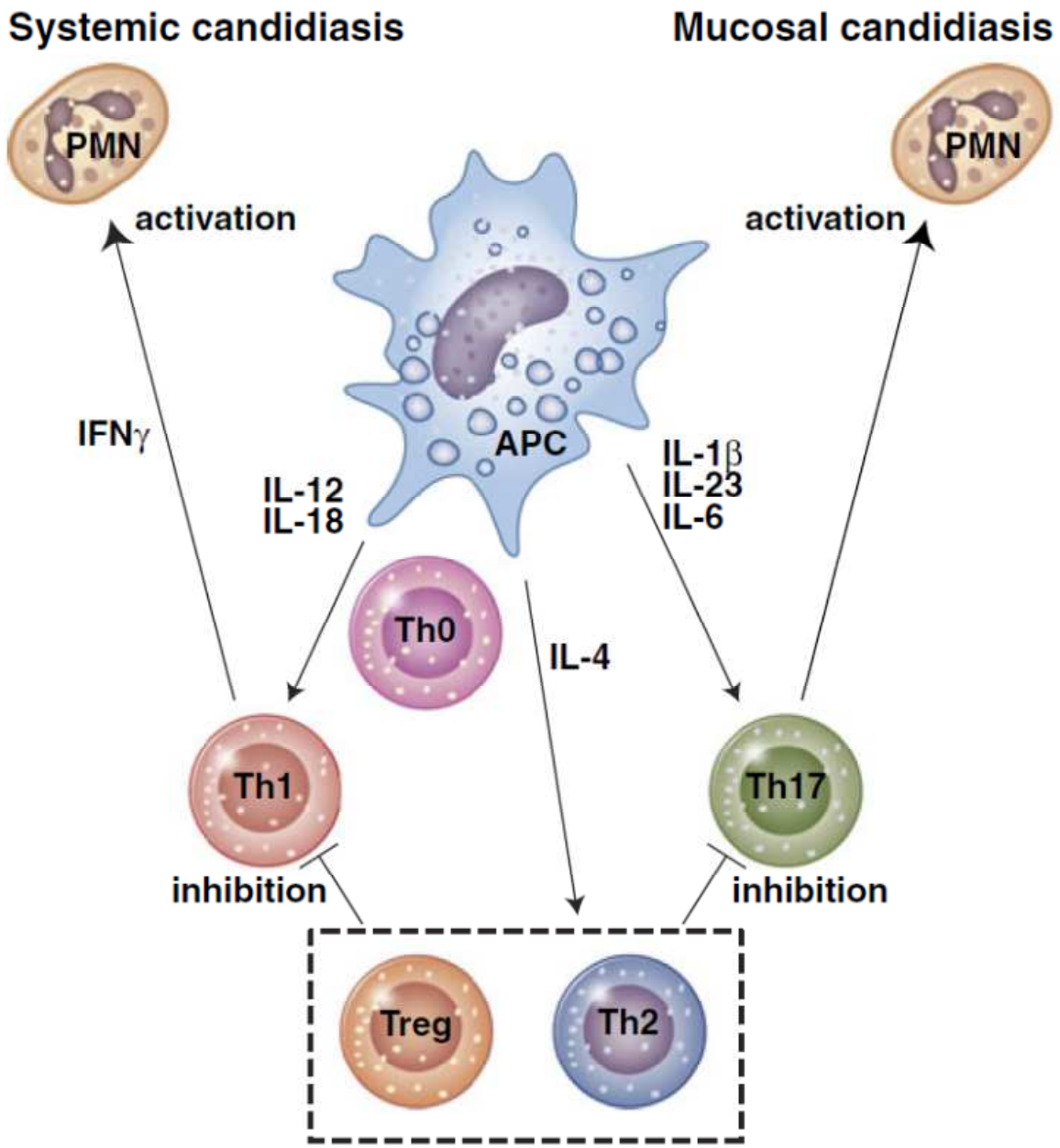

Fig.8: représentation des voies d'activation lymphocytaire, de leur coopération et de leur régulation lors du développement de la réponse immunitaire acquise anti-*Candida*. Reproduit de la référence [123].

La réponse immunitaire acquise à médiation humorale est quant à elle liée à la présentation des antigènes sur le CMH de type I, à des lymphocytes B. L'activation de clones plasmocytaires va libérer des Ac spécifiques. La présence de ces derniers est attestée par l'existence d'anticorps dirigés contre des protéines structurales (épitopes d'Hwp1) [132] ou enzymatiques (énolase) [133], mais aussi contre des polysaccharides, mannanes, chitine et

glucanes [134-138], dont certains seront utilisables comme tests diagnostics. Certains d'entre-eux sont protecteurs, selon différents mécanismes: effet fongicide direct, inhibition de l'adhésion, rôle d'opsonines favorisant la phagocytose, neutralisation des protéases, inhibition de la filamentation [139]. Leur utilisation en immunothérapie passive pourrait d'ailleurs éventuellement être envisagée [140].

Polymorphismes génétiques et prédisposition à l'infection en pratique clinique

Les gènes codant pour les différents récepteurs ou médiateurs impliqués dans la reconnaissance et la défense des levures du genre *Candida* peuvent présenter des polymorphismes responsables d'une susceptibilité génétique à l'infection. On peut distinguer de rares mutations à l'origine d'un déficit monogénétique complet, ou des variation plus fréquentes, ou communes (variant génétique commun), de type Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Ces dernières sont des variations dans la séquence d'ADN limitée à un nucléotide [141]. Nous avons déjà évoqué quelques polymorphismes dans le chapitre sur l'immunité innée. Concernant les déficits monogénétiques, l'étude génétique d'une famille consanguine dont plusieurs membres présentaient une susceptibilité manifeste aux candidoses (candidose invasive et candidose cutanéo-muqueuse chronique) a permis de montrer le rôle majeur joué par CARD9. En effet une mutation récessive sur le gène *Card9* aboutissant à un codon stop prématuré permet d'expliquer le phénotype des sujets malades. D'un point de vue fonctionnel, cette mutation s'accompagne d'une altération des lymphocytes Th17, ce qui est relié expérimentalement à un défaut dans la signalisation de Dectin-1 [142]. La candidose cutanéo-muqueuse chronique (CMC) est une pathologie qui a aussi permis de découvrir d'autres polymorphismes, avec des mutations récessives et dominantes. La candidose cutanéo-muqueuse autosomale dominante est ainsi liée à une mutation faux-sens hétérotygote sur le gène codant pour STAT1. La résultante en est un défaut d'expression des réponses Th1 et Th17, avec une diminution de la production d'IFN-ð, d'IL-17 et d'IL-22 [143]. Une mutation autosomale récessive (codon stop prématuré) sur le gène codant pour le récepteur de l'IL-17 et une mutation autosomale dominante (mutation faux-sens) sur le gène

codant pour l'IL-17 sont aussi responsables de CMC [144]. La résultante globale de ces différentes mutations est un défaut dans la polarisation Th17. Le syndrome de Job (association d'une hyper IgE sérique, d'un eczéma, d'infections muqueuses récidivantes à *Candida*, et d'infections cutanées et pulmonaires à *Staphylococcus aureus*) est un autre cadre nosographique associé à un défaut de polarisation Th17, en rapport avec différentes mutations: Stat3 (impliquée dans la voie effectrice du récepteur à l'IL-23); *DOCK* qui code pour une protéine intervenant dans la polarisation Th17; *TYK2* codant pour la Janus Kinase, intervenant dans la signalisation du récepteur de l'IL12 [141]. Plus en aval, il est possible de s'intéresser aux déficits constitutionnels de production d'interleukine. Ainsi, un déficit en IL-12 est associé à une susceptibilité aux candidoses, notamment cutanéo-muqueuses [145]. Finalement ces déficits monogénétiques correspondent à des phénotypes extrêmes, rares, voire exceptionnels. Leur impact en pratique clinique paraît faible, mais ils ont pu permettre de progresser dans la compréhension de la mécanistique de la reconnaissance immunitaire anti-*Candida*.

En regard de ces mutations, on décrit des SNP associés à une susceptibilité aux candidoses, notamment pour les gènes codant pour des récepteurs de l'immunité innée tels que les TLRs, comme nous l'avons vu précédemment. Les données disponibles sont parcellaires et parfois contradictoires. Il est probable que les phénotypes en rapport avec ces polymorphismes soient très variables, et que plusieurs SNPs de plusieurs gènes puissent avoir un effet synergique sur la prédisposition. Par ailleurs la susceptibilité peut concerner les candidoses cutanéo-muqueuses, mais pas nécessairement les candidoses systémiques [141]. Il est nécessaire pour appréhender ces effets de mener des études cas-témoins de grande envergure.

Synthèse générale

Il existe donc une immunité innée élaborée vis à vis de *Candida*, reposant essentiellement sur la reconnaissance non spécifique des polysaccharides de la paroi du champignon. Cette première phase de défense non spécifique va aussi servir à éduquer et à orienter la réponse

immunitaire secondaire adaptative. De nombreuses voies de coordination/contrôle/régulation des différents aspects de cette réponse existent, de manière à établir un équilibre strict entre la réponse pro et la réponse anti inflammatoires, et éviter ainsi la survenue d'une immunodépression secondaire. Le but de cette régulation fine est de permettre une cohabitation entre *Candida* et son hôte. Cet équilibre peut être rompu, favoriser la transition de *Candida* vers un phénotype pathogène, transition facilitée par l'expression d'un programme transcriptionnel de virulence. La rencontre d'un hôte fragilisé ou ayant un fond génétique particulier favorisera l'infection. Cette situation de déséquilibre est celle que l'on rencontre chez les malades de réanimation.

Candidoses invasives en réanimation

Epidémiologie générale

Fréquence et facteurs de risque

Les infections fongiques invasives représentent 19% des infections en réanimation [3]. Les candidoses invasives (CI) en sont la première cause et les levures du genre *Candida* sont au 4ème rang des agents retrouvés dans les hémocultures prélevées dans un contexte nosocomial [1], se répartissant pour moitié en réanimation et hors réanimation [146]. Comme nous l'avons vu, la physiopathologie établit une continuité entre colonisation et infection [42]. Les données sur cette colonisation sont assez sommaires, mais il a été établi que 50% des patients sont colonisés par *Candida* à leur admission dans une réanimation de recrutement médico-chirurgical [43]. L'intensité de cette colonisation peut être évaluée par les indices proposés par Pittet et al. L'index de colonisation (IC) a été défini par cet auteur comme le ratio entre le nombre de sites, autres que les hémocultures, pour lesquels des levures du genre *Candida* sont ilsoées, et le nombre de sites évalués pour la colonisation. L'index de colonisation corrigé (ICC) a quant à lui été défini comme le ratio entre le nombre de sites fortement colonisés et le nombre de sites évalués [147]. Parmi les 50% de patients colonisés

à leur admission, 59,3% avaient un IC à 0,5 et 37,3% un ICC à 0,4 [43]. Parmi les sites évalués pour la colonisation, on retrouvait au moins le pharynx, l'estomac et/ou la trachée. Les autres sites étaient variables. Des taux plus élevés de colonisation étaient relevés en réanimation médicale, puisque 65% des patients étaient colonisés, avec une évolution dynamique, puisque que le taux global de patients colonisés n'était pas différent entre l'admission et la sortie mais l'intensité de cette colonisation augmentait dans le temps pour atteindre un pic à trois semaines [148]. D'ailleurs le seul facteur de risque indépendant d'être fortement colonisé était le fait d'être déjà colonisé à l'entrée. Les facteurs de risque d'avoir une augmentation de l'intensité de la colonisation étaient le fait d'être exposé à une antibiothérapie à spectre large, le fait d'être porteur d'une hémopathie maligne et le fait de présenter une candidurie, si bien que les auteurs proposaient d'évaluer la colonisation simplement en suivant la candidurie [148]. La proportion de patients colonisés qui va s'infecter est faible, puisque seulement 1 seul patient parmi les 92 suivis pour leur colonisation a développé une candidose invasive, et il est habituellement considéré que 5 à 15 % des patients fortement colonisés vont présenter une candidose invasive [16, 42].

La seule étude qui a suivi toutes les infections fongiques invasives prospectivement en réanimation est italienne et a duré deux ans, incluant 38 services de réanimation dans 27 hôpitaux. 384 infections fongiques invasives étaient notifiées, dont 318 candidoses invasives, soit une fréquence des candidoses invasives de 10,8/1000 admissions et une incidence de 1,97/1000 patients jours [149]. Ces données sont concordantes avec la prévalence évaluée à 6,9/1000 patients par une enquête mondiale un jour donnée [8]. La répartition des tableaux cliniques de candidose invasive relevée dans l'étude italienne de Tortorano et al. est représentée dans le tableau 1.

Tableau 1: répartition des tableaux cliniques correspondant aux candidoses invasives relevées en réanimation. D'après la référence [149].

Tableau clinique	Proportion des candidoses invasives (%)
Candidémie	86,8
Candidose péritonéale	9,1
Pleurésie	2,8
Méningite	1,9
KT vasculaire	0,6
Prothèse vasculaire	0,3

Dans 15% des cas, les patients présentaient la candidose invasive à leur admission en réanimation. Dans l'étude Amarcand (Analyse du Management en Anesthésie et Réanimation des Candidoses Invasives), menée en France de manière prospective multicentrique sur 6 mois, 37% des candidémies survenaient dans les 5 jours suivant l'admission en réanimation [150]. L'incidence des candidémies acquises en réanimation était de 7,31/1000 admissions, et la durée moyenne d'hospitalisation en réanimation avant le diagnostic était de 22,8 jours [149]. Ceci est concordant avec le fait que les candidémies sont relevées en moyenne après trois semaines d'hospitalisation, c'est à dire plus tard que les bactériémies nosocomiales [1]. Dans le cadre d'un recrutement mixte médico-chirurgical, 2/3 des patients sont des patients dits chirurgicaux (50% chirurgie abdominale, 24% chirurgie thoracique, 12% neurochirurgie) [149]. Les facteurs de risque habituellement décrits comme favorisant les candidoses invasives [151, 152] concernaient le pourcentage suivant des patients: KT veineux central, 93%; antibiothérapie à spectre large, 85%; ventilation mécanique, 73%; corticoïdes, 24%; diabète, 20%; cancer solide, 18%; hémopathie maligne, 3%. Les autres facteurs de risque souvent rapportés dans la littérature sont l'épuration extra-rénale, la neutropénie et l'alimentation parentérale exclusive [16]. Nous avons choisi de rapporter ces résultats de Tortorano du fait de leur recueil prospectif en réanimation. Ils sont tout à fait cohérents avec ce qui est communément rapporté et admis dans la littérature [42]. Les patients souffrant d'hémopathies malignes constituent une catégorie particulière par la fréquence plus importante d'infection fongique invasive. Ainsi, une étude rétrospective taïwanaise montrait que 18% des patients qui avaient bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques étaient transférés en réanimation. Ils

étaient tous ventilés et un tiers d'entre-eux présentait une infection fongique invasive, grossièrement 50% de candidoses invasives et 50% d'aspergillose invasive. Toutes les hémopathies étaient représentées (leucémies, lymphomes, myélomes, anémies réfractaires, syndromes myélodysplasiques), ainsi que toutes les modalités de greffes (cellules souches périphériques et moelle, auto ou allo greffe). Les facteurs de risque de présenter une infection fongiques invasive (candidoses et aspergilloses confondues) étaient en analyse multivariée le fait d'être admis en réanimation plus de 40 jours après la greffe, le fait de présenter une réaction du greffon contre l'hôte, et le fait d'être corticothérapé [153].

Répartition des souches et émergence des espèces non *albicans*

L'autre point important à considérer est la modification de répartition des espèces décrites cette dernière décennie, avec l'émergence d'espèces non-*albicans*. Dans l'étude italienne de Tortorano et al., 60% des souches étaient *albicans*. En deuxième rang venait *C.glabrata* (13,4%) à part quasi-égale avec *C.parapsilosis* (13%). *C.tropicalis* était isolée dans 8% des cas et *C.krusei* dans 1,8%. Les autres espèces étaient isolées dans moins de 1% des cas [149]. Dans Amarcand, la répartition des espèce de C*andida* isolées d'hémocultures était: 57% pour *C.albicans*; 16,7% pour *C.glabrata*, 7,5% pour *C.parapsilosis*; 5,4% pour *C.krusei*, et 4,9% pour *C.tropicalis* [150]. Les seules différences cliniques significatives entre les patients présentant une infection à *C.albicans* et ceux présentant une infection à *Candida* non *albicans* étaient des scores de gravité composite SAPSII et SOFA plus élevés, une fréquence plus faible de neutropénie (2,6 vs 12%) et un délai de survenue de l'infection en réanimation plus long pour les espèces non *albicans* [154]. Ces données italiennes et françaises sont concordantes avec les données anglaises [155], mais très différentes de ce qui peut être observé dans d'autres régions. Au Brésil, *C.albicans* ne représente que 40,9% des souches, laissant la place à *C.tropicalis* (20,9%) et *C.parapsilosis* (20,1%), tous services confondus [156]. On peut considérer que 96% des infections à *Candida* en réanimation sont liées aux 5 espèces *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* et *C.krusei* [146].

Problématique de la résistance aux antifongiques

De cette répartition des espèces va découler la répartition des résistances, étant donné que *C.glabrata* peut présenter une diminution de sa sensibilité aux azolés, et que *C.krusei* est naturellement résistant aux azolés. Dans Amarcand, 17,1% des souches isolées toutes espèces confondues étaient résistantes au fluconazole, ou de sensibilité dose dépendante, catégorie que l'on peut considérer comme un niveau intermédiaire de sensibilité [150]. Ces données étaient analysées en fonction de la préexposition aux azolés, et sont reproduites dans le tableau 2.

Tableau 2: Pourcentage de souches résistantes au fluconazole ou de sensibilité dépendant de la dose, en fonction de la préexposition aux azolés, d'après la réf [150].

