Analyse de l'ergostérol dans des cultures fongiques par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Ing. P. LEMUR
Dr sc. N. DECHAMPS
ISICHt – Mons

Cet article est lié à un Travail de Fin d'Etude et à un stage en entreprise réalisé au sein de l'Institut Scientifique de Santé Publique. L'objectif du projet réalisé est la quantification de l'ergostérol présent dans des cultures fongiques en présence de divers agents antifongiques à différentes concentrations afin de développer une nouvelle méthode de test de sensibilité plus objective à l'aide de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS).

Mots clés : ergostérol, culture fongique, antifongique, chromatographie en phase liquide, spectrométrie de masse, levure pathogène, UPLC-MS/MS.

This article is linked to a thesis and an internship spent within The Scientific Institute of Public Health. The goal of this project was to quantify ergosterol present in fungi cultures in presence of different antifungal agents in several concentrations with the aim of developping a more objective new method of antifungal susceptibility testing using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

Key words : ergosterol, fungus culture, antifungal agent, liquid chromatography, mass spectrometry, pathogenic yeast, UPLC-MS/MS.

1. Introduction

Au cours de cette dernière décennie, la fréquence des infections fongiques a augmenté de manière considérable principalement à cause de l'accroissement du nombre de patients immunodéprimés. C'est, entre autres, pour cette raison que le projet de recherche et développement réalisé a été mis en place.

De plus, contrairement aux infections bactériennes, les infections fongiques ne sont pas faciles à diagnostiquer et à traiter. En effet, les tests d'identification et de sensibilité des champignons filamenteux par rapport aux antifongiques sont moins rapides et performants que ceux existant pour les bactéries. Des tests similaires à ceux utilisés pour les bactéries, existent pour les levures mais ils sont basés sur une lecture visuelle, et ne sont donc pas objectifs et quantitatifs. Ils ne permettent pas non plus de choisir l'antifongique et la concentration en ce dernier à tester.

Les tests actuels sont par exemple des systèmes de bandelette avec des concentrations en antifongiques variables à disposer sur une boîte de pétri dans laquelle la levure est mise en culture. En fonction du développement de la culture autour de la bandelette, la concentration minimale d'inhibition (MIC= Minimum Inhibitory Concentration) peut être déterminée. Nous comprenons aisément que ces systèmes sont possibles pour les levures mais pas pour les filamenteux et les dermatophytes dont les cultures ne sont pas uniformes.

En outre, les antifongiques ont énormément d'effets secondaires. Essayer de minimiser cette prise avec un meilleur diagnostic et traitement est important.

Concrètement, cette étude peut être résumée en plusieurs étapes. Tout d'abord, la souche de levure étudiée est repiquée sur un milieu spécifique et incubée 24h à 35°C. Ensuite, elle est mise en culture dans des plaques de 96 puits en présence de divers antifongiques à différentes concentrations. L'étape suivante consiste alors, après un temps de culture défini, à réaliser la lecture du MIC de façon visuelle et spectrophotométrique. Cette méthode est utilisée en routine au sein du service de mycologie et aérobiologie. La seconde partie fait de ce sujet de stage un projet de recherche et développement innovant.

La suite consiste à injecter le contenu des 96 puits de culture fongique au sein d'une UPLC-MS/MS afin de quantifier l'ergostérol libéré lors de la mort de la levure en testant au préalable différentes techniques de préparation des échantillons (centrifugation, filtration ou saponification). Le but est donc de réaliser ces analyses afin d'essayer de trouver un lien entre la concentration en ergostérol et celle en antifongiques, de remarquer si entre autres les MIC trouvés sont similaires afin de

pouvoir trouver une méthode de diagnostic plus rapide et efficace. Etant donné qu'il s'agit d'une méthode de quantification analytique, des standards doivent être préparés et une validation restreinte de la méthode doit être réalisée au préalable.

2. Partie bibliographique

2.1. L'ergostérol [1]

Equivalent au cholestérol dans les cellules animales, l'ergostérol se retrouve uniquement dans la membrane des levures et champignons. Ce stérol joue un rôle au niveau de la fluidité et de la perméabilité de la membrane cellulaire. Son absence totale dans les cellules animales fait de ce stérol une cible pour de nombreux antifongiques.

L'ergostérol existe sous deux formes au sein des cellules fongiques. La forme libre est présente au sein de la bicouche lipidique, le plus souvent en plus grande quantité. L'ergostérol sous forme d'ester (qualifié aussi de lié) est, quant à lui, présent dans le cytoplasme. Ces deux molécules sont présentées à la figure 1. Des études ont montré que l'estérification de l'ergostérol libre augmente lorsque les levures et champignons se trouvent dans une phase de croissance stationnaire. Le groupement R1 (fig.1) est fonction de l'acide gras qui réagit avec l'ergostérol libre pour donner la forme esterifiée.

