Année 2018/2019 N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Victor MERCIER

Né le 16/02/1988 à Orléans (45)

Approche protéomique de la physiopathologie des infections à *Candida albicans* à partir d'un modèle animal

---

Présentée et soutenue publiquement le 5 septembre 2019 devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Hélène BLASCO, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine – Tours

Membres du Jury :

Professeur Jacques CHANDENIER, Service de Parasitologie – Mycologie et Médecine Tropicale, Faculté de Médecine – Tours

Professeur Philippe LANOTTE, Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Hygiène Hospitalière, Faculté de Pharmacie – Tours

Docteur Éric BAILLY, PH, Service de Parasitologie – Mycologie et Médecine Tropicale – Tours

Directeur de thèse : Professeur Guillaume DESOUBEAUX, Service de Parasitologie – Mycologie et Médecine Tropicale, Faculté de Médecine – Tours

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN
Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN
Pr Henri MARRET

ASSESSEURS
Pr Denis ANGOULVANT, Pédagogie
Pr Mathias BUCHLER, Relations internationales
Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, Moyens – relations avec l'Université
Pr Clarisse DIBAO-DINA, Médecine générale
Pr François MAILLOT, Formation Médicale Continue
Pr Patrick VOURC'H, Recherche

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE
Mme Fanny BOBLETER

****

DOYENS HONORAIRES
Pr Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Pr Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Pr André GOUAZE - 1972-1994
Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES
Pr Daniel ALISON
Pr Philippe ARBEILLE
Pr Catherine BARTHELEMY
Pr Gilles BODY
Pr Jacques CHANDENIER
Pr Alain CHANTEPIE
Pr Pierre COSNAY
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr. Dominique GOGA
Pr Alain GOUDEAU
Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ
Pr Gérard LORETTE
Pr Roland QUENTIN
Pr Elie SALIBA

PROFESSEURS HONORAIRES
P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P.BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINE – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D. ROYERE - A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian.....Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis..... Cardiologie
AUPART Michel.....Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique ..... Cardiologie
BAKHOS David ..... Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas..... Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle.....Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe ..... Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora .....Pharmacologie clinique
BERNARD Anne ..... Cardiologie
BERNARD Louis ..... Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle .... Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique..... Physiologie
BRILHAULT Jean ..... Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent .....Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck..... Urologie
BUCHLER Matthias.....Néphrologie
CALAIS Gilles .....Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent ..... Psychiatrie d'adultes
COLOMBAT Philippe ..... Hématologie, transfusion
CORCIA Philippe ..... Neurologie
COTTIER Jean-Philippe .....Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand ..... Neurologie
DEQUIN Pierre-François.....Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume ..... Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe ..... Anatomie
DIOT Patrice .....Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague ..... Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri.....Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
DUMONT Pascal.....Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam ..... Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan .....Réanimation
FAUCHIER Laurent ..... Cardiologie
FAVARD Luc.....Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand.....Gériatrie
FOUQUET Bernard.....Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick ..... Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle ..... Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe..... Rhumatologie
GRUEL Yves..... Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice .....Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUYETANT Serge..... Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel ..... Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier..... Urologie
HALIMI Jean-Michel..... Thérapeutique
HANKARD Régis ..... Pédiatrie
HERAULT Olivier ..... Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis .....Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe ..... Biologie cellulaire
LABARTHE François..... Pédiatrie
LAFFON Marc .....Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert..... Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique .....Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry..... Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel..... Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude ..... Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent .....Dermato-vénéréologie
MAILLOT François ..... Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain ..... Pneumologie
MARRET Henri ..... Gynécologie-obstétrique

MARUANI Annabel ..... Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent..... Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine..... Pédiatrie
MORINIERE Sylvain..... Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa ..... Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis..... Rhumatologie
ODENT Thierry.....Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi.....Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna ..... Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles .....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric .....Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Dominique..... Réanimation médicale, médecine d'urgence
PERROTIN Franck.....Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean.....Ophtalmologie
PLANTIER Laurent ..... Physiologie
REMERAND Francis..... Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe ..... Biologie cellulaire
ROSSET Philippe.....Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel.....Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline.....Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem.....Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab .....Dermatologie-vénéréologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria .....Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre ..... Pédiatrie
TOUTAIN Annick..... Génétique
VAILLANT Loïc ..... Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane .....Anatomie
VOURC'H Patrick ..... Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé ..... Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien ..... Soins palliatifs
POTIER Alain.....Médecine Générale
ROBERT Jean.....Médecine Générale

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine ..... Anglais

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BARBIER Louise.....Chirurgie digestive
BERHOUET Julien.....Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNAULT Paul ..... Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès..... Biostat., informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas ..... Cardiologie
DENIS Frédéric.....Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie ..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane ..... Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure.....Hépatologie – gastroentérologie
FAVRAIS Géraldine ..... Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie..... Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe..... Néphrologie
GOUILLEUX Valérie ..... Immunologie
GUILLON Antoine ..... Réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie.....Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille ..... Immunologie

IVANES Fabrice ..... Physiologie
LE GUELLEC Chantal..... Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEFORT Bruno ..... Pédiatrie
LEMAIGNEN Adrien..... Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine ..... Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste ..... Radiologie pédiatrique
PIVER Éric..... Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille..... Médecine légale
ROUMY Jérôme ..... Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte ..... Thérapeutique
TERNANT David..... Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure ..... Génétique
ZEMMOURA Ilyess..... Neurochirurgie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia ..... Neurosciences
BOREL Stéphanie ..... Orthophonie
MONJAUZE Cécile ..... Sciences du langage – orthophonie
NICOGLOU Antonine ..... Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald..... Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile..... Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

RUIZ Christophe..... Médecine Générale
SAMKO Boris..... Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ Ayache..... Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON Sylvie..... Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY Yves ..... Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues ..... Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel ..... Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILOT Philippe..... Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice ..... Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie..... Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie..... Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice..... Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric ..... Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 1253
MAZURIER Frédéric..... Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-Christophe ..... Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET Christophe ..... Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William ..... Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SI TAHAR Mustapha..... Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire..... Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie
DELORE Claire..... Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie ..... Praticien Hospitalier

Pour l'Ecole d'Orthoptie
MAJZOUB Samuel..... Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale
BIRMELE Béatrice..... Praticien Hospitalier

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

Remerciements

A mes maîtres, professeurs, médecins et pharmaciens de compagnonnage auprès de qui je suis devenu docteur.

Aux membres du jury,

A Monsieur le Professeur Guillaume Desoubeaux, je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance pour votre accueil dans le Service de Parasitologie – Mycologie – Médecine Tropicale de Tours, ainsi que pour avoir dirigé cette thèse, votre disponibilité et votre enthousiasme sont des modèles de bienveillance et d'inspiration pour nous tous.

A Madame le Professeur Hélène Blasco, pour avoir accepté d'enrichir le jury de vos compétences. Merci de me faire l'honneur de présider cette thèse.

A Monsieur le Professeur Jacques Chandenier, votre pédagogie et votre parcours sont exemplaires. Merci d'être présent aujourd'hui.

A Monsieur le Professeur Philippe Lanotte, pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Docteur Éric Bailly, je tiens à vous remercier tout particulièrement pour votre écoute, votre ouverture d'esprit, ainsi que pour vos remarques toujours pertinentes et constructives. Votre présence pour juger ce travail compte beaucoup pour moi.

Je remercie l'ensemble du personnel du Service de Parasitologie – Mycologie – Médecine Tropicale pour leur patience et leur disponibilité : Isabelle, Ophélie, Béatrice, Lucie, Nathalie et Jeannine.

Les mots manquent aux émotions, je ne pourrais exprimer toute la sympathie et le respect que j'éprouve à l'ensemble de mes co-internes qui m'ont accompagné durant ces quatre années d'internat. Ils m'ont tous transmis un peu d'eux-mêmes au cours de cette aventure.

En Immunologie, Camille H m'a guidé lors de mes premiers pas en tant que nouvel interne débutant la Biologie Médicale. Au même moment, Nicolas accompagné de FX, m'ont fait découvrir l'activité nocturne de la ville de Tours. Par la suite j'ai eu la chance d'avoir Nicolas comme collègue lors de mon deuxième semestre dans le service de Bactériologie.

Chemin faisant, Amélie ainsi que Joëlle nous ont accueillis avec Camille P en Hématologie. Malgré les obstacles rencontrés au cours du semestre, ce fut une vraie découverte et elles ont su me donner une certaine appétence pour cette discipline. La suite en Biochimie avec Hugo, Myriam et Adeline, fut l'occasion de s'intéresser à la vie italienne et albigeoise lors de diverses tribulations.

A la troisième année d'internat débuta ma formation en Parasitologie-Mycologie. Anaïs, Camille P et moi avons été chaleureusement accueillis par le Professeur Chandenier, le Professeur Desoubeaux ainsi que le Docteur Bailly et avons bénéficié d'une formation qui a un écho au-delà de la Touraine. La trentaine arrivée, ce fut l'occasion de deux voyages inoubliables avec mon père à Amsterdam puis à Berlin qu'il avait connue lors de l'influence soviétique.

Ce semestre vit mon obtention du Diplôme Universitaire de Mycologie Médicale, mon ami de longue date François m'ayant offert le gîte et le couvert lors de mes montées à la Capitale. Surtout, ces six mois virent la naissance d'un projet en partenariat avec nos amis de Dijon initié par Monsieur le Professeur Dalle, qui se concrétisa sous la forme d'un Master 2 Recherche dirigé par le Professeur Desoubeaux. Ce fut l'occasion de retourner sur les bancs de la faculté où j'ai pu retrouver une ancienne connaissance, Luc, et en faire une nouvelle, Sylvain. Je tiens à les remercier tous les deux pour leur appui logistique au cours de ces quelques mois.

Enfin, nous en venons au travail présent. Ce dernier n'aurait pu exister sans le soutien et la compréhension de mes collègues qui m'ont accompagné durant mes deux autres semestres en Parasitologie-Mycologie, Coralie et Tristan dit Gauvin dit Nabi, puis Noémie C et José. Je remercie pour ce travail aussi mes collègues actuels en Bactériologie, Camille P, Victoria, Elsa et Simon.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Lachaud, Monsieur le Professeur Lavigne et Madame le Docteur Sasso du CHU de Nîmes pour la confiance qu'ils me témoignent en m'acceptant parmi eux, au sein de leur Service de Parasitologie-Mycologie.

Je n'oublie pas les autres camarades que j'ai eu l'occasion de croiser, Benjamin, Sébastien, Noémie R, Eve-Anne, Marie-Alix, Caroline, Karl, Jean-Baptiste, Adélaïde, Pierre W, Claire P, Victoria K, Thomas Ma, Joévin, Wayne-Corentin, Amanda, FX, Olivier et Anne, merci à vous tous.

Une reconnaissance éternelle à Jeff Hanneman et Dave Lombardo pour leur soutien moral et physique tout au long de mes études et des difficultés rencontrées.

Je remercie mon frère, Louis-Fabien, pour son soutien malgré sa méconnaissance du milieu médical et hospitalier, ainsi que sa compagne Estelle et leurs trois enfants, Daphné, Louise et Maxime.

Je dédie ce travail à mes parents qui n'auront pas pu connaître cet aboutissement.

A ma Mère, qui m'a appris à m'investir avec passion, puisses-tu avoir trouvé la sérénité que tu cherchais.

A mon Père, qui était une bibliothèque vivante, il m'a transmis des valeurs, une culture et son insatiable curiosité. Il était fier que je perpétue une longue tradition familiale.

Résumé

Introduction : Les candidémies sont des infections fongiques disséminées du sang dues au genre *Candida,* et principalement à *Candida albicans.* L'amélioration des connaissances sur la physiopathologie de ces infections est attendue pour chercher des nouveaux biomarqueurs ou cibles thérapeutiques. Une approche protéomique, utilisant la spectrométrie de masse, a pour but de mieux préciser la réponse de l'hôte durant ces processus infectieux.

Matériel et Méthode : La technologie de spectrométrie de masse nanoflow en chromatographie liquide en tandem a été utilisée pour l'identification directe et la quantification relative des protéines de sérums de souris infectées expérimentalement avec différentes souches de *C. albicans*. Les protéines étaient considérées comme différentiellement représentées lorsque la valeur du T-test (*p*-value) était inférieure à 0,05 et lorsque le Log2 de leur Fold Change était supérieur à 1 ou inférieur à -1 en «Spectral Counting» et en «*eXtracted Ion Chromatogram*».

Résultats : Huit comparaisons entre les différentes conditions deux à deux ont été effectuées. Vingt-trois protéines différentiellement représentées ont été identifiées avec des *Fold Change* entre deux conditions allant de 2,01 à 121,83. Douze protéines impliquées dans la phase aiguë de l'inflammation ont ainsi été observées dans les comparaisons mettant en jeu les souris immunocompétentes non infectées et celles immunocompétentes infectées. Aussi, une plus grande réaction inflammatoire a été notée lorsque l'infection est effectuée par une souche virulente *via* sa capacité à filamenter, par rapport à une souche de moindre virulence, incapable de filamenter. Enfin, l'immunodépression semblait interférer dans la réponse de l'hôte.

Discussion : La spectrométrie de masse apparaît être un outil utile pour des explorations *ex vivo* qui doivent être vues comme une étape préliminaire avant la validation de nouveaux biomarqueurs ou de cibles thérapeutiques au cours des candidémies.

Mots clés : Protéomique, *Candida albicans*, modèle murin

Abstract

Introduction : Candidemia is a bloodstream fungal infection caused by yeasts belonging to the *Candida* genus and more specifically to *Candida albicans* species. Improvement of knowledge about its patho-physiology is expected in order to discover new biomarkers or alternative therapeutic targets. The proteomic approach using mass spectrometry aims at precising the host response during infectious processes like candidemia.

Material and Method : Nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry technology has been used for direct identification and the relative quantification of serum proteins from mice experimentally-infected with different *C. albicans* strains. When comparing different conditions, proteins were considered as differentially-overrepresented when the T-test value (*p*-value) was less than 0.05 and the Log2 of their fold change were more than 1 ou less than -1 in «Spectral Counting» and «*eXtracted Ion Chromatogram*».

Results : Eight comparison sets were completed. Twenty-three proteins were found differentially-represented with respective *Fold Changes* ranging from 2.01 to 121.83. Twelve proteins involved in the acute phase were highlighted in the comparison between the immunocompromised non-infected mice and the immunocompetent infected ones. Also, a higher inflammatory reaction were notified when the infection was initiated with a virulent strain (ability to be filamentous cell) compared to a non-virulent strain (inability to generate filaments). Immunocompromising seemed to interfere within the host response.

Discussion : Mass spectrometry seems to be an useful tool for *ex vivo* studies and must be seen as a preliminary step before the approval of new biomarkers or therapeutic target during candidemia.