Espèce	Pourcentage de souches résistantes au fluconazole ou de sensibilité dose-dépendante	
	Patients naïfs	Patients pré-exposés aux azolés
toutes espèces confondues	16%	30%
C.albicans	4%	8%
C.glabrata	47%	75%
C.parapsilosis	6%	100%
autres espèces	23%	40%

Si on se réfère non plus aux isolats cliniques mais aux événements cliniques, 18,3% des épisodes de candidose invasive étaient liés à des souches résistantes au fluconazole, ou de sensibilité dose-dépendante, de 17% chez les patients naïfs de traitement, à 28,6% en cas de pré-exposition aux azolés. Ces résultats sont différents de ce qui est rapporté dans d'autres études. Une large étude américaine a ainsi, sur plus de 2329 isolats et 3 années de surveillance, rapporté un taux de résistance au fluconazole de 7%, stable dans le temps car similaire aux taux retrouvés dans une étude antérieure. Ce sont les souches de *Candida* non *albicans* qui avaient le plus d'impact sur ce taux de résistance, puisque seulement 1% des souches de *C.albicans* étaient concernées, versus 12% pour les souches non *albicans* (20% pour *C.glabrata*). La résistance aux échinocandines restait marginale car ne concernant que 1% des isolats. Seules 9 souches (8 *C.glabrata*) sur 2329 étaient multi-résistantes, à la fois au fluconazole et aux échinocandines [157]. Le programme de surveillance Sentry, réalisé à l'échelon mondial, relevait 5% de résistance au fluconazole pour les souches isolées chez

des patients de réanimation, similaire aux 4,4% de résistance relevés hors réanimation. Encore une fois cette résistance était très majoritairement le fait de *C.glabrata*, seule espèce pouvant être résistante aux azolés et aux échinocandines en même temps, quoique de manière anecdotique. La résistance globale aux échinocandines était par ailleurs tout à fait exceptionnelle [146]. Ces taux de résistance bien plus modestes que dans l'étude française vont dans le sens de l'idée générale que la résistance globale aux antifongiques reste un problème mineur, ne remettant pas en cause pour certains experts les stratégies thérapeutiques actuelles, notamment prophylactiques, dont l'imputabilité dans l'émergence des espèces de *Candida* non *albicans* et des souches résistantes au fluconazole a été source de polémiques [42]. Cependant, le problème général en pratique clinique est qu'il n'y a pas d'éléments tangibles permettant de prédire la responsabilité d'une espèce non *albicans* ou résistante dans l'épisode de candidose invasive pour un malade donné avant l'identification de la souche au laboratoire. Cette identification est parfois prise en défaut, nous le reverrons, ce qui justifie pour certaines équipes des stratégies thérapeutiques agressives au spectre d'emblée large [154]. Notons par ailleurs qu'il existe maintenant des données microbiologiques fiables pour affirmer qu'une pré-exposition aux antifongiques favorise l'émergence d'espèces non *albicans*, comme déjà soulevé par l'étude Amarcand. Ainsi, une préexposition au fluconazole est associée à l'émergence de *C.glabrata* et *C.krusei* -dont on a vu la fréquence de résistance au fluconazole pour l'une et la résistance naturelle pour l'autre-et une préexposition à la caspofungine est associée à l'émergence de *C.glabrata* et de *C.parapsilosis*, cette dernière espèce pouvant aussi présenter une résistance aux échinocandines [45]. Les antifongiques exercent bien une pression de sélection, comme l'attestent aussi les données anciennes décrites chez les patients séropositifs pour le VIH qui, avant l'ère des trithérapies antirétrovirales de type HAART, présentaient des candidoses oro-pharyngées et oesophagiennes ayant nécessité des traitements par fluconazole et chez qui ont été décrits l'émergence d'espèces résistantes, notamment *C.glabrata*. Ce phénomène, un temps contesté par comparaison avec les couples antibiotiques/bactéries, est cependant à pondérer au vu des récentes données épidémiologiques mondiales sur la

résistance, d'autant que l'émergence de mutants résistants d'une espèce donnée et que l'émergence d'espèces non *albicans* est liée à des phénomènes multifactoriels, au sein desquels le poids du terrain du patient (cancer solide, hémopathie, transplantation...) et l'utilisation d'autres médicaments (antibiothérapie, chimiothérapie, immunosuppresseurs...) semblent favoriser cette émergence plus que la pression de sélection exercée par les antifongiques [158]. Au final, nous disposons de données soulignant la possibilité d'émergence d'espèce de *C.albicans* résistantes aux azolés, et d'espèce de *C.* non *albicans*, notamment sous la pression de sélection exercée par les antifongiques, mais à l'impact épidémiologique pour l'instant limité.

Pronostic

Le pronostic des candidoses invasives est sombre avec une mortalité globale élevée. Ainsi la mortalité observée en cas de candidémie en réanimation est de 42,6%, significativement supérieure à celle observée en cas de bactériémie [8], variant significativement selon les données italiennes de 45% chez les patients "chirurgicaux" à 54% chez les patients "médicaux". L'espèce associée à la plus importante mortalité était *C.glabrata* avec une mortalité de 60%, comparée à 52,4% pour *C.tropicalis* et 41,7% pour *C.albicans* [149]. Dans Amarcand, les données étaient un peu différentes avec une mortalité de 66,7% pour *C.tropicalis*, 54,5% pour *C.kefyr*, 47,8% pour *C.parapsilosis*, 45,7% pour *C.albicans*, 42% pour *C.glabrata*, 31,3% pour *C.krusei*, et 42,9% pour les autres espèces [150]. En pratique, le facteur le plus important à prendre en compte est le délai d'introduction du traitement antifongique approprié. Tout patient confondu, la mortalité hospitalière est de 12% si le traitement antifongique est introduit dans les 12 heures qui suivent la survenue de l'événement candidémique, alors qu'elle est de 35% si le traitement est retardé de plus de 48 heures [13], et de 41% si le retard est de plus de 72 heures [159]. En situation de choc septique lié à une candidémie, la mortalité est de plus de 80%, variant de 20% si le traitement est introduit dans les 2 heures qui suivent la survenue de la candidémie à plus de 90% si le traitement est introduit avec un retard de plus de 12 heures, ce qui correspond à

une augmentation de la mortalité de 7,6% par heure de retard de traitement [160]. Il a aussi été établi que la source de l'infection doit être contrôlée dans les 24 heures du début de l'infection pour avoir un impact favorable sur la mortalité [14]. Parmi les sources possibles, on sait que le fait d'être porteur d'un cathéter veineux central est associé à une surmortalité [150] et que le retrait du cathéter impliqué peut diviser la mortalité par 2 [149].

Tout le problème dans ce délai d'introduction du traitement est l'obtention du résultat mycologique faisant porter le diagnostic de l'infection invasive à *Candida* ou identifier l'espèce pour adapter les traitements antifongiques au profil de sensibilité. En effet, Kollef et *al.*, dans leur étude déjà citée évaluant l'impact de la précocité du traitement antifongique empirique et de la rapidité du contrôle de la source, avaient trouvé que 18,3% des patients candidémiques mourraient sans traitement du fait du délai d'obtention des résultats d'hémocultures, sachant que le délai médian de décès après le prélèvement de la première hémoculture qui reviendra secondairement positive était de 48 heures, et que le délai médian d'obtention de la notion d'une hémoculture positive à *Candida* chez ces patients était de 55,8 heures, c'est à dire après leur décès. L'hémoculture était rendue positive avant le décès chez seulement 19,5% des patients [14].

Toutes ces données posent clairement la problématique du diagnostic mycologique pour la prise en charge de ces infections. Il est nécessaire d'avoir des outils alternatifs aux outils mycologiques conventionnels. Pour bien comprendre lesquels pourraient être utilisés et dans quel contexte, nous allons de façon non usuelle présenter les grandes lignes des principes thérapeutiques avant d'aborder le problème des moyens diagnostiques, de façon à recentrer ces derniers sur les différentes stratégies thérapeutiques possibles.

Principes généraux de traitement

Nous allons présenter dans un premier temps les différentes classes pharmacologiques utilisables pour le traitement systémique des candidoses invasives, avant d'exposer les différentes stratégies thérapeutiques utilisables. Rappelons que la prise en charge des

candidoses invasives ne peut pas se limiter à la prescription d'antifongiques, mais doit comporter la prise en charge de la source de l'infection.

Les différentes classes pharmacologiques

Quatre classes thérapeutiques sont disponibles: les polyènes, la fluorocytosine, les azolés et les échinocandines [161, 162].

Polyènes:

L'amphotéricine B et ses dérivés sont des molécules lipophiliques, administrées par voie intra-veineuse pour les traitements systémiques. Elles s'insèrent dans la membrane cytoplasmique de *Candida* en se fixant aux stérols, particulièrement l'ergostérol. Ceci perturbe la perméabilité membranaire. A faible dose, l'activité des canaux potassiques est augmentée et entraîne une fuite de K^+ du cytoplasme vers le secteur extra-cellulaire. A de fortes doses, l'amphotéricine B crée des pores dans la membrane. Cette action n'est pas dépendante de la croissance cellulaire et peut donc s'observer sur des cellules ne se multipliant pas. L'acquisition de résistance est liée à une diminution de la synthèse de l'ergostérol. Elle est anecdotique pour les espèces du genre *Candida* et concerne essentiellement *C.lusitaniae*. Elle exerce un effet fongistatique à faibles doses, et fongicide à fortes doses, dépendant du rapport Cmax/CMI. Il existe quelques différences entre chacune des formulations d'amphotéricine B. L'amphotéricine B "historique", extraite de la bactérie *Streptomyces nodosus*, est formulée avec l'acide déoxycholique (Fungizone ®). Elle est transportée par des lipoprotéines, stockée dans le foie et relarguée secondairement lentement. Elle est dégradée dans les tissus, et seule une petite fraction est éliminée dans les urines ou la bile. Sa diffusion tissulaire est bonne, excepté notablement pour le système nerveux central (liquide céphalo-rachidien et cerveau), l'humeur vitrée et les os. Son principal effet secondaire est sa néphrotoxicité, par toxicité tubulaire, pouvant s'accompagner de troubles hydro-électrolytiques. Elle concerne plus d'un patient sur deux et gêne considérablement son utilisation en pratique, rendue d'autant plus complexe que cette drogue est souvent mal tolérée lors de son administration. C'est la raison pour laquelle des

formulations lipidiques d'amphotéricine B ont été développées. Deux formes sont commercialisées en France : la forme lipidique complexe colloïdale dispersée (Abelcet ®) et la forme liposomale (Ambisome ®). Ces formulations ont un profil de tolérance beaucoup plus favorable, et ont beaucoup moins d'effets secondaires rénaux. Cependant leur coût est important. Les études comparant les formes lipidiques à la forme classique d'amphotéricine B pour le traitement des candidoses invasives sont peu nombreuses, et ont surtout porté sur des stratégies empiriques chez des patients neutropéniques. Le profil de tolérance des formes lipidiques était effectivement meilleur. Tous ces éléments ont fait positionner l'amphotéricine B, sous forme liposomale, comme traitement de seconde ou troisième ligne par les différentes sociétés savantes ayant édicté des recommandations sur les candidoses invasives. L'intérêt principal de la molécule réside dans le fait que quasiment toutes les espèces sont constamment sensibles. Il est donc quasi impossible de se tromper dans le pari microbiologique en utilisant cette classe. On notera par ailleurs que les formulations lipidiques d'amphotéricine B ont expérimentalement un effet sur le biofilm, ce qui peut être intéressant notamment pour les infections sur matériel [163].

Flucytosine

La flucytosine (Ancotil®), ou 5-fluorocytosine, est un analogue fluoré de la cytosine. Elle est administrée par voie orale, a une excellente biodisponibilité avec une bonne absorption digestive et une élimination à 90% par voie urinaire sous forme inchangée. Elle se fixe peu aux protéines plasmatiques et diffuse dans tous les compartiments, y compris le système nerveux central, l'oeil, les os, la bile. Sa demi-vie est de 3 à 5 heures, et son action, fongistatique, est plutôt temps-dépendant, en rapport avec le temps pendant lequel la concentration sérique est supérieure à la CMI. Elle agit sur la synthèse de l'ADN après une biotransformation par des enzymes de *Candida* en acide 5-fluorodeoxyuridilique monophosphate, se comportant comme un inhibiteur de la thymidilate synthétase. Elle peut aussi être convertie en 5-fluorouridine triphosphate, causant une transcription aberrante. Les effets secondaires principaux sont l'hépatotoxicité et la myélotoxocité, pouvant être sévères.

Le problème principal de cette clase thérapeutique est l'acquisition rapide de résistances, particulièrement en cas de monothérapie, du fait de la perte des perméases permettant le passage de la flucytosine dans le cytoplasme de *Candida*, ou de la perte des enzymes permettant sa biotransformation. C'est la raison pour laquelle son utilisation reste marginale, et ne peut de toute façon pas se concevoir en dehors d'une association thérapeutique. Sa diffusion tissulaire la rend malgré tout intéressante pour traiter des foyers infectieux neurologiques, oculaires, ostéo-articulaires ou pour la prise en charge des endocardites notamment sur matériel ou avec de grosses végétations.

Azolés

Cette classe thérapeutique présente plusieurs molécules utilisables en topiques locaux. Nous ne présenterons que celles utilisées en traitement systémique. Ces molécules ont été synthétisées à partir d'imidazolés ayant subi une N-substitution. On parle de triazolés. Elles se fixent sur le Erg11p, orthologue du cytochrome P-450, et inhibent ainsi la déméthylation du lanostérol, aboutissant à une diminution de la concentration d'ergostérol fini dans la membrane cytoplasmique. Les métabolites intermédiaires synthétisés en excès vont de plus être toxiques pour *Candida*. Cette action est fongistatique et dépend du cycle cellulaire. Elle est en rapport avec le rapport Aire sous la courbe/CMI. Les mécanismes de résistance sont multiples et dépendent des espèces: augmentation de l'expression de pompes à efflux empêchant la pénétration de la molécule dans la cellule, modification de la cible Erg11p par mutations changeant sa composition en acides aminés, surexpression de ERG11, et modification de la composition en stérols de la membrane. Ce dernier mécanisme est très rare mais est responsable d'une résistance croisée aux polyènes et aux azolés [158]. La fixation possible sur le cytochrome P450, présent chez l'homme, explique les interactions médicamenteuses et les effets secondaires initialement rapportés en lien avec l'inhibition de la synthèse de testostérone et de glucocorticoïdes. Ces effets secondaires sont moins marqués avec les molécules les plus récentes. Les molécules utilisables pour le traitement des candidoses invasives sont le fluconazole, le voriconazole et le posaconazole

(l'itraconazole est utilisée pour d'autres mycoses). Le fluconazole (triflucan®), disponible per os et par voie intraveineuse, est la molécule de loin la plus utilisée aussi bien en curatif qu'en prophylactique. Sa biodisponibilité est excellente, avec une absorption digestive de plus de 80%, une faible fixation protéique, une diffusion tissulaire très large (système nerveux central et rein notamment) et une élimination urinaire à 70%, sous forme inchangée, nécessitant une adaptation des posologies en cas d'insuffisance rénale. Sa demi-vie est d'une trentaine d'heures. Son profil de tolérance est aussi très avantageux. L'étude princeps qui avait comparé l'amphotéricine B au fluconazole dans les candidémies chez les patients non neutropéniques, ne mettait pas en évidence de différence de pronostic entre les deux groupes comparés [164]. Cependant on peut noter que cette étude, assez ancienne, n'était pas dessinée ni comme une étude de non-infériorité ni comme une étude d'équivalence, et il est donc stricto-sensu impossible de conclure à une équivalence des deux traitements sur cette étude. Une étude de cohorte allait aussi dans le sens d'une efficacité identique des deux classes thérapeutiques, avec moins d'effets secondaires pour le fluconazole [165], ce qui plaidait en faveur de ce dernier. Cela explique pourquoi il a été largement utilisé depuis. Nous avons déjà évoqué le problème de la résistance et l'émergence d'espèces non *albicans*. Ajoutons aussi que l'augmentation des posologies peut permettre de gérer quelques problèmes d'efficacité, sans augmentation d'effets secondaires rapportés [162]. Le voriconazole (V-Fend®) a un profil pharmacocinétique identique, hormis l'élimination qui est hépatique après dégradation par le cytochrome P450, nécessitant une adaptation à la fonction hépatique. Cela explique aussi les interactions médicamenteuses qui sont nombreuses. L'effet secondaire principal est l'apparition de troubles visuels, et quelques cas d'allongement du QT ont été rapportés. Sa grande différence avec le fluconazole est l'élargissement du spectre à *Aspergillus*, avec une supériorité prouvée par rapport à l'amphotéricine B [166]. Ceci peut être intéressant pour certains traitements ou pour certaines stratégies préventives, notamment chez des patients transplantés neutropéniques. Le dernier représentant de cette classe pour la prise en charge des candidoses invasives est le posaconazole (Noxafil®). Il n'existe que par voie orale, et est bien absorbé mais avec une

variation en fonction du régime alimentaire, l'absorption concomitante de lipides augmentant son absorption. Sa diffusion tissulaire est très bonne. Il est éliminé majoritairement par les selles. Ses interactions médicamenteuses sont très limitées, en prenant garde à la problématique de l'allongement du QT. Sa place principale est la prévention en hématologie, avec son utilisation en prophylaxie primaire des infections fongiques invasives dans les situations de réaction du greffon contre l'hôte après greffe de moelle, ou durant la période de neutropénie après chimiothérapie pour leucémie aiguë myéloïde ou syndrome myélodysplasique, du fait de sa supériorité sur les autres azolés, notamment pour la prévention de l'aspergillose [167, 168].

