



HAL
open science

Construction d'une souche de *Candida lusitaniae* génétiquement modifiée pour l'étude des mutations de résistance aux échinocandines caractérisées chez des isolats cliniques

Célia Couzigou

► **To cite this version:**

Célia Couzigou. Construction d'une souche de *Candida lusitaniae* génétiquement modifiée pour l'étude des mutations de résistance aux échinocandines caractérisées chez des isolats cliniques. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01411850

HAL Id: dumas-01411850

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01411850>

Submitted on 7 Dec 2016

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

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

Université de Bordeaux
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 2016

Thèse n°127

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE
(Décret 90-810 du 10 septembre 1990)

Tenant lieu de
Thèse pour l'obtention du
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement
le 28 octobre 2016
par Célia COUZIGOU
née le 19 octobre 1986 à Agen (47)

**Construction d'une souche de *Candida lusitaniae*
génétiquement modifiée pour l'étude
des mutations de résistance aux échinocandines
caractérisées chez des isolats cliniques**

Directeur de thèse :
Docteur Isabelle ACCOCEBERRY

Jury :

Monsieur le Professeur Thierry NOEL, PU	Président
Monsieur le Professeur Charles CAZANAVE, PU-PH	Membre
Monsieur le Professeur Gilles HILBERT, PU-PH	Membre
Mme le Docteur Elodie BLANCHARD, PH	Membre
Mme le Docteur Isabelle ACCOCEBERRY, MCU-PH	Directeur

Cette thèse représente l'aboutissement de ces longues années d'études, et le début d'une nouvelle période de vie. Je remercie toutes les personnes qui ont contribué à cette formation ou qui m'ont accompagné pendant ces années.

A Monsieur le Professeur Thierry NOËL,

Pour m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse. Merci de m'avoir fait découvrir la recherche et de m'avoir encadrée lors de mon Master 2 recherche.

A Madame le Docteur Isabelle ACCOCEBERRY,

Pour m'avoir encadrée dans ce travail de thèse et pour avoir passé des soirées et week-end à corriger ma thèse ! Merci pour tes conseils et ton soutien durant tout mon internat.

A Monsieur le Professeur Gilles HILBERT,

Et à Madame le Docteur Élodie BLANCHARD,

Pour avoir accepté d'être membre de ce jury et pour l'honneur que vous me faites de juger mon travail.

A Monsieur le Professeur Charles CAZANAVE,

Pour ton aide précieuse ces dernières années et pour avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse.

A Madame le Docteur Claire RICARD,

Pour ton excellent recueil de données sur les traitements reçus par les patients chez lesquels nous avons isolé une souche *fkS*-muté.

A tous les membres de l'UMR, en particulier à l'équipe « *Candida* et Pathogénicité »

Valérie, Nicolas B., Amandine, Frédéric,

Karine, Corinne, Nicolas P., Loïc, Magali, Mélanie, Derrick, Denis, Doranda, Nicolas L.,
Anna,

Merci pour votre accueil chaleureux et vos nombreux conseils.

A l'ensemble des biologistes et technicien(ne)s qui ont participé à ma formation au cours de mes quatre années d'internat,

Au personnel du PTRR à Haut-Lévêque avec qui j'ai commencé mon internat, à celui des laboratoires d'immunologie, de bactériologie et de parasitologie,

Au laboratoire de l'hôpital de Pau pour m'avoir fait découvrir la biologie médicale polyvalente et de m'avoir permis d'arriver où j'en suis.

A la société française de mycologie médicale,

Pour avoir cru en mon projet de recherche et m'avoir attribué le prix du meilleur poster de la SFMM en 2015.

A ma famille, mes parents et ma sœur,

Pour m'avoir soutenue dans mes études et pour leur amour.

A Julien

Merci d'être présent à mes côtés et de m'avoir soutenu pendant toutes ces années d'études, pour tous ces moments partagés ensemble, et ceux à venir...

A ma belle famille,

Pour votre gentillesse et votre générosité.

A mes amis

A mes amis de longue date, amis des Sureaux, du lycée, des bancs de fac, de tutorat et voisin de BU,

A mes anciens co-internes, voisins de chambre de l'internat de Limoges et amis d'internat, pour les moments partagés pendant ces années.

1	Introduction	11
2	Généralités	13
2.1	Les levures du genre <i>Candida</i>	13
2.1.1	Description du genre <i>Candida</i>	13
2.1.1.1	Habitat	13
2.1.1.2	Organisation de la cellule eucaryote fongique	13
2.1.1.3	Morphologie	15
2.1.1.4	La grande diversité du genre <i>Candida</i>	15
2.1.1.5	Éléments de taxonomie	16
2.2	Les candidoses invasives	16
2.2.1	Incidence et facteurs de risque	17
2.2.2	Physiopathologie des candidoses invasives	18
2.2.3	Immunité anti- <i>Candida</i>	18
2.2.4	Manifestations cliniques de candidoses invasives	21
2.2.4.1	Septicémies	21
2.2.4.2	Complications des candidémies	21
2.2.4.3	Autres candidoses invasives	22
2.2.5	Pronostic des candidoses invasives	23
2.3	Diagnostic mycologique conventionnel par culture	23
2.3.1	Examen direct et mise en culture	23
2.3.2	Identification de l'espèce	24
2.4	Techniques de diagnostic non basées sur la culture, les biomarqueurs sériques	25
2.5	Détermination de la sensibilité <i>in vitro</i> aux antifongiques	26
2.5.1	Techniques de références	27
2.5.2	Techniques de routine : l'exemple de l'Ettest [®]	29
2.5.3	Détermination de la sensibilité aux antifongiques par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF	29
2.6	Les antifongiques systémiques	31
2.6.1	Cibles des antifongiques	31
2.6.2	Les polyènes	31
2.6.3	Les fluoropyrimidines	33
2.6.4	Les triazolés	34