Key words : Protéomic, *Candida albicans*, mouse model

Tables des matières

Abréviations usuelles **13**

I - Introduction **14**

1. Présentation du genre *Candida* 14

a. Taxonomie 14

b. Facteurs de virulence 15

c. Démarche diagnostic biologique 16

b. Prise en charge thérapeutique 17

2. Intérêt de l'approche physiopathologique par protéomique 18

3. Objectifs 19

II – Matériel et Méthode **20**

1. Modèle animal de candidémie 20

2. Pré-traitement et fractionnement protéique 21

a. Déplétion des protéines surabondantes 21

b. Dosage de la concentration protéique 21

c. Préparation des gels monodimensionnels 21

3. Extraction protéique 22

4. Traitement par spectrométrie de masse à haute résolution 23

a. Analyse par LC1D-nanoESI-LTQ-Orbitrap 23

b. Interprétation protéomique 23

5. Analyse statistique 24

III – Résultats **25**

1. Constitution des groupes de comparaison 25

2. Comparaisons entre souris immunocompétentes témoins et immunocompétentes infectées 25

3. Comparaisons entre souris immunodéprimées témoins et immunodéprimées infectées 26

4. Comparaisons entre souris infectées immunocompétentes et immunodéprimées infectées 27

IV – Discussion **28**

1. Le modèle murin 28

2. Le challenge infectieux 29

3. La protéomique 30

4. Perspectives 34

V – Références **36**

VI – Figures **42**

VII – Tableaux **48**

VIII – Annexes **54**

Abréviations usuelles

Ag M : Antigène Mannane

ACP : Analyse en Composante Principale

AHSG : Glycoprotéine Alpha 2-HS

ALS : Agglutinin-like sequence

BDG : β (1,3)-D-Glucane

DTT : Dithiothreitol

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FGF : Fibroblast growth factor (facteur de croissance des fibroblastes)

IFI : Infection fongique invasive

LDS : Dodécyl-sulfate de lithium

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight

MOPS : Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique

PAR : Protease-activated receptors

SAP : Secreted aspartyl proteinase

SDS : Sodium dodecylsulfate

TLR : Toll-like receptor

UFC : Unité formant colonie

I – Introduction

Les infections à champignons contribuent largement à la morbidité et à la mortalité des populations, notamment celles qui sont fragilisées parce qu'immunodéprimées (Kohler *et al.* 2015). Le taux de décès à trois mois est de l'ordre de 40 %. Dans l'ensemble, on estime que 1,5 millions d'individus meurent d'infection fongique invasive (IFI) chaque année dans le monde. *Candida* représente le genre fongique principalement impliqué, devant *Aspergillus*, *Cryptococcus* et *Pneumocystis* (Brown *et al.* 2012). Ainsi en France, sur les 35.876 infections fongiques invasives recensées entre 2001 et 2010, 43,4% étaient dues au genre *Candida* (Bitar *et al.* 2014) [Figure 1]. Aux Etats-Unis d'Amérique, les infections profondes à *Candida*, ou candidoses (dont font partie les candidémies, infections sanguines disséminées dues au genre *Candida*), comptent pour plus de 8 % des infections nosocomiales (Pfaller *et al.* 2007). Plusieurs limites diagnostiques et thérapeutiques sont responsables de cet état de fait inquiétant.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie des infections à *Candida*, il apparaît donc indispensable de mieux caractériser les éléments de la réponse immunitaire de l'hôte. Le bénéfice apporté par les nouvelles technologies, comme celles de protéomique, doit être capable de répondre à ces attentes, et donc de trouver des pistes pour ensuite suggérer de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et développer de nouvelles cibles thérapeutiques,

1. Présentation du genre *Candida*

a. Taxonomie

Les champignons sont des êtres vivants eucaryotes. Les levures du genre *Candida* appartiennent à l'embranchement des ascomycètes. Ces champignons unicellulaires font partie de la flore commensale gastro-intestinale et uro-génitale, parfois cutanée (Kohler *et al.* 2015). Leur caractère opportuniste leur donne la possibilité de générer des infections invasives profondes, que l'on appelle candidoses, ou candidémies en cas de dissémination sanguine, dans des conditions de réceptivité d'hôte bien particulières, comme lors des chirurgies digestives, des transplantations d'organe, ... [Tableau I]. *Candida albicans* est l'espèce la plus

souvent isolée au cours des candidoses profondes et des candidémies (Papon *et al.* 2013). *C. albicans* est diploïde avec un noyau à huit paires de chromosomes.

b. Facteurs de virulence

Candida albicans est l'espèce du genre *Candida* la plus étudiée, et certains de ses facteurs de virulence ont déjà été clairement identifiés. Parmi ceux-ci, on retiendra sa capacité à produire des molécules qui permettent l'adhésion et l'invasion tissulaire, sa propension à former des biofilms, ainsi que la sécrétion d'enzymes à activité hydrolase ou son aptitude à filamenter (Mayer *et al.* 2013).

Concernant la capacité d'adhésion, citons Hwp1 qui est un substrat des transglutaminases associées aux cellules épithéliales facilitant un *cross-linking* avec celles-ci. Les lignées de *Candida albicans* déficitaire en Hwp1 sont incapables d'effectuer une adhésion stable à l'épithélium buccal humain et ont une capacité réduite à former des biofilms en cas de candidoses systémiques chez la souris (Nobile *et al.* 2006). Aussi, *C. albicans* possède des récepteurs à sa surface qui lui permettent de reconnaître les cellules de son hôte et de s'y attacher solidement. En effet, le β-1,2-phosphomannoside se lie ainsi à la galectine via une liaison lectinique. Les protéines de la famille ALS (*agglutinin-like sequence*) s'attachent à diverses protéines de la matrice extracellulaire (laminine, collagène, fibrinogène) ainsi qu'à des cellules épithéliales et endothéliales *via* des liaisons non covalentes (Sheppard *et al.* 2004), Als3 semble jouer un rôle-clé dans l'adhésion aux cellules épithéliales, aux dommages ultérieurs de l'épithélium ainsi qu'à l'induction de cytokines (Murciano *et al.* 2012).

C. albicans possède toute une gamme d'enzymes hydrolytiques qui s'expriment différemment selon l'environnement. Par exemple, les enzymes de la famille SAP (*secreted aspartyl proteinase*), qui compte actuellement 10 membres et dont les rôles sont variés, interviennent dans la dégradation de protéines, des structures cellulaires et tissulaires de l'hôte ou du système immunitaire. Leur expression dépend du pH, de la localisation de *C. albicans* et de sa forme morphologique (Borg-von Zepelin, *et al.* 1998).

Enfin, *C. albicans* est douée de dimorphisme : il s'agit d'une aptitude qui lui permet de passer de la forme levure ellipsoïdale standard vers la forme hyphale (encore appelée filamenteuse) [Figure 2]. La transition peut être induite par un grand

nombre de *stimuli* : le pH, la température, la composition du milieu... Régulées par l'expression de différents gènes comme *HWP1*, *ALS*, *SAP*, les voies de signalisation conduisant à la filamentation chez *C. albicans* sont soit MAP-kinase dépendante, soit pH-dépendante, soit AMPc-dépendante. Ces voies sont redondantes : le blocage de l'une d'elles ne suffit pas à inhiber la filamentation. Le processus initial de filamentation suit la cytokinèse donnant la séparation des cellules-filles fongiques. Ensuite, au stade terminal, les cellules-filles restent liées les unes aux autres par des *septa ;* la croissance continue au niveau apical. Entre les formes levure et hyphale, on peut trouver des stades morphologiques intermédiaires comme le pseudohyphe et la chlamydospore, qui sont toutefois plus rares (Sudbery, Peter *et al.* 2004). Divers mutants ont été produits en laboratoire pour approcher expressément ce caractère de virulence liée à la filamentation. Pour exemple, la souche *C. albicans* SC5314 possède une filamentation "normale", alors que la 926 est déficiente pour cette caractéristique.

c. Démarche diagnostique biologique

La détection positive d'un échantillon prélevé à partir d'un site normalement stérile suffit au diagnostic de candidose invasive. Dans ce sens, les hémocultures constituent le prélèvement le plus contributif pour accéder au diagnostic de candidémie, de façon univoque. La culture s'opère en flacons aérobies, mais n'est malheureusement positive que dans 50% des cas pourtant avérés. Après repiquage du contenu du flacon, la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification rapide de l'espèce à partir des colonies isolées *in vitro*, avec une performance diagnostique variable allant de 75% pour *C. krusei* à plus de 95% pour *C. albicans* (Spanu *et al.* 2012).

La recherche d'antigène mannane (Ag M) circulant dans le sang est une alternative à la culture mycologique connue depuis 30 ans. Le mannane est un polysaccharide constitutif de la paroi qui est produit par la levure au cours de sa croissance. La recherche d'Ag M semble très spécifique (98%), mais peu sensible (47%) pour le diagnostic de candidose invasive à *C. albicans* (Weiner *et al.* 1979 ; Yeo *et al.* 2002). Pour compenser le manque de sensibilité, il a été proposé de coupler le dosage de l'Ag M à celui des anticorps anti-mannanes. Ainsi, une méta-analyse récente retrouvait une spécificité de 86% et une sensibilité voisine de 83%, lorsque les deux dosages étaient associés (Mikulska *et al.* 2010).

Arrivé plus récemment sur le marché, le dosage d'antigène 1,3- β-D-glucane (BDG) offre des performances de sensibilité de 93% et de spécificité de 100% au cours des infections fongiques invasives (Pickering *et al.* 2005). Libéré dans la circulation sanguine, le BDG compose la paroi de la majorité des champignons responsables de pathologies humaines, à l'exception de *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatidis* et des zygomycètes. Sa nature panfongique l'empêche d'être spécifique des infections à *Candida*.

Différentes stratégies diagnostiques ont été élaborées (Held *et al.* 2013), mais actuellement le diagnostic des candidoses profondes, et en particulier des candidémies, souffre toujours de limites délétères pour assurer une prise en charge optimale des patients concernés [Figure 3]. Des moyens complémentaires sont maintenant attendus.

d. Prise en charge thérapeutique

Le retard à l'instauration d'un traitement antifongique efficace, ainsi que le non-contrôle de la source d'infection, sont les facteurs les plus largement associés à la mortalité des patients atteints d'infection profonde à *Candida*. Lors des chocs septiques, la mortalité était de 52,8% en cas de prise en charge thérapeutique précoce dans les 24 heures suivant le diagnostic et en cas de contrôle efficace de la source d'infection, alors qu'elle passait à 97,6% dans les autres situations (P< 0,001) (Kollef *et al.* 2012).

Par comparaison avec l'arsenal antibactérien, les chimiothérapies anti-*Candida* sont restreintes à trois classes antifongiques principales, uniquement : les polyènes, les azolés et les échinocandines, ces classes étant elles-mêmes constituées de quelques molécules seulement. Ces dernières ont d'ailleurs une efficacité limitée : par exemple, les azolés ne sont que fongistatiques sur les levures et n'exercent donc *a priori* aucune activité lytique *in vivo*. De même, des phénomènes de résistance acquises ont été rapportés avec les azolés ; la plus classique étant la résistance par la mutation de certains *hotspots* du gène *CYP51A1,* codant pour la lanostérol 14-α déméthylase, une enzyme de la famille du cytochrome P450 (ou Erg11p) impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la paroi fongique (Sanglard *et al.* 1998 ; Perea *et al.* 2001). De plus, l'usage des antifongiques est onéreux, générant un surcoût direct estimé à presque 5.000 € par patient, voire d'avantage en cas de traitement par voie intraveineuse. Surtout, l'ensemble des

drogues antifongiques susnommées est non exempt d'effets secondaires. Les polyènes, dont l'amphotéricine B est la seule représentante par voie systémique, sont mal tolérés au moment de l'administration intraveineuse et entraînent des insuffisances rénales à termes ; le voriconazole, un des chefs de file des antifongiques azolés, est responsable de troubles visuels, d'élévation des enzymes hépatiques et de carcinome cutané. De concert, tous ces éléments factuels restreignent l'usage des drogues antifongiques, sauf en cas de très forte présomption diagnostique (Hicheri *et al.* 2010 ; Maertens *et al.* 2011).

Des alternatives thérapeutiques sont donc à envisager, notamment celles qui pourraient cibler la réponse de l'hôte afin de faciliter la clairance tissulaire des agents pathogènes. Cette réponse est vraisemblablement variable en fonction du statut immunitaire de l'hôte et de sa maladie sous-jacente.

2. Intérêt de l'approche physiopathologique par protéomique

Au cours de la dernière décennie, les techniques de -omiques ont été largement améliorées, et donc ensuite utilisées pour appréhender la physiopathologie au sein d'organismes ou de fluides, et en particulier pour mieux décrire la réponse de l'hôte (Desoubeaux *et al.* 2014 ; Fekkar *et al.* 2012). La plus ancienne, la génomique, n'est capable de décrire que les gènes. La transcriptomique a aussi ses limites, car elle n'aborde que l'étude des ARNm et n'est donc pas capable de corréler de façon systématique la présence de ces ARNm avec les protéines traduites en aval, ni de prendre en compte les modifications post-traductionnelles (Schweppe *et al.* 2003 ; Zhao *et al.* 2013). En contraste, la protéomique permet une analyse de l'environnement très en aval, non figée, approchant les cascades de réactions biochimiques et les voies métaboliques impliquées dans les divers processus physiopathologiques. Elle offre la possibilité de lister les modifications protéiques post-traductionnelles, ainsi que les fragments protéiques dont certains sont possiblement doués d'un réel pouvoir pathogène.

En plus de leur capacité d'offrir une identification peptidique précise, les outils récents de protéomique sont maintenant équipés pour quantifier directement la représentativité relative des différentes protéines présentes dans un fluide ou dans un tissu par rapport à une situation de comparaison. Par exemple, l'analyse en spectrométrie de masse a déjà montré que le protéome de l'hôte durant les

infections fongiques était surtout représenté par des protéines qui habituellement sont exprimées dans des processus métaboliques ou de régulation biologique. Ainsi dans un modèle animal d'aspergillose, une autre infection fongique profonde, Desoubeaux *et al.* ont montré que la voie des cadhérines jouait un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire (Desoubeaux *et al.* 2018). De même, la voie de signalisation Wnt, une famille de glycoprotéines, semblait significativement impliquée dans ce modèle, de par son rôle dans l'embryogenèse et l'homéostasie des tissus adultes. L'approche protéomique de cette étude a aussi démontré que la voie du FGF permettait de maintenir la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs, et de réparer les lésions dues à un traumatisme, *a priori* celui généré par les lésions dues au champignon. Au total à travers ces différents exemples, il semble donc que la protéomique soit particulièrement adaptée pour les études exploratoires *ex vivo,* et pourrait constituer une première étape suggestive de nouveaux biomarqueurs ou cibles thérapeutiques.