Echinocandines

Ce sont des lipopeptides cycliques, disponibles seulement par voie intraveineuse. Elles agissent en inhibant la synthèse des β-D-1,3-glucanes, altérant ainsi l'intégrité de la paroi, aboutissant à une déformation de la cellule puis à sa mort. Cette action, fongicide, dépend du rapport Cmax/CMI. L'absence de glucane synthase chez l'homme explique son profil de tolérance excellent. Les interactions médicamenteuses sont très peu nombreuses. Ces molécules ont en outre une action sur le biofilm [163], et ont un effet post-antifongique de plus de 12 heures [169]. La première molécule historiquement est la caspofungine (Cancidas®), qui est donc celle pour laquelle nous disposons du plus de données cliniques. Elle est fixée à 98% sur l'albumine sérique, et diffuse assez bien dans les tissus, bien que de manière plus limitée dans le système nerveux central et au niveau cardiaque. Son élimination se fait par dégradation chimique par hydrolyse et N-acétylation. Les seules interactions médicamenteuses nécessitant des restrictions ou des précautions d'usage sont celles qui ont lieu avec les immunosuppresseurs. Elle a été comparée à l'amphotéricine B classique dans le traitement des candidoses invasives et la non-infériorité avec une tendance à la supériorité a été prouvée, avec significativement moins d'effets secondaires (mais amphotéricine B non lipidique comme comparateur) [170]. Elle a aussi été comparée à l'amphotéricine B liposomale en traitement empirique de la neutropénie fébrile, avec

démonstration de sa non-infériorité. Il était aussi mis en évidence une supériorité en analyse post-hoc chez les patients qui aveint une infection fongique invasive prouvée, en l'occurrence essentiellement des aspergilloses [171]. Le deuxième représentant est l'anidulafungine (Ecalta®). Elle a les mêmes caractéristiques que la caspofungine, mais sans les interactions médicamenteuses. Elle a été comparée au fluconazole et a montré sa non-infériorité dans les candidoses invasives [172], ce qui n'était peut être pas le comparateur le plus pertinent. Enfin, le dernier représentant est la micafungine (Mycamine®) qui a aussi sensiblement les mêmes caractéristiques que la caspofungine, avec comme avantage principal l'absence d'interactions médicamenteuses, notamment avec les immunosuppresseurs. Sa non-infériorité par rapport à l'amphotéricine B liposomale dans les candidoses invasives a été démontrée, avec moins d'effets secondaires [173]. Elle a aussi été comparée, à deux dosages différents, avec la caspofungine dans une étude de "non-infériorité" qui était en fait une étude de supériorité. Il n'y avait pas de différence dans le taux de succès thérapeutique entre les groupes, mais encore une fois stricto sensu il n'est pas possible de conclure à la non-infériorité des traitements [174]. Elle a enfin été comparée au fluconazole en prophylaxie des infections fongiques invasives après greffe de cellules souches. Il y avait significativement moins d'IFI dans le groupe micafungine que dans le groupe fluconazole. La différence portait essentiellement sur la survenue d'aspergilloses, et on peut s'interroger sur la pertinence d'une comparaison avec le fluconazole [175]. Il faudrait plutôt comparer au voriconazole dans ce contexte, et on peut s'interroger au vu de ce que nous avons discuté sur la résistance, sur la pertinence de traitements prophylactiques par les échinocandines.

Les caractéristiques principales de ces différentes molécules sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3: récapitulatif des différentes molécules disponibles pour la prise en charge des candidoses invasives et de leurs caractéristiques principales. Inspiré de la réf [162].

	Polyènes			Flucytosine	Azolés			Echinocandines		
	Ampho B	Ampho B lipidique colloïdale	Ampho B liposomale		fluco	vorico	posaco	caspo	anidula	mica
Spectre				Résistance en monothérapie						
-C.albicans		+		+	+	+	+	+	+	+
-C.glabrata		+		+	+/-	+	+	+	+	+
-C.praspilosis		+		+	+	+	+	+	+	+
-C.tropicalis		+		+	+	+	+	+	+	+
-C.krusei		+		+/-	-	+	+	+	+	+
Mode d'action	altération ergostérol membranaire			altération synthèse d'ADN et transcription	inhibition synthèse ergostérol membranaire			Inhibition synthèse des β-D-1,3-glucanes de la paroi		
Fungi-cide/statique	fongicide à haute dose			fongistatique	fongistatique			Fongicide		
Actif sur le biofilm	oui			non	non			Oui		
Effet post antifongique	oui			Non	non			Oui		
Adaptation des doses:										
-Fonction rénale	oui			oui	oui			non		
-Fonction hépatique	non			non	non			oui	?	?
Effets secondaires										
-fréquence (%)	70-90	20-40	15-30	30-50	10-15	10-20	10-20	10-15		
-type	frissons, insuffisance rénale	frissons, insuffisance rénale	frissons, insuffisance rénale	hépato, néphro, myélotoxique	digestif, rash cutanés	vision	Digestif	digestif		
Interactions médicamenteuses	non			non	oui (cyclosoporine, rifampicine, AVK...)			Oui (immunosupresseurs)	non?	non?
Diffusion	SNC<10%			bonne	bonne	bonne	SNC<10%	SNC faible?		

On peut retenir que nous disposons d'un arsenal thérapeutique conséquent, avec des molécules ayant des effets secondaires, des modalités d'adaptation posologique, des biodisponibilités, des modes d'action, des interactions médicamenteuses, variables. Ceci nous permet une certaine souplesse d'utilisation. Les échinocandines ont un pouvoir fongicide important et une action sur le biofilm, sans effet secondaire majeur, ce qui explique qu'elles ont été positionnées dans toutes les recommandations en première ligne de traitement curatif des infections fongiques invasives. A noter cependant que les études cliniques les ayant évaluées sont parfois contestables en ce qui concerne les groupes contrôles choisis. En outre, les conclusions ne sont pas toujours en accord avec la méthodologie développée, amenant à une certaine prudence dans leur extrapolation en pratique clinique.

Quoiqu'il en soit, cet arsenal thérapeutique varié n'a pas permis une amélioration franche du pronostic des candidoses invasives, ce qui souligne de nouveau la problématique majeure du diagnostic. Nous allons sommairement présenter les différentes stratégies thérapeutiques utilisables pour bien comprendre l'utilisation des outils diagnostiques.

Schémas thérapeutiques

Le traitement des candidoses invasives a fait l'objet de recommandations de la part de l'Infectious Diseases Society of America (DISA) [17] et de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) [176-179], avec des distinctions en fonction des terrains et des organes potentiellement concernés par l'infection. Ces recommandations ont rendu un peu caduques en France celles conjointes des Société de Réanimation de Langue Française/Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française/Société Française d'Anesthésie Réanimation (SRLF/SPILF/SFAR) de 2004, peu utilisées en pratique. Le détail de ces recommandations sort du cadre de ce travail. Nous allons juste développer les stratégies thérapeutiques dans lesquelles s'inscrivent les traitements. Le traitement prophylactique a pour objectif de prévenir l'infection. Il s'applique à des populations à risque et intervient donc en amont de la question du diagnostic. Les stratégies curatives précoces sont le traitement empirique, le traitement probabiliste et le traitement préemptif, qui se comparent au traitement curatif ciblé d'une infection déclarée.

Traitement empirique

L'idée est ici de débuter un traitement antifongique précoce sur des arguments cliniques sans attendre la confirmation microbiologique étant donné l'impact des retards thérapeutiques que nous avons souligné précédemment. En pratique, cette situation est évoquée devant une fièvre persistante sous antibiothérapie bien conduite chez des patients à risque de candidose invasive. On entrevoit que les malades potentiellement concernés par cette approche vont être nombreux, car nous avons vu dans le chapitre épidémiologie que les facteurs de risque sont présentés par de nombreux malades de réanimation. Notons par ailleurs que les fièvres de cause inconnue peuvent présenter des étiologies très variées y compris non infectieuses [180]. Elles nécessitent une démarche diagnostique complète assez complexe et les traitements empiriques en réanimation ne paraissent justifiés que chez des malades instables sélectionnés [181]. Quoiqu'il en soit, pour évaluer/recommander cette stratégie empirique, il faut distinguer patients neutropéniques de patients non

neutropéniques. Chez les patients neutropéniques, peu d'études sont disponibles. Dans une étude rétrospective, les patients candidémiques ayant bénéficié d'un traitement empirique adapté avant le retour de l'hémoculture positive avaient une meilleure survie que les patients n'ayant pas bénéficié de cette prise en charge [182]. Une seule étude a comparé de manière prospective randomisée cette stratégie, en évaluant le fluconazole contre placebo, chez des patients de réanimation. Le critère de jugement principal était composite, et la prescription de fluconazole ne donnait pas de résultat significativement supérieur à la prescription de placebo. L'analyse du critère de jugement concluait au fait que l'échec de traitement était essentiellement en rapport avec l'absence d'obtention de l'apyrexie, alors que cette fièvre était le critère d'introduction du traitement. Cette stratégie manque donc d'efficacité, probablement par difficulté à sélectionner les malades qui en bénéficieraient le plus, par l'absence de critère réellement discriminant. Une dernière étude intéressante sur le sujet est une modélisation mathématique pour évaluation coût-efficacité de l'approche préemptive. Différents schémas thérapeutiques étaient testés, chez des malades de réanimation présentant une fièvre ou une hypothermie ou une instabilité hémodynamique malgré une antibiothérapie bien conduite. Ils étaient comparés à une stratégie ciblée avec introduction du traitement après obtention de l'hémoculture. La seule stratégie empirique coût-efficace était celle basée sur la prescription de fluconazole. La stratégie préemptive basée sur la prescription de caspofungine ne devenait coût efficace que si la prévalence des candidoses invasives était supérieure à 60%, ou si la proportion de souches de *Candida* résistantes au fluconazole était de plus de 30%, ou si le prix de la caspofungine était divisé par plus de 10 [183]. Cette étude présentait l'intérêt de souligner la nécessité de prendre en compte la prévalence de la maladie et des résistances ainsi que le coût des antifongiques dans toute réflexion sur ce sujet. La stratégie préemptive était pourtant retenue par l'IDSA [17]. Cependant, les termes utilisés étaient particulièrement ambigus, puisqu'il nous est précisé qu'elle doit s'appuyer sur les marqueurs "sérologiques" et/ou la culture de sites réputés stériles (autrement dit la colonisation): "Empirical antifungal therapy should be considered for critically ill patients with risk factors for invasive candidiasis and no other known cause of

fever, and it should be based on clinical assessment of risk factors, serologic markers for invasive candidiasis, and/or culture data from nonsterile sites". Nous le reverrons, cette stratégie est en réalité une stratégie préemptive. L'ESCMID n'a pas émis de recommandation sur le sujet par manque de données, notamment sur les critères et le choix du moment devant faire instaurer le traitement. Il est conseillé de prendre sa décision en fonction de l'épidémiologie locale et des interactions médicamenteuses potentielles. On notera que pour les malades d'hématologie (chimiothérapie compliquée de neutropénie et allo/autogreffe de cellules souches hématopoïétiques), qui sont des patients de typologie un peu différente, le traitement préemptif est recommandé, et cette fois-ci sans fluconazole, du fait de son spectre étroit et du fait de la nécessité de couvrir aussi les champignons filamenteux. Si on regarde ce qui se passe en réanimation un jour donné, 7,5% des patients de réanimation ont un traitement antifongique, alors que 2/3 d'entre-eux n'ont pas d'infection fongique invasive documentée [184]. Le fluconazole est utilisé dans presque 2/3 des cas, la caspofungine dans 1/4 des cas. L'étude portait sur tous les malades hospitalisés le jour de l'enquête, quel que soit leur terrain et leur durée d'hospitalisation. Le pourcentage de patients traités par antifongiques en réanimation est probablement plus important chez des patients qui ont une hospitalisation prolongée ou appartenant à des groupes à risque.

Cette stratégie empirique est donc au final peu satisfaisante et sans doute assez coûteuse. Il est nécessaire d'envisager d'autres moyens pour mieux sélectionner les patients devant bénéficier d'un traitement antifongique alors que la candidose invasive n'est pas encore prouvée.

Traitement probabiliste

C'est l'objectif de l'approche probabiliste, dans laquelle on essaye de codifier le traitement en utilisant une approche plus formelle, statistique. Plusieurs règles de prédiction et scores ont ainsi été développés et évalués pour la réanimation. L'existence d'une candidose invasive était déterminée en utilisant les critères EORTC classant les candidoses invasives en

prouvé, probable, possible en utilisant des critères d'hôte et des critères microbiologiques ([185] pour la version révisée la plus récente).

Le premier est le score développé par Paphitou NI et al. [186]. Le but initial de la démarche des auteurs était d'avoir une règle permettant de codifier les traitements prophylactiques, et non les traitements curatifs, en identifiant un groupe de patients ayant une prévalence attendue de l'infection de plus de 15%. Il a été élaboré rétrospectivement en appliquant une méthode de régression logistique à une base de données issue de réanimation chirurgicale, en sélectionnant les patients hospitalisés plus de 4 jours. Il était ainsi montré que les patients restant hospitalisés plus de 4 jours en réanimation et ayant l'un des facteurs de risque suivant dans les 7 jours qui précédaient l'admission en réanimation -diabète, hémodialyse *de novo*, nutrition parentérale totale ou antibiothérapie à spectre large- avaient une probabilité de développer une infection fongique invasive de 16,6% alors qu'elle n'était que de 2,5% pour les patients ne présentant pas ces caractéristiques, en considérant les catégories EORTC prouvée+probable+possible. 52% des patients qui restaient plus de 4 jours en réanimation remplissaient les conditions de la règle. Son application à la cohorte ayant servi à l'élaboration de ce score permettait de capturer 78% des patients qui allaient développer une candidose invasive. En appliquant la même méthode, mais de manière multi-centrique sur des réanimations médico-chirurgicales, et en élaborant la règle sur 3/4 de la population étudiée et en la validant sur le 1/4 restant, Ostrosky-Zeichner L et *al.* [187], en posant J0 comme le jour de l'admission en réanimation trouvaient que la règle la plus pertinente était la suivante : association entre J1 et J3 d'une antibiothérapie ou d'une KT veineux central et de deux facteurs parmi i) n'importe quelle chirurgie entre J-7 et J0, ii) l'usage d'un traitement immunosuppresseur entre J-7 et J0, i) une pancréatite entre J-7 et J0, i) une nutrition parentérale totale entre J1 et J3, i) une dialyse entre J1 et J3, i) l'usage de corticoïdes entre J-7 et J0. Cette règle avait une sensibilité (Se) de 34% et une spécificité (Sp) de 90%. 34% des patients était donc capturés par la règle, mais aussi 10% de l'ensemble des patients ne présentant pas de candidose invasive. Ces deux règles ont été comparées dans une étude

rétrospective cas/témoins appariés. Elles avaient sensiblement la même aire sous la courbe ROC, de 0,65 à 0,70 et les auteurs proposaient une règle alternative intégrant la durée de l'hospitalisation avant la réanimation, avec une aire sous la courbe ROC de 0,77 [188]. Ils établissaient des valeurs prédictives pour ces trois règles, de manière artificielle puisque le dessein de l'étude donnait une fausse prévalence artificielle de la pathologie. Il est cependant possible de retenir que la performance de ces règles portait surtout sur la valeur prédictive négative et non sur la valeur prédictive positive, ce qui revient à dire qu'elles sont intéressantes pour sélectionner les patients chez qui un traitement précoce n'est pas justifié, plus que pour sélectionner les patients chez qui il convient d'introduire un traitement. Une règle alternative moins restrictive a été secondairement proposée par Ostrosky-Zeichner L et al., dans l'idée de l'utiliser dans des essais cliniques pour l'évaluation de schémas thérapeutiques prophylactiques [189]. En utilisant l'association ventilation mécanique et voie veineuse centrale et antibiothérapie à spectre large entre les premiers et troisièmes jours d'hospitalisation en réanimation, et l'un des facteurs de risque parmi nutrition parentérale, dialyse, chirurgie majeure, pancréatite, corticothérapie systémique ou utilisation d'un autre agent immunosuppresseur, la règle de prédiction clinique permettait de sélectionner 18% des patients, présentant une prévalence de CI de 10%.

Léon C et al. ont, quant à eux, élaboré le "Candida score" (CS) dans une étude ayant porté sur la cohorte extraite du projet EPCAN, registre espagnol de surveillance multicentrique des candidoses invasives et de la colonisation à *Candida* en réanimation. En appliquant un modèle de régression logistique multivariée sur les facteurs de risque de candidose invasive, prouvée seulement cette fois, chez des patients non neutropéniques, les items du score étaient nutrition parentérale totale, chirurgie, colonisation multi-focale, sepsis sévère et KT veineux central. Chaque item était pondéré d'un point, sauf le KT central qui était pondéré de deux points. Un score supérieur à 2,5 avait une aire sous la courbe ROC de 0,847, une sensibilité de 81% et une spécificité de 74% [190]. Le CS fut validé prospectivement dans un second temps par la même équipe de manière multicentrique en réanimation médico-

chirurgicale en Espagne, France et Argentine pour des patients hospitalisés plus de 7 jours. Un CS>3 présentait alors une aire sous la courbe ROC de 0,774 et sa performance était surtout son excellente valeur prédictive négative [191]. Il était un peu plus performant que l'index de colonisation dont nous reparlerons ensuite. Ce score est donc, comme les règles de prédiction clinique, plus intéressant pour ne pas introduire un traitement que pour en introduire un. Remarquons d'ailleurs que dans l'étude de Azoulay et *al.* déjà citée, 75% des patients traités par antifongique un jour donné, alors qu'ils n'avaient pas d'infection fongique documentée, avaient un CS>2, contre 83,3% pour les patients traités qui avaient une infection et 29,8% pour les patients non traités [184]. Cependant rappelons qu'il manque la référence au temps, puisque le CS était élaboré pour une durée d'hospitalisation de plus de 7 jours.

Enfin, pour clore ce chapitre sur les stratégies probabilistes, notons qu'une règle de prédiction clinique d'isolement de levures du genre *Candida* sur des prélèvements péritonéaux de patients de réanimation avec péritonite avait plus anciennement été élaborée rétrospectivement et validée prospectivement. La présence d'au moins trois facteurs de risque parmi -défaillance hémodynamique, porte d'entrée gastro-intestinale, sexe féminin, antibiothérapie en cours- prédisait la positivité des prélèvements per-opératoires à *Candida* avec une Se de 84%, une Sp de 50%, une valeur prédictive positive de 67% et une valeur prédictive négative de 72% [192].

Au final ces règles et scores de prédiction sont intéressants, quoique complexes pour une utilisation en routine au lit du patient, pour essayer de trier les malades, mais ils vont permettre d'exclure des patients sans risque de candidose invasive plus que d'inclure des patients à sur-risque de candidose invasive. Il faut donc d'autres stratégies pour essayer de combler cette limite, éventuellement à associer à cette approche probabiliste [193].