2.6.5	Les échinocandines	35
2.7	Recommandations thérapeutiques	36
2.8	Modification de l'écologie fongique sous traitement par échinocandines	37
3	La résistance aux échinocandines	38
3.1	Mécanismes de résistance	38
3.1.1	Généralités sur la résistance aux antifongiques	38
3.1.1.1	Le type de résistance aux antifongiques	38
3.1.1.2	Les différents mécanismes moléculaires de résistance	38
3.1.2	Bases moléculaires de la résistance aux échinocandines	39
3.1.2.1	Les gènes <i>FKS</i> codent pour une glucane synthase (Fks)	39
3.1.2.2	Notion de « Hot-Spot »	40
3.1.2.3	Rôle et régulation des différents gènes <i>FKS</i>	41
3.1.2.4	Mutations <i>FKS</i>	42
3.2	Détection et caractérisation des souches de sensibilité diminuée aux échinocandines . .	43
3.2.1	Détection des souches de sensibilité diminuée aux échinocandines par analyse phénotypique	43
3.2.2	Détection des mutants <i>fks</i> par étude génotypique	44
3.2.2.1	Le séquençage nucléotidique	44
3.2.2.2	L'amplification en chaîne par polymérase (PCR)	45
3.3	Epidémiologie de la résistance aux échinocandines	46
3.3.1	Incidence des mutations <i>fks</i> et sensibilité aux antifongiques	46
3.3.2	Démonstration de l'implication des mutations <i>fks</i> dans la résistance aux échi- nocandines	48
3.4	Modifications compensatrices chez les mutants <i>fks</i> et coût énergétique	49
3.4.1	Autres mécanismes de résistance	49
3.4.1.1	Réponse adaptative au stress	49
3.4.1.2	Effet paradoxal (EP)	51
3.4.1.3	Sphingolipides	51
3.4.1.4	Multi-résistance	52
3.4.1.5	Perspectives thérapeutiques	52
3.4.2	Coût énergétique	53
4	Contexte et objectifs	55
5	Matériel et méthode	57
5.1	Matériel biologique et conditions de culture	57
5.1.1	Souches de <i>Candida lusitaniae</i> utilisées et conditions de culture	57
5.1.2	Souches d' <i>Escherichia coli</i>	58
5.1.3	Plasmides	58
5.2	Techniques de biologie moléculaire	58
5.2.1	Préparation des acides nucléiques	58
5.2.1.1	Extraction et purification d'ADN génomique de levure	58
5.2.1.2	Extraction et purification d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	58
5.2.1.3	Réaction d'amplification de fragments d'ADN par PCR	59
5.2.1.4	Purification des produits de PCR (QiaQuick, Qiagen)	59

5.2.1.5	Clonage des produits de PCR (In-Fusion, Clontech)	59
5.2.1.6	Transformation des bactéries par choc thermique	60
5.2.1.7	Transformation des levures par électroporation	60
5.2.1.8	Séquençage nucléotidique	60
5.2.1.9	Southern Blot	60
5.2.1.10	Analyses bioinformatiques	61
5.2.1.11	Tests de sensibilité aux antifongiques	61
6	Résultats	62
6.1	Conception de la souche de <i>Candida lusitaniae</i> génétiquement modifiée	62
6.1.1	Pré-requis : analyse bio-informatique pour l'identification du gène <i>FKS1</i> de <i>C. lusitaniae</i>	62
6.1.2	Conception de la souche génétiquement modifiée de <i>Candida lusitaniae</i>	63
6.1.3	Construction de la souche génétiquement modifiée de <i>C. lusitaniae</i>	64
6.1.3.1	Insertion des marqueurs <i>TRP1</i> et <i>URA3</i> en amont et en aval du gène <i>FKS1</i> de <i>C. lusitaniae</i>	64
6.1.3.2	Délétion d'une partie des marqueurs <i>TRP1</i> et <i>URA3</i>	68
6.1.4	Vérification de l'insertion des marqueurs	69
6.1.4.1	Sondes <i>URA3</i> : co-hybridation des sondes 5' <i>URA3</i> et 3' <i>URA3</i>	70
6.1.4.2	Sonde <i>FKS1</i>	70
6.1.4.3	Sonde 3' <i>TRP1</i>	70
6.2	Preuve du concept : remplacement d'allèle <i>FKS1</i> et étude des mutations de résistance aux échinocandines	72
7	Epidémiologie de la résistance aux échinocandines au CHU de Bordeaux	74
8	Conclusion et perspectives	81

TABLE DES FIGURES

2.1	Structure de la paroi [18, 79, 112]	14
2.2	Représentation des différentes formes morphologiques des levures du genre <i>Candida</i>	15
2.3	Relation phylogénétique entre les principales espèces du clade CTG [163]	16
2.4	Mécanismes et cellules impliqués dans l'élimination des <i>Candida spp</i> [129]	19
2.5	Reconnaissance des <i>Candida spp</i> par le système immunitaire [129]	20
2.6	Trouble vitréen avec foyers de candidose [185]	22
2.7	Distribution des CMI en caspofungine chez <i>C. albicans</i> , mesurées par la méthode CLSI par 12 laboratoires d'après [59]	28
2.8	Distribution des CMI en caspofungine mesurées par les méthodes CLSI et Etest	29
2.9	Détermination de la concentration de caspofungine qui induit le moins de modification du spectre [27]	30
2.10	Cibles des antifongiques systémiques	31
2.11	L'amphotéricine B	32
2.12	Métabolisme et mécanisme d'action de la flucytosine [92]	33
2.13	Les antifongiques systémiques azolés [168]	34
2.14	Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>C. albicans</i> (A) et représentation schématique de l'action des azolés (B) [155, 172]	34
2.15	Structure chimique des trois échinocandines actuellement commercialisées	35
3.1	Illustration du rôle central de Rho1 dans la régulation de l'intégrité de la paroi	40
3.2	Représentation schématique de la protéine Fks1 et des séquences des régions « Hot-spot » d'après [138, 99]	40
3.3	Expression des gènes <i>FKS</i> chez différentes espèces de levures [71]	42
3.4	Distribution des CMI CLSI à la micafungine d'isolats cliniques de <i>C. glabrata</i> isolés dans le Monde	44
3.5	PCR en point final pour la détection des mutants R1361G	46
3.6	Distribution des CMI en micafungine de 97 isolats de <i>C. glabrata</i> mutés dans le HS1 de <i>FKS2</i>	47
3.7	Stratégie de remplacement d'une partie du gène <i>FKS1</i> de <i>S. cerevisiae</i> (A) par la séquence 617-649 de <i>F. solani</i> (B) [99]	49
3.8	Voies de signalisation impliquées dans l'organisation de la paroi de <i>C. albicans</i>	50
3.9	Adaptation des levures à l'action exercée par les échinocandines sur la paroi par augmentation de la synthèse de chitine [198]	50
3.10	Illustration du mécanisme potentiel par lequel une accumulation de LCB est responsable d'une résistance à la caspofungine et une sensibilité accrue à la micafungine.	52
6.1	Concept du remplacement d'allèle dans la souche de <i>C. lusitaniae</i> génétiquement modifiée	63
6.2	Principe de la sélection et de la contre-sélection	64
6.3	Illustration de l'insertion du marqueur <i>TRP1</i> en amont du gène <i>FKS1</i>	65
6.4	Représentation schématique des amorces utilisées pour la construction de la cassette <i>TRP1</i>	65