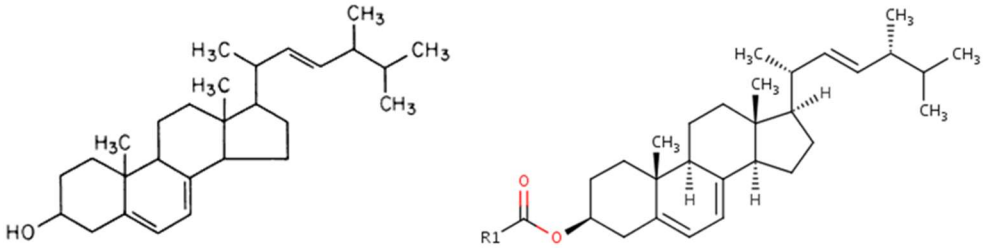

Figure 1: Ergostérol libre (à gauche) et ergostérol estérifié ou lié (à droite)

2.2. La souche de levure utilisée [2] [3]

Il était logique de commencer ce projet de recherche avec des souches de levures dont la culture est plus simple de par leurs temps et leur uniformité que par des dermatophytes ou des filamenteux dont la culture est plus difficile.
La souche de levure choisie est *Candida parapsilosis.* Le choix de l'étude de cette espèce vient du fait qu'il s'agit de la deuxième espèce de *Candida* responsable de septicémies et que son incidence a énormément augmenté durant ces dernières années.

De plus, il s'agit d'une souche de référence dont des breakpoints sont disponibles. Les breakpoints sont des valeurs qui permettent de déterminer si la souche est sensible, intermédiaire ou résistante à l'antifongique testé. Cette souche de référence est utilisée pour le contrôle de la qualité des plaques de culture à 96 puits.

2.3. Les antifongiques [4] [5]

Le tableau 1 ci-dessous résume les informations importantes en ce qui concerne les différents antifongiques utilisés au cours de ce projet. Les antifongiques testés sont évidemment efficaces contre la souche de levure étudiée et ont une action sur l'ergostérol sauf la caspofungine. Le choix de cet antifongique vient du fait que nous espérons que l'ergostérol sera libéré lors de la lyse de la cellule et qu'il pourra alors être quantifié.

Classe d'antifongique	Mécanisme d'action	Nom de l'antifongique	Actif contre *Candida parasilosis*	MIC breakpoint [µg/ml] *C.parasilosis* [8]	
				S ≤	R>
Polyènes	Interaction avec l'ergostérol de la membrane cellulaire et altération de celle-ci	Amphotéricine B	Oui	1	1
Azolès	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol constituant la membrane cellulaire	Kétoconazole	Oui	/	/
		Fluconazole	Oui	2	4
		Itraconazole	Oui	0,12	0,12
		Voriconazole	Oui	0,12	0,12
Echinocandines	Inhibition de la synthèse des glucanes constituant la paroi cellulaire	Caspofungine	Oui	0,002	4

Tableau 1: informations sur les antifongiques utilisés (S= sensible, R= résistant, MIC= minimum inhibitory concentration)

2.4. L'UPLC-MS/MS

Un système d'UPLC-MS/MS a été choisi afin de quantifier l'ergostérol, libre et/ou estérifié selon le mode de préparation des échantillons. L'UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), qui est une amélioration de la chromatographie en phase liquide, permet la séparation physico-chimique de l'ergostérol du reste de l'échantillon. Le principe de séparation repose sur l'affinité que présente un composé lorsqu'il est mis en présence de deux phases non miscibles : une phase stationnaire solide fixée dans une colonne (polaire ou apolaire) et une phase mobile se déplaçant à travers la phase stationnaire sous l'action d'une pression extérieure.
Les paramètres utilisés pour la partie UPLC sont repris dans le tableau 2 ci-dessous.

Marque de la colonne	ACQUITY UPLC (Waters)
Longueur de la colonne	50 mm
Diamètre interne de la colonne	2,1 mm
Diamètre des particules internes	1,7 µm
Forme des particules	Sphérique
Taille des pores	130 Å
Technologie	BEH (Ethylene Bridged Hybrid)
Type de chaine greffée	C 18
Mode d'utilisation	Phase inverse
Gamme de pH	1-12
Activité silanol	Faible
Phase mobile	Régime isocratique : - 95% phase aqueuse (eau distillée avec 0,1% acide formique) - 5% phase organique (méthanol avec 0,1% acide formique)
Flux de solvant	0,6 ml/min

Tableau 2: paramètres utilisés pour la partie UPLC

La partie MS/MS permet de détecter la molécule d'intérêt. Le principe du spectromètre de masse réside en la fragmentation des molécules sous formes de molécules chargées (ions) et ensuite à la séparation de ces ions en fonction du rapport masse sur charge (m/z). Plusieurs analyseurs et modes de détection existent en fonction de l'analyse à réaliser et du genre de résultats désirés (spectre reprenant les ions parents et tous les ions fragments ou spectre correspondant à une transition en particulier par exemple).

Dans notre cas, la technique de spectrométrie à triple quadripôle est utilisée en mode MRM (Multiple Reaction monitoring). Cet analyseur est utilisé car le but des

analyses effectuées est de cibler et quantifier une molécule en particulier (l'ergostérol) et non pas de relever les spectres de masses de tous les composés présents dans les échantillons.

Les paramètres utilisés pour la partie MS-MS sont repris dans le tableau 3 ci-dessous.