Stratégie préemptive

L'idée est ici que le traitement précoce est guidé par une suspicion clinique renforcée par des arguments biologiques. Nous avons vu l'ambigüité des termes dans les recommandations de l'IDSA. Cette ambigüité est retrouvée ailleurs dans la littérature. A titre d'exemple pour préciser la stratégie préemptive, on peut considérer comme prototype de ce type d'approche en infectiologie le traitement des infections à cytomégalovirus non encore prouvées chez des patients séropositifs pour le VIH ayant des CD4+ inférieurs à 50/mm3 ou chez des malades transplantés de cellules souches hématopoïétiques, chez qui il existe une antiginémémie CMV ou une PCR CMV sanguines fortement positives ou de cinétique croissante. Cela correspond à une situation à risque majeur où il est légitime de penser qu'une infection est en train de se déclencher et qu'il faut instaurer un traitement avant d'attendre la confirmation que l'infection est en cours. L'ESCMID a précisé ce cadre pour les candidoses invasives en parlant de traitement déclenché par des arguments microbiologiques sans preuve d'infection fongique invasive. Elle a orienté ses recommandations sur les biomarqueurs, dont les β-D-1,3-glucanes et mannanes/Ac anti-mannanes, que nous allons développer dans le chapitre suivant. Le grade de recommandation était faible quant à utiliser les β-D-1,3-glucanes pour l'introduction du traitement antifongique, tant pour les malades de réanimation que chez les malades d'hématologie, du fait d'insuffisances de données robustes. Une autre approche possible est le suivi de colonisation par l'IC et l'ICC, utilisé par certaines équipes [162]. Cependant les données que nous avons présentées dans le chapitre épidémiologique soulignent les limites de cette stratégie, qui est mal évaluée en réanimation médicale, mais qui amènerait probablement si elle était utilisée seule à sélectionner des patients par excès. L'ESCMID a reprécisé à ce propos que l'isolement de *Candida* dans les prélèvements respiratoires devait être considéré plus comme la preuve d'une colonisation que d'une infection à proprement parler, comme démontré par les séries autopsiques [194], et ne pas faire introduire de traitement sur ce seul argument microbiologique, contrairement à ce qui est souvent fait, en tout cas par les médecins réanimateurs [195]. Un essai d'évaluation d'une approche

préemptive basée sur l'utilisation des BDG et la prescription d'anidulafungine, comparée à une approche empirique, a été publié. Les auteurs de cette étude ont été confrontés à des difficultés d'inclusion (consentement non recueilli, prophylaxie antifongique préalable...) rendant toute interprétation difficile [196]. On notera tout de même que les patients des deux groupes avaient une répartition identique des facteurs de risque, témoignant bien de l'impossibilité de sélectionner les patients devant bénéficier d'un traitement précoce sur ces seuls facteurs de risque. Plus récemment Osotrosky-Zeichner et al. ont évalué une stratégie prophylactique par caspofungine versus placebo chez des malades de réanimation captés par la dernière version de la règle de prédiction clinique citée dans le chapitre précédent, et ont identifié modélisé a posteriori les patients ayant eu en fait un schéma préemptif car présentant une candidose invasive prouvée ou probable selon les critères EORTC [197]. Il n'y avait pas de différence significative entre les patients du groupe caspofungine et les patients du groupe placebo dans le schéma prophylaxie en ce qui concerne l'incidence de la candidose invasive (9,8% vs 16,7%, p=0.14), alors que dans le schéma préemptif l'incidence de la candidose invasive était significativement plus faible dans le groupe caspofungine (18,8%) que dans le groupe placebo (30,4%) (p=0,04), sans différence cependant en ce qui concerne la mortalité et la durée de séjour. Au vu de ce que nous avons présenté sur les données épidémiologiques sur la résistance, il est possible de s'interroger sur la pertinence du choix de la caspofungine dans ces schémas thérapeutiques.

Une approche en développement suscitant actuellement un intérêt certain est l'approche génétique. Le principe serait d'évaluer le terrain génétique des patients, et de cibler les thérapeutiques, prophylactiques et curatives précoces, sur des facteurs de prédisposition. Cette approche a donné lieu à de nombreuses recherches dans le domaine des infections bactériennes et du sepsis sévère. Par exemple, il a été montré que le polymorphisme TNF2 sur le promoteur du gène codant pour le TNF-α était associé à une prédisposition à développer un choc septique et à une surmortalité [198], que certains polymorphismes du TLR2 pouvait prédisposer aux infections à staphylocoque [199], mais aussi aux infections

sévères, à la tuberculose et à la lèpre [200]. Certains phénotypes extrêmes en rapport avec des polymorphismes rares peuvent expliquer des infections sévères à répétition [201], ou des formes cliniques réputées rares [202]. De nombreuses études ont ainsi porté sur de nombreuses voies d'activation et de reconnaissance de différents microorganismes. L'un des champs d'investigation particulièrement développé sur ce sujet de la prédisposition génétique est la tuberculose, pour comprendre pourquoi seule une minorité de sujets exposés à *Mycobacterium tuberculosis* va développer la maladie, l'idée étant qu'il est nécessaire de considérer en regard de ce terrain les facteurs environnementaux, notamment la virulence du pathogène [203]. Pour les infections fongiques, le passage des données fondamentales, présentées précédemment, à l'application clinique est embryonnaire. D'un point de vue conceptuel, il a été montré par Bochud PY et *al.* que les patients ayant bénéficié d'une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques présentaient une augmentation du risque de présenter une aspergillose invasive si certains polymorphismes de TLR4 étaient présentés par le donneur [204]. Plus récemment, chez des malades de réanimation chirurgical à haut risque de péritonite candidosique, une association était mise en évidence entre certains polymorphismes du TNFα et des β-défensine1 et le fait de développer une péritonite à *Candida* [205]. Ainsi en établissant une cartographie des polymorphismes des patients, nous pourrions imaginer dans le futur cibler nos thérapeutiques sur les patients les plus à risque.

Outils diagnostiques microbiologiques

Les recommandations les plus récentes concernant l'utilisation des différentes techniques utilisables pour le diagnostic de candidose invasive ont été élaborée par l'ESCMID [18], basées sur l'analyse des performances des différents tests. On les classe habituellement en techniques basées sur la culture, et techniques non basées sur la culture, ou biomarqueurs.

Techniques basées sur la culture

La technique de référence pour les tissus prélevés par biopsie est leur analyse anatomo-pathologique, avec différentes techniques (hybridation *in situ*, biologie moléculaire, immunofluorescence...) complétant la microscopie optique conventionnelle.

Les hémocultures

En pratique clinique l'examen le plus pratiqué et le plus accessible est l'hémoculture. Contrairement aux infections bactériennes, sa performance est mauvaise pour le diagnostic de candidose invasive. En effet sur des séries autopsiques assez anciennes il avait été déterminé que seulement 30% des patients qui présentaient des lésions anatomopathologiques de candidose invasive avait eu un diagnostic posé avant leur décès, mais le(s) test(s) diagnostiques utilisés n'étaient pas précisés [206]. Une autre étude nécropsique avait évalué les performances des hémocultures améliorées techniquement par l'utilisation de la lyse-centrifugation. Le sensibilité globale de cette technique était de 43% pour le diagnostic de candidose invasive, variant de 28% en cas d'atteinte d'un seul organe à 58% en cas d'atteinte de plusieurs organes [207]. Au final, on retient donc communément que les hémocultures ont une sensibilité de 50% pour le diagnostic de candidose invasive et de candidémie [10, 208]. Nous avons vu par ailleurs que le délai médian d'obtention de la positivité d'une hémoculture est de plus de 50 heures [14]. Une légère amélioration a été apportée par l'utilisation de flacons d'hémoculture spécifiques pour les champignons, mis en incubation dans des automates détectant la production de CO2 en temps réel, utilisés en bactériologie mais aussi performants en mycologie [209]. Ces flacons sont des milieux cerveau-cœur enrichis au sucrose et contenant des antibiotiques (chloramphénicol+tobramycine) pour inhiber la croissance d'éventuelles bactéries présentes dans le prélèvement, et de la saponine comme agent de lyse. Ces milieux (Mycosis) ont été comparés avec ceux des flacons d'hémoculture utilisés pour la bactériologie (Aerobic), sur lesquels peuvent pousser les champignons à condition de les garder suffisamment longtemps en incubation, chez des patients ayant présenté une candidémie, avec incubation

dans le même type d'automate. Le taux de positivité était significativement amélioré avec le milieu Mycosis, que ce soit par flacon (88% vs 74,9%) ou par patient (92,5% vs 72,9%), particulièrement chez les patients chez qui il y avait une co-infection bactérienne. La présence de la bactérie fait en effet chuter fortement les performances du flacon Aerobic pour la mise en évidence la levure. En analysant par espèce, cette augmentation de sensibilité était valable par patient et par flacon pour *C.glabrata*, puisque 100% des épisodes de candidémie étaient mis en évidence avec les flacons Mycosis vs 58,1% avec les flacons Aerobic. Pour *C.parapsilosis*, la différence était significative par flacon mais pas par patient. Pour les autres espèces, notamment *C.albicans*, le pourcentage de positivité n'était pas différent entre les deux types de flacon. L'autre intérêt était l'amélioration du temps d'obtention du résultat positif, qui passait de manière significative de 36,5 heures à 28,9 heures [10]. Les temps les plus courts étaient pour *C.albicans*, et les plus longs pour *C.glabrata*, cependant nettement améliorés par rapport à ce qui était rapporté antérieurement [210]. Au final, l'utilisation de flacons d'hémocultures spécifiques des champignons a permis de gagner en sensibilité surtout pour *C.glabrata*, et un peu dans le délai d'obtention du résultat. Il reste cependant un temps incompressible. Les autres améliorations techniques sont toutes liées aux étapes qui sont en aval de la positivité du flacon et n'ont aucun impact sur le délai d'obtention des résultats. Ainsi, l'identification d'espèces qui nécessitait classiquement des évaluation des caractéristiques phénotypiques macroscopiques, enzymatiques et biochimiques a été améliorée par l'utilisation de milieu de cultures colorimétriques CHROMagar [211], permettant d'identifier l'espèce dès la culture d'isolement sur milieu solide.

La spectrométrie de masse

L'introduction de la spectrométrie de masse dans les laboratoires de microbiologie a constitué une révolution récente dans les pratiques de laboratoire. La technique utilisée est celle dite Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF). Le principe général est de soumettre un échantillon co-cristallisé dans une matrice sur une

plaque métallique à bombardement laser pulsé, ce qui va ioniser et volatiliser en phase gaz les molécules le composant. Celles-ci vont ainsi acquérir un rapport masse/charge m/z. Elles vont être accélérées dans un champ électrostatique, puis éjectées dans un tube métallique soumis au vide, pour percuter un détecteur. Elles vont ainsi être passées dans un analyseur qui va évaluer le rapport m/z, ici par le temps de vol. La charge étant en générale unique, les molécules sont en pratique séparées par leur masse, les plus petites étant les plus rapides. En soumettant les prélèvements microbiologiques à cette technique, on obtient une "signature" ou "carte d'identité" spectrométrique [212]. L'ensemble de cette procédure est schématisée sur la figure 9.

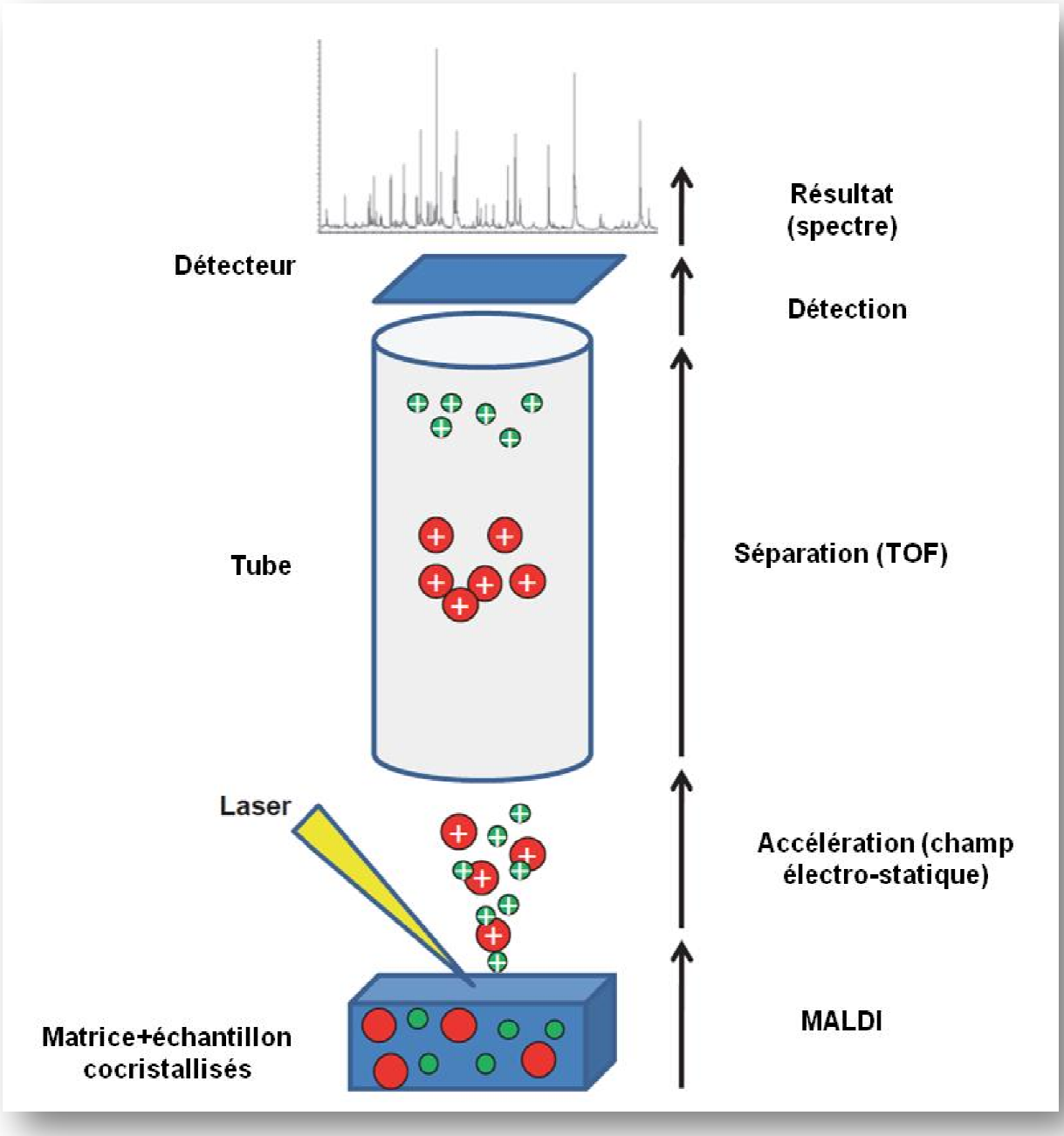

Figure 9: Représentation schématique de la procédure d'analyse d'un échantillon en MALDI-TOF. D'après la réf [212].

Le spectre obtenu est comparé aux données collectées dans une base, permettant ainsi d'identifier rapidement le genre et l'espèce du microorganisme présent. Les améliorations technologiques dans le domaine ont permis en bactériologie d'appliquer la technique directement sur les colonies obtenues en culture, sans passer par une phase de pré-traitement et d'extraction des protéines comme fait initialement, ce qui a permis de remplacer avantageusement les identifications biochimiques par galerie API, et ainsi de gagner du temps, avec un coût modéré et un temps-technicien modeste. Le MALDI-TOF a été appliqué ensuite en mycologie, mais ici il est nécessaire de soumettre les levures à un pré-traitement pour extraction, ce qui fait passer le taux d'identification de 4 à 100 % [213], mais qui peut poser un problème de standardisation. L'un des enjeux actuels est d'avoir des bases de données propres et exhaustives pour chacun des systèmes commercialisés. La technique est clairement prometteuse puisqu'il est maintenant possible d'avoir des taux d'identification de plus de 98% avec des appareils différents, contre 96,5% pour les techniques phénotypiques classiques, en prenant comme gold standard les techniques de biologie moléculaire [214]. Par contre, contrairement à ce qui est possible en bactériologie, l'application du MALDI-TOF directement sur le flacon d'hémoculture rendu positif par l'automate sans passer par la phase de culture n'est pas encore réalisable. Les développements technologiques sont à suivre, d'autant qu'il existe même des données expérimentales suggérant qu'il serait possible d'évaluer la sensibilité aux antifongiques en évaluant les variations de protéome en MALDI-TOF [12].

Le MALDI-TOF MS est peut être plus prometteur que les techniques de biologie moléculaire, semblant représenter dans les années 90 la panacée pour un isolement sensible et une identification spécifiques, mais qui au terme de plus de 20 ans de recherche active n'ont pas abouti à des tests fiables utilisables en routine. La raison en est que les techniques sont variées, tant en terme de produit biologique utilisé (sang total, sérum...) que de cible amplifiée (ARN ribosomal, cytochrome P450...) [215]. Par ailleurs, les problèmes d'extraction ne sont pas encore parfaitement résolus, à l'origine de faux négatifs. A l'inverse de faux

positifs peuvent être liés à la contamination par des saprophytes environnementaux [216]. Cependant, le problème de temps précieux qui s'écoule entre le moment du prélèvement et celui où l'automate détecte une croissance microbienne dans l'hémoculture n'est pas résolu. D'autres outils biologiques peuvent éventuellement combler ce temps d'attente.

Techniques non basées sur la culture

Ici, l'idée est de déterminer la présence dans un prélèvement biologique d'un composé fongique. Deux approches sont possibles: la détection de matériel génétique (ADN) par biologie moléculaire, ou de composés structuraux et/ou métaboliques. Pour ces derniers, plusieurs cibles moléculaires ont été explorées : des protéines structurales et enzymatiques, des produits du métabolisme ou des polysaccharides de la paroi [217]. Il est aussi possible d'explorer la réponse de l'hôte dirigée contre ces composés fongiques en déterminant la présence d'Ac.

Détection d'ADN par PCR

En dépit des multiples travaux ayant porté sur cette technique, la détection d'ADN de *Candida* (et d'ADN fongique de manière plus générale) n'a toujours pas trouvé sa place en pratique clinique de routine, contrairement à ce qui est observé en bactériologie et en virologie médicales. La raison principale est liée à l'hétérogénéité des techniques développées, tant en terme de cible amplifiée, que de type de sondes utilisées, ou de matériel biologique sur lequel est fait le prélèvement (sang ou sérum pour la problématique de la CI) [215, 216]. Ces hétérogénéités techniques rendent la comparaison des études difficile. Par ailleurs la procédure d'extraction de l'ADN, rendue en partie difficile du fait de la constitution de la paroi de *Candida* [217], a été optimisée mais reste contraignante. Cependant, il semblerait que la réalisation des PCR sur le sérum ou le plasma soit plus performante que sur sang total [218], ce qui pourrait simplifier l'extraction. Dans ce travail, la PCR permettait de gagner 2,2 jours en médiane par rapport à l'hémoculture, mais il y avait 25% de faux négatifs. Le technique multiplex en tandem utilisée permet aussi d'amplifier différentes régions cibles par des amorces différentes, ce qui peut permettre d'identifier

différentes espèces de *Candida* (et d'autres genres de champignons que *Candida*) [219]. Cette approche multiplex a fait l'objet de développement de kits commerciaux utilisant en outre une technique de PCR en temps réel (Septifast sur Light-Cycler ®, Roche) semblant présenter un certain intérêt pour faire le diagnostic de candidose invasive à hémocultures négatives, tant sur des sujets neutropéniques que non neutropéniques [220, 221], à la restriction prêt que l'isolement de matériel génétique fait toujours polémique quant à savoir si cela correspond effectivement à la présence d'un agent infectieux pathogène viable [222]. Le nombre de patients pour lesquels de l'ADN de la levure du genre *Candida* était amplifié par cette technique Septifast ® est trop limité pour pouvoir conclure de manière satisfaisante. Une méta-analyse analysant les différentes techniques de PCR a évalué la sensibilité globale à 95% et la spécificité globale à 92% [215]. On remarquera d'ailleurs dans ce travail que les auteurs retrouvaient la PCR plus performante lorsqu'elle était réalisée sur sang total, en contradiction avec les travaux de Lau A et L. suscités. Par ailleurs, il convient de noter la grande hétérogénéité des groupes contrôles utilisés d'une étude à l'autre. Au final, la technique est prometteuse et les développements à suivre, mais les données trop hétérogènes, si bien que les experts considèrent qu'il est impossible dans l'état actuel des connaissances d'établir des recommandations sur l'utilisation de la PCR en pratique clinique [18].