Table des figures

6.5	Construction de la cassette <i>TRP1</i> et intégration dans la région 5' du gène <i>FKS1</i> de <i>C. lusitaniae</i> . . .	66
6.6	Représentation schématique de la réaction de fusion et de la sélection des bactéries transformées	67
6.7	Résultats des PCR sur les transformants <i>TRP1</i>	68
6.8	Représentation schématique des amorces utilisées pour la construction de la cassette <i>URA3</i>	68
6.9	Représentation de la délétion des marqueurs <i>TRP1</i> et <i>URA3</i>	69
6.10	Localisation des différents sites de coupure de l'enzyme EcoRV aux loci <i>TRP1</i> , <i>FKS1</i> et <i>URA3</i>	70
6.11	Résultats des hybridations à l'aide des différentes sondes (<i>URA3</i> , <i>FKS1</i> , 3' <i>TRP1</i>)	71
6.12	Stratégie et jeux d'amorces utilisés pour le remplacement de l'allèle <i>FKS1</i> résident par co-transformation de 2 fragments d'ADN	73
6.13	CMI à la caspofungine de la souche sauvage et des 3 mutants, après 48 h d'incubation	73
7.1	Répartition des espèces isolées dans les candidémies	74
7.2	Répartition des CMI en échinocandines pour <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i>	77
7.3	Répartition des CMI en échinocandines pour <i>C. tropicalis</i> et <i>C. parapsilosis</i>	78

LISTE DES TABLEAUX

2.1	Principe de la nomenclature des rangs taxinomiques en mycologie, adapté de [32]	16
2.2	Répartition des pathologies sous-jacentes de 12 039 épisodes de candidémie étudiés sur la période 2004-2010 en France, d'après [16]	17
2.3	Distribution des espèces de <i>Candida spp</i> isolées dans les candidémies	25
2.4	Distribution des CMI et détermination de la valeur seuil épidémiologique de la micafungine (MIC) pour <i>C. albicans</i> (EUCAST) [62]	27
2.5	Valeurs seuils d'interprétation clinique pour les échinocandines définies par le CLSI et l'EUCAST [146, 63]	28
3.1	Localisation et fréquence des altérations des protéines Fks1 et Fks2 chez <i>C. glabrata</i> , d'après [51] .	42
3.2	Sensibilité et spécificité des différents seuils critiques d'interprétation clinique (BPs) en fonction des molécules pour l'identification des souches <i>fks</i> -muté	43
3.3	Exemple de PCR pour la recherche de mutations ponctuelles	45
3.4	Epidémiologie de la résistance aux échinocandines pour les différentes espèces de <i>Candida</i> dans le Monde (programme SENTRY)	46
3.5	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentration d'inhibition (CI 50%) de la glucane synthétase des souches étudiées, d'après [71, 99]	48
5.1	Souches de <i>Candida lusitanae</i> utilisées et construites au cours de ce travail. Les souches obtenues lors de ce travail apparaissent en gras.	57
5.2	Liste des milieux utilisés et leur composition	58
5.3	Paramètres des réactions d'amplification utilisé pour les réactions d'amplification utilisant la <i>Go-Taq</i> et la <i>Pfu</i>	59
7.1	Valeur seuil épidémiologique (ECOFF) des échinocandines pour les 4 espèces de <i>Candida</i> les plus fréquemment isolées au CHU de Bordeaux et comparaison aux ECOFFs publiées par le CLSI et l'EUCAST pour ces espèces [62, 61, 146]	75
7.2	CMI modales des échinocandines pour les 4 espèces de <i>Candida</i> les plus fréquemment isolées au CHU de Bordeaux et comparaison aux ECOFFs publiées par le CLSI et l'EUCAST pour ces espèces	75
7.3	Pour les 4 espèces de <i>Candida</i> testées, nombre d'isolats présentant une CMI en échinocandine supérieure à la valeur du BP du CLSI ou de l'ECOFF calculé	76
7.4	Sensibilité aux échinocandines des souches de <i>Candida spp</i> présentant une mutation <i>fks</i> isolées au CHU de Bordeaux (2014-2016)	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-FAA	5-fluoro-anthranilate
5-FAO	5-fluoro-orotate
5-FC	5-fluorocytosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AmB	Amphotéricine B
ATP	Adénosine triphosphate
ATPases	Adénosine triphosphatase
AUC	Aire sous la courbe
BP	Valeurs seuils critiques d'interprétation clinique (Clinical breakpoints)
Cap1	Candida activator protein 1
CCI	Index de corrélation composite
CI	Candidose invasive
CLR	C-lectin récepteur
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DAmB	Amphotéricine B déoxycholate
DSBR	Double-strand break repair
ECV	Valeur seuil épidémiologique (Epidemiological cutoff values)
EP	Effet paradoxal
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GS	β -(1-3)-D-glucane synthétase
HOG	High osmolarity glycerol
IL	Interleukine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
Km	Constante d'affinité
LCB	Sphingolipid Long-Chain
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of flight
MMR	Mismatch repair
MPCC	Concentration de caspofungine qui induit le moins de modification du spectre
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
ORF	Open Reading Frame = cadre de lecture ouvert
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
pb	Paires de bases

Liste des tableaux

PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PKC	Protéine kinase C
PNN	Polynucléaire neutrophile
PRRs	Pattern Recognition Receptors
Se	Sensibilité
Sp	Spécificité
TLR	Toll-like récepteurs
UDP	Uridine diphosphate
UDPG	Uridine diphosphate glucose
UTR	UnTranslated Region = région non traduite
V _m	Vitesse maximale

Les infections fongiques invasives à *Candida spp*, en augmentation ces 20 dernières années, sont associées à une mortalité élevée de l'ordre de 40%. Un diagnostic fiable et rapide est indispensable pour instaurer un traitement antifongique approprié. Devant la faible sensibilité des hémocultures et leur positivité tardive, le traitement antifongique est souvent instauré avant toute documentation microbiologique de l'infection. Les échinocandines sont les molécules les plus largement utilisées dans le traitement empirique et curatif des candidoses invasives. Trois molécules sont actuellement disponibles : la caspofungine (CANCIDAS[®]), la micafungine (MYCAMINE[®]) et l'anidulafungine (ECALTA[®]). Leur activité fongicide sur les *Candida spp*, est la conséquence de l'inhibition non compétitive de la β -1,3-D-glucane synthétase, complexe enzymatique présent dans la membrane fongique et responsable de la synthèse du β -1,3-D-glucane, composant majeur de la paroi fongique. Ces dernières années, des échecs cliniques et thérapeutiques liés à l'acquisition de mutations ponctuelles dans les gènes *FKS*, qui codent pour la sous-unité catalytique de la β -1,3-D-glucane synthétase, ont été décrits. La majorité de ces mutations apparaissent dans deux régions très conservées entre les espèces, appelées «Hot-Spots» (HS). La caractérisation de ces souches de *Candida spp* résistantes aux échinocandines repose sur des études phénotypiques et génotypiques. L'étude phénotypique passe par la mesure des concentrations minimales inhibitrices aux échinocandines et par la mesure de l'activité enzymatique. L'analyse génotypique repose sur le séquençage nucléotidique complet du gène *FKS1* (et *FKS2* chez *Candida glabrata*), suivi d'une comparaison des séquences nucléotidiques. Les gènes étudiés peuvent également être exprimés dans une levure modèle par expression hétérologue. Du fait de la grande taille du gène *FKS*, la majorité des études génotypiques se limitent aux régions HS et non pas à la totalité du gène *FKS*. De plus, les études de mutagenèse dirigée et d'expression hétérologue utilisent *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle d'expression. Or, *S. cerevisiae* est phylogénétiquement assez éloigné du clade CTG des *Candida* qui decode le codon CUG en sérine au lieu d'une leucine. Notre objectif était donc de développer un modèle cellulaire permettant de caractériser de façon simple et rapide les mutations *fks* par remplacement d'allèle *FKS1* complet dans une levure du clade CTG des *Candida*, *Candida lusitaniae*.