Marque du spectromètre de masse	XEVO TQ-S (Waters)
Source	APCI +
Gaz de nébulisation	Azote
Gaz de collision	Argon
Température d'ionisation	600 °C
Voltage de la décharge corona	3,7 kV
Voltage au niveau du cône	40 V
Source offset	30 V
Débit du gaz de collision	0,25 ml/min
Débit du gaz de nébulisation	1000 L/h
Débit du gaz de nébulisation au niveau du cône	150 L/h
Pression de nébulisation	4 bars
Pression au sein de la chambre de collision	$7{,}638852.10^{-5}$mbar
Energie de collision	25 V
Mode d'analyse	MRM
Rapport m/z de l'ion parent	379,2
Rapport m/z des ions fragments	69,0 144,9 159,0

Tableau 3: paramètres utilisés pour la partie MS-MS

3. Matériels et méthode expérimentales

3.1. Préparation des cultures fongiques

Afin d'obtenir des échantillons à analyser, des cultures fongiques de *Candida parapsilosis* ont été réalisées sur plusieurs jours et en plusieurs étapes en se basant sur le mode opératoire décrit par l'EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). [7]

Pour cela, des plaques comprenant 96 puits (12 colonnes numérotées de 1 à 12 et 8 lignes identifiées de A à H) ont été utilisées. Chaque ligne correspond à un antifongique différent et chaque puits d'une ligne possède une concentration décroissante en ce même fongicide. Un schéma des plaques obtenues est présent à la figure 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Cont neg	Contrôle négatif
B	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Contrôle positif
C	AmB 16	AmB 8	AmB 4	AmB 2	AmB 1	AmB 0.5	AmB 0.25	AmB 0.125	AmB 0.064	AmB 0.032	AmB 0.016	AmB 0.008	Amphotéricine B
D	FLC 64	FLC 32	FLC 16	FLC 8	FLC 4	FLC 2	FLC 1	FLC 0.5	FLC 0.25	FLC 0.125	FLC 0.064	FLC 0.032	Fluconazole
E	VOR 16	VOR 8	VOR 4	VOR 2	VOR 1	VOR 0.5	VOR 0.25	VOR 0.125	VOR 0.064	VOR 0.032	VOR 0.016	VOR 0.008	Voriconazole
F	ITC 16	ITC 8	ITC 4	ITC 2	ITC 1	ITC 0.5	ITC 0.25	ITC 0.125	ITC 0.064	ITC 0.032	ITC 0.016	ITC 0.008	Itraconazole
G	KTZ 16	KTZ 8	KTZ 4	KTZ 2	KTZ 1	KTZ 0.5	KTZ 0.25	KTZ 0.125	KTZ 0.064	KTZ 0.032	KTZ 0.016	KTZ 0.008	Kétoconazole
H	Caspo 8	Caspo 4	Caspo 2	Caspo 1	Caspo 0.5	Caspo 0.25	Caspo 0.125	Caspo 0.064	Caspo 0.032	Caspo 0.016	Caspo 0.008	Caspo 0.004	Caspofungine

Figure 2: concentrations finales en antifongiques dans les puits en [µg/ml]

Dans chaque puits se trouve un volume total de 202 µl réparti comme suit : 100µl d'eau stérile, 100µl d'inoculum (milieu RPMI + souche de levure + eau saline) et 2 µl d'antifongique. Les puits correspondant aux contrôles négatifs sont utilisés pour vérifier que l'eau et le milieu utilisés étaient bien stériles. Par conséquent, aucune levure ne devra s'y développer. La deuxième ligne de la plaque (B 1 à B12), sert, quant à elle, de contrôle positif afin de vérifier que la souche de levure s'est bien développée. Elle ne contient donc pas d'antifongique.

3.2. Préparation des échantillons

Une étape de préparation du contenu des puits doit être réalisée avant l'injection dans l'UPLC-MS/MS. En effet, suite à l'action des antifongiques, les levures mortes vont libérer l'ergostérol mais également d'autres composés et organites par exemple. Il est alors nécessaire de se débarrasser au maximum de ces derniers afin de ne pas encrasser la colonne et risquer d'avoir des contaminations. Quatre techniques ont été testées : centrifugation, filtration, saponification suivie d'une centrifugation et saponification suivie d'une filtration.
La centrifugation se réalise durant 10 min à 13 000 tours/ minute. La filtration s'effectue à l'aide d'un filtre PVDF 0,2µm à placer au bout d'une seringue.
La saponification est intéressante à tester uniquement pour les antifongiques azolés. Effectivement, ces antifongiques empêchent la formation d'ergostérol. Néanmoins, si une quantité de ce stérol est quand même produite il faut être capable de la détecter

par après, qu'elle soit sous forme libre ou estérifiée. Cette technique n'est pas intéressante pour les agents actant sur l'ergostérol de la membrane comme l'amphotéricine B.

Etant donné qu'il s'agit d'un projet de recherche et développement, les conditions nécessaires à la saponification n'étaient pas définies. Le choix de ces conditions s'est donc fait après lecture et étude de plusieurs publications liées à l'analyse de l'ergostérol contenu dans des champignons de divers échantillons. Les conditions alors choisies sont les suivantes : ajout de 40µl d'une solution d'hydroxyde de potassium méthanolique 1,5M dans chaque puits et mise au bain chaud à 70°C pendant 1heure.

3.3. Préparation des standards

La préparation des standards est une étape importante car ceux-ci permettent de réaliser une droite d'étalonnage afin de quantifier l'ergostérol présent dans les échantillons de cultures fongiques. Une gamme de concentrations de l'ordre de 0ng/ml à 2500ng/ml a été sélectionnée sous base de tests réalisés antérieurement (8 standards au total : 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 et 2500 ng/ml). Il est donc essentiel de réaliser des solutions de concentrations intermédiaires (100, 10 et 1 µg/ml) et une solution stock de base (1mg/ml).