3. Objectifs

La compréhension de la physiopathologie des candidoses et en particulier des candidémies (les formes sanguines disséminées causées par Candida albicans) est primordiale pour pouvoir affiner et établir ensuite une meilleure stratégie diagnostique et/ou thérapeutique vis-à-vis du genre *Candida.* La finalité d'une telle approche réside dans l'amélioration de la prise en charge médicale globale, donc dans la réduction substantielle de la morbi-mortalité.

Ainsi, grâce à une approche protéomique utilisant des outils modernes de spectrométrie de masse, ce travail a pour but de mieux préciser la réponse de l'hôte, à partir d'un modèle animal de candidémie infecté expérimentalement par différentes souches de *C. albicans* théoriquement plus ou moins virulentes, en partant de l'hypothèse que la diversité phénotypique des levures a un impact sur ces processus.

II - Matériel et Méthode

1. Modèle animal de candidémie

Un modèle animal de candidémie a été exploité. Des souris femelles Crl:CD1(ICR) de six semaines d'âge ont été placées dans des cages à filtration d'air, et nourries avec de l'eau et de la nourriture stériles *ad libitum*. Il a ensuite été procédé à l'immunodépression d'un des groupes de souris (lot nommé IVC), induite par une injection intra-péritonéale de cyclophosphamide (200 mg/kg, une fois par jour, à J-1, J0 et J+1 de l'expérience, le jour 0 correspondant au jour de l'infection). Dans l'autre groupe, les souris immunocompétentes (lot nommé IV et ne recevant pas de cyclophosphamide) ont reçu de l'eau physiologique en injection aux mêmes dates. L'immunodépression a été évaluée sur la mesure du nombre de lymphocytes de la lignée B par cytométrie en flux.

Afin de mimer la dissémination sanguine du champignon observée lors de candidémie, le challenge infectieux a été réalisé par injection au niveau de la veine de la queue avec un volume de suspension de 0,1 mL comprenant $1,0x10^6$ UFC (unité formant colonie) de levures. Deux souches de *C. albicans* de phénotypes différents ont été testées dans deux sous-groupes : SC5314 (capable de filamenter) et 926 (incapable de filamenter), de manière mutuellement exclusive.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés par prélèvement au niveau de la veine mandibulaire, un, trois et cinq jours après l'infection expérimentale. Chaque sérum correspond à une souris différente qui a été sacrifiée au moment de l'échantillonnage.

Toutes les procédures ont été approuvées par un comité local d'éthique et le Ministère de la Recherche, de l'Innovation et de l'Enseignement Supérieur (Autorisation N° APAFIS#6672-2016091911214455 et APAFIS#5508-2016062810304863), en accord avec la directive 86/609/EU du Conseil de l'Union Européenne et les recommandations de l'Union Européenne.

2. Pré-traitement et fractionnement protéique

a. Déplétion en protéines surabondantes

L'enrichissement protéique a été effectué pour chaque échantillon sérique en utilisant le kit Pierce Albumin / IgG Removal (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.), selon les recommandations du fabricant. Ce genre d'outils permet théoriquement la déplétion des protéines surreprésentées comme l'albumine ou les immunoglobulines (Kumar *et al.* 2012 ; Csokai *et al.* 2009).

b. Dosage de la concentration protéique

Les protéines totales ont été quantifiées dans chaque échantillon sérique, déplété au préalable, par le kit Pierce BCA Protein assay (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, U.S.A.), selon les instructions du fabricant (Desoubeaux *et al.* 2013 ; Kumar *et al.* 2012). Il était crucial de normaliser les quantités protéiques, afin d'avoir une approche protéomique quantitative rigoureuse, en plus de l'analyse qualitative.

c. Préparation des gels monodimensionnels

Chaque échantillon déplété et quantifié a ensuite été mélangé avec du tampon de charge, pour charger positivement les protéines du milieu, dans des proportions 4 :
1. Le tampon de charge était composé de NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), additionné de 20 µL de réducteur en proportion 10 : 1 Le tout a été incubé 10 minutes à 70°.

Ensuite, une même quantité unique, soit 50 µg de protéines totales pour chaque échantillon pré-traité, a été mélangée à du tampon Laemmli composé de sodium dodécyl-sulfate (SDS), bêta-mercaptoéthanol et bleu de bromophénol. Le mix a alors été dispensé dans un puit individuel au sommet d'un gel à 8% de polyacrylamide disposé dans la cuve à électrophorèse. Le gel a été inondé dans 600 mL de tampon extérieur MOPS (préparé avec 760 mL d'eau pur et 40 mL de MOPS 20X) et 200mL de tampon intérieur (préparé avec 200 mL de la solution précédente additionnée de 500µL d'anti-oxydant).

Chacun des échantillons sériques a migré en triplicat sans *stacking gel* à 50V pendant 20 minutes. Puis, pour chacun des gels issus de cette migration, une coloration au bleu de Coomassie a été menée par trois lavages pendant cinq minutes avec 100 mL d'eau distillée, puis ajout de 25 mL de colorant, et agitation du

gel pendant 1h15. Les gels ont été décolorés sous agitation pendant 2h30 avec 200 mL d'eau distillée. Ils ont ensuite été découpés, de façon plus stérile, en petits morceaux de 1 mm^3, puis après séchage des échantillons obtenus, ils ont été disposés dans des tubes Eppendorf puis congelés à -80°C avant analyse en spectrométrie de masse.

3. Extraction protéique

Les morceaux de gel de 1 mm^3 ont été lavés avec une solution d'acétonitrile diluée, volume à volume, dans de l'eau pendant cinq minutes, puis avec une solution d'acétonitrile pure pendant 10 minutes. Les résidus de cystéine ont été alkylés par des incubations successives avec 10 mM de DTT (dithiothréitol) dans 50 mM de NH_4HCO_3 (bicarbonate d'ammonium) pendant 30 minutes à 56°C, puis dans 55 mM d'iodoacetamide et dans 50 mM de NH_4HCO_3 pendant 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Ensuite, les morceaux de gel ont été incubés avec une solution de 50 mM de NH_4HCO_3 et d'acétonitrile volume à volume pendant 10 minutes, suivi d'une solution pure d'acétonitrile pendant 15 minutes.

La digestion protéolytique a été effectuée toute une nuit en utilisant 25 mM de NH_4HCO_3 avec 12,5 ng/µL de trypsine (Sequencing grade, Roche diagnostics, Paris, France).

Les peptides résultants de la digestion trypsique ont été extraits par incubation dans de l'acide formique à 5% par sonication, puis un premier surnageant a été récupéré. Ensuite, chaque échantillon a subi une seconde incubation dans de l'acétonitrile et de l'acide formique à 1%, volume à volume, pendant 10 minutes, suivie d'une incubation finale avec de l'acétonitrile pendant cinq minutes. La fraction surnageante a finalement été récupérée. Les deux extractions de surnageant obtenues ont alors été rassemblées et séchées en utilisant un système Speedvac® SPD1010 (Thermosavant, Thermofisher Scientific, Bremen, Germany)

4. Traitement par spectrométrie de masse à haute résolution

a. Analyses par LC1D-nanoESI- LTQ-Orbitrap

Le traitement protéomique a été mené par spectrométrie de masse nanoflow en chromatographie liquide en tandem (nano LC-MS/MS). Pratiquement, les peptides issus de la digestion en gel ont été analysés par un système Ultimate 3000® RSLC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) couplé à un spectromètre de masse à haute résolution Orbitrap® Fusion (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Les échantillons ont été dessalés et concentrés en ligne par une pré-colonne Acclaim PepMap100 C18 trap (3µm, 75µm x 2cm) (Dionex, Sunnyvale, California, USA), pendant 10min à 5 µL/min, puis séparés par gradient sur une colonne analytique en phase inversée Acclaim PepMAp C18 (2µm, 75µm x 50cm), avec un débit de 300 nL/min. Le profil du gradient a été le suivant : 4 à 40% d'acetonitrile/ 0,1% d'acide formique durant 120 minutes.

L'acquisition des données s'est faite de façon automatique entre les modes MS à haute résolution (FWMH 120,000) dans l'analyseur Orbitrap® (*mass-to-charge* ratio (m/z) : 400 to 2000) et le Ultimate 3000® RSLC pour la fragmentation à basse résolution MS/MS (MS2), alors que les spectres par dissociation par collision induite (CID) étaient enregistrés. Le spectromètre de masse a opéré en mode positif données-dépendante pour automatiquement commuter l'acquisition entre l'Orbitrap®-MS et le piégeage linéaire MS/MS durant trois secondes entre les *master scans*.

b. Interprétation protéomique

Les données brutes de spectrométrie de masse ont été confrontées à la banque de données SwissProt (01/2019) *via* MASCOT (server local version 2.3) (Matrix Science, London, UK) grâce au logiciel Proteome discoverer 2.1 (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Les paramètres de recherche incluaient la trypsine comme protéase avec un seul *miss cleavage* accepté et la carbamidométhylation, N-terminal acétylation et l'oxydation des méthionines en modifications variables. La tolérance des ions était réglée à 10 ppm de précision de masse sur MS et 0,8 Da sur MS/MS. Les peptides et les protéines identifiés par MASCOT étaient ensuite validés en utilisant les algorithmes « Peptid Prophet » et « Protein Prophet » avec Scaffold® software (version 4.8.9, Proteome Software, Portland, USA). Les identifications

protéiques étaient acceptées si elles contenaient au moins deux peptides reconnus. Etait considéré comme unique, tout peptide qui était identifié dans une protéine seulement. La base de données avec la taxonomie « Mus musculus » a été interrogée pour l'identification protéique.

Puis, les données ont été exportées vers Scaffold PerSPECtives software (version 2.1, Proteome Software, Portland, USA). A partir de la liste de protéines identifiées, des analyses de représentations différentielles (T-test) entre les différentes conditions ont été réalisées en utilisant les deux méthodes de quantification « *Spectral Counting* » et «*eXtracted Ion Chromatogram*». Le « *Spectral Counting* » (référencé « *Normalized Weighted Spectrum Count* ») est une quantification qui se base sur les valeurs normalisées du nombre de spectres de fragmentation ayant permis d'identifier les peptides d'une protéine. La quantification est prise en compte pour les protéines identifiées avec au moins cinq spectres. L'« *eXtracted Ion Chromatogram* » aussi appelé « XIC » (référencé « *Normalized Log10 (Precursor Intensity)* ») est une quantification qui se base sur les valeurs normalisées des aires des pics chromatographiques correspondant aux peptides d'une protéine.

Les protéines sont considérées comme différentiellement représentées lorsque la valeur du T-test (*p-value*) est inférieure à 0,05 et lorsque le Log2 de leur *Fold Change* est supérieur à 1 ou inférieur à -1. La quantification relative des protéines différentielles surabondantes dans les comparaisons est exprimée par le ratio des moyennes des quantifications normalisées des cinq spectres en « *Weighted Spectrum Count* » utilisés pour identifier les protéines. Ce ratio des moyennes entre les deux conditions est exprimé par le *Fold Change*.

5. Statistiques

Les analyses statistiques ont été faites *via* XLStat v.2016.6.04 software (Addinsoft, Paris, France). Le risque alpha était ajusté à 0,05.

III – Résultats

1. Constitution des groupes de comparaison

Il a été opéré des comparaisons deux à deux en groupant au sein d'un même lot les triplicats de chaque sérum (pour limiter les variations intra-individuelles), ainsi que les individus ayant suivi les mêmes régimes d'infection et de traitement (pour limiter les variations interindividuelles) [Tableau III], sans tenir compte des jours de prélèvement dans un premier temps. Au total, huit jeux de comparaisons ont ainsi été effectués entre les sérums de souris immunocompétentes ou immunodéprimées, et infectées ou non, et suivant le choix de la souche fongique utilisée en cas de challenge infectieux, douée de filamentation ou non.

Au total lors de ces différents jeux de comparaison, 23 protéines sont apparues différentiellement surreprésentées dans une catégorie par rapport à sa situation contrôle. [Tableau IV - V]. Les résultats des comparaisons sont présentés en *Volcano plot* dans la Figure 4. Le détail des identifications et quantifications protéiques est présenté dans les annexes 1 à 8, et est abordé ci-dessous en traitant individuellement chaque jeu de comparaisons.

2. Comparaisons entre souris immunocompétentes témoins et immunocompétentes infectées

Les trois conditions suivantes ont été comparées deux à deux : souris immunocompétentes témoins (T), celles ayant eu une infection par *C. albicans* 926 incapable de filamenter (IV), et celles avec la souche SC5314 capable de filamenter (IVSC) [Tableau IV].

La comparaison entre les souris immunocompétentes témoins (T) et celles qui sont immunocompétentes et infectées par la souche SC5314 (IVSC) montre que 12 protéines apparaissent en sur-représentation relative dans ce dernier groupe (IVSC) par rapport au premier (T), chacune ayant un *Fold Change* allant de 2,01 à 121,83. Parmi ces protéines, l'haptoglobine est une protéine majoritairement surreprésentée dans la condition IVSC avec un Fold Change à 50,29, ainsi que les protéines de la famille des *inter alpha trypsin inhibitor* avec des *Fold Change* compris entre 2,34 et 121,83. La comparaison entre les souris immunocompétentes témoins (T) et les

immunocompétentes infectées par la souche 923 (IV) met en évidence trois protéines en surabondance grâce à leur *Fold Change* dont une, la *carboxylesterase 1C* de 2,31, dans la condition contrôle (T), la *ceruloplasmine* de 2,02 et l'*haptoglobine à 80,16*, dans la condition infectée (IV).

La comparaison entre les souris immunocompétentes infectées par la souche SC5314 (IVSC) et celles par la souche 926 (IV) met en évidence trois protéines différentiellement exprimées : la *corticosteroid-binding globulin* avec un *Fold Change* de 3,59, la *leukemia inhibitory factor receptor* de 5,89 et la *prothrombine* de 4,26 qui sont toutes en surabondances avec l'infection générée par la première souche.

3. Comparaisons entre souris immunodéprimées témoins et immunodéprimées infectées

Les protéomes des souris immunodéprimées non infectées (TC), des souris ayant subi une infection par *C. albicans* 926 incapable de filamenter (IVC) , et celles challengés par la souche SC5314 capable de filamenter (IVCSC) ont été comparés entre eux [Tableau IV].

