

# Induction *in vitro* de résistance à la caspofungine chez *Candida glabrata*

## Introduction

En France, l'incidence annuelle de candidémies est de 6 à 7 000 cas par an, plaçant ainsi l'espèce *Candida* au 5<sup>ème</sup> rang des espèces responsables de septicémies nosocomiales. Depuis le début du siècle, *Candida glabrata* tend à devenir l'espèce la plus fréquemment rencontrée après *C. albicans*, notamment en Europe du Nord.

Une étude rétrospective des candidémies sur l'hôpital de Nantes a montré que *Candida glabrata* était la troisième espèce en terme d'incidence. Il s'agit donc des espèces du genre *Candida sp.* pour laquelle il y a une émergence de résistance aux échinocandines. Les échinocandines ont rapidement remplacé les azolés en thérapie de première ligne pour les candidoses invasives dans les cas de patients immunodéprimés ou neutropéniques.

De plus, le recours aux échinocandines reste la meilleure alternative pour *C. glabrata* et *C. krusei* en cas de résistance intrinsèque aux azolés.

La caspofungine agit en inhibant la synthèse du (1,3)-D-glucane, un constituant principal de la paroi cellulaire des levures. Le mécanisme de résistance se fait par des mutations sur les gènes FKS1 et FKS2.

L'objectif de cette étude est de générer des isolats de *Candida glabrata* résistants à la caspofungine *in vitro* en soumettant des isolats cliniques à une pression de sélection grâce à des concentrations antifongiques correspondant à leur CMI/2 et à leur CMI/4.

## Matériels et méthodes

### ✓ Molécule utilisée : caspofungine

La caspofungine est un hexapeptide cyclique synthétisé à partir d'un produit de fermentation de *Glarea lozoyensis*.

Son activité fongicide a été démontrée sur le genre *Candida sp.*

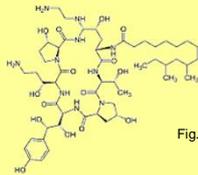


Fig. 1 : Structure de la molécule de caspofungine

### ✓ Choix des souches :

2 isolats cliniques de *Candida glabrata* (CHU de Nantes) :

➢ CAGL 18

➢ CAGL 20

2 souches de référence ATCC® :

➢ ATCC 22019 (*C. krusei*)

➢ ATCC 6258 (*C. parapsilosis*)



### Détermination des CMI

Pour contrôler l'induction de la résistance à la caspofungine sur les souches de *Candida glabrata*, des CMI sont réalisées régulièrement, selon la méthode CLSI, une technique de référence américaine. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration de caspofungine pour laquelle on observe 50% d'inhibition de la croissance, par rapport à un témoin de culture positif. Des concentrations croissantes de caspofungine sont utilisées.

La lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37 °C.

La souche sera considérée comme sensible si la CMI est  $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$  et résistante si sa CMI est  $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$ .

Concentration caspofungine ( $\mu\text{g/mL}$ ) : 0,016 0,031 0,062 0,125 0,25 0,5 1 2 4 8

CAGL18 Isolât A

CAGL18 Isolât B

CAGL18 Isolât C

CAGL18 Isolât D

CAGL18 Isolât E

Souche CAGL18

Souche ATCC 22019

Souche ATCC 6258

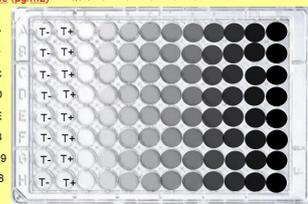


Fig. 2 : Plan de plaque 96 puits pour les CMI

## Protocole

### Induction de la résistance à la caspofungine

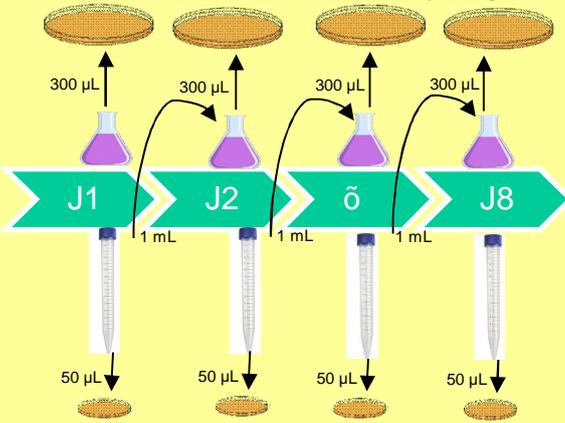


Fig. 3 : Protocole mis au point :

Toutes les 24h, ensemencement de 300  $\mu\text{L}$  de milieu de culture sur boîte de Pétri. Centrifugation du milieu à 2500 rpm pendant 5 min, reprise du culot dans le milieu de culture (à 0,5 - 1 Mc Farland) pour ensemencement de 50  $\mu\text{L}$  sur boîte de Pétri et de 1 mL pour dans l'érlenmeyer J+1.

### Evaluation de la résistance à la caspofungine

J0

Ensemencement des souches initiales sur pentes Sabouraud  
Réalisation d'une CMI (CMI de « départ », avant toute pression)

J4 + 1

Ensemencement des souches du jour n°4 sur pentes Sabouraud  
Réalisation d'une CMI (éventuel constat de résistance)

J8 + 1

Ensemencement des souches du jour n°8 sur pentes Sabouraud  
Réalisation d'une CMI (observation d'une stabilité de la résistance ou non)



Fig. 4 : Colonies de *Candida glabrata* sur Sabouraud

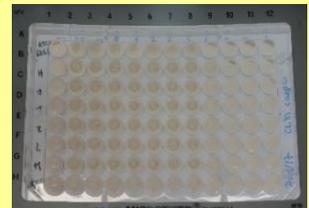


Fig. 5 : Plaque 96 puits pour lecture de la CMI

## Résultats

Après 8 jours de traitement par la caspofungine à  $0,125 \mu\text{g/mL}$ , les CMI ont été déterminées par la méthode CLSI.

Tab. 1: CMI obtenues par la méthode CLSI à J8

CAGL18	Isolat « E »	Isolat « F »	Isolat « G »
0,5 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$

À l'issue de mon stage, un Etest® a été réalisé au laboratoire de mycologie médicale du CHU sur la souche initiale (CAGL18) ainsi que sur l'isolat « G »

Tab. 2: CMI obtenues par l'E-test à J8

	CAGL18	Isolat « G »
24h	0,19 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
48h	0,25 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$



Fig. 6 : Etest®

## Conclusion et perspectives

Le protocole mis au point a permis, par pression de sélection, l'induction *in vitro* d'isolats de *Candida glabrata* pour lesquels un shift de CMI a été constaté par la méthode de référence CLSI puis confirmé par Etest®. Un phénomène de résistance physiologique a donc été observé et l'objectif du stage a été atteint.

Ce travail va se poursuivre par la caractérisation du mécanisme de résistance impliqué. Pour cela, un séquençage des gènes FKS1 et FKS2, décrits comme étant impliqués dans les mécanismes de résistance de *C. glabrata* aux échinocandines va être réalisé.

Si aucune des mutations connues sur ces deux gènes ne sont observées, il faudra envisager de nouveaux essais avec des traitements sur une durée plus longue ou avec des doses différentes.