Il est intéressant de mentionner que les standards sont réalisés en utilisant du milieu RPMI comme solvant afin d'être dans les mêmes conditions que les échantillons provenant des cultures fongiques pour éviter ainsi les effets de matrice.

4. Résultats

4.1. Validation de la méthode de quantification

La validation de la méthode analytique a été réalisée en suivant les guidelines proposés par "La Commission des Communautés Européennes" [6].
Trois paramètres importants ont été validés : la linéarité, la justesse et la répétabilité. Pour ce faire, avant de commencer l'analyse des échantillons, seuls les standards ont été injectés sur deux jours. Deux séries comprenant les 8 standards, 6 standards à 25 ng/ml, 6 standards à 250 ng/ml et 6 standards à 2500 ng/ml, ont été injectés.

- La linéarité

La linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse à fournir, à l'intérieur d'un certain intervalle, une valeur d'information (dans notre cas la surface sous le

chromatogramme obtenu) en fonction de la quantité d'analyte à doser. La procédure suivie demande que la courbe d'étalonnage soit construite avec au moins cinq niveaux, zéro compris (donc minimum quatre standards). Il est ensuite demandé d'obtenir une valeur de R et de R^2 (coefficient de corrélation) supérieure ou égale à 0,99. Un exemple de droite de calibration obtenue se situe à la figure 3.

Cette étape permet également de définir la limite supérieure de linéarité ainsi que la limite inférieure de linéarité qui correspondent respectivement aux standards de concentration égale à 2500 ng/ml et à 0 ng/ml.
La limite de quantification (LOQ = Limit Of Quantification) est fixée au standard de 25 ng/ml. La LOD (Limit Of Detection) n'a pas été déterminée mais elle est évidemment plus faible que la LOQ et son rapport signal sur bruit doit être de minimum 3.

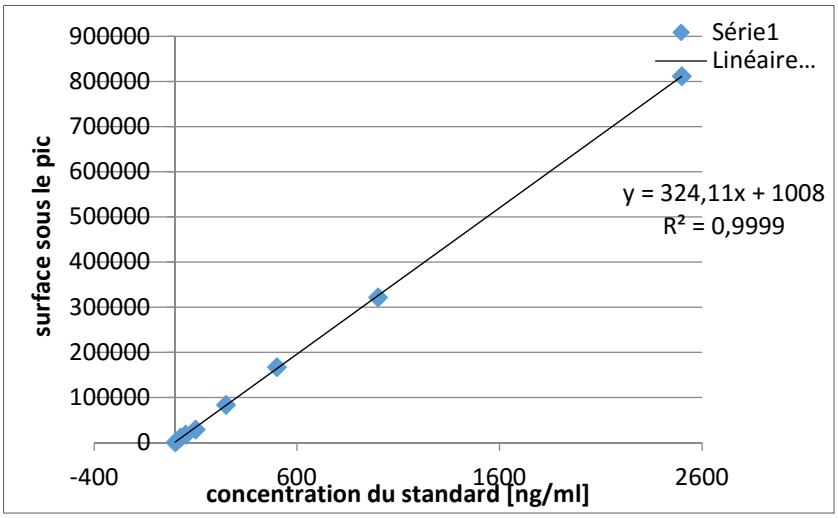

Figure 3: exemple de droite de calibration pour expliciter la linéarité

- La justesse

La justesse ou l'exactitude est l'étroitesse d'accord entre la valeur trouvée et la valeur acceptée (valeur conventionnellement vraie). Pour qualifier ce paramètre, les valeurs des pourcentages de déviation (coefficient de variation, Relative Standard Deviation) sont analysées (fig.4).

Pour des concentrations de standards supérieures ou égales à 10 µg/kg ou 10 ng/ml, comme dans notre cas, les guidelines exigent, que les valeurs des pourcentages de déviation soient comprises entre -20% et +10% pour que la justesse soit validée.

concentrations des standards [ng/ml]	RSD (%)	concentrations trouvées [ng/ml]
0	/	0
25	**24,4**	31,1
50	3,7	51,9
100	-12,9	87,1
250	1,7	254,2
500	2,4	512,1
1000	-1,1	988,8
2500	0	2499,8

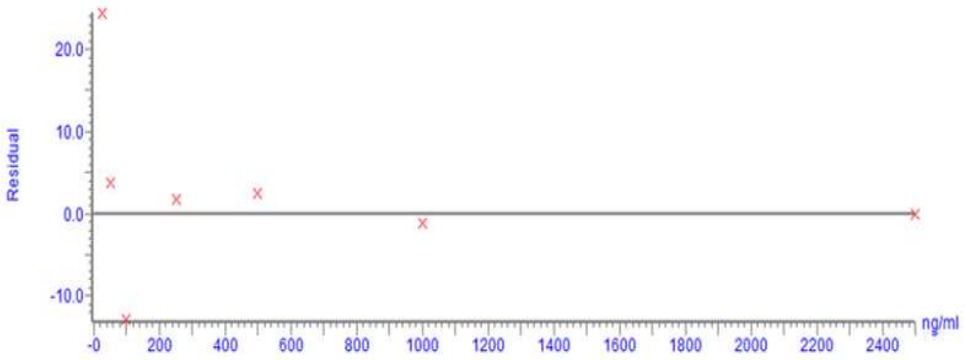

Figure 4: valeurs des RSD (Relative Standard Deviation) et graphique des résidus

Dans l'exemple proposé ci-dessus, nous remarquons qu'un pourcentage de déviation n'est pas compris dans l'intervalle prôné par les guidelines de la Commission des Communautés Européenne. Cela signifie alors que cette valeur n'est pas considérée comme juste. Normalement, il faudrait recommencer la droite pour ne plus obtenir un tel écart. Néanmoins, comme tous les autres pourcentages sont contenus dans l'intervalle [-20, +10]% et que la droite de calibration est linéaire (R et R^2 tout deux supérieurs à 0,99, voir figure 3), nous avons tout de même décidé de garder cette série.