Après une introduction bibliographique sur les candidoses invasives, les antifongiques systémiques et la résistance aux échinocandines, nous exposons dans la seconde partie de ce manuscrit la construction de la souche de *Candida lusitaniae* génétiquement modifiée et la validation du modèle. Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'épidémiologie locale de la résistance aux échinocandines au Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux sur la période allant de novembre 2013 à septembre 2016.

Etude bibliographique

Les levures du genre *Candida* sont responsables d'infections opportunistes variées de pronostic très différent. Les infections superficielles atteignant la peau, les ongles et/ou les muqueuses (digestive ou vulvo-vaginale), les plus communes, ont en général une évolution favorable. Les infections profondes, survenant sur des terrains particuliers, présentent une morbi-mortalité élevée.

2.1 Les levures du genre *Candida*

2.1.1 Description du genre *Candida*

Les levures du genre *Candida* sont des micro-organismes eucaryotes, cosmopolites opportunistes, appartenant au règne des champignons et à la famille des *Saccharomycetaceae*. Elles sont unicellulaires, d'une taille de 4 à 10 micromètres, dépourvues de capsule et se divisent par bourgeonnement polaire. Le genre *Candida* regroupe plus de 300 espèces, allant de *Candida aaseri* à *Candida zeylanoides* [104]. Seules quelques espèces sont retrouvées en pathologie humaine, les plus fréquentes étant *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei*.

2.1.1.1 Habitat

Les levures sont des micro-organismes hétérotrophes ubiquitaires, retrouvées dans l'environnement (sol, légumes, produits laitiers), qui se nourrissent de matières organiques mortes. Elles utilisent les glucides et des composés azotés pour la synthèse de leurs acides aminés. Quelques espèces vivent à l'état commensal chez l'Homme, où elles colonisent certains sites comme le tube digestif, la peau et les voies génito-urinaires. *Candida albicans* et *C. glabrata* sont des levures commensales du tube digestif et des voies génito-urinaires, tandis que *C. parapsilosis* est retrouvé au niveau de la peau et des phanères. Le passage du commensalisme à la pathogénicité témoigne d'un déséquilibre entre les défenses de l'hôte et le pouvoir pathogène de la levure. *Candida albicans* est de loin l'espèce la plus fréquemment isolée, responsable d'un spectre large de pathologies : 56 à 91% des candidoses vulvo-vaginales [173, 35], 62 à 83% des candidoses oro-pharyngées [40, 128, 184] et 38 à 70% des candidémies [80, 151].

2.1.1.2 Organisation de la cellule eucaryote fongique

La paroi est caractéristique du règne fongique. Elle a un rôle de protection contre les différences de pression osmotique et les attaques physico-chimiques de l'environnement (action d'enzymes, ex-

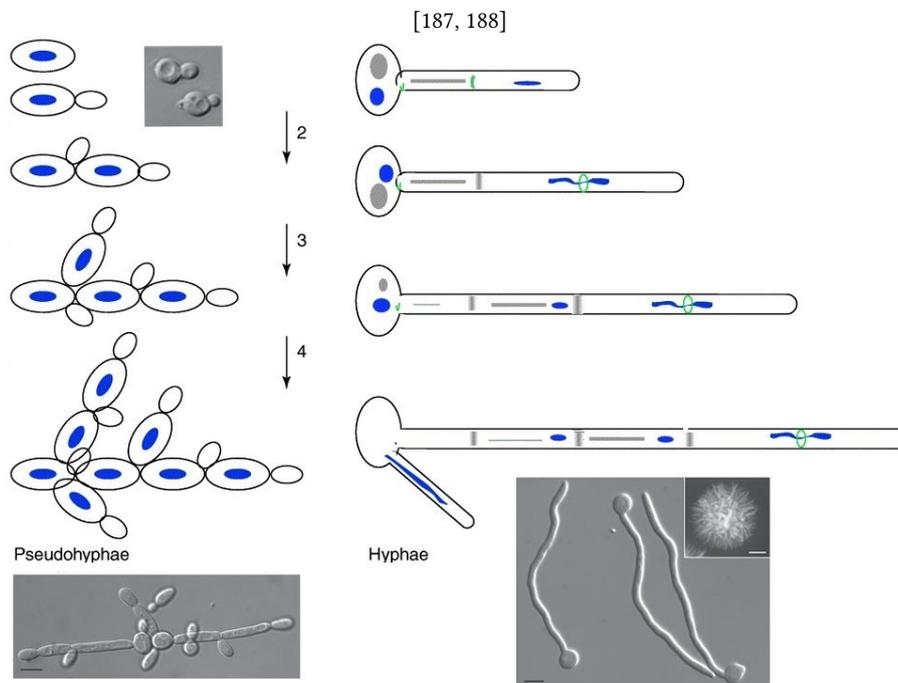
2.1.1.3 Morphologie

Les *Candida* se présentent sous la forme de blastospore ou blastoconidie, éléments ronds ou ovalaires, se reproduisant par bourgeonnement. Ils peuvent également se présenter sous la forme de pseudomycélium, à l'exception de quelques espèces comme *C. glabrata*. Cette forme correspond à la croissance d'un bourgeon qui va prendre une forme tubulaire, tout en restant attaché à la cellule mère. D'autres blastospores peuvent ensuite se former au niveau des zones de constriction, donnant naissance à des ramifications latérales.

Candida albicans, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* ont également la capacité de former un mycélium vrai. Un tube germinatif va se développer au niveau d'un bourgeon, se cloisonner et se ramifier au fur et à mesure de son élongation.

L'aptitude à réaliser la transition morphogénétique entre la forme levure et la forme filament est décrite comme étant un facteur de virulence, car elle favorise l'angio-invasion et la résistance à la phagocytose.