La comparaison entre les souris immunodéprimées témoins (TC) et celles qui sont immunodéprimées infectées par la souche de *C. albicans* SC5314 capable de filamenter (IVCSC) montre deux protéines en surabondance : la *myoglobine* avec un *Fold Change* de 2,84 et la *triosephosphate isomerase* de 3,06, à chaque fois dans la condition immunodéprimée témoin.

La comparaison entre les souris immunodéprimées témoins (TC) et les immunodéprimées infectées par la souche de *C. albicans* 926 (IVC) met en évidence quatre protéines différentiellement surreprésentées à savoir : l'*alpha 2 HS glycoprotein* avec un *Fold Change* de 2,49, la *lumicane* de 2,18 et la *prothrombine* de 4,26 dans la condition témoins immunodéprimées (TC), ainsi que la *vascular non inflammatory molecule 3* avec un *Fold Change* de 3,87 dans la condition immunodéprimées infectées par *C. albicans* 926 (IVC).

La comparaison entre les souris immunodéprimées infectées par la souche 926 (IVC) et celles immunodéprimées infectées par la souche SC 5314 (IVCSC) repère une seule protéine en surabondance dans la condition IVC, la *vitronectine*, avec un *Fold Change* de 4,93.

4. Comparaisons entre souris infectées immunocompétentes et infectées immunodéprimées

Les protéomes des souris immunocompétentes infectées soit par la souche de *C. albicans* SC5314 soit la 926 (respectivement IVSC et IV) ont été comparés à ceux des souris infectées par les mêmes souches, mais immunodéprimées (respectivement IVCSC et IVC) [Tableau V].

En cas d'infection par la souche SC5314, une seule protéine apparaît en surabondance chez les immunocompétentes (IVSC), par rapport aux immunodéprimées (IVCSC): l'*apolipoprotein B100*, avec un *Fold Change* de 3,51.

La comparaison entre les souris immunocompétentes infectées par la souche 926 (IV) et celles immunodéprimées infectées par la même souche 926 (IVC) permet de repérer une protéine en surabondance dans la seconde condition (IVC) : la *corticosteroid-binding globulin,* avec un *Fold Change* de 2,19.

IV – Discussion

Les candidoses invasives sont des infections fongiques causées par le genre *Candida*, et qui sont de diagnostic et de traitement difficiles. Ce constat est particulièrement tangible pour les candidémies qui correspondent aux formes sanguines disséminées des infections à *Candida*. Leur diagnostic, s'il arrive à être fiable et rapide, constitue le garant de l'instauration d'un traitement antifongique adapté et précoce. Celui-ci permet de diminuer drastiquement la mortalité, ainsi que le coût global des hospitalisations liées aux candidémies. Aujourd'hui encore, des efforts de recherche doivent continuer à être consentis pour améliorer la prise en charge des candidoses et des candidémies, et cela passe vraisemblablement par l'amélioration de la compréhension de la physiopathologie de l'infection. En approchant au plus près les mécanismes de défense de l'hôte, la réponse inflammatoire, et les cascades métaboliques déployées lors des candidémies, il est ainsi espéré la découverte d'éléments-clefs dans la lutte antifongique. En se basant sur ce concept, nous ambitionnons de pouvoir cibler plus efficacement quelques facteurs de virulence propres à certaines souches, voire même moduler la réponse de l'hôte, propre à chaque individu, afin d'améliorer la morbidité et la mortalité au cours des candidémies.

1. Le modèle murin

Les modèles animaux constituent de bonnes alternatives pour approcher la physiopathologie des infections. Les murins sont les plus utilisés pour reproduire les infections fongiques invasives en laboratoire. En effet par rapport à leur physiologie, les souris et les humains possèdent des similarités dans le fonctionnement de leurs organes, la biochimie, les pathologies, ainsi que leurs génomes respectifs qui comportent environ 30 000 gènes chacun et qui ont une portion sans homologie inférieure à 1% (Mouse Genome Sequencing Consortium *et al.* 2002). Aussi, beaucoup de kits et réactifs commerciaux dédiés à ces modèles murins sont aujourd'hui disponibles.

De plus, la taille et la masse limitées des souris permettent l'usage d'un relativement grand nombre d'animaux qu'il est possible de manipuler simultanément dans les conditions standards d'un même et unique protocole. Il s'agit là d'une

garantie primordiale pour assurer la répétabilité expérimentale et la fiabilité des analyses statistiques. En contrepartie et comparé aux lapins ou aux autres rongeurs, la petite taille des souris ne permet de collecter que de petits volumes de fluides biologiques. La répétition des prélèvements en est difficile, en particulier lorsqu'une dégradation clinique est attendue à cause d'un challenge infectieux. Les approches cinétiques chez un même individu en deviennent alors compliquées. Ainsi, l'analyse en sous-groupes, avec des prélèvements étagés, répartis chez différents animaux, semble nécessaire pour pouvoir apprécier la cinétique d'une infection.

En outre, au vu de la grande variété de lignées de souris génétiquement définies maintenant à disposition, les scientifiques ont la possibilité de choisir les propriétés d'hôte les plus appropriées pour mimer au mieux des situations cliniques spécifiques et générer ainsi des infections selon un schéma bien défini (Pollock *et al.* 1995). Par exemple, les souris C57BL/*6* sont connues pour être un modèle générique multifonction qui permet l'étude de toutes sortes de maladies infectieuses. Dans notre situation, la lignée de souris Crl:CD1(ICR) a été retenue pour deux raisons : d'une part, elle est fréquemment utilisée dans les protocoles d'expérimentation en immunologie. Des antécédents de faisabilité existent, rapportant des protocoles expérimentaux à base de souris Crl:CD1(ICR) pour étudier les candidoses invasives à *C. albicans* (Kobayashi-Sakamoto *et al.* 2018). D'autre part, la lignée Crl:CD1(ICR) est non consanguine, ce qui tend à refléter la diversité génétique que l'on pourrait retrouver dans la population humaine (Aldinger *et al.* 2009). A l'inverse, les souris consanguines ont un génotype uniforme, ce qui est utile pour une interprétation et une comparaison facilitées des résultats, mais s'éloigne des situations réelles rencontrées en médecine humaine.

2. Le challenge infectieux

D'aucuns pourraient admettre que l'injection intraveineuse de *C. albicans* représente un processus non-naturel d'infection. Hors contexte de toxicomanie par voie intraveineuse, les candidémies sont en effet bien souvent le résultat d'une contamination endogène de l'hôte à partir de son propre mycobiote digestif, suite à une effraction tissulaire accompagnant un acte chirurgical (Dalle *et al.* 2010). Pour contourner cette limitation expérimentale relative à notre protocole, il serait nécessaire d'étudier des sérums de souris ayant subi une infection digestive,

vraisemblablement par gavage, puis par translocation digestive. Cependant, la voie intraveineuse reste le mode de contamination le plus efficace pour initier l'infection expérimentale avec un haut rendement (Clancy *et al.* 2009).

Pour améliorer la prise de l'infection dans le modèle expérimental, nous avons choisi ici d'instaurer une immunodépression par l'usage du cyclophosphamide qui est une drogue classiquement utilisée en médecine humaine. Elle est censée représenter la réalité des pratiques médicales, car classiquement utilisée dans les services de cancérologie ou d'hématologie. A partir d'une seule injection la veille de l'infection expérimentale (J-1), il a été constaté que, deux jours plus tard (J+1), les souris étaient complètement immunodéprimées. Puis, leur immunité commençait à se réinstaurer progressivement (dès J+3) et qu'enfin, les souris étaient redevenues immunocompétentes une semaine plus tard (à J+5, données non présentées). Or, lors des analyses entre groupes, les échantillons ont été ici poolés indépendamment du jour de prélèvement ce qui abroge toute approche cinétique fine de l'analyse protéomique. Aussi, il est important de souligner que toute immunosuppression expérimentale, comme celle générée ici par le cyclophosphamide, peut affecter la réponse de l'hôte à l'infection et *de facto* complexifier la compréhension du modèle expérimental. Dans un avenir proche, la comparaison des souris témoins immunocompétentes non infectées *versus* les souris témoins immunodéprimées (par injection de cyclophosphamide) non infectées devra être effectuée pour évaluer le retentissement de l'immunodépression sur le protéome à l'état de base non infecté. Ces effets devraient clairement être identifiés, car ils impactent vraisemblablement les conclusions finales de l'étude (Balloy *et al.* 2005).

3. La protéomique

Les résultats de spectrométrie de masse ont mis en évidence 23 protéines différentiellement représentées dans les différents jeux de comparaisons. La majorité de ces protéines ont été décrites dans le passé comme impliquées dans divers processus biologiques : 12 protéines participent à l'inflammation, une au métabolisme lipidique, une au métabolisme du cuivre, une au métabolisme et à l'activation de médicament, une à l'interaction entre milieu extracellulaire et intracellulaire, une à la prolifération, différenciation et survie cellulaire, une aux processus tumoraux, une au transport de l'oxygène dans les muscles, deux à la

coagulation, une à la glycolyse et la production d'énergie, et une à l'hémostase [Tableau VI ; Figure 5].

Les protéines impliquées dans l'inflammation ont été surtout mises en évidence dans les jeux de comparaisons qui utilisaient des souris immunocompétentes. En effet, les sérums de souris immunocompétentes infectées par la souche SC5314 (IVSC) douée de filamentation montrent une plus grande quantité de protéines impliquées dans les processus inflammatoires que celles immunocompétentes infectées par la souche 926 (IV) avec sept protéines *versus* deux, respectivement lorsqu'elles sont comparées aux sérums de souris témoins immunocompétentes. La capacité de filamentation des levures étant décrite comme un facteur de virulence, ces résultats nous confortent dans le choix de nos souches car la capacité à filamenter semble stimuler davantage la réponse immunitaire, ainsi l'étude de l'interaction hôte-pathogène lors des candidoses disséminées semble avoir un meilleur rendement avec l'utilisation de ces souches. La plupart des protéines de l'inflammation mises en évidence sont des protéines de la phase aiguë, comme *apha 1 acid glycoprotein 2*, la *CRP*, la *céruloplasmine*, l'*haptoglobine*, les protéines de la famille des *inter alpha trypsin inhibitor* ou la prothrombine. Le dosage de ces protéines est classiquement augmenté dans les syndromes infectieux biologiques, en particulier la *CRP* et l'*haptoglobine* qui sont des protéines dosées en routine dans les laboratoires de Biochimie en milieu hospitalier. Or, Akin *et al.* ont cherché à mesurer les taux de la *CRP,* ainsi que d'autres marqueurs utilisés pour le diagnostic de bactériémie, et de les appliquer dans le cadre des candidémies. Le dosage de la *CRP* n'a pas montré de différence entre les patients ayant une candidémie et ceux ayant une bactériémie. Aussi, Petrikkos *et al.* ont mis en évidence que le niveau de la *CRP* est même plus bas chez les patients avec une candidémie que ceux avec une bactériémie. De même, l'*haptoglobine* est une protéine différentielle qui a été mise en évidence dans deux sets de comparaisons, celles effectuées entre les souris immunocompétentes témoins (T) avec les souris immunocompétentes infectées par la souche SC5314 (IVSC) ou avec les souris immunocompétentes infectées par la souche 926 (IV) ; ainsi une surabondance a été observée avec un *Fold Change* de 50,29 dans la condition IVSC et 80,16 dans la condition IV, on la retrouve donc augmentée dans les sérums de souris immunocompétentes infectées par rapport aux souris immunocompétentes témoins non infectées. Seulement cette protéine de la phase aiguë est peu spécifique, effectivement elle est aussi responsable du

transport de l'hémoglobine, on la retrouve aussi bien dans des maladies inflammatoires qu'infectieuses (Wassel *et. al* 2000). L'utilisation des protéines de la phase aiguë comme biomarqueurs pour une infection fongique invasive ne seraient que peu rentables.

Il est plus surprenant de constater que l'immunodépression affecte la réponse de l'hôte en n'induisant aucune augmentation des protéines de la phase aiguë comme on peut le constater dans les comparaisons entre les souris immunodéprimées témoins (TC) et celles immunodéprimées infectées par la souche SC5314 (IVCSC) ou 926 (IVC). En effet, l'analyse en composantes principales (ACP) [Figure 6] qui permet d'explorer les liaisons entre les variables et les ressemblances entre les conditions, nous montre que les souris immunocompétentes infectées par la souche 926 (IV) n'ont que très peu de différence avec les souris immunodéprimées infectées par la souche 926 (IVC) [Figure 6.1]. Nous avons déjà évoqué le fait que la souche de *C. albicans* 926 dépourvue de la capacité à filamenter ne semble que peu affecter la réponse de l'hôte chez les souris immunocompétentes, ainsi l'immunodépression des souris lors d'une infection avec cette même souche n'affecte pas plus la réponse hôte-pathogène. Aussi, en s'intéressant à l'ACP de la comparaison entre les souris immunodéprimées infectées par *C. albicans* 926 (IVC) ou SC5314 (IVCSC) [Figure 6.2], on constate que ces deux populations de souris n'ont que très peu de différences alors que nous avions mis en évidence que la souche de *C. albicans* SC5314 était associée à une réaction inflammatoire plus importante chez les souris immunocompétentes (IVSC). De la même manière, on constate avec l'ACP de la comparaison entre les souris immunodéprimées témoins (TC) et immunodéprimées infectées par la souche 926 (IVC) [Figure 6.3] que ces deux conditions n'ont que très peu de différence, or nous avons expliqué que la souche 926 n'induit que peu de réponse inflammatoire. Ces différents éléments nous confortent dans le fait que l'immunodépression entraîne une moindre réponse de l'hôte à *C. albicans* et ce indépendamment de la capacité ou non de la souche à filamenter.

L'étude de protéines dîtes « positives » de la phase aiguë de l'inflammation est une approche classique des infections microbiologiques, mais les protéines dîtes « négatives » de la phase aiguë n'en restent pas moins informatives. La *Corticosteroid binding globulin* est une protéine mise en évidence dans les comparaisons effectuées entre les souris immunocompétentes infectées par la souche 926 (IV) et les souris immunocompétentes infectées par la souche SC5314

(IVSC) ou les souris immunodéprimées infectées par la souche 926 (IVC), ainsi il a été observé respectivement une surabondance avec un *Fold Change* de 3,59 dans la condition IVSC et 2,19 dans la condition IVC. Cette protéine glycosylée du plasma est impliquée dans le transport et la livraison des stéroïdes (Lin *et al.* 2010). C'est une protéine dite « négative » lors de la phase aiguë de la réponse inflammatoire, sa concentration diminue rapidement au cours d'un sepsis (Pugeat *et al.* 1989), ainsi cela permet l'augmentation la fraction libre de glucocorticoïdes agissant dans le contrôle de la réponse inflammatoire, la néoglucogenèse et le stress. Aussi, sa baisse a été décrite lors des chocs septiques (Meyer *et al.* 2019), dans nos résultats cette protéine est abaissée dans la condition IV lors de la comparaison entre les souris immunocompétentes infectées (IV) et les souris immunodéprimées infectées (IVC). Cela nous suggère que l'immunodépression des souris est associée à une réaction inflammatoire moindre lors d'une candidémie, et ce quelle que soit la souche utilisée. Cet état de fait est retrouvé dans la candidose hépatosplénique qui se développe en cas d'immunodépression profonde et prolongée devenant symptomatique lors de la restauration de l'immunité par le biais de la réaction inflammatoire (Rammaert *et al.* 2012).