- La répétabilité

Les conditions de répétabilité sont respectées lorsque les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode (même analyte), dans le même

laboratoire, par le même utilisateur avec le même équipement, pendant un court intervalle de temps.

La répétabilité (intra-jour) ainsi que la répétabilité intermédiaire, qualifiée également d'intra-laboratoire (sur deux jours) ont été validées. Pour ce faire, les coefficients de variation (intra-jour et intra-laboratoire) sont calculés et il faut ensuite vérifier qu'ils sont inférieurs aux coefficients de variations maximums définis par les équations d'Horwitz. Ces dernières peuvent être écrites comme suit: $C_{VR\ max}= \frac{2}{3} \times 2^{(1-0,5\times log_{10}C)}$ et $C_{VRW\ max}=2^{(1-0,5\times log_{10}C)}$ dans lesquelles C représente la fraction de la masse exprimée en puissance de 10 (par exemple, 250ng/ml=250.10^{-9}).

Les résultats sont obtenus aisément grâce à un programme statistique (exemple pour les standards de 250ng/ml à la figure 5). Les coefficients de variations dans un jour (C_{VR}) et entre 2 jours (C_{VR}) sont inférieurs aux maximums d'Horwitz, ce qui montre que les critères de répétabilité sur un jour ainsi que de répétabilité intra-laboratoire sont respectés lors de nos analyses. Notre méthode peut donc être qualifiée de valide en ce qui concerne la répétabilité.

mean of means =	250 µg/l	Max Horwitz
CV_r =	5.36758 %	13.1%
CV_{RW} =	5.62394 %	19.7%

	jour 1 (06/10/2014)	jour 2 (09/10/2014)
concentrations des standards [ng/ml]	concentrations trouvées [ng/ml]	concentrations trouvées [ng/ml]
250	248,9	229,9
250	229,3	243,1
250	261,3	245,2
250	254	257,2
250	235,1	268,4
250	271,4	256,2
moyenne	**250**	**250**

Figure 5: Résultats type pour les répétabilités (standards à 250ng/ml), la première image reprend les résultats tels que le programme statistique les présente

4.2. Choix de la meilleure technique de préparation des échantillons

Une fois la méthode validée pour les paramètres choisis, les échantillons peuvent être injectés. A la suite d'une analyse par UPLC-MS/MS, les résultats sont obtenus sous forme de chromatogramme tel que celui présent à la figure 6. Ces chromatogrammes sont utiles pour quantifier des analytes. En effet, en intégrant le pic il est possible d'obtenir une valeur de surface. Grâce à des standards de concentration connue, une droite de calibration de l'aire sous le pic en fonction de la concentration peut être réalisée. Pour des échantillons de concentration inconnue, il suffira alors de trouver la concentration correspondant à la surface sous le pic grâce à la droite de calibration.

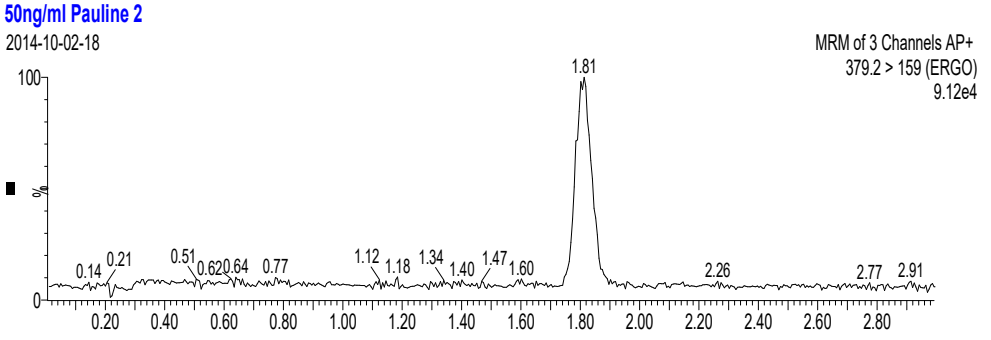

Figure 6: exemple de chromatogramme obtenu

Quatre plaques de culture fongique avec *Candida parapsilosis* et les différents antifongiques à diverses concentrations ont été préparées afin de tester la centrifugation, la filtration, la saponification suivie de la centrifugation ainsi que la saponification suivie de la filtration. Les chromatogrammes obtenus sont alors analysés afin de comparer les MIC récoltés via les 3 méthodes (UPLC-MS/MS, lecture visuelle et lecture via spectrophotomètre) et la meilleure des 4 techniques est ensuite sélectionnée.