Figure 2.2 – Représentation des différentes formes morphologiques des levures du genre *Candida*
Forme levure bourgeonnante (haut à gauche), forme pseudo-filamenteuse (à gauche) et forme filamenteuse (à droite)



2.1.1.4 La grande diversité du genre *Candida*

On distingue des espèces diploïdes comme *C. albicans* et *C. parapsilosis* ou haploïdes comme *C. glabrata*, dont le nombre de chromosome est variable (8 pour *C. albicans*, 13 pour *C. glabrata*).

Les levures d'intérêt médical sont divisées en 2 clades :

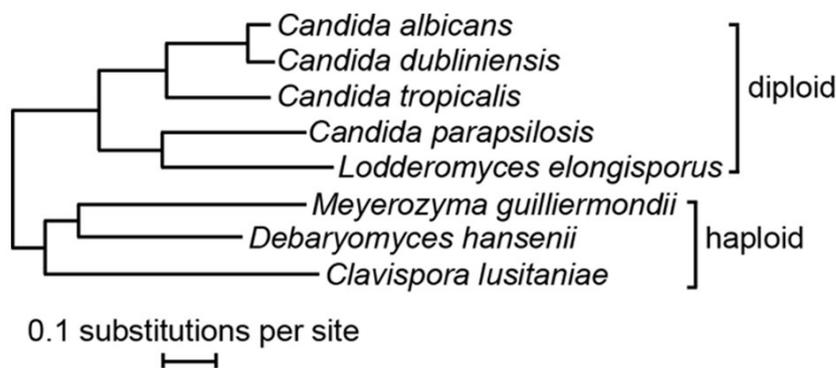
- les levures du clade CTG qui décodent le codon CUG en leucine au lieu d'une sérine regroupant la majorité des espèces de *Candida* isolées en pathologie humaine, à l'exception de *C. glabrata*,
- les levures du clade Whole Genome Duplication dont *C. glabrata*, pour lesquelles le génome a subi une duplication.

Certaines espèces sont capables de se reproduire par reproduction sexuée dans certaines conditions de culture défavorables, comme lors d'une carence en azote. Il s'agit notamment de *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* et *C. krusei* dont les noms des formes sexuées (formes téléomorphes) sont respectivement *Clavispora lusitaniae*, *Meyerozyma guilliermondii* et *Issatchenkia orientalis*.

Saccharomyces cerevisiae bien qu'exceptionnellement impliqué en pathologie humaine, constitue le principal organisme modèle pour l'étude du métabolisme et des mécanismes cellulaires eucaryotes. C'est une levure haploïde, capable de former des ascospores par reproduction sexuée, facile à cultiver et très aisément modifiable par génie génétique.

Candida lusitaniae, également haploïde, possède l'avantage d'appartenir au clade CTG des *Candida*. Elle est donc bien plus proche phylogénétiquement des autres *Candida spp* impliqués en pathologie humaine que *S. cerevisiae*, à l'exception de *C. glabrata*.

Figure 2.3 – Relation phylogénétique entre les principales espèces du clade CTG [163]



2.1.1.5 Eléments de taxonomie

Le code international de nomenclature botanique indique d'utiliser, quand elle est connue, le nom de la forme sexuée (téléomorphe) et non celui de la forme asexuée (anamorphe). En pratique clinique, pour simplifier, les levures d'intérêt médical sont désignées par le nom de leur forme asexuée.

Tableau 2.1 – Principe de la nomenclature des rangs taxinomiques en mycologie, adapté de [32]

Rangs taxinomiques	Exemple : <i>Candida lusitaniae</i>
Règne : champignon (<i>Fungi</i>)	<i>Fungi</i>
Division ou phylum : -... <i>mycotina</i>	Ascomycotina
Classe -...mycètes	Saccharomycètes
Ordre -... ales	Saccharomycetales
Famille -... aceae	Candidaceae
Genre espèce : stade téléomorphe (sexué)	<i>Clavispora lusitaniae</i>
Genre espèce : stade anamorphe (asexué)	<i>Candida lusitaniae</i>

2.2 Les candidoses invasives

Les candidoses invasives représentent la première cause d'infection fongique invasive (IFI). Elles englobent les candidémies (présence de levures du genre *Candida* dans le sang) et les affections viscérales profondes résultant d'une dissémination hématogène ou de l'inoculation directe du *Candida spp* dans un site stérile. Une candidémie est définie par au moins une hémoculture positive à *Candida*, une candidose profonde par la mise en évidence de *Candida spp* à partir d'un site normalement stérile [45].

2.2.1 Incidence et facteurs de risque

L'incidence des candidémies en France sur la période 2001-2010 était de 2,5 cas pour 100 000 habitants [17]. L'incidence mondiale est variable, avec de grandes disparités. Elle est plus faible en Europe qu'aux Etats-Unis, où elle atteignait dans certaines régions 24/100 000, comme dans l'état du Connecticut et le comté de Baltimore entre 1998-2000 [151, 145, 82]. Ce sont des infections essentiellement nosocomiales, survenant dans plus de 40% des cas chez des patients hospitalisés dans un service de réanimation [151, 116]. Le mode de contamination est essentiellement endogène, le patient s'infectant avec une souche dont il est porteur. Les facteurs favorisant la colonisation fongique, la rupture des barrières cutanéomuqueuses ainsi que l'altération des défenses immunitaires constituent les facteurs de risque de développer une candidose invasive. Ces facteurs ont été bien décrits [201, 26, 116], les principaux étant :

- Des facteurs de risque associés aux soins
 - Une chirurgie digestive ou cardiaque dans les 30 jours précédents
 - La présence de cathéters vasculaires centraux
 - Une nutrition parentérale
 - Une hospitalisation prolongée, notamment en unité de soins intensifs
 - L'utilisation d'antibiotiques à large spectre
 - Un traitement par des corticoïdes ou une chimiothérapie
- Des facteurs de risques liés à l'hôte
 - Une neutropénie
 - Un âge extrême (nouveau-nés prématurés, personnes âgées)
 - La présence d'une pathologie sous-jacente : hémopathie maligne, transplantation d'organes solides, greffe de cellules souches, pancréatite aiguë, diabète, brûlures...

Tableau 2.2 – Répartition des pathologies sous-jacentes de 12 039 épisodes de candidémie étudiés sur la période 2004-2010 en France, d'après [16]

Facteurs de risque	Nombre de cas
Hémopathies malignes	1710
avec transplantation de moelle	276
avec neutropénie	721
hémopathie maligne seule	713
Cancers d'organes solides	3683
Diabète	1123
Maladies respiratoires chroniques	433
Insuffisance rénale chronique	336
Greffe d'organes solides	190
Maladies inflammatoires systémiques	178
VIH-SIDA	142
Autres pathologies*	1751
Non spécifié	2493
séjour en réanimation	841
séjour en chirurgie	317
âges extrêmes	484
aucun facteur de risque connu	851

*cirrhoses 15,8%, obésités morbides et pancréatites <6% et insuffisances rénales aiguës (IRA) 84,6%

2.2.2 Physiopathologie des candidoses invasives

La manifestation la plus fréquente des formes invasives est la septicémie à *Candida spp*, ou candidémie, résultant le plus souvent d'une translocation digestive. L'infection est essentiellement endogène et se développe à partir d'une souche présente à l'état commensal chez le patient. La transition entre l'état commensal et l'état pathogène s'effectue en 4 étapes : adhésion/colonisation, invasion, dissémination puis d'une extravasation/pérennisation tissulaire.