De même, l'alpha-*2-HS-glycoprotein* est une protéine qui est diminuée dans la condition souris immunodéprimées infectées par *C. albicans* 926 (IVC) par rapport à la condition témoin immunodéprimées (TC) avec un *Fold Change* de 2,49 dans cette dernière condition. Cette protéine est impliquée dans la modulation de la réponse macrophagique lors de la phase aiguë de l'inflammation (Wang *et al.* 1998), elle aussi est une protéine dîte « négative » de la phase aiguë (Daveau *et al.* 1988). Sa diminution lors d'une infection à *C. albicans* de virulence atténuée en situation d'immunodépression par rapport à une situation contrôle immunodéprimée, nous permet de dire que l'immunodépression affecte la réponse de l'hôte mais ne l'annihile pas complètement. Cet aspect est important pour comprendre la physiolopathologie des infections fongiques en situation d'immunodépression, car nous avons montré que la réponse inflammatoire était certes moindre dans cette situation, mais il est d'intérêt de constater qu'il existe une réponse de l'hôte pour persévérer dans l'étude de la protéomique sérique de modèles immunodéprimés candidémiques.

Certaines protéines surabondantes ont des rôles biologiques assez éloignés des mécanismes physiopathologiques des candidémies classiquement décrits. Dans

différents jeux de comparaisons, des protéines comme l'*epidermal growth factor receptor*, l'*apolipoproteine B100* ou la *leukemia inhibitory factor receptor* semblent surreprésentées chez les souris immunocompétentes infectées par la souche SC5314 capable de filamenter. De même, l'*apolipoprotéine B100* est une protéine mise en évidence à deux reprises, à la fois dans les comparaisons effectuées entre les souris immunocompétentes infectées par la souche SC5314 (IVSC) et les souris immunocompétentes témoins (T) avec un *Fold Change* non quantifié dans la condition IVSC, ainsi qu'avec les souris immunodéprimées infectées par SC5314 (IVCSC) dans la condition IVSC avec un *Fold Change* à 3,51. Malgré la stabilité de la lignée de souris Crl:CD1(ICR) utilisée, on ne peut exclure qu'une variabilité inter-souris soit à l'origine de résultats non spécifiques dans l'exploration de la réponse de l'hôte aux candidémies. Sachant qu'un sérum dans une condition correspond à une seule souris qui a été sacrifiée, il serait nécessaire d'explorer cette potentielle variabilité pour ne pas surestimer la présence de protéines mises en évidence dans une comparaison entre deux conditions.

4. Perspectives

La spectrométrie de masse apparaît être un outil utile pour des explorations *ex vivo* qui doivent être vues comme une étape préliminaire avant la validation de nouveaux biomarqueurs ou de cibles thérapeutiques au cours des candidémies. Effectivement, les résultats obtenus mériteraient des tests ELISA ou en cytométrie en flux qui pourraient venir confirmer la sur-représentation ou sous-représentation de certaines protéines dignes d'intérêt. Aussi, la grande variabilité de la réponse hôte-pathogène mise en évidence dans notre protocole expérimental en utilisant une souche de *C. albicans* capable de filamenter (SC5314) et une souche incapable (926), nous amène à nous intéresser à d'autres isolats cliniques de *C. albicans* de phénotype bien caractérisé pour des tests ultérieurs, ainsi que des mutants de *C. albicans* déficients en certaines propriétés biologiques qui affectent leur virulence comme les biomolécules de reconnaissance de cellules de l'hôte telles que les adhésines, les aspartyl-protéases sécrétées ou les phospholipases.

Au demeurant, l'ensemble de nos résultats nous encourage dans la validité de notre modèle expérimental pour l'étude du protéome sérique dans les candidémies. En effet, nous retrouvons les protéines de la phase aiguë de l'inflammation dans les

comparaisons entre souris immunocompétentes infectées *versus* souris immunocompétentes non infectées. La présence de ces protéines lors de la phase aiguë des infections disséminées à *C. albicans* mériteraient une approche par une cinétique quantitative sur les trois différents jours de prélèvements pour ainsi évaluer leur intérêt dans le suivi, donc dans le pronostic, au moins à court terme des candidémies. Aussi, nous mettons en évidence une plus grande réaction inflammatoire lorsque l'infection est effectuée par une souche apte à filamenter, peut-être parce que la forme hyphale est considérée comme un facteur de virulence car responsable de l'invasion tissulaire. Enfin, il est intéressant de constater que l'immunodépression interfère dans la réponse de l'hôte ; ce dernier point est crucial pour la compréhension de la physiopathologie de ces infections, une des principales populations à risque de développer une candidémie étant celle qui est immunodéprimée de façon profonde et prolongée.

V – REFERENCES

Aldinger, K. A., Sokoloff, G., Rosenberg, D. M., Palmer, A. A., & Millen, K. J. (2009). Genetic Variation and Population Substructure in Outbred CD-1 Mice: Implications for Genome-Wide Association Studies. *PLoS ONE*, *4*(3), e4729. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004729

Appunni, S., Anand, V., Khandelwal, M., Gupta, N., Rubens, M., & Sharma, A. (2019). Small Leucine Rich Proteoglycans (decorin, biglycan and lumican) in cancer. Clinica Chimica Acta, 491, 1–7. https://doi.org/10.1016/J.CCA.2019.01.003

Balloy, V., Huerre, M., Latge, J.-P., & Chignard, M. (2005). Differences in Patterns of Infection and Inflammation for Corticosteroid Treatment and Chemotherapy in Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Infection and Immunity*, *73*(1), 494–503. https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.494-503.2005

Bassetti, M., Trecarichi, E. M., Righi, E., Sanguinetti, M., Bisio, F., Posteraro, B., … Tumbarello, M. (2007). Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *58*(3), 325–331. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.005

Bitar, D., Lortholary, O., Le Strat, Y., Nicolau, J., Coignard, B., Tattevin, P., … Dromer, F. (2014). Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(7), 1163–1169. https://doi.org/10.3201/eid2007.140087

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, *4*(165), 165rv13-165rv13. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404

Bublil, E. M., & Yarden, Y. (2007). The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. Current Opinion in Cell Biology, 19(2), 124–134. https://doi.org/10.1016/J.CEB.2007.02.008

Charlie-Silva, I., Klein, A., Gomes, J. M. M., Prado, E. J. R., Moraes, A. C., Eto, S. F., … Belo, M. A. A. (2019). Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. Scientific Reports, 9(1), 4776. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41312-z

Clancy, C. J., Cheng, S., & Nguyen, M. H. (2009). Animal Models of Candidiasis. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-151-6_8

Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A., & Künzel, F. (2009). Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, *163*(1–2), 18–26. https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.03.057

Dalle, F., Wächtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., … Hube, B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular Microbiology*, *12*(2), 248–271. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01394.x

Daveau, M., Christian-Davrinche, Julen, N., Hiron, M., Amaud, P., & Lebreton, J.-P. (1988). The synthesis of human α-2-HS glycoprotein is down-regulated by cytokines in hepatoma HepG2 cells. *FEBS Letters*, *241*(1–2), 191–194. https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81059-7

Desoubeaux, G., Jourdan, M.-L., Valera, L., Jardin, B., Hem, S., Caille, A., … Chandenier, J. (2014). Proteomic demonstration of the recurrent presence of inter-alpha-inhibitor H4 heavy-chain during aspergillosis induced in an animal model. *International Journal of Medical Microbiology*, *304*(3–4), 327–338. https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2013.11.015

Desoubeaux, G., CHAUVIN, D., Piqueras, M. del C., BRONSON, E., BHATTACHARYA, S. K., SIRPENSKI, G., … CRAY, C. (2018). Translational proteomic study to address host protein changes during aspergillosis. *PLOS ONE*, *13*(7), e0200843. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200843

Du Clos, T. W., & Mold, C. (2004). C-Reactive Protein: An Activator of Innate Immunity and a Modulator of Adaptive Immunity. *Immunologic Research*, *30*(3), 261–278. https://doi.org/10.1385/IR:30:3:261

Eagle, H. (1935). STUDIES ON BLOOD COAGULATION: I. THE ROLE OF PROTHROMBIN AND OF PLATELETS IN THE FORMATION OF THROMBIN. The Journal of General Physiology, 18(4), 531–545. https://doi.org/10.1085/jgp.18.4.531

Eggimann, P., Garbino, J., & Pittet, D. (2003). Management of Candida species infections in critically ill patients. *The Lancet. Infectious Diseases*, *3*(12), 772–785. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00831-4

Fekkar, A., Pionneau, C., Brossas, J. Y., Marinach-Patrice, C., Snounou, G., Brock, M., … Mazier, D. (2012). DIGE enables the detection of a putative serum biomarker of fungal origin in a mouse model of invasive aspergillosis. *Journal of Proteomics*, *75*(9), 2536–2549. https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2012.01.040

Fournier, T., Medjoubi-N, N., & Porquet, D. (2000). Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1482*(1–2), 157–171. https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00153-9

Han, X., Fiehler, R., & Broze, G. J. (2000). Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. Blood, 96(9), 3049—3055. Retrieved from http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/96/9/3049

Held, J., Kohlberger, I., Rappold, E., Busse Grawitz, A., & Hacker, G. (2013). Comparison of (1->3)- -D-Glucan, Mannan/Anti-Mannan Antibodies, and Cand-Tec Candida Antigen as Serum Biomarkers for Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(4), 1158–1164. https://doi.org/10.1128/JCM.02473-12

Hellman, N. E., & Gitlin, J. D. (2002). C ERULOPLASMIN M ETABOLISM AND F UNCTION. Annual Review of Nutrition, 22(1), 439–458. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457

Hicheri, Y., Toma, A., Maury, S., Pautas, C., Mallek-Kaci, H., & Cordonnier, C. (2010). Updated guidelines for managing fungal diseases in hematology patients. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *8*(9), 1049–1060. https://doi.org/10.1586/eri.10.85

Hurt, E. M., Chan, K., Serrat, M. A. D., Thomas, S. B., Veenstra, T. D., & Farrar, W.L. (2009). Identification of Vitronectin as an Extrinsic Inducer of Cancer Stem Cell Differentiation and Tumor Formation. Stem Cells, 28(3), N/A-N/A. https://doi.org/10.1002/stem.271

Imai, T. (2006). Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *21*(3), 173–185. https://doi.org/10.2133/DMPK.21.173

Jirak, P., Stechemesser, L., Moré, E., Franzen, M., Topf, A., Mirna, M., … Salmhofer, H. (2019). Clinical implications of fetuin-A. *Advances in Clinical Chemistry*, *89*, 79–130. https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2018.12.003

Kane, J. P., Hardman, D. A., & Paulus, H. E. (1980). Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(5), 2465–2469. https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2465

Kaskow, B. J., Proffitt, J. M., Michael Proffit, J., Blangero, J., Moses, E. K., & Abraham, L. J. (2012). Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules - the Vanin pantetheinases. Biochemical and Biophysical Research Communications, 417(2), 653–658. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.099

Kobayashi-Sakamoto, M., Tamai, R., Isogai, E., & Kiyoura, Y. (2018). Gastrointestinal colonisation and systemic spread of Candida albicans in mice treated with antibiotics and prednisolone. *Microbial Pathogenesis*, *117*, 191–199. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.02.043

Kohler, J. R., Casadevall, A., & Perfect, J. (2015). The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*(1), a019273–a019273. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019273

Kollef, M., Micek, S., Hampton, N., Doherty, J. A., & Kumar, A. (2012). Septic Shock Attributed to Candida Infection: Importance of Empiric Therapy and Source Control. *Clinical Infectious Diseases*, *54*(12), 1739–1746. https://doi.org/10.1093/cid/cis305

Kumar, Y., Liang, C., Bo, Z., Rajapakse, J. C., Ooi, E. E., & Tannenbaum, S. R. (2012). Serum Proteome and Cytokine Analysis in a Longitudinal Cohort of Adults with Primary Dengue Infection Reveals Predictive Markers of DHF. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(11), e1887. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001887

Leroy, O., Gangneux, J.-P., Montravers, P., Mira, J.-P., Gouin, F., Sollet, J.-P., … AmarCand Study Group. (2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Critical Care Medicine*, *37*(5), 1612–1618. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819efac0

Lin, H.-Y., & Muller, Y. A. (2010). Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *316*(1), 3–12. https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.06.015

Maertens, J., Marchetti, O., Herbrecht, R., Cornely, O. A., Flückiger, U., Frêre, P., … Cordonnier, C. (2011). European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3—2009 Update. *Bone Marrow Transplantation*, *46*(5), 709–718. https://doi.org/10.1038/bmt.2010.175

Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, *4*(2), 119–128. https://doi.org/10.4161/viru.22913

Meyer, E., Nenke, M., Rankin, W., Lewis, J., & Torpy, D. (2016). Corticosteroid-Binding Globulin: A Review of Basic and Clinical Advances. Hormone and Metabolic Research, 48(06), 359–371. https://doi.org/10.1055/s-0042-108071

Meyer, E. J., Nenke, M. A., Rankin, W., Lewis, J. G., Konings, E., Slager, M., … Torpy, D. J. (2019). Total and high-affinity corticosteroid-binding globulin depletion in septic shock is associated with mortality. Clinical Endocrinology, 90(1), 232–240. https://doi.org/10.1111/cen.13844

Mikulska, M., Calandra, T., Sanguinetti, M., Poulain, D., Viscoli, C., & Third European Conference on Infections in Leukemia Group. (2010). 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. *Critical Care (London, England)*, *14*(6), R222. https://doi.org/10.1186/cc9365

Nicola, N. A., & Babon, J. J. (2015). Leukemia inhibitory factor (LIF). Cytokine & Growth Factor Reviews, 26(5), 533–544. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.001