- Centrifugation

Les résultats obtenus peuvent être présentés sous forme de tableaux.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**	**Cont neg**
B	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos	Cont pos
C	**AmB 16**	**AmB 8**	**AmB 4**	**AmB 2**	**AmB 1**	**AmB 0,5**	**AmB 0,25**	**AmB 0,125**	**AmB 0,064**	**AmB 0,032**	AmB 0,016 28,6	AmB 0,008 26,6
D	**FLC 64**	**FLC 32**	**FLC 16**	**FLC 8**	**FLC 4**	**FLC 2**	**FLC 1**	FLC 0,5 34,2	FLC 0,25 42,2	FLC 0,125 41,8	FLC 0,064 27,7	FLC 0,032 39,5
E	**VOR 16**	**VOR 8**	**VOR 4**	**VOR 2**	**VOR 1**	**VOR 0,5**	**VOR 0,25**	**VOR 0,125**	**VOR 0,064**	**VOR 0,032**	VOR 0,016 32,6	VOR 0,008 43,3
F	**ITC 16**	**ITC 8**	**ITC 4**	**ITC 2**	**ITC 1**	**ITC 0,5**	**ITC 0,25**	**ITC 0,125**	**ITC 0,064**	**ITC 0,032**	**ITC 0,016**	ITC 0,008 26,1
G	**KTZ 16**	**KTZ 8**	**KTZ 4**	**KTZ 2**	**KTZ 1**	**KTZ 0,5**	**KTZ 0,25**	**KTZ 0,125**	**KTZ 0,064**	**KTZ 0,032**	KTZ 0,016 26,3	KTZ 0,008 32,7
H	Caspo 8 102,8	Caspo 4 67,7	Caspo 2 39,5	Caspo 1 83	Caspo 0,5 79,5	Caspo 0,25 63,3	Caspo 0,125 38,6	Caspo 0,064 30,3	Caspo 0,032 28,6	Caspo 0,016 33,2	Caspo 0,008 28	Caspo 0,004 25,9

Tableau 4: MIC trouvés via analyse par UPLC-MS/MS en utilisant la technique de centrifugation

Au sein d'une case,

- 1ere ligne = nom de l'antifongique
- 2ieme ligne= concentration en cet antifongique [µg/ml]
- 3ieme ligne = concentration en ergostérol [ng/ml]
-

ergostérol pas detecté/quantifié

Ergostérol détecté/quantifié

- MIC

Tout d'abord, le premier tableau montre que dans tous les puits ne contenant pas de culture fongique (contrôles négatifs), aucune trace d'ergostérol n'a été détectée. Cela prouve que la mise en culture a bien été réalisée de manière stérile et que l'eau et les divers solvants utilisés étaient également sans traces de levures et/ou champignons au préalable.
Dans les puits correspondant aux contrôles positifs et ne contenant pas d'antifongique, les levures se sont bien développées vu que de l'ergostérol a été détecté (la souche est donc bien valide). Néanmoins, les quantités d'ergostérol quantifiées dans ces puits ne sont à priori pas utiles pour la suite des résultats et conclusions, c'est pourquoi elles ne figurent pas dans le tableau. Cependant, pour ce premier test, la concentration moyenne en ergostérol dans les contrôles positifs était d'environ 30 ng/ml.
Ensuite, une tendance peut être observée pour les azolés : plus la concentration en antifongique augmente, moins l'ergostérol est détecté. Cette remarque est logique vu que les azolés ont une action directe sur l'ergostérol (blocage de celle-ci). Les résultats expérimentaux obtenus pour l'amphotéricine B présentent une tendance inverse, ce qui est à priori contradictoire vu le mode d'action de cet antifongique (capture de l'ergostérol au niveau de la membrane cellulaire).
Pour la caspofungine, de l'ergostérol est détecté dans tous les cas que les levures soient mortes ou vivantes. Dans ce premier cas, cette molécule est présente car cet antifongique n'a pas d'action sur l'ergostérol mais sur la 1,3-beta-D-glucane qui compose la paroi cellulaire engendrant alors la lyse des cellules de levures.
Nous pouvons dès lors déjà conclure que la technique que nous essayons de mettre au point ne fonctionnera surement pas pour cet antifongique. Nous savions précédemment à l'analyse que cet antifongique n'avait pas l'ergostérol pour cible mais nous avons quand même décidé de réaliser des tests en présence de celui-ci en espérant trouver un autre lien entre les deux concentrations (en ergostérol et en antifongique).

	MIC breakpoint		Valeurs de MIC par UPLC-MS	Valeurs de MIC lecture visuelle	Valeurs de MIC via spectrophotomètre
	S ≤	R >			
Amphotéricine B	1	1	0,032	0,125	0,125
Fluconazole	2	4	1	4	1
Voriconazole	0,12	0,12	0,032	0,064	0,032
Itraconazole	0,12	0,12	0,016	0,032	0,064
Kétoconazole	/	/	0,032	0,064	0,032
Caspofungine	0,002	4	/	2	0,5

Tableau 5: les différentes valeurs de MIC trouvées pour la centrifugation en [µg/ml]

La conclusion importante qui peut être déduite de ce tableau 5 est que la souche de *Candida parapsilosis* étudiée est bien sensible aux antifongiques testés. Effectivement, dans tous les cas (sauf caspofungine et ketoconazole), les valeurs de MIC trouvées par les trois méthodes de quantification sont inférieures au MIC breakpoint S. Ce constat est un premier élément important car il permet de confirmer que les résultats obtenus par la « nouvelle » technique UPLC-MS/MS sont en accord avec ceux trouvés avec les deux autres « anciennes »méthodes prônées par l'EUCAST.