L'adhésion aux cellules de l'hôte est indispensable à la survie commensale du *Candida spp*, ainsi qu'à l'initiation de l'infection. La colonisation précède toujours l'infection et le risque de développer une candidose invasive est corrélé à l'importance de la colonisation [25]. Ainsi, la colonisation multifocale à *Candida spp* est un facteur de risque indépendant de candidose invasive (CI). Plusieurs études réalisées chez des patients en unité de soins intensifs chirurgicaux ont mis en évidence l'intérêt potentiel de l'index de colonisation ($\frac{\text{nombre de sites positifs en culture}}{\text{nombre de sites testés}}$) [157, 25] pour le suivi dynamique de la colonisation, et il est devenu l'outil le plus largement utilisé pour évaluer précocement le risque de CI. Sa valeur prédictive positive (VPP) est faible (<9%) mais sa bonne valeur prédictive négative en fait un outil utile pour l'identification des patients à faible risque [53]. Des modèles prédictifs cliniques combinant plusieurs facteurs de risque cliniques dont la colonisation à *Candida spp* ont également été proposés : le « *Candida score* » [110] ou le score d'Ostrosky-Zeichne modifié [158, 88]. La colonisation est favorisée par l'expression d'adhésines comme les protéines Als (Agglutinin-Like Sequences) chez *C. albicans* et Epa chez *C. glabrata*, ainsi que par la formation de biofilm.

L'invasion des cellules épithéliales passe par deux mécanismes : l'induction de l'endocytose ou la pénétration active des hyphes. Le mécanisme prédominant chez *C. albicans* est l'invasion active. Les filaments désorganisent physiquement les structures cellulaires. Par ailleurs, la filamentation s'accompagne de l'expression co-régulée de protéinases, conduisant à l'altération des cellules de l'hôte. Ce mécanisme joue un rôle important dans l'invasion des tissus profonds et des vaisseaux sanguins [160, 24, 79].

Après l'invasion, les *Candida spp* se retrouvent dans la circulation sanguine et vont pouvoir disséminer. Tous les tissus peuvent être infectés et la pathologie dépendra alors de l'organe atteint (candidose péritonéale, intra-abdominale, hépatosplénique, rénale, cutanée ou endophtalmie, endocardite, méningite, ostéomyélite...). Plus rarement, l'infection d'un site normalement stérile peut intervenir après l'introduction directe du pathogène (infection sur cathéter, candidose rénale ascendante, péritonite après une chirurgie intestinale).

2.2.3 Immunité anti-*Candida*

Après les barrières physiques épithéliales, les cellules de l'immunité innée (cellules phagocytaires des lignées monocyttaire et neutrophile) constituent la première ligne de défense contre les levures. Ces dernières sont reconnues par différents récepteurs spécifiques comme les Toll-like récepteurs (TLR) et les C-lectin récepteurs (CLR) qui reconnaissent des composants pariétaux.

Les cellules phagocytaires

Les polynucléaires neutrophiles (PNNs) sont les plus abondants et jouent un rôle important dans les infections à *Candida spp*, comme le souligne la prédisposition aux candidoses chez les patients présentant une neutropénie ou une altération de la fonction des PNNs. L'activité fongicide des PNNs est assurée principalement par la phagocytose. Les levures sont lysées à l'intérieur du phagolysosome par

une cascade de mécanismes oxydatifs et non-oxydatifs. Un autre mécanisme sans phagocytose des pathogènes a été décrit. Les PNNs peuvent former des filets extracellulaires anti-microbiens nommés NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Les NETs sont composés de chromatine formant le filet et de calprotectine ayant une activité microbicide, ainsi que du contenu des granules des neutrophiles qui exercent leur activité lytique à l'extérieur de la cellule.

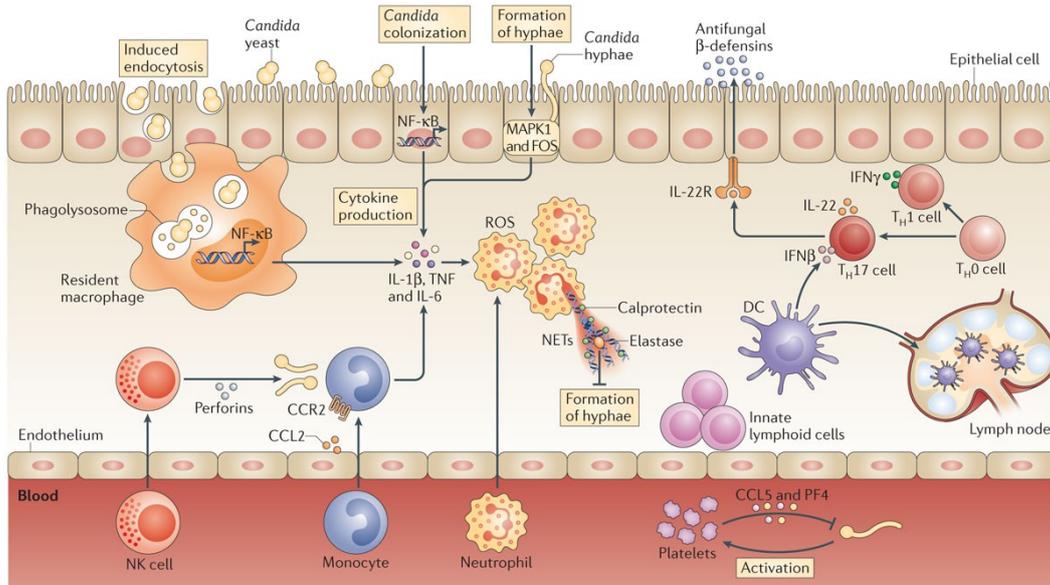
Les macrophages proviennent de la différenciation des monocytes sanguins et résident dans les tissus. Ils jouent un rôle important dans la détection et la destruction des levures. Ils modulent également la réponse immunitaire par présentation antigénique et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12...).

Les cellules dendritiques font également partie des cellules présentatrices d'antigène. Ces cellules sont capables de phagocyter *C. albicans* via le récepteur du mannose et stimulent ensuite la prolifération des lymphocytes T. L'internalisation de la forme levure induit une réponse de type Th1 via la production d'IL-12 alors que l'internalisation de la forme mycélienne induit la production d'IL-4 [50]. Les cellules dendritiques sont moins efficaces que les macrophages.