Ordway, G. A., & Garry, D. J. (2004). Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. Journal of Experimental Biology, 207(20), 3441 LP – 3446. https://doi.org/10.1242/jeb.01172

Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. (2002). *Nature*, *420*(6915), 520–562. https://doi.org/10.1038/nature01262

Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species: Beyond the Candida albicans Paradigm. *PLoS Pathogens*, *9*(9), e1003550. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003550

Perea, S., López-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., McAtee, R. K., Santillán, R. A., Martínez, M., … Patterson, T. F. (2001). Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(10), 2676–2684. https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001

Petrikkos, G. L., Christofilopoulou, S. A., Tentolouris, N. K., Charvalos, E. A., Kosmidis, C. J., & Daikos, G. L. (2005). Value of measuring serum procalcitonin, C-reactive protein, and mannan antigens to distinguish fungal from bacterial infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 24(4), 272–275. https://doi.org/10.1007/s10096-005-1312-z

Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(1), 133–163. https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06

Pickering, J. W., Sant, H. W., Bowles, C. A. P., Roberts, W. L., & Woods, G. L. (2005). Evaluation of a (1-3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(12), 5957–5962. https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5957-5962.2005

Pollock, J. D., Williams, D. A., Gifford, M. A. C., Li, L. L., Du, X., Fisherman, J., … Dinauer, M. C. (1995). Mouse model of X–linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nature Genetics*, *9*(2), 202–209. https://doi.org/10.1038/ng0295-202

Pugeat, M., Bonneton, A., Perrot, D., Rocle-Nicolas, B., Lejeune, H., Grenot, C., … Cuilleron, C. Y. (1989). Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. *Clinical Chemistry*, *35*(8). Retrieved from http://clinchem.aaccjnls.org/content/35/8/1675.long

Preissner, K. T., & Seiffert, D. (1998). Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. Thrombosis Research, 89(1), 1–21. https://doi.org/10.1016/s0049-3848(97)00298-3

Rammaert, B., Desjardins, A., & Lortholary, O. (2012). New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. Mycoses, 55(3), e74–e84. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02182.x

Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., de Gómez-Puyou, M. T., Pérez-Montfort, R., … Torres-Larios, A. (2008). Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. The Journal of Biological Chemistry, 283(34), 23254–23263. https://doi.org/10.1074/jbc.M802145200

Schaer, D. J., Vinchi, F., Ingoglia, G., Tolosano, E., & Buehler, P. W. (2014). Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways—basic science, clinical perspectives, and drug development. Frontiers in Physiology, 5, 415. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00415

Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Micheli, M. de, & Bille, J. (1998). Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resistance Updates*, *1*(4), 255–265. https://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80006-X

Schweppe, R. E., Haydon, C. E., Lewis, T. S., Resing, K. A., & Ahn, N. G. (2003). The Characterization of Protein Post-Translational Modifications by Mass Spectrometry. *Accounts of Chemical Research*, *36*(6), 453–461. https://doi.org/10.1021/ar020143l

Spanu, T., Posteraro, B., Fiori, B., D'Inzeo, T., Campoli, S., Ruggeri, A., … Fadda, G. (2012). Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of Candida species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(1), 176–179. https://doi.org/10.1128/JCM.05742-11

Weiner, M. H., & Coats-Stephen, M. (1979). Immunodiagnosis of Systemic Candidiasis: Mannan Antigenemia Detected by Radioimmunoassay in Experimental and Human Infections. *Journal of Infectious Diseases*, *140*(6), 989–993. https://doi.org/10.1093/infdis/140.6.989

Yeo, S. F., & Wong, B. (2002). Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(3), 465–484. https://doi.org/10.1128/cmr.15.3.465-484.2002

Wang, H., Zhang, M., Bianchi, M., Sherry, B., Sama, A., & Tracey, K. J. (1998). Fetuin (α-2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophagedeactivating molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(24), 14429 LP – 14434. https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14429

Wassell, J. (2000). Haptoglobin: function and polymorphism. Clinical Laboratory, 46(11–12), 547–552. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11109501

Zhao, Q., Zhang, H., Wang, T., Chen, S., & Dai, S. (2013). Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. *Journal of Proteomics*, *82*, 230–253. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.024

Zhuo, L., Hascall, V. C., & Kimata, K. (2004). Inter-α-trypsin Inhibitor, a Covalent Protein-Glycosaminoglycan-Protein Complex. Journal of Biological Chemistry, 279(37), 38079–38082. https://doi.org/10.1074/jbc.R300039200

VI - Figures

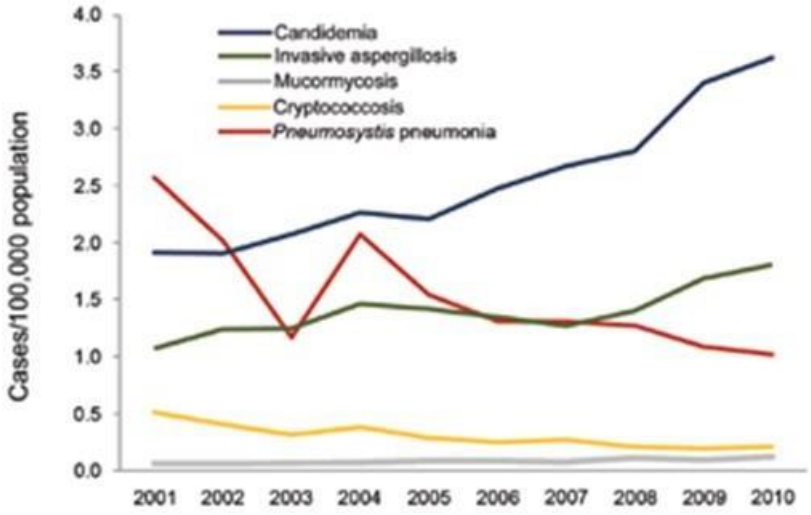


Figure 1. Tendance des incidences des infections fongiques en France entre 2001 et 2010. La tendance est à l'augmentation de l'incidence des candidoses de 7,8% par an (p<0,001) (Régression de Poisson) (Bitar *et al.* 2014)

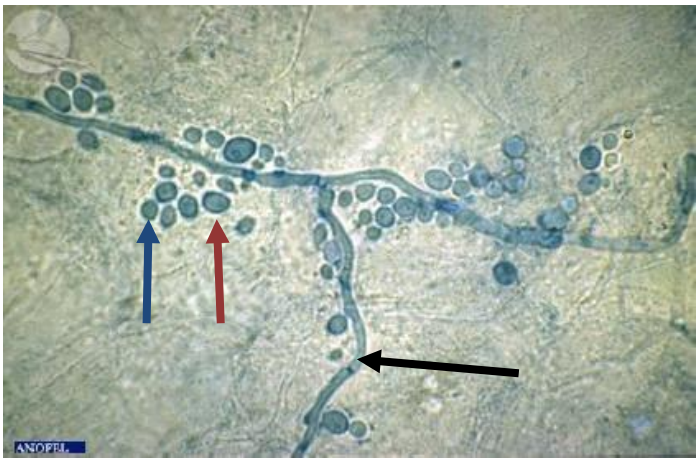


Figure 2. *C. albicans* isolé in vitro, coloré au bleu de lactophénol, visionné au microscope optique. Levures (→), blastospores(→) et pseudomycélium (→). (Gari-Toussaint M. Collégiale des enseignants et praticiens hospitaliers de Parasitologie et Mycologie médicale (ANOFEL))

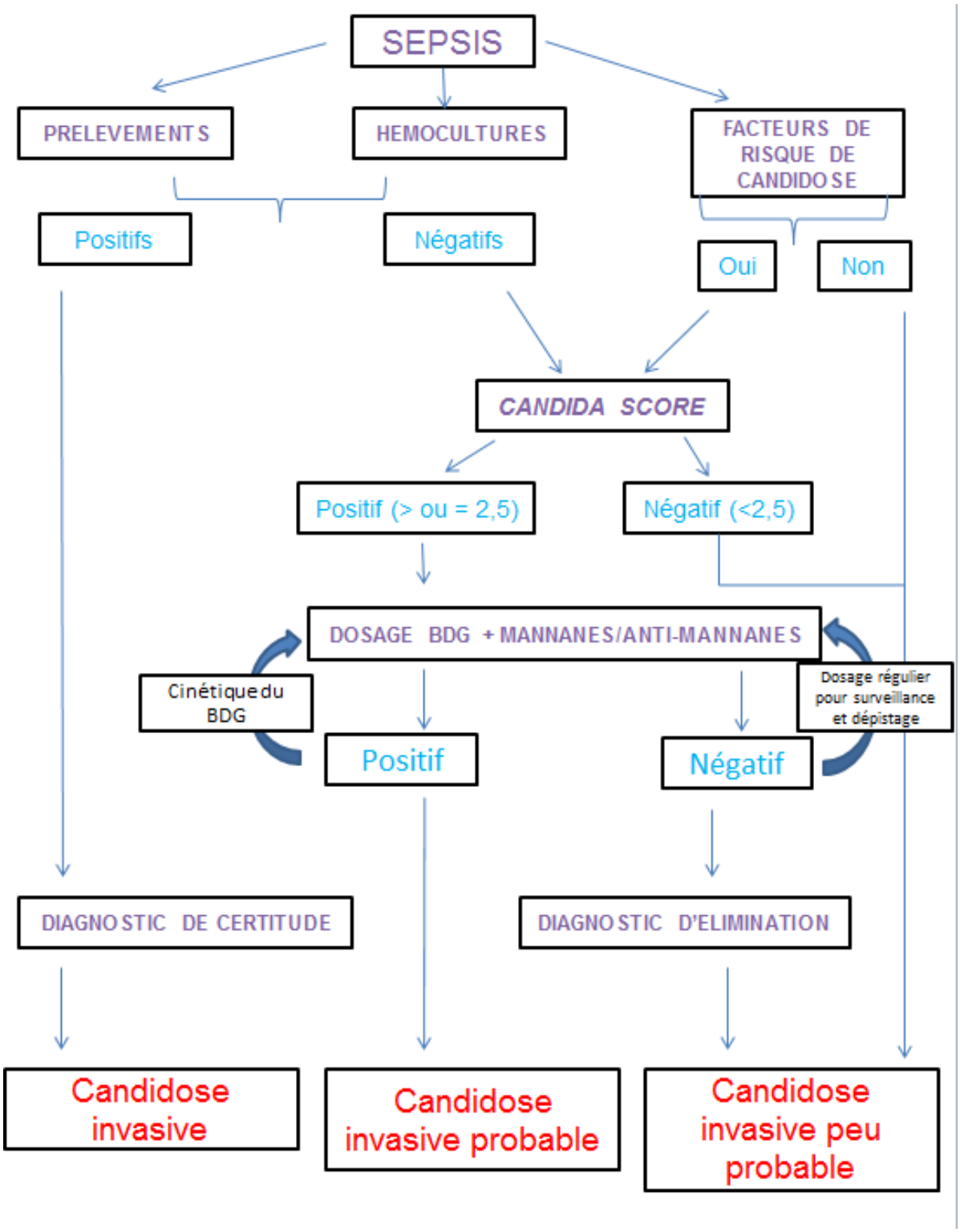


Figure 3. Proposition d'algorithme de diagnostic des candidoses invasives et de surveillance des patients à risque en réanimation (d'après Held et al. 2013)

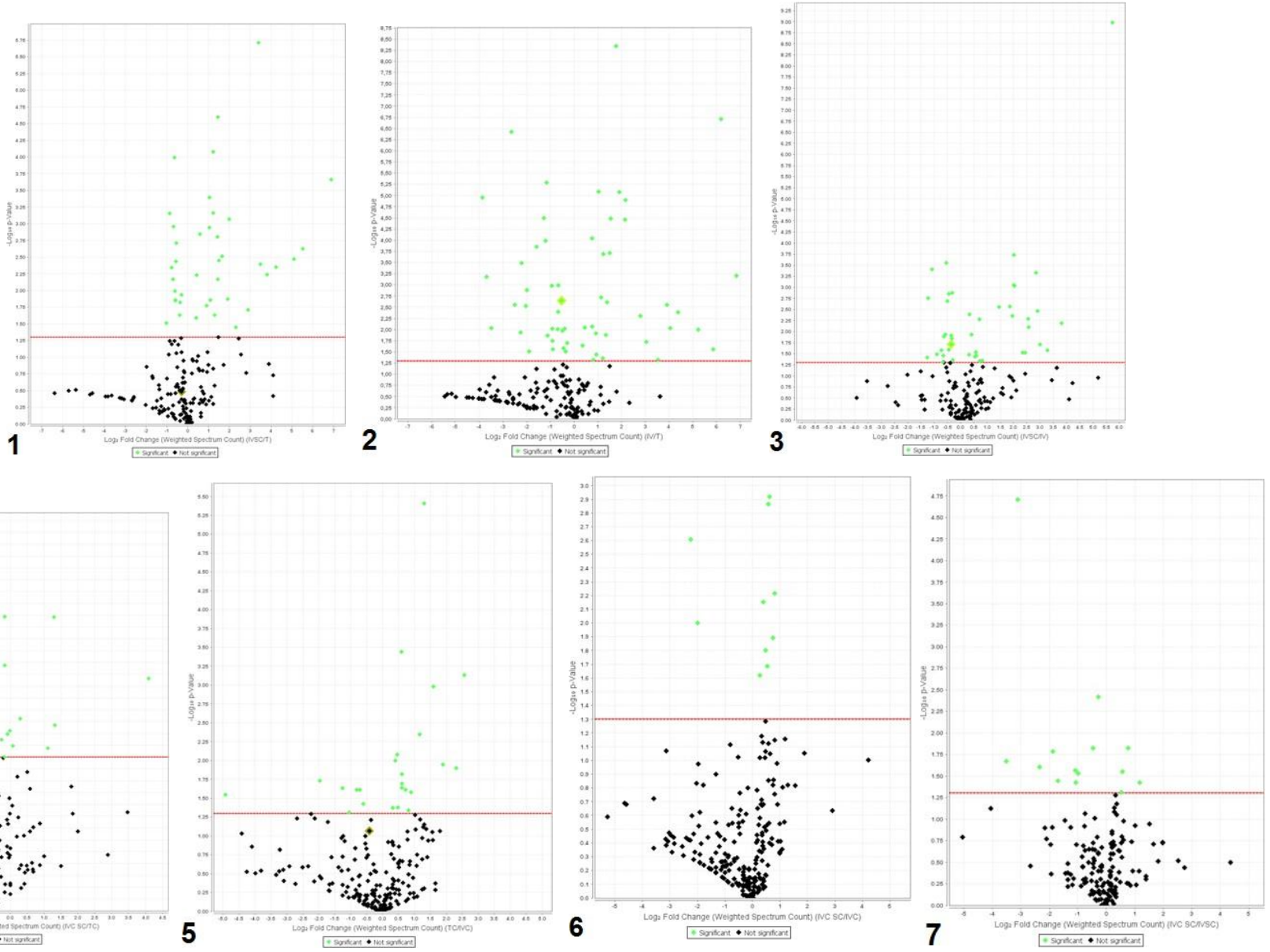

1
-Log10 p-Value
Log2 Fold Change (Weighted Spectrum Count) (IVSC/T)
Significant
Not significant
2
-Log10 p-Value
Log2 Fold Change (Weighted Spectrum Count) (IV/T)
Significant
Not significant
3
-Log10 p-Value
Log2 Fold Change (Weighted Spectrum Count) (IVSC/IV)
Significant
Not significant
4
-Log10 p-Value
Log2 Fold Change (Weighted Spectrum Count) (IVC SC/TC)
Significant
Not significant
5
-Log10 p-Value
Log2 Fold Change (Weighted Spectrum Count) (TC/IVC)
Significant
Not significant
6
-Log10 p-Value
Log2 Fold Change (Weighted Spectrum Count) (IVC SC/IVC)
Significant
Not significant
7
-Log10 p-Value
Log2 Fold Change (Weighted Spectrum Count) (IVC SC/IVSC)
Significant
Not significant