Cependant, il est impossible de confirmer cela pour la casponfungine à cause de son mode d'action (même raison que ci-dessus) et pour le kétoconazole car les valeurs de MIC breakpoint ne sont pas disponibles (antifongique retiré du marché en 2013).

- Filtration

Les résultats obtenus lors du test de la technique de filtration ne sont pas détaillés car les observations réalisées sont les mêmes que celles faites pour la technique de centrifugation.

- Saponification

Les résultats obtenus pour les deux techniques utilisant la saponification sont similaires et non traitables puisque aucune trace d'ergostérol n'a été détectée lors de ces analyses !

L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette situation réside dans le fait que, soumettre la culture à 70°C pendant une heure, a complètement tué les levures. Même si cela est parfois indiqué dans la littérature pour des levures, aucune information n'a été trouvée à ce sujet en ce qui concerne les cultures de *Candida parapsilosis* en particulier.

La saponification, dans les conditions telles que nous les avons choisies, ne sont donc pas du tout optimales puisqu'aucun résultat ne peut en être retiré après analyse par UPLC-MS/MS. Comme expliqué précédemment, les conditions de saponification pour lesquelles nous avons optés, ont été choisies après analyses de publications. Il a donc bien fallu faire un choix mais dans ce cas il n'est pas du tout optimal. La mise au point de l'optimisation des conditions de saponification pourrait faire l'objet d'une étude à elle seule.

- Technique choisie : la centrifugation

Une fois les quatre techniques de préparation des échantillons testées, le choix de la meilleure a été réalisé. Il est évident que les deux techniques utilisant la saponification ont directement été éliminées pour les raisons évoquées

précédemment et donc le choix a dû être effectué entre la centrifugation et la filtration. Les résultats obtenus par ces deux techniques étant similaires, le choix s'est donc porté sur des critères économiques et de gain de temps.

La centrifugation a alors été choisie pour continuer nos recherches. Cette technique demande donc la possession d'une centrifugeuse. Outre cet équipement, elle ne nécessite pas de matériel particulier à part des tubes eppendorfs. De plus, il est possible de mettre 24 tubes eppendorfs en une fois dans la centrifugeuse, ce qui permet un gain de temps. Au contraire, la filtration est une étape plus longue car il faut filtrer puits par puits (nécessité d'utiliser 96 seringues et 96 filtres PVDF pour une seule plaque d'échantillons).

4.3. Vérification de la répétabilité de la technique choisie

Afin de monter que les résultats obtenus lors de l'analyse de la première plaque n'étaient pas dû au hasard, une petite vérification de la répétabilité de la méthode de centrifugation a été effectuée. Deux plaques (N_1 et N_2) ont été préparées et puis comparées aux premiers résultats.

	MIC breakpoint [µg/ml]		Valeurs de MIC par UPLC-MS				Valeurs de MIC lecture visuelle				Valeurs de MIC via spectrophotomètre			
	S ≤	R >	1ere analyse	N1	N2	moyenne	1ere analyse	N1	N2	moyenne	1ere analyse	N1	N2	moyenne
AmB	1	1	0,032	0,25	0,125	0,136	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
FLC	2	4	1	2	2	1,67	4	1	1	2	1	1	1	1
VOR	0,12	0,12	0,032	0,064	0,064	0,053	0,064	0,016	0,016	0,032	0,032	0,016	0,016	0,021
ITC	0,12	0,12	0,016	0,016	0,016	0,016	0,032	0,008	0,008	0,016	0,064	0,008	0,008	0,027
KTZ	/	/	0,032	0,064	0,032	0,043	0,064	0,008	0,008	0,027	0,032	0,016	0,016	0,021
Caspo	0,002	4	/	/	/	/	2	1	0,5	1,17	0,5	1	1	0,833

Tableau 6: comparaison des différentes valeurs de MIC [µg/ml] pour les 3 plaques avec utilisation de la centrifugation

Le tableau 6 ci-dessus permet d'observer que les trois valeurs de MIC obtenues par analyse UPLC-MS/MS pour la technique de centrifugation ne donnent pas toujours trois résultats similaires. Ces différences sont dues au fait qu'il s'agit d'un système biologique. En conséquence, le développement des levures ainsi que l'action des antifongiques ne sont pas toujours identiques.

Il est impossible de prévoir exactement le comportement d'un tel système de culture. Cette remarque est également valable pour les deux autres techniques mais la différence est plus visible par UPLC-MS/MS car il est possible d'obtenir des résultats plus précis.
Néanmoins, les valeurs précises de MIC ne sont pas les données les plus importantes. Le plus intéressant est de remarquer que, dans tous les cas, la souche est bien sensible aux antifongiques car les valeurs sont inférieures aux MIC breakpoint S. Cette information permet de confirmer que les résultats obtenus par la méthode UPLC-MS/MS sont cohérents avec ceux trouvés par les deux autres méthodes. Pour les mêmes raisons évoquées précédemment, cette conclusion n'est pas confirmable pour le kétoconazole et le caspofungine.
Le fait de savoir que la souche testée, dans notre cas *Candida parapsilosis*, est sensible aux antifongiques est un paramètre important car de plus en plus de souches résistantes apparaissent.

5. Conclusion et perspectives

Le but de ce projet était la mise au point d'un nouveau test de sensibilité aux antifongiques, plus objectif que les tests existants actuellement, par quantification de l'ergostérol contenu dans les cultures fongiques à l'aide d'une UPLC-MS/MS. Deux grands axes peuvent alors être définis : une partie mycologie traitant de la mise en culture des levures (souche de *Candida parapsilosis*) en présence des divers antifongiques et une partie analytique visant la quantification de l'ergostérol.