La phagocytose de *C. albicans* s'effectue après son opsonisation et fait intervenir le complément (C3b, Fc des IgG ou des IgE...) et/ou des anticorps spécifiques anti-*Candida* présents sur la paroi qui favorisent sa reconnaissance par les macrophages. Un processus spécifique du pathogène, indépendant des opsonines, met en jeu la reconnaissance des PAMPs ou « Pathogen-associated molecular patterns » par les PRRs pour « Pattern Recognition Receptors » présents sur les phagocytes. Chez les *Candida spp*, les PAMPs comprennent principalement des composés de la paroi cellulaire tels que les mannoprotéines, les sucres β -D-glucanes, le mannose et la chitine.

Les levures peuvent échapper aux cellules phagocytaires en filamentant ou en se multipliant à l'intérieur de ces dernières et entraîner leur lyse. De plus, la composition pariétale varie entre les formes levure, pseudo-filament et filament, ce qui entraîne une reconnaissance différente de ces formes par les cellules phagocytaires. Les β -glucanes à l'origine d'une forte réponse inflammatoire sont plus ou moins masqués par une couche de manno-protéines [57, 129, 194].

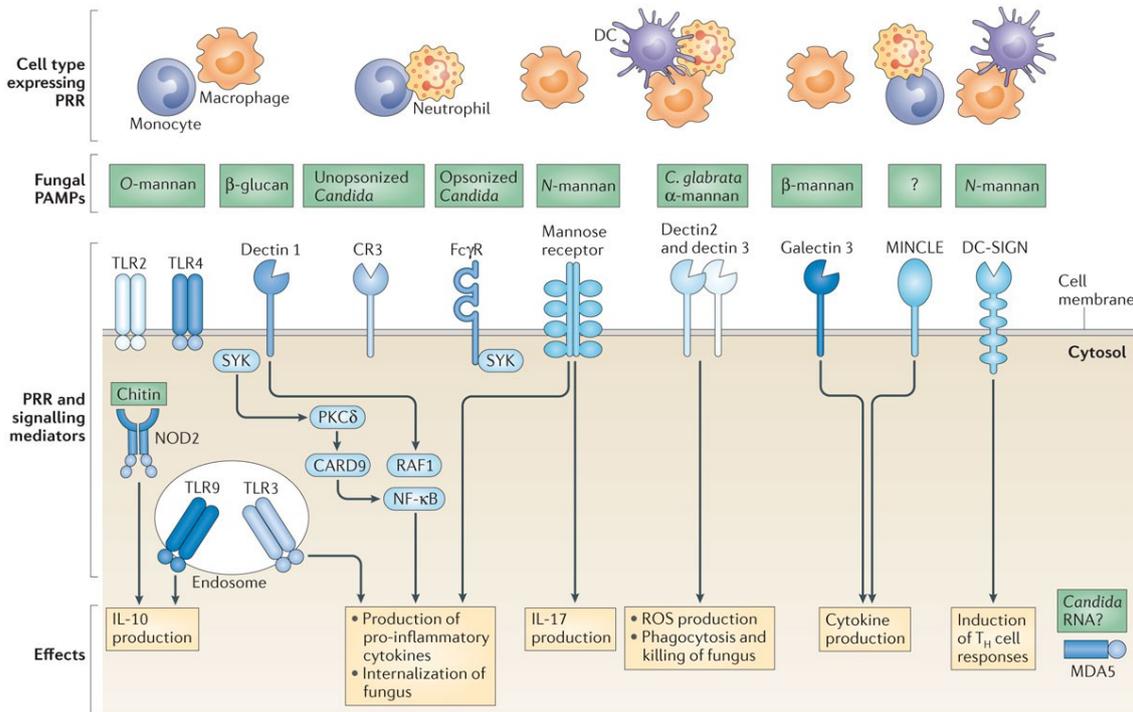
Figure 2.4 – Mécanismes et cellules impliqués dans l'élimination des *Candida spp* [129]



Les récepteurs

Les principaux PRRs reconnaissant les pathogènes fongiques font partie des TLRs et des CLR.

Figure 2.5 – Reconnaissance des *Candida spp* par le système immunitaire [129]



Parmi les TLRs, on distingue les TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 et TLR9 qui reconnaissent les résidus O-mannosylés de la paroi fongique (TLR4), les phospholipomannanes (TLR2 et TLR6), les β -glucanes (TLR2) et l'ADN fongique (TLR3 et TLR9). Les TLRs sont alors à l'origine de cascades de signalisation impliquées dans la transduction des signaux menant principalement à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

Les CLR sont des récepteurs calcium-dépendants qui reconnaissent les sucres de la paroi fongique : mannanes (Dectin-2, Dectin-3, Mincle, récepteur au Mannose), chitine (récepteur non connu) et β -glucane (Dectin1). Le récepteur au Mannose, principal récepteur des macrophages, participe à l'activation de la réponse pro-inflammatoire. Le récepteur Dectin-1, principalement exprimé sur les monocytes et les macrophages, active la production de cytokines et la formation de synapses phagocytiques qui participent à l'internalisation des levures. La voie Dectin-1 permet également de freiner la formation des NETs qui sont à l'origine de dommages tissulaires.

Plusieurs récepteurs au complément sont impliqués dans la reconnaissance des opsonines. Les récepteurs CR3 et CR4 reconnaissent le C3bi, le CR1 le fragment C3b. Ils sont présents chez les macrophages, les monocytes, les NK et les neutrophiles. Le CR3 des neutrophiles est également impliqué dans la reconnaissance des levures non opsonisées via les β -glucanes.

La mise en place d'une immunité adaptative

Les cytokines produites par les macrophages entraînent une différenciation des lymphocytes T non activés (Th0) en lymphocytes Th1 ou Th2. Les lymphocytes vont à leur tour produire des cytokines qui vont activer des cellules phagocytaires et des cellules B.

Au cours d'une infection par *C. albicans*, la voie Th1, médiée par des cytokines telles que l'IL-12 et

l'interféron-gamma, est essentielle pour l'activation des fonctions microbicides des cellules de l'immunité innée (sécrétion d'agents oxydants, dégranulation) et pour la production d'anticorps anti-*Candida*. A l'inverse, une réponse de type Th2 est associée à une susceptibilité accrue aux infections à *Candida spp.* Cependant, après l'élimination des pathogènes, l'inflammation doit être stoppée en inhibant la réponse immunitaire de type Th1, afin de limiter les dommages tissulaires. Cette réorientation anti-inflammatoire est contrôlée par les macrophages qui sécrètent de l'IL-10 et du TGF β et qui induisent la prolifération des cellules T-reg (T régulatrices) ainsi que des cytokines pro-Th2 tels que l'IL-4 et l'IL-13.