Figure 4. *Volcano plot* montrant (en vert) les protéines différentielles (*p-value* <0.05) dans les comparaisons entre les souris immunocompétentes témoins (T) et les souris immunocompétentes infectées par la souche SC5314 (IVSC) (1) ainsi que celles immunocompétentes infectées par la souche 926 (IVC) (2), les souris immunocompétentes infectées par la souche 926 (IV) et celles infectées par la souche SC5314 (IVSC) (3), les souris immunodéprimées témoins (TC) et les souris immunodéprimées infectées la souche SC 5314 (IVCSC) (4) et celles infectées par la souche 926 (IVC) (5), les souris immunodéprimées infectées par la souche 926 (IVC) et celles infectées par la souche SC5314 (IVCSC) (6), les souris infectées par la souche SC5314 immunodéprimées (IVCSC) et celles immunocompétentes (IVSC) (7) en *Weighted Spectrum Count* La représentation des protéines d'intérêt par *Volcano Plot* permet de repérer les caractères les plus intéressants en termes d'effets biologique et statistique. L'axe des ordonnées est constitué du log10 de la *p-value*, les valeurs élevées représentent des effets significatifs et les valeurs faibles des effets non-significatifs. L'axe des abscisses est constitué du log à base 2 du ratio des moyennes des quantifications normalisées des cinq spectres en « *Weighted Spectrum Count* » utilisés pour identifier les protéines.

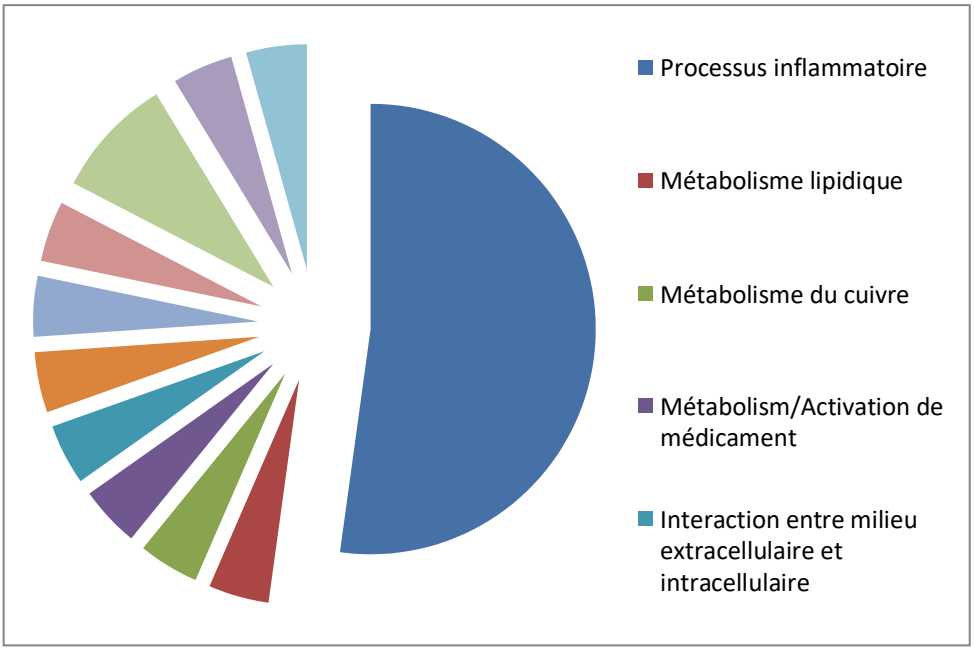
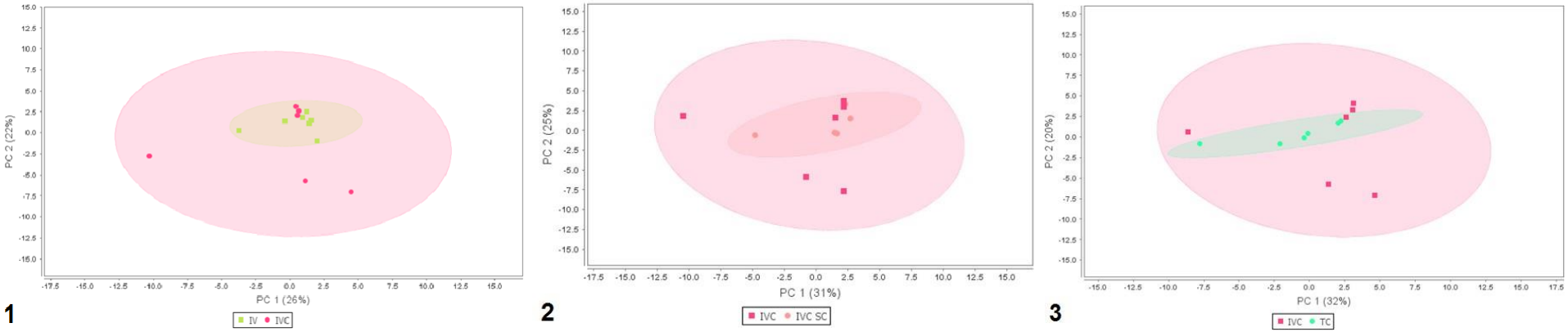


Figure 5. Diagramme en secteurs présentant les rôles biologiques des protéines différentielles communes mises en évidence en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1



1 2 3

Figure 6. Analyse en composantes principales (PC1 et PC2) des comparaisons entre les souris immunodéprimées infectées par la souche de *C. albicans* 926 (IVC) et les souris immunocompétentes infectées par la souche 926 (IV) (1), les souris immunodéprimées infectées par *C. albicans* SC5314 (IVSC) (2), les souris immunodéprimées témoins (TC) (3) pour les valeurs « *Weight Spectrum Count* » Les ACP des trois comparaisons montrent qu'il n'y a que très peu de différence entre leurs conditions

VII - Tableaux

Tableau I. Facteurs de risque de candidoses invasives chez l'adulte (d'après Eggiman *et al.* 2003 ; Leroy *et al.* 2009 ; Bassetti *et al.* 2007)

- Hémopathie maligne ou tumeur solide
- Neutropénie
- Corticothérapie prolongée
- Chimiothérapie
- Insuffisance rénale aiguë
- Pancréatite aiguë grave
- Patient transplanté
- Hospitalisation prolongée en réanimation
- Score APACHE II > 20 *
- Hémodialyse
- Antibiothérapie à large spectre
- Usage d'antifongique
- Accès veineux central
- Ventilation mécanique
- Nutrition parentérale totale
- Traitement immunosuppresseur
- Colonisation à *Candida sp.*
- Chirurgie digestives récente
- Brûlure étendue (> 50%)

*Score APACHE II (Acute physiology and Chronic Health Evaluation) : 12 variables + âge + état de santé du patient ; ce score désigne le degré de sévérité d'une pathologie des patients admis en unité de soins intensifs.

Tableau II. Description des groupes et sérums de souris utilisés (*n* = 36)

Identification échantillon	Jour de prélèvement	Groupe de souris
T1	J1	Témoins
T2		
T3	J3	
T4		
T5	J5	
T6		
TC1	J1	Témoins Cyclo
TC2	J3	
TC3		
TC4	J5	
TC5	J1	
TC6	J5	
IVSC1	J1	SC5314 IV
IVSC2		
IVSC4	J3	
IVSC6		
IVSC9	J5	
IVSC12		
IV9.1	J1	926 IV
IV9.3		
IV9.6	J3	
IV9.7	J5	
IV9.9		
IV9.11	J3	
IV9.5		
IVC SC1	J1	SC5314 IV+Cyclo
IVC SC4		
IVC SC8	J3	
IVC SC9		
IVC SC11	J5	
IVC9.3	J5	926 IV+Cyclo
IVC9.4		
IVC9.6	J3	
IVC9.8	J1	
IVC9.10	J3	
IVC9.12	J1	

***IV** : Souris immunocompétente ***IVC** : Souris immunodéprimées ***Cyclo** : Cyclophosphamide

***926** : souche *C. albicans* déficiente en filamentation ***SC5314** : souche *C. albicans* compétente en filamentation

Tableau III. Groupes de comparaison des sérums de souris

Souches témoins (T) T1 + T2 + T3 + T4 + T5 + T6	**Souche SC5314 (IVSC)** IVSC1 + IVSC2 + IVSC4 + IVSC6 + IVSC9 + IVSC12
Souches témoins (T) T1 + T2 + T3 + T4 + T5 + T6	**Souche 926 (IV)** IV9.1 + IV9.3 + IV9.6 + IV9.7 + IV9.9 + IV9.11+ IV9.5
Souches témoins + cyclophosphamide (TC) TC1 + TC2 + TC3 + TC4 + TC5 + TC6	**Souche SC5314 + cyclophosphamide (IVCSC)** IVCSC1 + IVCSC4 + IVCSC8 + IVCSC9 + IVCSC11
Souches témoins + cyclophosphamide (TC) TC1 + TC2 + TC3 + TC4 + TC5 + TC6	**Souche 926 + cyclophosphamide (IVC)** IVC9.3 + IVC9.4 + IVC9.6 + IVC9.8 + IVC9.10 + IVC9.12
Souche SC5314 (IVSC) IVSC1 + IVSC2 + IVSC4 + IVSC6 + IVSC9 + IVSC12	**Souche 926 (IV)** IV9.1 + IV9.3 + IV9.6 + IV9.7 + IV9.9 + IV9.11+ IV9.5
Souche SC5314 + cyclophosphamide (IVCSC) IVCSC1 + IVCSC4 + IVCSC8 + IVCSC9 + IVCSC11	**Souche 926 + cyclophosphamide (IVC)** IVC9.3 + IVC9.4 + IVC9.6 + IVC9.8 + IVC9.10 + IVC9.12
Souche SC5314 (IVSC) IVSC1 + IVSC2 + IVSC4 + IVSC6 + IVSC9 + IVSC12	**Souche SC5314 + cyclophosphamide (IVCSC)** IVCSC1 + IVCSC4 + IVCSC8 + IVCSC9 + IVCSC11
Souche 926 (IV) IV9.1 + IV9.3 + IV9.6 + IV9.7 + IV9.9 + IV9.11+ IV9.5	**Souche 926 + cyclophosphamide (IVC)** IVC9.3 + IVC9.4 + IVC9.6 + IVC9.8 + IVC9.10 + IVC9.12

Tableau IV. Protéines différentielles communes mises en évidence dans les comparaisons selon le statut immunitaire des souris en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1). Les protéines augmentées pour chaque comparaison sont gratifiées de leur *Fold Change* dans la condition concernée.

	Souris immunocompétentes témoins ou infectées						Souris immunodéprimées témoins ou infectées					
	T vs IVSC		T vs IV		IV vs IVSC		TC vs IVCSC		TC vs IVC		IVC vs IVCSC	
	T	IVSC	T	IV	IV	IVSC	TC	IVCSC	TC	IVC	IVC	IVCSC
Alpha 1 acid glycoprotein 2		2,86										
Alpha 2 HS glycoprotein									2,49			
Apolipoprotein B100		X										
C-reactive protein		4,1										
Carboxylesterase 1C			2,31									
Ceruloplasmin				2,02								
Corticosteroid binding globulin						3,59						
Epidermal growth factor receptor		2,58										
Haptoglobin		50,29		80,16								
Inter alpha trysin inhibitor Heavy Chain 4		34,07										
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H1		121,83										
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H2		10,65										
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H3		2,34										
Leukemia inhibitory factor receptor						5,89						
Lumican									2,18			
Murinoglobulin-1		2,01										
Murinoglobulin-2		3,03										
Myoglobulin							2,84					
Protein Z dependant protease inhibitor		2,31										
Prothrombin						4,26			6,09			
Triosephosphate isomerase							3,06					
Vascular non inflammatory molecule 3										3,87		
Vitronectin											4,93	

Tableau V. Protéines différentielles communes mises en évidence dans les comparaisons selon l'infection par un seul type de souche en fonction du statut immunitaire des souris en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1). Les protéines augmentées pour chaque comparaison sont gratifiées de leur *Fold Change* dans la condition concernée.