Protéines

Pour les protéines enzymatiques, la détection de l'énolase (métalloenzyme impliquée dans la glycolyse) par des techniques ELISA a donné des résultats prometteurs pour le diagnostic des CI, avec une spécificité de 100% et une sensibilité d'environ 70% lors des premières évaluations. Ce biomarqueur semblait aussi assez discriminant entre colonisation et infection [223], mais son développement a été abandonné. La recherche de SAP candidosiques par Elisa a été évaluée sur les urines dans un modèle animal, et semblait assez intéressant pour discriminer colonisation d'infection [217].

Ont aussi été évalués le dosage des Ac dirigés contre des composants protéiques de Candida. Les Ac anti-énolase et anti-fructose biphosphate aldolase ont une spécificité isolée pour le diagnostic de CI supérieure à 90%, et la sensibilité est de 90% si on associe les deux tests [224]. Pour les protéines structurales, il est possible de rechercher dans le sérum des patients des Ac dirigés contre Hwp1, protéine du tube germinatif. Il semble que ces Ac soient un marqueur intéressant pour le diagnostic de candidose invasive, mais il reste nécessaire de les évaluer [132].

Produits du métabolisme

Enfin, les ratio urinaires de D-arabinitol (d'origine fongique)/ L-arabinitol (en rapport avec le métabolisme humain) ont été proposés pour faire le diagnostic de CI, avec des performances intéressantes [225]. Ce métabolite n'est pas produit par *Candida krusei* et *glabrata* et peut être influencé par la prescription de fluconazole [226]. Il peut aussi être dosé dans le sérum, et son ratio avec la créatinine a été proposé pour évaluer le pronostic de la CI sous traitement [227].

Tous ces tests sont intéressants sur le plan conceptuel, mais ne sont pas disponibles en routine en France. Pour la pratique clinique, il faut se tourner vers les tests utilisant les polysaccharides de la paroi, qui ont fait l'objet de commercialisation.

Polysaccharides de la paroi de Candida

Nous renvoyons à la figure 4 représentant cette paroi pour avoir d'avantage de précisions concernant ces molécules.

En pratique clinique, ce sont les mannanes et les β-D-1,3-glucanes qui font l'objet de dosages. Les mannanes sont dosés par Elisa, et c'est un épitope α-tri-man qui est reconnu [136]. Bien que de cinétique différente, le dosage de ces Ag mannanes est indissociable du dosage des Ac, aussi effectué par Elisa, et nous allons voir qu'ils ont souvent été évalués de concert dans les études cliniques. Pour les BDG, on utilise un "limulus test" [228]. Ce test exploite la capacité de la limule, arthropode marin ancestral, à coaguler son hémolymphe en

présence de LPS ou de glucanes, par l'activation d'une cascade enzymatique initiée par le facteur G. Il s'agit d'un moyen de défense primitif non spécifique très efficace. Cette hémolymphe peut être prélevée et utilisée pour des tests de détection de LPS ou de BDG. Pour la détection spécifique des BDG, la cascade enzymatique est inactivée pour le LPS, et le produit final est marqué par un fluorochrome permettant une quantification sur l'intensité du signal optique obtenu. L'étalon utilisé pour faire la gamme de référence est un extrait de la paroi de *Candida*, purifié de tout mannane. Les techniques d'extraction initialement décrites pour la préparation de ce standard permettaient d'obtenir un degré de polymérisation probablement entre 10 et 50 [229]. Le motif reconnu par le facteur G est au moins un pentasaccharide [230].

La majorité des études ayant évalué les performances de ces biomarqueurs ont concerné des populations d'hématologie ou de réanimation chirurgicale. Les données pour les services de réanimation ayant un recrutement "médical" ou polyvalent sont assez parcellaires. Par ailleurs, la plupart des études ont concerné des patients candidémiques. Nous verrons que certaines études plus récentes ont essayé d'aborder le problème des candidoses invasives sans candidémie. La recherche de Mn circulant dans le sérum a été suggérée comme aide au diagnostic de candidose invasive il y a plus de 30 ans. Le test était exploré chez le lapin et l'homme, en situation d'infection et de colonisation, et comparé au signal donné par les infections à *Aspergillus*. Il était spécifique puisque aucun des sujets sains, colonisés par *Candida* ou infecté par *Aspergillus* ne présentait de mannanémie, et la sensibilité était faible puisque 50% des sujets infectés par *Candida* présentaient un test positif [231]. Cette mannanémie est transitoire [232] et la complexation Ag/Ac est problématique pour le dosage. C'est la raison pour laquelle il a été ensuite proposé de coupler le dosage Mn/Ac anti Mn et d'utiliser des Ac dirigés contre différents épitopes. Il avait ainsi été montré dans un premier temps que la sensibilité et la spécificité, pour le diagnostic de candidose invasive, étaient pour les Mn seuls respectivement de 40 et 98%, pour les Ac anti-Mn seuls de 53 et 94% et pour l'association des deux tests de 80 et 93%. Les auteurs décrivaient aussi la

possibilité d'observer une cinétique inverse des Ac et des antigènes Mn, expliquée par la complexation antigène/anticorps [136]. Leur positivité est cependant peu précoce, puisque plus souvent observée au moment ou après l'hémoculture, mais moins souvent dans les jours précédents [135]. Il existe ainsi un kit commercial détectant les Ac anti-Mn et un kit détectant des Mn par méthode ELISA en utilisant un Ac monoclonal dit EB-CA1 et reconnaissant des α-1,2-mannanes. Il a été montré que l'association avec un Ac monoclonal 5B2 reconnaissant des β-1,2-mannanes améliore la sensibilité de la détection des Mn et offre l'avantage de détecter des Ag dont la cinétique de relargage est un peu différente [233], mais cette approche n'a jamais fait l'objet d'un développement commercial. Quoiqu'il en soit, le test utilisable en routine peut détecter les Mn issus des espèces *albicans*, *glabrata*, *tropicalis* mais est moins performant pour *parapsilosis* et *kefyr* [234]. Ces tests ont été évalués chez des patients neutropéniques, et permettaient un gain de temps pour le diagnostic de candidose invasive, notamment pour les patients avec des lésions hépato-spléniques, en comparaison à l'apport de l'imagerie [235]. Une méta-analyse récente a déterminé les performances de ces tests, dans des populations cependant hétérogènes : la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic de candidose invasive étaient ainsi respectivement de 58 et 93% pour le Mannane seul, de 59 et 83% pour l'Ac anti-Mannane seul et de 83 et 86% pour l'association des deux tests, ce qui tend à promouvoir l'usage de la combinaison Ag/Ac, recommandé par le groupe de travail à l'origine de cette méta-analyse [236]. Les BDG ont fait l'objet d'évaluations multiples. Dans l'étude princeps, ayant inclus 2/3 de patients hématologiques, la sensibilité était de 90% pour le diagnostic des IFI, et la spécificité de 100%, pour un seuil fixé à 20 pg/mL. Les taux sériques étaient plus élevés en cas de candidose invasive qu'en cas d'aspergillose [228]. Les études ultérieures ont surtout été réalisées en hématologie. La méthodologie de ces différentes études est très variable : différents seuils de positivité, différents tests commerciaux, patients neutropéniques inclus ou exclus, évaluation des performances du BDG pour le diagnostic des infections fongiques invasives (candidoses, aspergillose, pneumocystose) de manière globale..., rendant l'extrapolation de ces études difficile à faire pour les réanimations. Par ailleurs, les patients y

sont souvent classées en IFI prouvée/probable/possible selon les critères EORTC [185]. Cette classification a l'avantage de pouvoir comparer des groupes homogènes de patients, mais a pour inconvénient d'introduire un degré d'incertitude (par définition...) dans les catégories probables et possibles. Les groupes témoins sont aussi assez variables, mais souvent composés de sujets sains. Il est légitime de s'interroger sur la pertinence de ces témoins, la problématique en clinique étant de disposer d'un test discriminant pour cibler dans une population à risque, selon des facteurs de risque bien connus, quels patients seraient à "sur-risque" de développer une candidose. Il serait donc sans doute plus adapté de prendre des témoins présentant les mêmes facteurs de risque que les cas, mais n'ayant pas présenté, et ce de façon certaine, de candidose invasive. Cela rend nécessaire de prendre avec un certain recul les résultats de ces études. Les performances rapportées dans les travaux princeps d'Ostrosky *et al*. évaluant le test dans une population recrutée dans différents services étaient probablement surestimées car le groupe témoin utilisé était composé essentiellement de sujets sains. Pour les CI, la sensibilité pour un seuil à 80 pg/mL était proche de 80%, mais variait selon les espèces de 60% pour *parapsilosis* à 100% pour *krusei* [237]. En utilisant comme contrôles des patients hospitalisés, pour certains colonisés, et sans limiter la population évaluée aux patients de réanimation, Nguyen et al. trouvaient une sensibilité équivalente proche de 80%, mais une spécificité plus faible autour de 70% pour le diagnostic de CI. Dans cette étude, les auteurs concluaient à une supériorité de la PCR sur les BDG [238]. En se focalisant sur des patients de réanimation chirurgicale, non neutropéniques, le test est retrouvé sensible mais peu spécifique. Cette sensibilité varie de 90% si on considère les catégories CI probable et possible, à 100% si on se focalise sur la catégorie CI prouvée. A l'inverse la spécificité passe de 80% à 60-70%. La spécificité augmente avec la multiplication des tests, au prix d'une perte de sensibilité. Ces dosages sériés de BDG paraissent nécessaires pour identifier les faux positifs retrouvés dans les trois jours qui suivent une intervention chirurgicale [239]. Ce manque de spécificité a même été retrouvé comme ne permettant pas, devant un sepsis, de distinguer infection bactérienne d'infection fongique [240]. En regardant les données hors réanimation, plusieurs études

convergent vers l'intérêt d'un monitoring des BDG chez les patients neutropéniques fébriles pour aider au diagnostic d'IFI, et favoriser la précocité de ce diagnostic [241, 242]. De la même manière, le test est décrit comme ayant une bonne valeur prédictive négative pour le diagnostic d'IFI, dont les CI, dans une population de patients souffrant de leucémie aiguë myéloïde et de syndrome myélodysplasique. Dans cette dernière étude, les auteurs retrouvaient une spécificité de 90% [243]. Plus récemment, dans une population non restreinte à la réanimation ou aux pathologies hématologiques, en prenant comme comparateurs des patients bactériémiques et des patients à hémocultures négatives, Held J. *et al*. retrouvaient une sensibilité et une spécificité des BDG pour les candidémies de 85% environ. Dans ce travail, l'Ag Mn était un biomarqueur spécifique mais peu sensible, et l'association de ces deux antigènes semblait être la stratégie d'utilisation de biomarqueurs la plus performante si on la comparait à la stratégie Ag Mn+Ac anti-Mn [244]. Pour ce qui est des infections intra-abdominales à *Candida*, les données sont très parcellaires. Une positivité des BDG peut permettre de gagner du temps sur le diagnostic d'infection intra-abdominale à *Candida*, avec une sensibilité de 65% et une spécificité de 78% pour deux tests consécutifs positifs, performances modestes mais supérieures à celles obtenues pour le Candida Score et l'évaluation de la colonisation [245]. Dans ce contexte nosographique particulier, il semblerait que les BDG puissent être intéressants pour distinguer colonisation d'infection [246], ce qui n'est pour l'instant pas extrapolable aux IFI autres que les infections intra-abdominales à *Candida*. En compilant les études, les performances du dosage des BDG pour le diagnostic des IFI prouvées et probables en excluant la pneumocystose sont de 76,8% pour la sensibilité et de 85,3% pour la spécificité [247]. Le manque de spécificité de BDG peut être dû aux faux positifs possibles décrits lors de l'administrations d'albumine, d'immunoglobulines intra-veineuses, d'utilisation de membrane de celllulose pour les épurations extra-rénales et de certaines compresses comprenant des dérivés glycaniques. Des interactions avec les antibiotiques ont aussi été décrites. Ainsi des solutions reconstituées de colistine, ertapénème, triméthoprime-sulfamétoxazole, céfotaxime, céfépime, et ampicilline-sulbactam semblent pouvoir donner des faux positifs. Cependant, à

des concentrations identiques aux concentrations plasmatiques rencontrées en thérapeutique, l'interférence avec le dosage de BDG est peu probable [248]. On remarquera par ailleurs que dans les pratiques actuelles les membranes de dialyse en cellulose ne sont plus utilisées. Enfin, le suivi de la cinétique des BDG a été proposé pour l'évaluation de l'efficacité du traitement. La cinétique décroissante des BDG sous échinocandines était un facteur en faveur d'un pronostic favorable [249]. Cependant, seuls deux points rapprochés étaient évalués dans cette étude, et l'impact de cette décroissance sur le pronostic était très faible.

L'ensemble de ces biomarqueurs, commercialisés ou non, est repris dans le tableau 4.

Tableau 4: principaux biomarqueurs pour le diagnostic des candidoses invasives.

Biomarqueur	Nature du biomarqueur/des épitopes	Site biologique de détection	Technique de détection	Disponibilité en routine	Durée d'exécution de l'analyse/Délai de rendu des résultats*
Mannane	Ag/Polysaccharide pariétal	Sérum, LBA, LCR	Immunologique, Elisa	Disponible	3 heures
Anticorps anti-mannane	Ac/ Polysaccharide pariétal	Sérum	Immunologique, Elisa	Disponible	3 heures
B-D-1,3-glucane	Ag/Polysaccharide pariétal	Sérum, LBA, LCR	Biochimique, Limulus test	Disponible	2 heures
Enolase	Ag/Enzyme de la glycolyse	Sérum	Immunologique, Elisa	Commercialisation abandonnée	
Anticorps anti-énolase	Ac/Enzyme de la glycolyse	Sérum	Immunologique, Elisa	Non commercialisé	
Anticorps anti fructose biphosphate aldolase	Ac/Polysaccharide-enzyme	Sérum	Immunologique, Elisa	Non commercialisé	
D-arabinitol	Ag/Métabolite fongique	Sérum, urines	Chromatographie phase liquide	Non commercialisé	
Hwp1	Ag/Protéine du tube germinatif	Sérum	Immunologique, Elisa	Non commercialisé	

* Les délais de rendu des résultats sont variables selon les laboratoires en fonction du volume d'analyses traitées et du nombre de séries réalisées par semaine. En effet, la majorité des tests étant réalisée en microplaque, leur regroupement en série est nécessaire.

Notre travail de recherche a porté sur l'intérêt de ces biomarqueurs polysaccharidiques dans le cadre d'une approche préemptive. Nous avons voulu d'une part préciser les significations

diagnostiques et pronostiques de la glycanémie, mannane et glucane, chez les patients de réanimation, d'autre part participer à l'évaluation de l'intérêt de la spectrométrie de masse dans l'analyse des polysaccharides circulant dans le sérum des patients candidémiques.

Présentation du travail de recherche

Objectifs

Nos objectifs étaient

-d'évaluer la performance des dosages de β-D-1,3-glucanes et de mannanes chez des patients de réanimation pour le diagnostic précoce de candidémie le suivi du traitement

-en tirer des piste de réflexion pour le diagnostic des candidoses invasives

-de participer à l'évaluation de l'intérêt d'une évaluation de la glycanémie en spectrométrie de masse

Matériels et méthodes/Résultats

Discussion article 1

Nous avons évoqué les nombreuses causes d'interférence avec la technique de dosage de β-D-1,3-glucanes. Parmi celles-ci on retrouve des causes "intrinsèques" au patient sur lesquelles le prescripteur ne peut pas agir avant de faire le dosage. La problématique était de savoir comment s'affranchir des interactions au laboratoire en cas de sérum hyperlipémique, ictérique, ou hyperprotidique.

Ce premier article est une lettre décrivant une technique simple de pré-traitement par la châleur + EDTA pour séparer les glucanes des protides, des lipides et de la bilirubine, sans

modification de la gucanémie sur des sérums tests. Il a fait l'objet d'une publication dans Journal of Clinical Microbiology.