Avant analyse des échantillons, différentes techniques de préparation de ceux-ci ont été testées. Un des objectifs était de choisir la technique la plus efficace et notre choix s'est porté sur la centrifugation. Une partie validation de la méthode de quantification a dû également être réalisée au préalable. La linéarité, la justesse et la répétabilité ont été validées.

Les résultats obtenus peuvent être résumés comme il suit :

- Les antifongiques n'ayant pas pour cible l'ergostérol, comme par exemple la caspofungine, ne peuvent pas être analysés par cette nouvelle méthode car il n'est pas possible de détecter un MIC.
- Pour le kétoconazole, nous n'avons pas non plus pu tirer de conclusions intéressantes comme les valeurs de MIC breakpoint (MIC « théoriques »), permettant de définir si la souche testée est sensible ou résistante, ne sont pas connues pour cause de mise hors du marché.
- Pour les autres antifongiques testés (amphotéricine B, fluconazole, itraconazole et voriconazole) des résultats intéressants ont été obtenus. Il est évident que nous n'avons pas eu exactement la même valeur de MIC pour

chaque test car il s'agit d'un système biologique et que de nombreux paramètres interviennent dans la croissance des levures ainsi que lors de l'action des antifongiques. Néanmoins, il est important de remarquer que dans tous les cas, les MIC trouvés par analyse UPLC-MS/MS sont toujours inférieurs ou égaux au MIC breakpoint S ce qui signifie que la souche est sensible à ces antifongiques. Les MIC repérés visuellement ou via spectrophotométrie rejoignent cette remarque mais l'analyse par UPLC-MS/MS est plus objective, ce qui est un point positif et capital de cette nouvelle technique.

En ce qui concerne les points négatifs de cette méthode, le temps d'analyse doit être pris en compte. En effet, une préparation supplémentaire des échantillons et des standards ainsi que la phase d'analyse par UPLC-MS/MS doivent être prises en compte. De plus, l'interprétation des résultats est moins aisée, les résultats ne sont pas basés sur une simple lecture visuelle. L'entièreté de l'analyse demande du personnel qualifié et une UPLC-MS/MS, appareillage coûteux qui n'est actuellement pas présent dans les laboratoires de mycologies hospitaliers. Par conséquent, dans le futur, le développement de cette méthode en kit pourrait être intéressant.

A propos des points positifs, mis à part l'objectivité de la technique qui est très importante, nous pouvons aussi citer le fait qu'elle laisse davantage de liberté et de choix. Effectivement, les tests de sensibilité fongique utilisés actuellement en laboratoire hospitalier ne permettent pas de choisir le type d'antifongique ainsi que sa concentration. Ces paramètres sont définis par le constructeur des tests. Cependant, aucun test clinique fiable n'existe pour tester la résistance des champignons filamenteux et des dermatophytes. Toutefois, cette importante information, ouvre de nombreuses perspectives pour la suite de ce projet.

Etant donné qu'il s'agit d'un projet de recherche et développement qui n'avait pas encore été traité, de nombreuses perspectives sont possibles. Les recherches ont débuté avec des levures se développant plus uniformément et plus rapidement. Néanmoins, de nombreuses maladies mycologiques sont également dues à des filamenteux ou des dermatophytes. Il serait intéressant de tester à l'avenir cette technique par UPLC-MS/MS avec des champignons de ce type car leur culture n'est pas du tout uniforme contrairement à une levure. Les tests de lecture visuelle et spectrophotométrique sont donc très difficiles voire irréalisables.
De plus, comme relevé précédemment, aucun test clinique direct n'existe pour déterminer la sensibilité des filamenteux et des dermatophytes. Pour l'instant, ces derniers ne présentent pas de résistance. Cependant, il est possible que dans quelques années des résistances se développent également pour ce type de pathogène.

6. Sources

[1] DE SIO Francesco *et al*. (2000), *Analysis of free and esterified ergosterol in tomato products,* Journal ofAgricultural and Food Chemistry, vol. 48, pp. 780-784.

[2] GACSER Attila, NOSANCHUK Joshua D., TROFA David (2008), *Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen,* Clinical Microbiology Reviews, vol. 21, No. 4, pp. 606-625.

[3] BOEKHOUT T., FELL J.W., KURTZMAN C.P. (2011), *The yeasts, a taxonomic study*, fifth edition, volume 1, Londres, Elsevier, pp. 3-13 et pp. 111-115.

[4] S.HALL Gerri (2012), *Interactions of yeasts, moulds and antifungal agents*, Londres, Springer, pp. 1-35.

[5] NEVE Jean, *Etudes des médicaments : médicaments organiques volume 1,* cours dédié aux étudiants en troisième année du grade de bachelier en Sciences Pharmaceutiques, année académique 2012-2013, Université Libre de Bruxelles, pp. 134-149.

[6] Commission des Communautés Européennes, (17 août 2002), *Décision de la Commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats,* Journal Officiel des Communautés européennes, 2002/657/CE.

[7] The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST), (mars 2012), *Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts,* Document E.Def7.2., disponible via http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/EUCAST_EDef_7_2_revision.pdf

[8] The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), (12 août 2014), *Antifungal Agens Breakpoint tables for interpretation of MICs*, version 7.0, disponible via http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_7.0.pdf