	Souris infectées par un type de souche immunocompétentes ou -déprimées			
	IVSC vs IVCSC		IV vs IVC	
	IVSC	IVCSC	IV	IVC
Alpha 1 acid glycoprotein 2				
Alpha 2 HS glycoprotein				
Apolipoprotein B100	3,51			
C-reactive protein				
Carboxylesterase 1C				
Ceruloplasmin				
Corticosteroid binding globulin				2,19
Epidermal growth factor receptor				
Haptoglobin				
Inter alpha trysin inhibitor Heavy Chain 4				
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H1				
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H2				
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H3				
Leukemia inhibitory factor receptor				
Lumican				
Murinoglobulin-1				
Murinoglobulin-2				
Myoglobulin				
Protein Z dependant protease inhibitor				
Prothrombin				
Triosephosphate isomerase				
Vascular non inflammatory molecule 3				
Vitronectin				

Tableau VI. Rôles biologiques des différentes protéines différentielles communes mises en évidence en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1)

	Rôle
Alpha 1 acid glycoprotein 2	Processus inflammatoire (phase aigüe) (Fournier *et al*. 2000)
Alpha 2 HS glycoprotein	Processus inflammatoire (phase aigüe) (Jirak *et al.* 2019)
Apolipoprotein B100	Métabolisme lipidique (Kane *et al.* 1980)
C-reactive protein	Processus inflammatoire (phase aigüe) (Du Clos *et al.* 2004)
Carboxylesterase 1C	Enzyme impliquée dans le métabolisme et l'activation de médicament (Imai *et al.* 2006)
Ceruloplasmin	Enzyme impliquée dans le métabolisme du cuivre / Processus inflammatoire (Hellman *et al.* 2002 ; Charlie-Silva *et al.* 2019)
Corticosteroid binding globulin	Processus inflammatoire (phase aigüe et chronique) (Meyer *et al.* 2016)
Epidermal growth factor receptor	Intéraction milieu extra-cellulaire et intra-cellulaire (Bublil *et al.* 2007)
Haptoglobin	Métabolisme de l'hémoglobine / Processus inflammatoire (phase aigüe) (Schaer *et al.* 2014)
Inter alpha trysin inhibitor Heavy Chain 4	Processus inflammatoire (Zhuo *et al.* 2004)
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H1	Processus inflammatoire (Zhuo *et al.* 2004)
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H2	Processus inflammatoire (Zhuo *et al.* 2004)
Inter alpha trypsin inhibitor Heavy Chain H3	Processus inflammatoire (Zhuo *et al.* 2004)
Leukemia inhibitory factor receptor	Prolifération, différenciation et survie cellulaire (Nicola *et al.* 2015)
Lumican	Processus tumoral (Appunni *et al.* 2019)
Murinoglobulin-1	Processus inflammatoire (phase aigüe) (Charlie-Silva *et al.* 2019)
Murinoglobulin-2	Processus inflammatoire (phase aigüe) (Charlie-Silva *et al.* 2019)
Myoglobulin	Transport de l'oxygène dans les muscles (Ordway *et al.* 2004)
Protein Z dependant protease inhibitor	Coagulation (Han *et al.* 2000)
Prothrombin	Coagulation (Eagle *et al.* 1935)
Triosephosphate isomerase	Glycolyse et production d'énergie (Rodríguez-Almazán *et al.* 2008)
Vascular non inflammatory molecule 3	Processus inflammatoire / Stress oxydatif / Migration cellulaire (Kaskow *et al.* 2012)
Vitronectin	Processus tumoral / Hémostase (Hurt *et al.* 2010 ; Preissner *et al.* 1998)

VIII - Annexes

Annexe 1. Protéines différentielles communes entre les deux conditions IV et IVC en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1) Le Log2 Fold Change <-1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IV et le Log2 Fold Change >1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVC

			Normalized Weighted Spectrum Count				Log10 Precursor Intensity			
Informations protéines			IV vs IVC		Moyenne		IV vs IVC		Moyenne	
Noms de protéine	Numéro d'ordre	Poids moléculaire	p-value	Log2 Fold Change	IV	IVC	p-value	Log2 Fold Change	IV	IVC
Corticosteroid-binding globulin	CBG_MOUSE	45 kDa	0,042	1,01	3,302	6,96	0,027	4,18	7,18	8,237

Annexe 2. Protéines différentielles communes entre les deux conditions IV et IVSC en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1) Le Log2 Fold Change <-1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IV et le Log2 Fold Change >1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVSC

			Normalized Weighted Spectrum Count				Log10 Precursor Intensity			
Informations protéines			IV vs IVSC		Moyenne		IV vs IVSC		Moyenne	
Noms de protéine	Numéro d'ordre	Poids moléculaire	p-value	Log2 Fold Change	IV	IVSC	p-value	Log2 Fold Change	IV	IVSC
Corticosteroid-binding globulin	CBG_MOUSE	45 kDa	0,003	1,86	3,28	11,79	0,006	6,16	7,22	8,71
Leukemia inhibitory factor receptor	LIFR_MOUSE	123 kDa	0,005	2,55	1,29	7,61	0,004	-14,7	7,41	8,34
Prothrombin	THRB_MOUSE	70 kDa	0	2,01	1,5	6,39	0,019	4,11	7,36	8,66

Annexe 3. Protéines différentielles communes entre les deux conditions IVC et IVC SC en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1) Le Log2 Fold Change <-1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVC et le Log2 Fold Change >1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVC SC

			Normalized Weighted Spectrum Count				Log10 Precursor Intensity			
Informations protéines			IVC vs IVC SC		Moyenne		IVC vs IVC		Moyenne	
Noms de protéine	Numéro d'ordre	Poids moléculaire	p-value	Log2 Fold Change	IVC	IVS SC	p-value	Log2 Fold Change	IVC	IVC SC
Vitronectin	VTNC_MOUSE	55 kDa	0,002	-2,25	3,386	0,686	0,003	-9,92	7,973	6,72

Annexe 4. Protéines différentielles communes entre les deux conditions IVSC et IVC SC en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1) Le Log2 Fold Change <-1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVSC et le Log2 Fold Change >1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVC SC

			Normalized Weighted Spectrum Count				Log10 Precursor Intensity			
Informations protéines			IVSC vs IVC SC		Moyenne		IVSC vs IVC SC		Moyenne	
Noms de protéine	Numéro d'ordre	Poids moléculaire	p-value	Log2 Fold Change	IVC SC	IVSC	p-value	Log2 Fold Change	IVC SC	IVSC
Apolipoprotein B-100	APOB_MOUSE	509 kDa	0,036	-2,09	5,37	18,89	0,012	-6,42	7,13	8,26

Annexe 5 Protéines différentielles communes entre les deux conditions T et IV en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1) Le Log2 Fold Change <-1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle T et le Log2 Fold Change >1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IV

			Normalized Weighted Spectrum Count				Log10 Precursor Intensity			
Informations protéines			T vs IV		Moyenne		T vs IV		Moyenne	
Noms de protéine	Numéro d'odre	Poids moléculaire	p-value	Log2 Fold Change	IV	T	p-value	Log2 Fold Change	IV	T
Ceruloplasmin	CERU_MOUSE	121 kDa	0,000	1,03	75,11	37,11	0,000	1,99	10,03	9,39
Haptoglobin	HPT_MOUSE	39 kDa	0,000	6,18	97,80	1,22	0,000	16,5	10,72	7,61
Carboxylesterase 1C	EST1C_MOUSE	61 kDa	0,000	-1,16	27,45	63,54	0,001	-2,29	9,79	10,44

Annexe 6. Protéines différentielles communes entre les deux conditions T et IVSC en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1) Le Log2 Fold Change <-1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle T et le Log2 Fold Change >1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVSC

			Normalized Weighted Spectrum Count				Log10 Precursor Intensity			
Informations protéines			T vs IVSC		Moyenne		T vs IVSC		Moyenne	
Noms de protéine	Numéro d'ordre	Poids moléculaire	p-value	Log2 Fold Change	IVSC	T	p-value	Log2 Fold Change	IVSC	T
Murinoglobulin-1	MUG1_MOUSE	165 kDa	0,00	1,03	86,38	42,82	0,00	2,97	10,22	9,28
Murinoglobulin-2	MUG2_MOUSE	162 kDa	0,00	1,65	30,36	10,01	0,00	3,13	9,81	8,86
Haptoglobin	HPT_MOUSE	39 kDa	0,00	5,52	76,44	1,52	0,00	-16,1	10,36	7,55
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	ITIH3_MOUSE	99 kDa	0,00	1,22	34,52	14,78	0,00	3,98	9,67	8,41
Alpha-1-acid glycoprotein 2	A1AG2_MOUSE	24 kDa	0,00	1,5	6,34	2,21	0,00	3,24	9,18	8,10
Apolipoprotein B-100	APOB_MOUSE	509 kDa	0,00	Reference Missing	18,86	0,00	0,00	Reference Missing	8,27	#DIV/0!
Protein Z-dependent protease inhibitor	ZPI_MOUSE	52 kDa	0,00	1,23	11,92	5,17	0,00	2,05	8,84	8,10
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4	ITIH4_MOUSE	105 kDa	0,00	5,1	12,95	0,38	0,00	-21,7	8,22	6,97
Epidermal growth factor receptor	EGFR_MOUSE	135 kDa	0,00	1,44	8,94	3,46	0,00	3,91	8,36	7,31
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	ITIH1_MOUSE	101 kDa	0,00	6,89	7,31	0,06	0,00	-29,6	8,05	6,17
C-reactive protein	CRP_MOUSE	25 kDa	0,00	1,99	5,76	1,41	0,00	4,65	8,20	6,93
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2_MOUSE	106 kDa	0,00	3,49	5,43	0,51	0,00	-16	8,04	6,63

Annexe 7. Protéines différentielles communes entre les deux conditions TC et IVC SC en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1) Le Log2 Fold Change <-1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle TC et le Log2 Fold Change >1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVC SC

			Normalized Weighted Spectrum Count				Log10 Precursor Intensity			
Informations protéines			TC vs IVC SC		Moyenne		TC vs IVC SC		Moyenne	
Noms de protéine	Numéro d'ordre	Poids moléculaire	p-value	Log2 Fold Change	IVC SC	TC	p-value	Log2 Fold Change	IVC SC	TC
Myoglobine	MYG_MOUSE	17 kDa	0,03	-1,48	3,93	11,17	0,03	-2,8	7,66	8,38
Triosephosphate isomerase	TPIS_MOUSE	32 kDa	0,05	-1,66	1,89	5,79	0,02	-4,71	7,3	8,18

Annexe 8 Protéines différentielles communes entre les deux conditions TC et IVC en *Spectral counting* et *XIC* (p-value < 0,05 et Log2 Fold Change <-1 ou >1) Le Log2 Fold Change <-1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle TC et le Log2 Fold Change >1 correspond aux protéines plus abondantes dans le modèle IVC

			Normalized Weighted Spectrum Count				Log10 Precursor Intensity			
Informations protéines			TC vs IVC		Moyenne		TC vs IVC		Moyenne	
Noms de protéine	Numéro d'ordre	Poids moléculaire	p-value	Log2 Fold Change	IVC	TC	p-value	Log2 Fold Change	IVC	TC
Alpha2-HS glycoprotein (AHSG)	FETUA_MOUSE	37 kDa	0,00	-1,30	10,39	25,90	0,00	-2,09	9,11	9,81
Vascular non-inflammatory molecule 3	VNN3_MOUSE	56 kDa	0,02	1,97	17,54	4,53	0,01	5,51	8,79	7,45
Lumicane	LUM_MOUSE	38 kDa	0,00	-1,16	3,84	8,40	0,01	-1,75	7,61	8,19
Prothrombine	THRB_MOUSE	70 kDa	0,00	-2,56	0,93	5,66	0,00	-4,94	7,29	8,17

Vu, le Directeur de Thèse

Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le

université de TOURS | Faculté de médecine

Thèse 2018/2019

DOCTORAT en MEDECINE

Diplôme d'Etat

D.E.S. de **Biologie Médicale**

Présentée et Soutenue le 05 Septembre 2019

Dépôt de sujet de thèse, proposition de jury.

NOM : MERCIER

Prénoms : Victor, Geoffroy

Date de naissance : 16/02/1988 **Nationalité : Française**

Lieu de naissance : Orléans (45)

Directeur de Thèse : Pr Guillaume DESOUBEAUX

Titre de la Thèse :

Approche protéomique de la physiopathologie des infections à *Candida albicans* à partir d'un modèle animal

JURY

Président : Professeur Hélène BLASCO, Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine – Tours

Membres :

Professeur Guillaume DESOUBEAUX, Service de Parasitologie – Mycologie et Médecine Tropicale, Faculté de Médecine – Tours

Professeur Jacques CHANDENIER, Service de Parasitologie – Mycologie et Médecine Tropicale, Faculté de Médecine – Tours

Professeur Philippe LANOTTE, Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Hygiène Hospitalière, Faculté de Pharmacie – Tours

Docteur Éric BAILLY, PH, Service de Parasitologie – Mycologie et Médecine Tropicale – Tours

Avis du Directeur de Thèse
À Tours, le 08/07/2019

Signature

Pr Guillaume DESOUBEAUX
PU-PH

Avis du Directeur de l'U.F.R. Tours
à Tours, le 11.7.19

Signature

académie d'Orléans-Tours | université de TOURS | Faculté de médecine

Mercier Victor

60 pages – 6 figures – 6 tableaux – 8 annexes

Approche protéomique de la physiopathologie des infections à *Candida albicans* à partir d'un modèle animal

Introduction : Les candidémies sont des infections fongiques disséminées du sang dues au genre *Candida,* et principalement à *Candida albicans.* L'amélioration des connaissances sur la physiopathologie de ces infections est attendue pour chercher des nouveaux biomarqueurs ou cibles thérapeutiques. Une approche protéomique, utilisant la spectrométrie de masse, a pour but de mieux préciser la réponse de l'hôte durant ces processus infectieux.

Matériel et Méthode : La technologie de spectrométrie de masse nanoflow en chromatographie liquide en tandem a été utilisée pour l'identification directe et la quantification relative des protéines de sérums de souris infectées expérimentalement avec différentes souches de *C. albicans*. Les protéines étaient considérées comme différentiellement représentées lorsque la valeur du T-test (*p*-value) était inférieure à 0,05 et lorsque le Log2 de leur Fold Change était supérieur à 1 ou inférieur à -1 en «Spectral Counting» et en «*eXtracted Ion Chromatogram*».

Résultats : Huit comparaisons entre les différentes conditions deux à deux ont été effectuées. Vingt-trois protéines différentiellement représentées ont été identifiées avec des *Fold Change* entre deux conditions allant de 2,01 à 121,83. Douze protéines impliquées dans la phase aiguë de l'inflammation ont ainsi été observées dans les comparaisons mettant en jeu les souris immunocompétentes non infectées et celles immunocompétentes infectées. Aussi, une plus grande réaction inflammatoire a été notée lorsque l'infection est effectuée par une souche virulente *via* sa capacité à filamenter, par rapport à une souche de moindre virulence, incapable de filamenter. Enfin, l'immunodépression semblait interférer dans la réponse de l'hôte.

Discussion : La spectrométrie de masse apparaît être un outil utile pour des explorations *ex vivo* qui doivent être vues comme une étape préliminaire avant la validation de nouveaux biomarqueurs ou de cibles thérapeutiques au cours des candidémies.

Mots clés : Protéomique, *Candida albicans*, modèle murin

Jury :

Président du Jury : Professeur Hélène BLASCO

Directeur de thèse : Professeur Guillaume DESOUBEAUX

Membres du Jury : Professeur Jacques CHANDENIER
Professeur Philippe LANOTTE
Docteur Éric Bailly

Date de soutenance : 5 septembre 2019