Discussion article 2

Dans ce travail, accepté pour publication dans Critical Care, nous avons voulu évaluer la signification de la glycanémie d'origine candidosique mesurée dans le sérum des patients de réanimation polyvalente médico-chirurgicale par le biais du couple antigénique β-D-1,3-glucanes/mannanes, sans exclusion des patients neutropéniques. L'idée était de se confronter à la problématique rencontrée en clinique au quotidien, où face à une population cumulant les facteurs de risques sans qu'aucun de ceux-ci ne soit discriminant pour guider la stratégie thérapeutique, les cliniciens ont besoin d'outils pour sélectionner une population à sur-risque à laquelle appliquer de façon la plus pertinente possible un traitement antifongique précoce, si nécessaire. C'est la raison pour laquelle le groupe témoin choisi dans cette étude de cohorte est un groupe de patients hospitalisés dans le même service que les cas, exposé aux mêmes facteurs de risque. Nous avons volontairement restreint ce groupe aux patients ne présentant aucun argument pour une infection fongique invasive, en excluant les cas probables et possibles de la classification EORTC, et inclus comme cas des patients ayant une candidose invasive prouvée sur le critère "hémoculture positive". Nous avons voulu par ce choix limiter au maximum les incertitudes liées aux patients pour lesquels le diagnostic de CI n'est pas certain, de manière à se placer dans les conditions les plus défavorables au test, et ainsi pouvoir se permettre de faire des extrapolations pour la prise en charge de la candidose invasive. Il ressort de notre travail que nous avons à disposition deux biomarqueurs ayant des performances tout à fait différentes, mais que l'on peut considérer comme complémentaires. En effet, aux seuils recommandés par les fabricants, la détection du Mn est un test très spécifique, mais de faible sensibilité, pour le diagnostic de candidémie. Sa fenêtre de positivité peut commencer quelques jours avant le prélèvement de l'hémoculture, mais concerne surtout les jours qui suivent la date de prélèvement des hémocultures. A l'inverse, la détection de BDG est un test très sensible, peu spécifique, mais

précoce puisque pouvant être positif plusieurs jours avant l'hémoculture. Il est donc possible de considérer le BDG comme un test de dépistage, et le Mn comme un test de confirmation. Le manque de spécificité de ces tests ne semble pas être en rapport direct avec la colonisation puisque nous n'avons pas mis en évidence de lien entre intensité de colonisation et glucanémie en évaluation quantitative, même si il semble y avoir une tendance entre une fourchette de glucanémie élevée et une colonisation très intense, si on considère une approche catégorielle semi-quantitative. Il faut noter par ailleurs la nature différente des Mn et BDG d'un point de vue variable statistique. En effet, le Mn se comporte comme une variable binaire, comme l'atteste la courbe ROC décalée vers les hautes spécificités. Autrement dit, la variation du seuil ne permet pas de gagner en sensibilité. Le BDG lui est plus à considérer comme une variable quantitative, dont les performances vont varier de façon très importante en fonction des seuils. Ainsi, pour des glucanémies très élevées, sa spécificité va être excellente, au détriment de sa sensibilité. Nous avons voulu retranscrire dans l'algorithme décisionnel que nous proposons cette nécessité de considérer le seuil atteint dans l'utilisation des BDG, et la complémentarité des deux tests permettant d'envisager leur utilisation conjointe. Pour des taux très élevés de BDG (nous avons choisi un seuil supérieur à 800 pg/mL donnant une spécificité de plus de 90%) un traitement précoce de type préemptif paraît justifié vue la probabilité élevée d'observer une candidémie, et par extrapolation une candidose invasive à hémocultures négatives. L'excellente sensibilité du test permet par ailleurs de prédire une valeur prédictive négative élevée, même si elle n'a pas pu être déterminée dans notre travail du fait de l'impossibilité de calculer la prévalence exacte de la maladie dans notre cohorte. C'est pourquoi pour des taux inférieurs à 80 pg/mL il paraît raisonnable d'exclure la probabilité d'une candidose invasive et ainsi de ne pas introduire de traitement antifongique (ou de l'arrêter si il a été débuté). Pour des taux intermédiaires, pour lesquels la spécificité est insuffisante pour prendre une décision raisonnable, la mannanémie prend tout son sens. En effet, chez ces patients présentant une glucanémie significative, il est possible de penser que nous avons dépisté un signal permettant de catégoriser ces malades comme des malades ayant un "sur-risque" de

candidose invasive. En cas de mannanémie significative, la spécificité des Mn étant élevée, la probabilité d'une candidémie et par extrapolation d'une candidose invasive, devient de nouveau suffisamment élevée pour envisager un traitement préemptif. En cas de mannanémie négative, il nous a paru intéressant de s'aider de l'intensité de la colonisation, bien que nous n'ayons pas évalué l'intérêt de cette dernière dans notre travail. Cette intensité de colonisation est assez contraignante à déterminer au quotidien, c'est pourquoi la restreindre à des patients ciblés nous a paru intéressant. L'autre intérêt de cette colonisation serait de guider les praticiens dans le choix de leur molécule antifongique, puisque chez un patient stable colonisé par *C.albicans* sensible aux azolés, l'utilisation du fluconazole en préemptif nous paraît suffisant, sans nécessairement avoir nécessité d'un recours aux échinocandines. Cette classe thérapeutique est celle qui est évaluée dans les tentatives de modélisation de traitement préemptif [196, 197], mais dans le cadre d'un traitement précoce, chez des malades stables, chez qui la colonisation peut éventuellement être déterminée avec obtention d'un antifongigramme, peut être est il licite de s'interroger sur la pertinence de garder une place aux azolés, dans une volonté de coût-efficacité et de limitation de pression de sélection. L'autre façon de concevoir cet algorithme est de l'utiliser pour sélectionner la population à sur-risque, et d'attendre l'évènement clinique septique pour initier un traitement qui prendra alors en compte la probabilité d'une candidose invasive. Ces différentes stratégies proposées ici nécessitent bien sûr d'être évaluées. Cependant, nous pouvons signaler que les tentatives d'études sur le sujet, citées dans le chapitre sur la thérapeutique de notre revue générale, se sont heurtées au problème de la capacité d'inclusion des malades. Il est donc nécessaire de projeter des études multicentriques de grande envergure, qui poseront nécessairement le problème de l'homogénéité des prises en charge, les critères EORTC prêtant nous l'avons vu à une certaine incertitude nosographique.

Discussion article 3

Nous avons vu que la détection de polysaccharides issus des levures du genre *Candida* pouvait être utilisée afin de disposer de biomarqueurs des candidoses invasives. Pour certains de ces polysaccharides qui sont immunogènes le dosage des anticorps humains dont ils sont la cible peut représenter un intérêt. C'est notamment le cas pour les Ac anti-mannanes, dont la cinétique est souvent "en miroir" de celle des Mn, par un mécanisme de complexation Ag/Ac, si bien que leur dosage couplé et le suivi de leur cinétique respective peut présenter un intérêt. Dans le travail présenté ici, publié dans Journal of Clinical Immunology, nous avons voulu déterminer de la même manière l'intérêt potentiel d'un dosage de la MBL, lectine circulante, intervenant plus en amont dans la réponse immunitaire. Le premier point est que le taux de MBL mesuré chez les patients présentant une candidose invasive est significativement plus élevé que le taux mesuré chez les contrôles, aussi bien les sujets sains que les sujets témoins hospitalisés. Le deuxième point est qu'il existe une balance entre la MBL et le Mn, identique à ce qui est décrit entre les Ac anti mannanes et les Mn. Ces deux éléments nous amènent à penser que la MBL joue bien un rôle dans la réponse immunitaire anti-*Candida*, et qu'elle est probablement régulée positivement en cas de candidose invasive, durant laquelle elle va se complexer aux mannanes. La question est de savoir si cette complexation concerne les Mn pariétaux, ce qui pourrait favoriser la phagocytose des cellules de la levure *Candida* circulant dans le sérum des patients, ou si elle se limite aux Mn circulants. La MBL est une lectine cation divalent dépendante et sa complexation avec les mannanes circulants est fortement suggérée par le fait que l'ajout de NA2EDTA (qui capte ces cations) est indispensable à la dissociation des complexes par la chaleur telle que présentée dans l'article 1. Cette interaction Mn/MBL a pu être prouvée et analysée dans notre laboratoire par résonance plasmonique de surface [250]. Par ailleurs, les patients colonisés non infectés présentaient, de manière significativement plus fréquente que les sujets sains ou que les patients présentant une candidose invasive, des taux de MBL <100 ng/mL, ce qui est considéré comme un déficit profond en MBL. Autrement dit, un déficit sévère en MBL favoriserait la colonisation, dont on

a vu qu'elle était la première étape de l'infection. Il est plus difficile de déterminer à quel point ce déficit est en soit un facteur favorisant la candidose invasive, étant donnée la régulation positive de la MBL en cas de candidose invasive. Par ailleurs, il est nécessaire dans ces évaluations du rôle de la MBL de l'analyser de manière quantitative mais aussi qualitative. Ces résultats préliminaires ouvrent tout un champ d'investigations sur la MBL d'une part comme biomarqueur potentiel de candidose invasive, d'autre part comme acteur de la réponse immunitaire. Il est possible de faire l'hypothèse que son utilisation comme biomarqueur puisse être gêné par son rôle dans la réponse dirigée contre les bactéries, et qu'elle manquera peut être de spécificité. Des travaux complémentaires sont donc nécessaires.

Discussion article 4

Dans ce travail, nous avons participé au développement à à l'évaluation d'une technique impliquant la spectrométrie de masse, désormais implantée dans les services de microbiologie, pour la détection et la caractérisation des glycannes issus de levures pathogènes du genre *Candida* ou plus largement de champignons pathogènes, circulant dans le sérum des patients. L'hypothèse de départ avait été élaborée suite à des travaux antérieurs du laboratoire sur la caractérisation en spectrométrie de masse d'extraits de glucanes de la paroi de *Candida* [251]. Une procédure pré-analytique de traitement par la châleur+EDTA, par analogie avec ce que nous avons proposé pour limiter les faux positifs du Fungitell®, suivie d'une extraction des oligosaccharides en deux phases, a permis de limiter le rapport signal/bruit. Un signal en position m/z 365 a ainsi pu être mis en évidence dans le sérum de patients candidémiques, avec une spécificité qui semblait intéressante puisque les sujets indemnes d'infection fongique invasive ne présentaient pas ce signal. Le rapport m/z correspond au rapport théorique d'un dihexose ionisé sur lequel s'est complexé un atome de Na+ et nous pensions initialement détecter un dérivé disaccharidique du polymère de β-D-1,3-glucane. Une approche semi-quantitative a été rendue possible par l'utilisation du ratio 365/361, le pic 361 étant ubiquitaire et correspondant à un pic matriciel.

Une approche utilisant un standard interne (tréhalose deutéré, m/z 375) dont le signal m/z ne peut s'apparenter à un produit naturel a également été explorée comme mode de quantification. Nous avons lors de ce travail observé des discordances importantes entre l'intensité de ce signal et la quantité de β-D-1,3-glucanes mesurée par le Fungitell®. Des essais visant à améliorer le rendement de la procédure pré-analytique par une technique d'immunocapture en utilisant des billes sensibilisées par des anticorps anti-mannanes et anti-glucanes n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Ces différents éléments nous ont amené à nous interroger sur la nature de la molécule révélée par le pic en position 365. La perméthylation des échantillons a permis de confirmer la nature disaccharidique du sucre mis en évidence, et l'analyse en GC-MS (couplage de chromatographie phase gaz à la spectrométrie de masse) au laboratoire de glycobiologie structurale en incluant des standard internes correspondant à différents hexoses candidats a permis de montrer que ce sucre est en fait du tréhalose et non un diholoside de β-D-1,3-glucane.

Ceci amène à s'interroger sur la présence et la fonction de ce sucre chez *Candida* , son rôle dans les candidoses invasives et pourquoi on le retrouve aussi « facilement ». Le tréhalose est un disaccharide ne présentant pas d'extrémité terminale réductrice dans lequel deux molécules de glucose sont reliées par une liaison α,α-1,1. De nombreuses bactéries sont aussi capables de le synthétiser selon des voies métaboliques très variées, et pour certaines d'entre-elles il fait partie intégrante de la paroi, ce qui est particulièrement marqué chez les mycobactéries, *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Corynebacterium*, où on le trouve lié aux acides mycoliques [252]. Le tréhalose pourra être clivé par une tréhalase pour donner deux molécules de glucose. Chez l'homme, on a relevé la présence de tréhalase dans la bordure en brosse de l'épithélium de l'intestin grêle, ainsi que dans le rein au niveau du tube contourné proximal, bien que son rôle soit obscur [252-254]. Le glycolipide que le tréhalose contribue à constituer au sein de la paroi notamment des mycobactéries joue un rôle expérimentalement *in vitro* dans l'inhibition de la fusion phagolysosomiale calcium dépendante, et constitue ainsi un facteur de pathogénicité majeur, mais son association à la

partie lipidique semble indispensable, puisque le tréhalose seul et les acides mycoliques seuls n'inhibent pas cette fusion [255]. Cette capacité d'inhiber la fusion de membranes cytoplasmiques se fait probablement du fait d'interactions hydrophobes à l'interface entre les deux couches de la bicouche phospholipidique de la membrane et du fait d'un encombrement stérique lié au tréhalose. Ces mécanismes sont aussi probablement impliqués dans le rôle du tréhalose dans la protection des bactéries vis à vis du froid, de la dessication et du stress osmotique (ce qui explique son utilisation dans l'industrie pour ses propriétés protectrices des membranes). On remarquera que ce disaccharide peut représenter jusque 10% du poids sec de ces bactéries [256]. Le dernier rôle décrit chez les bactéries est le rôle énergétique. La mobilisation du glycogène pour donner du glucose passe par le tréhalose et à l'inverse le stockage du glucose en glycogène passe par le tréhalose puis le maltose [253]. Les voies de synthèse et de dégradation du tréhalose chez les bactéries sont ainsi bien étudiées et décrites, mais il est assez difficile de trouver des informations pertinentes sur le rôle de tréhalose dans le cadre de la relation bactérie/homme. Chez les levures, la synthèse du tréhalose se fait en deux étapes : la tréhalose P synthase (TPS ou TPS1) catalyse le transfert du glucose de l'UDP-glucose vers le glucose-6-phosphate pour donner le tréhalose-6-phosphate, puis la tréhalose P phosphatase (TPP, ou TPS2) va libérer le tréhalose libre [252]. *C.albicans* accumule le tréhalose en cas de choc thermique, sans activation des voies de biosynthèse, probablement parce que cette accumulation est régulée à un niveau post-transcriptionnel [257]. Dans cette situation de choc thermique, il a été montré que le tréhalose joue aussi le rôle de molécule chaperonne et peut inhiber l'induction de la filamentation par Hsp90 [258]. L'accumulation intra-cytoplasmique est aussi un phénomène de protection vis à vis du stress oxydatif [259], où l'interaction protéine-tréhalose est associée à une relative diminution de la dénaturation protéique [260]. Les mutants déficients en Tps1 présentent d'ailleurs une surmortalité en cas de stress oxydatif [261], et les mutants déficients en Tps1 et Tps2 métabolisent mal le glucose et ont une virulence atténuée [262]. En cas d'exposition à l'amphotéricine B, la synthèse accrue de tréhalose semble aussi être un mécanisme protecteur pour *Candida*

[263]. La régulation du tréhalose est donc indispensable à l'adaptation au stress environnemental chez *Candida*. Ces différents éléments donnent des arguments pour penser que la synthèse de tréhalose (et donc son relargage?) est fortement accrue en situation de stress environnemental, tel que celui qui pourrait être lié à la réponse immunitaire de l'hôte. Cela pourrait permettre de comprendre pourquoi sur modèle murin le signal 365 discrimine la colonisation de l'infection. Sur quelques expériences préliminaires à confirmer et non présentées dans l'article, nous n'avons pas mis en évidence de signal 365 dans le surnageant de culture de *Candida* sur milieu RPMI avec ou sans sérum de veau foetal aussi bien à 37°C et 25°C, précocement comme tardivement, sous forme blastoconidie comme après filamentation. Par contre en co-culture avec des polynucléaires de souris, on retrouvait sur des temps précoces un pic 365, qui disparaissait avec la prolongation du temps de culture.

La détection de tréhalose dans le sérum de patients candidémiques en spectrométrie de masse, semblant assez spécifique de l'infection par rapport à la colonisation, ouvre donc la voie à de nouveaux outils diagnostiques, mais aussi à des clés de compréhension de la physiopathologie de la candidose invasive. On pourrait imaginer une phase en deux temps, de filamentation en réponse aux conditions environnementales que nous avons évoquées dans notre revue générale, avec une régulation négative de la synthèse de tréhalose, puis une exposition à la réponse de l'hôte après invasion, aboutissant à une synthèse adaptative et un relargage de tréhalose. Ceci serait bien sûr à vérifier, mais ferait le lien entre l'observation que nous avons faite de la présence de ce résidu dans les sérums de patients et les différentes phases de la transition saprohyte-pathogène et la réponse de l’hôte.

Enfin il apparaît que le rôle du tréhalose chez les bactéries (composant structural de la paroi, métabolite de réserve énergétique) diffère nettement de celui qu'il joue chez *Candida* (protection des agressions). Ces agressions sont celles rencontrées en situation d'infection du fait de la réponse de l'hôte (fièvre, mobilisation des polynucléaires neutrophiles et exposition au peroxyde d'hydrogène...). Cette différence entre bactéries et *Candida* pourrait

expliquer pourquoi ce marqueur semble très spécifique de l'infection fongique. D'ailleurs, nous avons de façon non formelle chercher la présence du pic d'intérêt 365 chez des patients présentant des infections bactériennes "pures" clairement identifiées à leur phase initiale (méningite à pneumocoque, fasciite avec bactériémie à *Fusobacterium nucleatum*, pneumonie à *Klebsiella pneumoniae*) et le pic n'a jamais été retrouvé. Cette spécificité est bien entendu à confirmer à une plus large échelle en clinique, et il faudra bien s'assurer, en exposant *Candida* et des bactéries diverses à différents types stress, que le relargage du tréhalose est bien spécifique de *Candida*.

Conclusions/perspectives

Notre travail a porté sur les outils biologiques de diagnostic précoce des candidoses invasives, plus particulièrement en réanimation. L'enjeu est d'essayer de raccourcir les délais nécessaires pour l'obtention des résultats avec les méthodes classiques basées sur la culture, incompatibles avec l'introduction rapide du traitement antifongique.

Nous avons ainsi montré que des antigènes polysaccharidique de la paroi de *Candida* peuvent être utilisés comme biomarqueurs, avec des performances différentes et complémentaires. Les β-D-1,3-glucanes sont ainsi précoces, sensibles mais peu spécifiques et leur cinétique de décroissance est prolongée. Les mannanes sont quant à eux spécifiques mais ont une sensibilité limitée, en partie probablement du fait de leur dégradation rapide et de leur fugacité dans le sérum. Les performances respectives des β-D-1,3-glucanes et des mannanes permet d'envisager leur utilisation couplée, soit dans le cadre d'une stratégie de traitement préemptif basée sur les biomarqueurs, soit dans le cadre d'une stratégie de criblage d'une population à sur-risque de candidose invasive.

Les évolutions techniques nous ont fait envisager l'utilisation de la spectrométrie de masse pour appréhender ces biomarqueurs. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un signal semblant spécifique des infections fongiques invasives, correspondant à la circulation sérique de tréhalose. Quelques données préliminaires expérimentales suggèrent en outre

que ce marqueur pourrait discriminer la colonisation de l'infection. Il pourrait donc renforcer la stratégie proposée avec les glycannes, en complétant avantageusement le mannane.

La compréhension de la circulation et des performances de ces biomarqueurs correspondant à des molécules de la levure du genre *Candida* doit intégrer la circulation des anticorps ou des récepteurs les reconnaissant, comme attesté antérieurement par le couple Mn/Ac anti-Mn et dans le travail présenté ici par l'analyse de la cinétique de la MBL, mais aussi leur catabolisme.

Les perspectives ouvertes par ce travail sont:

-d'un point de vue clinique, de valider notre proposition d'approche préemptive de manière prospective, et d'évaluer les performances du signal spectrométrique d'intérêt isolément et en complément des biomarqueurs actuellement disponibles.

-d'un point de vue fondamental, par analogie avec les Mn, d'essayer de préciser la circulation des glucanes en relation avec celle des Ac anti glucanes. Ces derniers ont été décrits à de nombreuses reprises, mais sans susciter l'intérêt clinique qu'ils méritent. La circulation des antigènes polysaccharidiques, parfois prolongée et soutenue, pose question quant à leur impact sur la modulation de la réponse immunitaire, et en regard des innombrables données de la littérature sur leur interaction avec les récepteurs de l'immunité innée, il pourrait être intéressant de l'évaluer *ex-vivo*, notamment en ce qui concerne la balance pro/anti-inflammatoire.

En ce qui concerne la mise en évidence de la circulation de tréhalose dans le sérum des patients présentant une candidose invasive, la compréhension de la cinétique de relargage de sucre nécessite de préciser sur modèle *in-vitro* et sur modèle animal les différents stress qui aboutissent à la synthèse et à la libération de tréhalose chez *Candida* lors du "fitting" de *C.albicans* à différents environnements en milieux synthétiques, en co-culture cellulaire ou dans des modèles animaux. Ceci pourrait aussi permettre de comprendre les modalités de

circulation de ce marqueur en termes de précocité et de cinétique dans les candidoses invasives.

Pour l'évaluation et la validation clinique des ces outils, il est indispensable de disposer d'une cohorte clinique cas/témoins prospective, sans ambigüité sur la caractérisation des patients. La constitution de cette cohorte est actuellement en cours, sous couvert d'un objectif principal d'étude basé sur la détermination des polymorphismes génétiques prédisposant à la candidose invasive. La constitution d'une sérothèque et la collection exhaustive de données cliniques et épidémiologiques devrait nous fournir des outils d'analyse précise des biomarqueurs et de leur stratégie d'utilisation dans le domaine peu exploré de l’interface clinico-biologique chez les malades complexes de réanimation.

Références

1. Wisplinghoff, H., et al., *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.* Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 309-17.
2. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.* N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.
3. Vincent, J.L., et al., *International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units.* JAMA, 2009. **302**(21): p. 2323-9.
4. Gudlaugsson, O., et al., *Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited.* Clin Infect Dis, 2003. **37**(9): p. 1172-7.
5. Wey, S.B., et al., *Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay.* Arch Intern Med, 1988. **148**(12): p. 2642-5.
6. Pittet, D., et al., *Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model.* Clin Infect Dis, 1997. **24**(6): p. 1068-78.
7. Rentz, A.M., M.T. Halpern, and R. Bowden, *The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness.* Clin Infect Dis, 1998. **27**(4): p. 781-8.
8. Kett, D.H., et al., *Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study.* Crit Care Med, 2011. **39**(4): p. 665-70.
9. Blot, S.I., et al., *Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients.* Am J Med, 2002. **113**(6): p. 480-5.
10. Meyer, M.H., et al., *Comparison of Mycosis IC/F and plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the bactec 9240 system.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(2): p. 773-7.
11. Lacroix, C., et al., *Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of Candida species.* Clin Microbiol Infect, 2013.
12. Vella, A., et al., *Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis.* J Clin Microbiol, 2013. **51**(9): p. 2964-9.
13. Morrell, M., V.J. Fraser, and M.H. Kollef, *Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(9): p. 3640-5.

14. Kollef, M., et al., *Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control.* Clin Infect Dis, 2012. **54**(12): p. 1739-46.
15. Stevens, D.A., *Diagnosis of fungal infections: current status.* J Antimicrob Chemother, 2002. **49 Suppl 1**: p. 11-9.
16. Eggimann, P., J. Bille, and O. Marchetti, *Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU.* Ann Intensive Care, 2011. **1**: p. 37.
17. Pappas, P.G., et al., *Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America.* Clin Infect Dis, 2009. **48**(5): p. 503-35.
18. Cuenca-Estrella, M., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures.* Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 9-18.
19. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012.* Crit Care Med, 2013. **41**(2): p. 580-637.
20. Fitzpatrick, D.A., et al., *A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis.* BMC Evol Biol, 2006. **6**: p. 99.
21. Butler, G., et al., *Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes.* Nature, 2009. **459**(7247): p. 657-62.
22. Bougnoux, M.E., et al., *Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of Candida albicans.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 5265-6.
23. Tavanti, A., et al., *Optimization and validation of multilocus sequence typing for Candida albicans.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(8): p. 3765-76.
24. Odds, F.C., et al., *Candida albicans strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(10): p. 3647-58.
25. Odds, F.C., et al., *Molecular phylogenetics of Candida albicans.* Eukaryot Cell, 2007. **6**(6): p. 1041-52.
26. Tavanti, A., et al., *Multilocus sequence typing for differentiation of strains of Candida tropicalis.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5593-600.
27. Dodgson, A.R., et al., *Multilocus sequence typing of Candida glabrata reveals geographically enriched clades.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(12): p. 5709-17.
28. Tavanti, A., et al., *Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 284-92.
29. Soll, D., *Switching and mating*, in *Candida and Candidiasis*, R. Calderone and C. Clancy, Editors. 2012, ASM press. p. 75-90.

30. Bennett, R.J., et al., *Nuclear fusion occurs during mating in Candida albicans and is dependent on the KAR3 gene.* Mol Microbiol, 2005. **55**(4): p. 1046-59.
31. Bennett, R.J. and A.D. Johnson, *Completion of a parasexual cycle in Candida albicans by induced chromosome loss in tetraploid strains.* EMBO J, 2003. **22**(10): p. 2505-15.
32. Slutsky, B., et al., *"White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans.* J Bacteriol, 1987. **169**(1): p. 189-97.
33. Huang, G., et al., *CO(2) regulates white-to-opaque switching in Candida albicans.* Curr Biol, 2009. **19**(4): p. 330-4.
34. Huang, G., et al., *N-acetylglucosamine induces white to opaque switching, a mating prerequisite in Candida albicans.* PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000806.
35. Pujol, C., et al., *The closely related species Candida albicans and Candida dubliniensis can mate.* Eukaryot Cell, 2004. **3**(4): p. 1015-27.
36. Alby, K., D. Schaefer, and R.J. Bennett, *Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen Candida albicans.* Nature, 2009. **460**(7257): p. 890-3.
37. Heitman, J., *Microbial genetics: Love the one you're with.* Nature, 2009. **460**(7257): p. 807-8.
38. Yi, S., et al., *Alternative mating type configurations (a/alpha versus a/a or alpha/alpha) of Candida albicans result in alternative biofilms regulated by different pathways.* PLoS Biol, 2011. **9**(8): p. e1001117.
39. Huang, G., *Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen Candida albicans.* Virulence, 2012. **3**(3): p. 251-61.
40. Moran, G., D. Coleman, and D. Sullivan, *An Introduction to the Medically Important Candida Species*, in *Candida and Candidiasis*, A. Press, Editor 2012, Calderone, RA

Clancy, CJ: Washington DC. p. 11-25.
41. Bougnoux, M.E., et al., *Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of Candida albicans isolates from the human digestive tract.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(5): p. 1810-20.
42. Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet, *Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients.* Lancet Infect Dis, 2003. **3**(11): p. 685-702.
43. Tortorano, A.M., et al., *Candidosis in the intensive care unit: a 20-year survey.* J Hosp Infect, 2004. **57**(1): p. 8-13.
44. Gale, C. and J. Berman, *Cell Cycle and Growth Control in Candida Species* in *Candida and candidiasis*, R. Calderone and C. Clancy, Editors. 2012, ASM Press: Washington, DC.

45. Lortholary, O., et al., *Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients.* Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(2): p. 532-8.
46. Pfaller, M.A., et al., *Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance.* J Clin Microbiol, 2013. **51**(8): p. 2571-81.
47. Pfaller, M.A., et al., *Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of Candida glabrata.* J Clin Microbiol, 2012. **50**(4): p. 1199-203.
48. Trofa, D., A. Gacser, and J.D. Nosanchuk, *Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen.* Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(4): p. 606-25.
49. van Asbeck, E.C., K.V. Clemons, and D.A. Stevens, *Candida parapsilosis: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility.* Crit Rev Microbiol, 2009. **35**(4): p. 283-309.
50. Nosek, J., et al., *Biology and genetics of the pathogenic yeast Candida parapsilosis.* Curr Genet, 2009. **55**(5): p. 497-509.
51. Wingard, J.R., *Importance of Candida species other than C. albicans as pathogens in oncology patients.* Clin Infect Dis, 1995. **20**(1): p. 115-25.
52. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond Candida albicans and Aspergillus fumigatus.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(10): p. 4419-31.
53. Pfaller, M.A., et al., *Candida guilliermondii, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(10): p. 3551-6.
54. Krcmery, V. and A.J. Barnes, *Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance.* J Hosp Infect, 2002. **50**(4): p. 243-60.
55. Colombo, A.L., et al., *Outbreak of Candida rugosa candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2003. **46**(4): p. 253-7.
56. Dube, M.P., et al., *Fungemia and colonization with nystatin-resistant Candida rugosa in a burn unit.* Clin Infect Dis, 1994. **18**(1): p. 77-82.
57. Pfaller, M.A., et al., *Candida rugosa, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(10): p. 3578-82.

58. Poulain, D., *Physiopathologie des candidoses systémiques*, in *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités. Les Mycoses.*, F. Dromer and O. Lortholary, Editors. 2003, Elsevier: Paris. p. 105-124.
59. Reagan, D.R., et al., *Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe.* J Clin Microbiol, 1990. **28**(12): p. 2733-8.
60. Filler, S.G. and D.C. Sheppard, *Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells.* PLoS Pathog, 2006. **2**(12): p. e129.
61. de Repentigny, L., et al., *Characterization of binding of Candida albicans to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells.* Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3172-9.
62. Naglik, J.R., S.J. Challacombe, and B. Hube, *Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis.* Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(3): p. 400-28, table of contents.
63. Klis, F.M., P. de Groot, and K. Hellingwerf, *Molecular organization of the cell wall of Candida albicans.* Med Mycol, 2001. **39 Suppl 1**: p. 1-8.
64. Tronchin, G., et al., *Adherence mechanisms in human pathogenic fungi.* Med Mycol, 2008. **46**(8): p. 749-72.
65. Kanbe, T., et al., *Evidence that mannans of Candida albicans are responsible for adherence of yeast forms to spleen and lymph node tissue.* Infect Immun, 1993. **61**(6): p. 2578-84.
66. Kanbe, T. and J.E. Cutler, *Minimum chemical requirements for adhesin activity of the acid-stable part of Candida albicans cell wall phosphomannoprotein complex.* Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 5812-8.
67. Dalle, F., et al., *Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of Candida albicans blastospores to human enterocytes in vitro.* Infect Immun, 2003. **71**(12): p. 7061-8.
68. Dromer, F., et al., *Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast Candida albicans.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(12): p. 3869-76.
69. Timpel, C., et al., *Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen candida albicans.* J Bacteriol, 2000. **182**(11): p. 3063-71.
70. Munro, C.A., et al., *Mnt1p and Mnt2p of Candida albicans are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence.* J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1051-60.
71. Sheppard, D.C., et al., *Functional and structural diversity in the Als protein family of Candida albicans.* J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30480-9.

72. Santoni, G., et al., *Candida albicans expresses a fibronectin receptor antigenically related to alpha 5 beta 1 integrin.* Microbiology, 1994. **140 (Pt 11)**: p. 2971-9.
73. Klotz, S.A., M.L. Pendrak, and R.C. Hein, *Antibodies to alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with Candida albicans alcohol dehydrogenase.* Microbiology, 2001. **147**(Pt 11): p. 3159-64.
74. Ray, T.L. and C.D. Payne, *Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for Candida acid proteinase.* Infect Immun, 1988. **56**(8): p. 1942-9.
75. Hazan, I., M. Sepulveda-Becerra, and H. Liu, *Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in Candida albicans.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 134-45.
76. Brega, E., R. Zufferey, and C.B. Mamoun, *Candida albicans Csy1p is a nutrient sensor important for activation of amino acid uptake and hyphal morphogenesis.* Eukaryot Cell, 2004. **3**(1): p. 135-43.
77. Gale, C.A., et al., *Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in Candida albicans to a single gene, INT1.* Science, 1998. **279**(5355): p. 1355-8.
78. Nantel, A., et al., *Transcription profiling of Candida albicans cells undergoing the yeast-to-hyphal transition.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(10): p. 3452-65.
79. Staab, J.F., C.A. Ferrer, and P. Sundstrom, *Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on Candida albicans.* J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6298-305.
80. Wolyniak, M.J. and P. Sundstrom, *Role of actin cytoskeletal dynamics in activation of the cyclic AMP pathway and HWP1 gene expression in Candida albicans.* Eukaryot Cell, 2007. **6**(10): p. 1824-40.
81. Lengeler, K.B., et al., *Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence.* Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 746-85.
82. Staab, J.F. and P. Sundstrom, *Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of Candida albicans.* Yeast, 1998. **14**(7): p. 681-6.
83. Poulain, D., *Candida albicans, plasticity and pathogenesis.* Crit Rev Microbiol, 2013.
84. Staab, J.F., et al., *Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Candida albicans Hwp1.* Science, 1999. **283**(5407): p. 1535-8.
85. Sundstrom, P., E. Balish, and C.M. Allen, *Essential role of the Candida albicans transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal*

oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. J Infect Dis, 2002. **185**(4): p. 521-30.
86. Courouge, M., et al., *Celiac disease patients present high prevalence of antibodies generated during Candida albicans infectionamong which anti-hyphal wall protein 1 profiles parallel with anti-gliadin*, in *10th Candida and candidiasis* ASM, Editor 2010: Miami.
87. Nobile, C.J., et al., *Function of Candida albicans adhesin Hwp1 in biofilm formation.* Eukaryot Cell, 2006. **5**(10): p. 1604-10.
88. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 167-93.
89. Ramage, G., et al., *Our current understanding of fungal biofilms.* Crit Rev Microbiol, 2009. **35**(4): p. 340-55.
90. Finkel, J.S. and A.P. Mitchell, *Genetic control of Candida albicans biofilm development.* Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(2): p. 109-18.
91. Casadevall, A. and L.A. Pirofski, *The damage-response framework of microbial pathogenesis.* Nat Rev Microbiol, 2003. **1**(1): p. 17-24.
92. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe sepsis and septic shock.* N Engl J Med, 2013. **369**(21): p. 2063.
93. Moens, E. and M. Veldhoen, *Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours.* Immunology, 2012. **135**(1): p. 1-8.
94. Pamer, E.G., *Immune responses to commensal and environmental microbes.* Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1173-8.
95. Boirivant, M., A. Amendola, and A. Butera, *Intestinal microflora and immunoregulation.* Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S47-9.
96. Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition of the indigenous microbial flora.* Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S10-4.
97. Gow, N.A., et al., *Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization.* Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(2): p. 112-22.
98. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
99. van der Poll, T. and S.M. Opal, *Host-pathogen interactions in sepsis.* Lancet Infect Dis, 2008. **8**(1): p. 32-43.
100. Romani, L., *Immunity to fungal infections.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 275-88.
101. Netea, M.G., et al., *An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system.* Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(1): p. 67-78.

102. Jouault, T., et al., *Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by Candida albicans.* Cell Microbiol, 2009. **11**(7): p. 1007-15.
103. Cunha, C., et al., *DAMP signaling in fungal infections and diseases.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 286.
104. Fradin, C., et al., *Beta-1,2 oligomannose adhesin epitopes are widely distributed over the different families of Candida albicans cell wall mannoproteins and are associated through both N- and O-glycosylation processes.* Infect Immun, 2008. **76**(10): p. 4509-17.
105. Romani, L., *Immunity to fungal infections.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 1-23.
106. van Asbeck, E.C., et al., *Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells.* BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 229.
107. Sheriff, S., C.Y. Chang, and R.A. Ezekowitz, *Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil.* Nat Struct Biol, 1994. **1**(11): p. 789-94.
108. Ip, W.K., et al., *Mannose-binding lectin and innate immunity.* Immunol Rev, 2009. **230**(1): p. 9-21.
109. Lillegard, J.B., et al., *Recognition of Candida albicans by mannan-binding lectin in vitro and in vivo.* J Infect Dis, 2006. **193**(11): p. 1589-97.
110. Walport, M.J., *Complement. First of two parts.* N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
111. van Rozendaal, B.A., et al., *Role of pulmonary surfactant protein D in innate defense against Candida albicans.* J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 917-22.
112. Villamon, E., et al., *Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against Candida albicans infections.* Microbes Infect, 2004. **6**(1): p. 1-7.
113. Villamon, E., et al., *Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to Candida albicans in a murine model of disseminated candidiasis.* Microbes Infect, 2004. **6**(6): p. 542-8.
114. Netea, M.G., et al., *Toll-like receptor 2 suppresses immunity against Candida albicans through induction of IL-10 and regulatory T cells.* J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3712-8.
115. Del Sero, G., et al., *Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice.* Microbes Infect, 1999. **1**(14): p. 1169-80.
116. Roilides, E., et al., *Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against Candida albicans and Staphylococcus aureus.* J Infect Dis, 1998. **178**(6): p. 1734-42.

117. Murciano, C., et al., *Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to Candida albicans in a model of hematogenously disseminated infection.* Med Mycol, 2006. **44**(2): p. 149-57.
118. van der Graaf, C.A., et al., *Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by Candida albicans blastoconidia and hyphae.* Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7458-64.
119. Van der Graaf, C.A., et al., *Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection.* Eur Cytokine Netw, 2006. **17**(1): p. 29-34.
120. van der Graaf, C.A., et al., *Candida-specific interferon-gamma deficiency and toll-like receptor polymorphisms in patients with chronic mucocutaneous candidiasis.* Neth J Med, 2003. **61**(11): p. 365-9.
121. Reid, D.M., N.A. Gow, and G.D. Brown, *Pattern recognition: recent insights from Dectin-1.* Curr Opin Immunol, 2009. **21**(1): p. 30-7.
122. Carvalho, A., et al., *Genetic variability of innate immunity impacts human susceptibility to fungal diseases.* Int J Infect Dis, 2010. **14**(6): p. e460-8.
123. van de Veerdonk, F.L. and M.G. Netea, *T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses.* Curr Fungal Infect Rep, 2010. **4**(4): p. 238-243.
124. Sarazin, A., D. Poulain, and T. Jouault, *In vitro pro- and anti-inflammatory responses to viable Candida albicans yeasts by a murine macrophage cell line.* Med Mycol, 2010. **48**(7): p. 912-21.
125. Smeekens, S.P., et al., *The Candida Th17 response is dependent on mannan- and beta-glucan-induced prostaglandin E2.* Int Immunol, 2010. **22**(11): p. 889-95.
126. Bedoya, S.K., et al., *Th17 cells in immunity and autoimmunity.* Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 986789.
127. Yang, Y., et al., *Focused specificity of intestinal T17 cells towards commensal bacterial antigens.* Nature, 2014.
128. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
129. Bonifazi, P., et al., *Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal Candida albicans.* Mucosal Immunol, 2009. **2**(4): p. 362-74.
130. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, *Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach.* Lancet Infect Dis, 2013. **13**(3): p. 260-8.
131. Fenoglio, D., et al., *Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to Candida albicans.* Blood, 2009. **113**(26): p. 6611-8.

132. Lain, A., et al., *Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of Candida albicans hyphal wall protein 1.* BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 35.
133. Lain, A., et al., *Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect immunoglobulin G antibody to enolase for serodiagnosis of invasive candidiasis.* Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(3): p. 318-9.
134. Sendid, B., et al., *Antibodies against glucan, chitin, and Saccharomyces cerevisiae mannan as new biomarkers of Candida albicans infection that complement tests based on C. albicans mannan.* Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(12): p. 1868-77.
135. Sendid, B., et al., *Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic Candida species.* J Med Microbiol, 2002. **51**(5): p. 433-42.
136. Sendid, B., et al., *New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating Candida albicans mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis.* J Clin Microbiol, 1999. **37**(5): p. 1510-7.
137. Chiani, P., et al., *Anti-beta-glucan antibodies in healthy human subjects.* Vaccine, 2009. **27**(4): p. 513-9.
138. Ishibashi, K., et al., *Role of anti-beta-glucan antibody in host defense against fungi.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. **44**(1): p. 99-109.
139. Casadevall, A., *Antibody immunity and invasive fungal infections.* Infect Immun, 1995. **63**(11): p. 4211-8.
140. Cassone, A., F. De Bernardis, and A. Torososantucci, *An outline of the role of anti-Candida antibodies within the context of passive immunization and protection from candidiasis.* Curr Mol Med, 2005. **5**(4): p. 377-82.
141. Smeekens, S.P., et al., *Genetic susceptibility to Candida infections.* EMBO Mol Med, 2013. **5**(6): p. 805-13.
142. Glocker, E.O., et al., *A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections.* N Engl J Med, 2009. **361**(18): p. 1727-35.
143. van de Veerdonk, F.L., et al., *STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis.* N Engl J Med, 2011. **365**(1): p. 54-61.
144. Puel, A., et al., *Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity.* Science, 2011. **332**(6025): p. 65-8.
145. Ouederni, M., et al., *Clinical features of Candidiasis in patients with inherited interleukin 12 receptor beta1 deficiency.* Clin Infect Dis, 2014. **58**(2): p. 204-13.

146. Pfaller, M.A., et al., *Candida bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009).* Int J Antimicrob Agents, 2011. **38**(1): p. 65-9.
147. Pittet, D., et al., *Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients.* Ann Surg, 1994. **220**(6): p. 751-8.
148. Charles, P.E., et al., *Candida spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study.* Intensive Care Med, 2005. **31**(3): p. 393-400.
149. Tortorano, A.M., et al., *Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008).* Mycoses, 2012. **55**(1): p. 73-9.
150. Leroy, O., et al., *Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006).* Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1612-8.
151. Wey, S.B., et al., *Risk factors for hospital-acquired candidemia. A matched case-control study.* Arch Intern Med, 1989. **149**(10): p. 2349-53.
152. Blumberg, H.M., et al., *Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey.* Clin Infect Dis, 2001. **33**(2): p. 177-86.
153. Hung, C.Y., et al., *Invasive fungal infection among hematopoietic stem cell transplantation patients with mechanical ventilation in the intensive care unit.* BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 44.
154. Leroy, O., et al., *Comparison of albicans vs. non-albicans candidemia in French intensive care units.* Crit Care, 2010. **14**(3): p. R98.
155. Chalmers, C., et al., *Epidemiology and management of candidaemia--a retrospective, multicentre study in five hospitals in the UK.* Mycoses, 2011. **54**(6): p. e795-800.
156. Colombo, A.L., et al., *Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(8): p. 2816-23.
157. Cleveland, A.A., et al., *Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011.* Clin Infect Dis, 2012. **55**(10): p. 1352-61.
158. Sanglard, D. and F.C. Odds, *Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences.* Lancet Infect Dis, 2002. **2**(2): p. 73-85.

159. Garey, K.W., et al., *Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study.* Clin Infect Dis, 2006. **43**(1): p. 25-31.
160. Kumar, A., *poster K-2174*, in *ICAAC*2007: Chicago.
161. Rex, J. and D. Stevens, *Systemic Antifungal Agents*, in *Principles and Practice of Infectious Diseases*, G. Mandell, J. Benett, and R. Dolin, Editors. 2010, Elsevier: Philadelphia. p. 549-563.
162. Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet, *Management of Candida species infections in critically ill patients.* Lancet Infect Dis, 2003. **3**(12): p. 772-85.
163. Kuhn, D.M., et al., *Antifungal susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(6): p. 1773-80.
164. Rex, J.H., et al., *A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute.* N Engl J Med, 1994. **331**(20): p. 1325-30.
165. Nguyen, M.H., et al., *Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study.* Arch Intern Med, 1995. **155**(22): p. 2429-35.
166. Herbrecht, R., et al., *Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis.* N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 408-15.
167. Cornely, O.A., et al., *Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia.* N Engl J Med, 2007. **356**(4): p. 348-59.
168. Ullmann, A.J., et al., *Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease.* N Engl J Med, 2007. **356**(4): p. 335-47.
169. Ernst, E.J., M.E. Klepser, and M.A. Pfaller, *Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against Candida albicans and Cryptococcus neoformans.* Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(4): p. 1108-11.
170. Mora-Duarte, J., et al., *Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis.* N Engl J Med, 2002. **347**(25): p. 2020-9.
171. Walsh, T.J., et al., *Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia.* N Engl J Med, 2004. **351**(14): p. 1391-402.
172. Reboli, A.C., et al., *Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis.* N Engl J Med, 2007. **356**(24): p. 2472-82.

173. Kuse, E.R., et al., *Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial.* Lancet, 2007. **369**(9572): p. 1519-27.
174. Pappas, P.G., et al., *Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis.* Clin Infect Dis, 2007. **45**(7): p. 883-93.
175. van Burik, J.A., et al., *Micafungin versus fluconazole for prophylaxis against invasive fungal infections during neutropenia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation.* Clin Infect Dis, 2004. **39**(10): p. 1407-16.
176. Lortholary, O., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS.* Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 68-77.
177. Ullmann, A.J., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT).* Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 53-67.
178. Hope, W.W., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp.* Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 38-52.
179. Cornely, O.A., et al., *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients.* Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 7**: p. 19-37.
180. Arnow, P.M. and J.P. Flaherty, *Fever of unknown origin.* Lancet, 1997. **350**(9077): p. 575-80.
181. O'Grady, N.P., et al., *Guidelines for evaluation of new fever in critically ill adult patients: 2008 update from the American College of Critical Care Medicine and the Infectious Diseases Society of America.* Crit Care Med, 2008. **36**(4): p. 1330-49.
182. Parkins, M.D., et al., *Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive Candida species infections.* J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(3): p. 613-8.
183. Golan, Y., et al., *Empirical anti-Candida therapy among selected patients in the intensive care unit: a cost-effectiveness analysis.* Ann Intern Med, 2005. **143**(12): p. 857-69.
184. Azoulay, E., et al., *Systemic antifungal therapy in critically ill patients without invasive fungal infection*.* Crit Care Med, 2012. **40**(3): p. 813-22.
185. De Pauw, B., et al., *Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National*

Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis, 2008. **46**(12): p. 1813-21.
186. Paphitou, N.I., L. Ostrosky-Zeichner, and J.H. Rex, *Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care unit: approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials.* Med Mycol, 2005. **43**(3): p. 235-43.
187. Ostrosky-Zeichner, L., et al., *Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007. **26**(4): p. 271-6.
188. Hermsen, E.D., et al., *Validation and comparison of clinical prediction rules for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a matched case-control study.* Crit Care, 2011. **15**(4): p. R198.
189. Ostrosky-Zeichner, L., et al., *Improvement of a clinical prediction rule for clinical trials on prophylaxis for invasive candidiasis in the intensive care unit.* Mycoses, 2011. **54**(1): p. 46-51.
190. Leon, C., et al., *A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization.* Crit Care Med, 2006. **34**(3): p. 730-7.
191. Leon, 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, 2009. **37**(5): p. 1624-33.
192. Dupont, H., et al., *Can yeast isolation in peritoneal fluid be predicted in intensive care unit patients with peritonitis?* Crit Care Med, 2003. **31**(3): p. 752-7.
193. Ostrosky-Zeichner, L., *Clinical prediction rules for invasive candidiasis in the ICU: ready for prime time?* Crit Care, 2011. **15**(5): p. 189.
194. Meersseman, W., et al., *Significance of the isolation of Candida species from airway samples in critically ill patients: a prospective, autopsy study.* Intensive Care Med, 2009. **35**(9): p. 1526-31.
195. Eggimann, P., et al., *Invasive candidiasis: comparison of management choices by infectious disease and critical care specialists.* Intensive Care Med, 2005. **31**(11): p. 1514-21.
196. Hanson, K.E., et al., *beta-D-glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a randomized pilot study.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42282.
197. Ostrosky-Zeichner, L., et al., *MSG-01: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Caspofungin Prophylaxis Followed by*

Preemptive Therapy for Invasive Candidiasis in High-Risk Adults in the Critical Care Setting. Clin Infect Dis, 2014. **58**(9): p. 1219-26.
198. Mira, J.P., et al., *Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study.* JAMA, 1999. **282**(6): p. 561-8.
199. Lorenz, E., et al., *A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection.* Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6398-401.
200. Texereau, J., et al., *The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections.* Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 7**: p. S408-15.
201. Debard, A.L., et al., *FcgammaRIIIb and complement component C7 codeficiency in a patient with recurrence of fulminant meningococcal septic shock.* Clin Infect Dis, 2005. **40**(11): p. 1679-83.
202. Constantin, J.M., et al., *Lemierre's syndrome and genetic polymorphisms: a case report.* BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 115.
203. Abel, L., et al., *Human genetics of tuberculosis: a long and winding road.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1645): p. 20130428.
204. Bochud, P.Y., et al., *Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation.* N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1766-77.
205. Wojtowicz, A., et al., *Polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha increase susceptibility to intra-abdominal Candida infection in high-risk surgical ICU patients*.* Crit Care Med, 2014. **42**(4): p. e304-8.
206. Groll, A.H., et al., *Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital.* J Infect, 1996. **33**(1): p. 23-32.
207. Berenguer, J., et al., *Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection.* Diagn Microbiol Infect Dis, 1993. **17**(2): p. 103-9.
208. Jones, J.M., *Laboratory diagnosis of invasive candidiasis.* Clin Microbiol Rev, 1990. **3**(1): p. 32-45.
209. Horvath, L.L., B.J. George, and D.R. Hospenthal, *Detection of fifteen species of Candida in an automated blood culture system.* J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 3062-4.
210. Horvath, L.L., et al., *Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(1): p. 115-8.
211. Horvath, L.L., et al., *Direct isolation of Candida spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(6): p. 2629-32.

212. Croxatto, A., G. Prod'hom, and G. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.* FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(2): p. 380-407.
213. Bizzini, A., et al., *Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory.* J Clin Microbiol, 2010. **48**(5): p. 1549-54.
214. Lacroix, C., et al., *Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of Candida species.* Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(2): p. 153-8.
215. Avni, T., L. Leibovici, and M. Paul, *PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis.* J Clin Microbiol, 2011. **49**(2): p. 665-70.
216. Khot, P.D. and D.N. Fredricks, *PCR-based diagnosis of human fungal infections.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2009. **7**(10): p. 1201-21.
217. Reiss, E. and C.J. Morrison, *Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis.* Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(4): p. 311-23.
218. Lau, A., et al., *Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR.* J Clin Microbiol, 2010. **48**(3): p. 811-6.
219. Lau, A., et al., *Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(9): p. 3021-7.
220. Lamoth, F., et al., *Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia.* J Clin Microbiol, 2010. **48**(10): p. 3510-6.
221. Wallet, F., et al., *Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood.* Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(6): p. 774-9.
222. Alanio, A. and S. Bretagne, *Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand?* Clin Microbiol Infect, 2014. **20 Suppl 6**: p. 36-41.
223. Mitsutake, K., et al., *Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia.* J Clin Microbiol, 1996. **34**(8): p. 1918-21.
224. Li, F.Q., et al., *Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against Candida enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia.* BMC Infect Dis, 2013. **13**: p. 253.
225. Lehtonen, L., et al., *Diagnosis of disseminated candidiasis by measurement of urine D-arabinitol/L-arabinitol ratio.* J Clin Microbiol, 1996. **34**(9): p. 2175-9.

226. Eisen, D.P., et al., *Urine D-arabinitol/L-arabinitol ratio in diagnosing Candida infection in patients with haematological malignancy and HIV infection.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2002. **42**(1): p. 39-42.
227. Yeo, S.F., et al., *Measurement of serum D-arabinitol/creatinine ratios for initial diagnosis and for predicting outcome in an unselected, population-based sample of patients with Candida fungemia.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(11): p. 3894-9.
228. Obayashi, T., et al., *Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes.* Lancet, 1995. **345**(8941): p. 17-20.
229. Ohno, N., et al., *Solubilization of yeast cell-wall beta-(1-->3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction.* Carbohydr Res, 1999. **316**(1-4): p. 161-72.
230. Ueda, Y., et al., *Factor G utilizes a carbohydrate-binding cleft that is conserved between horseshoe crab and bacteria for the recognition of beta-1,3-D-glucans.* J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3810-8.
231. Weiner, M.H. and M. Coats-Stephen, *Immunodiagnosis of systemic candidiasis: mannan antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental and human infections.* J Infect Dis, 1979. **140**(6): p. 989-93.
232. Poulain, D., et al., *Clearances of Candida albicans-derived alpha- and beta-linked mannose residues in sera from patients with candidiasis.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1997. **16**(1): p. 16-20.
233. Sendid, B., et al., *Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(1): p. 164-71.
234. Rimek, D., J. Singh, and R. Kappe, *Cross-reactivity of the PLATELIA CANDIDA antigen detection enzyme immunoassay with fungal antigen extracts.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3395-8.
235. Prella, M., et al., *Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **51**(2): p. 95-101.
236. Mikulska, M., et al., *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, 2010. **14**(6): p. R222.
237. Ostrosky-Zeichner, L., et al., *Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans.* Clin Infect Dis, 2005. **41**(5): p. 654-9.

238. Nguyen, M.H., et al., *Performance of Candida real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis.* Clin Infect Dis, 2012. **54**(9): p. 1240-8.
239. Mohr, J.F., et al., *Prospective survey of (1-->3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting.* J Clin Microbiol, 2011. **49**(1): p. 58-61.
240. Digby, J., et al., *Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients.* Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(5): p. 882-5.
241. Senn, L., et al., *1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia.* Clin Infect Dis, 2008. **46**(6): p. 878-85.
242. Ellis, M., et al., *Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever.* J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 3): p. 287-95.
243. Odabasi, Z., et al., *Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome.* Clin Infect Dis, 2004. **39**(2): p. 199-205.
244. Held, J., et al., *Comparison of (1->3)-beta-D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec Candida antigen as serum biomarkers for candidemia.* J Clin Microbiol, 2013. **51**(4): p. 1158-64.
245. Tissot, F., et al., *beta-glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis.* Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(9): p. 1100-9.
246. Leon, C., et al., *Value of beta-D-glucan and Candida albicans germ tube antibody for discriminating between Candida colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions.* Intensive Care Med, 2012. **38**(8): p. 1315-25.
247. Karageorgopoulos, D.E., et al., *beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis.* Clin Infect Dis, 2011. **52**(6): p. 750-70.
248. Marty, F.M., et al., *Reactivity of (1-->3)-beta-d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3450-3.
249. Jaijakul, S., et al., *(1,3)-beta-D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis.* Clin Infect Dis, 2012. **55**(4): p. 521-6.
250. Damiens, S., et al., *Characterization of the recognition of Candida species by mannose-binding lectin using surface plasmon resonance.* Analyst, 2013. **138**(8): p. 2477-82.

251. Jawhara, S., et al., *Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions.* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40648.
252. Arguelles, J.C., *Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis.* Arch Microbiol, 2000. **174**(4): p. 217-24.
253. Ruhal, R., R. Kataria, and B. Choudhury, *Trends in bacterial trehalose metabolism and significant nodes of metabolic pathway in the direction of trehalose accumulation.* Microb Biotechnol, 2013. **6**(5): p. 493-502.
254. Elbein, A.D., et al., *New insights on trehalose: a multifunctional molecule.* Glycobiology, 2003. **13**(4): p. 17R-27R.
255. Spargo, B.J., et al., *Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 737-40.
256. Chandra, G., K.F. Chater, and S. Bornemann, *Unexpected and widespread connections between bacterial glycogen and trehalose metabolism.* Microbiology, 2011. **157**(Pt 6): p. 1565-72.
257. Brown, J., et al., *Stress responses in Candida*, in *Candida and Candidiasis*, R. Calderone and C. Clancy, Editors. 2012, ASM Press: Washington, DC. p. 225-242.
258. Serneels, J., H. Tournu, and P. Van Dijck, *Tight control of trehalose content is required for efficient heat-induced cell elongation in Candida albicans.* J Biol Chem, 2012. **287**(44): p. 36873-82.
259. Sanchez-Fresneda, R., et al., *Specific stress-induced storage of trehalose, glycerol and D-arabitol in response to oxidative and osmotic stress in Candida albicans.* Biochem Biophys Res Commun, 2013. **430**(4): p. 1334-9.
260. Chen, Q. and G.G. Haddad, *Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals.* J Exp Biol, 2004. **207**(Pt 18): p. 3125-9.
261. Alvarez-Peral, F.J., et al., *Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in Candida albicans.* Microbiology, 2002. **148**(Pt 8): p. 2599-606.
262. Vylkova, S. and M. Lorenz, *Encounters with Mammalian Cells: Survival Strategies of Candida Species*, in *Candida and Candidiasis*, C. RA and C. Clancy, Editors. 2012, ASM Press: Washington, DC. p. 261-282.
263. Gonzalez-Parraga, P., et al., *Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in Candida albicans.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1810**(8): p. 777-83.