2.2.4 Manifestations cliniques de candidoses invasives

2.2.4.1 Septicémies

Les signes cliniques sont pauvres et non spécifiques. Une candidémie doit donc être évoquée systématiquement et recherchée minutieusement devant toute fièvre prolongée résistante à un traitement antibiotique adapté et bien conduit, chez un patient à risque (paragraphe 2.2.1).

2.2.4.2 Complications des candidémies

Endocardite Les signes cliniques sont identiques à ceux d'une endocardite bactérienne. L'évolution est toutefois aiguë. L'endocardite fongique doit être suspectée si les hémocultures restent positives, ou si le patient reste fébrile après l'instauration d'un traitement antifongique adapté. Les symptômes les plus fréquents sont la modification d'un souffle préexistant, l'apparition d'un nouveau souffle de régurgitation, une insuffisance cardiaque ou des symptômes en relation avec l'existence d'emboles septiques comme des signes neurologiques focaux ou diffus, une dyspnée témoignant d'emboles septiques pulmonaires. Les emboles des gros vaisseaux sont une caractéristique des endocardites fongiques car les végétations valvulaires sont volumineuses et friables. Les anévrysmes mycotiques et les complications cérébrales sont plus fréquents qu'en cas d'endocardite bactérienne.

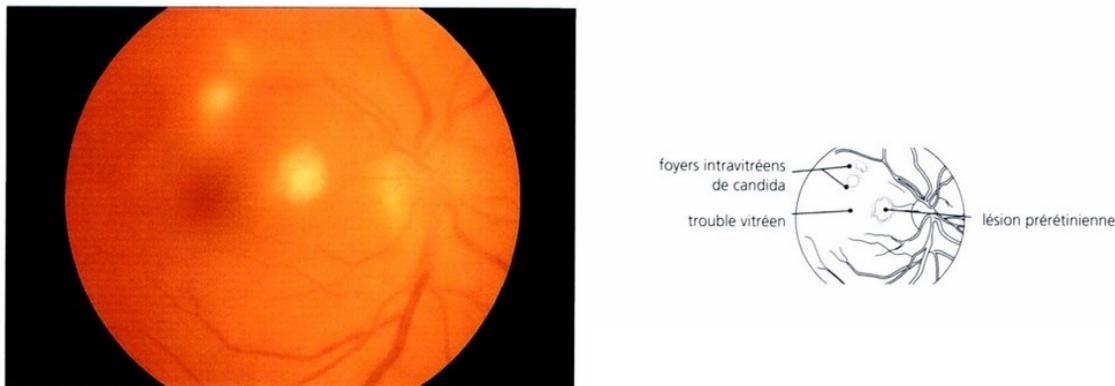
Les levures du genre *Candida* représentent un peu plus de 50% des étiologies fongiques, *C. albicans* étant impliqué dans un cas sur deux, suivi de *C. parapsilosis*.

Les principaux facteurs de risque sont les anomalies valvulaires (antécédent de chirurgie valvulaire ou d'endocardite bactérienne...), la présence d'un matériel (Pacemaker, prothèses vasculaires), la toxicomanie par voie intra-veineuse, et les facteurs de risques habituels de candidémie [136, 47, 108].

Endophtalmie La lésion initiale de l'endophtalmie endogène est un foyer embolique dans un vaisseau rétinien. Le *Candida* diffuse vers le vitré et s'y multiplie formant des nodules blanchâtres duveteux dans le vitré postérieur (foyers vitréorétiniens en œufs de fourmis au fond d'œil). Les endophtalmies endogènes miment une panuvéite rapidement progressive. L'atteinte postérieure va induire des troubles visuels relativement précoces à type de myodésopsies, suivies par une baisse de l'acuité visuelle. L'atteinte du corps ciliaire et l'inflammation du segment antérieur peuvent entraîner une symptomatologie douloureuse avec rougeur oculaire [20, 106, 185].

Le risque d'atteinte oculaire lors d'une septicémie à *Candida* serait de l'ordre de 12,5 à 30 %. Dans l'étude de Lashof et al. portant sur 370 patients atteints de candidémie, 16% présentait une anomalie oculaire à l'examen du fond d'œil, dont 9% une chorio-rétinite. Cependant, la majorité des patients n'avaient pas de signes cliniques oculaires [106]. Les facteurs de risque sont ceux des candidémies et plusieurs cas ont été décrits chez des usagers de drogues [90].

Figure 2.6 – Trouble vitréen avec foyers de candidose [185]



Candidoses ostéo-articulaires L'atteinte ostéoarticulaire peut se révéler plusieurs semaines ou mois après un épisode de candidémie. Les symptômes sont caractérisés par une douleur locale, généralement non associée à un syndrome inflammatoire général. Les populations les plus touchées sont les enfants et les adultes non-neutropéniques. L'atteinte vertébrale lombaire est plus fréquente chez les adultes, alors que les enfants développent préférentiellement une infection des os longs (fémur et humérus). Dans la population pédiatrique, l'infection est retrouvée au niveau de la métaphyse osseuse associée à une arthrite septique, contrairement aux adultes pour lesquels l'épiphyse est touchée. L'atteinte est souvent multifocale. *Candida albicans* et *C. tropicalis* sont les espèces les plus souvent en cause [70].

Candidose hépato-splénique La candidose hépato-splénique est une forme particulière de candidose systémique évoluant sur le mode chronique. Elle s'observe en particulier chez des patients neutropéniques en sortie d'aplasie. La présence de fièvre ne cédant pas aux antibiotiques et des douleurs abdominales sur ce terrain doivent conduire à pratiquer une IRM. Des abcès multiples, hépatiques et/ou spléniques, en cocarde, intraparenchymateux, seront retrouvés. La physiopathologie implique une exacerbation de la réponse pro-inflammatoire anti-*Candida* de type Th17 lors de la reconstitution immunitaire [165].

2.2.4.3 Autres candidoses invasives

L'inoculation directe du *Candida spp* dans un foyer profond est également possible. Une épidémie de quatre cas nosocomiaux d'endocardite à *C. parapsilosis* sur prothèse a été rapportée, l'infection ayant probablement été contractée au cours de l'intervention chirurgicale [49]. Des endophtalmies de la chambre antérieure peuvent être retrouvées suite à des traumatismes oculaires. L'étiologie fongique représente moins d'un quart des étiologies infectieuses, mais le risque est plus élevé si le traumatisme oculaire a été causé par un végétal [200].

Les candidoses neuro-méningées peuvent survenir à la suite d'une candidémie ou après un acte de neurochirurgie. La méningite est la présentation clinique la plus fréquente. Les prématurés sont particulièrement à risque de développer une candidose neuroméningée au décours d'une candidémie.

Les péritonites à *Candida* et les abcès intra-abdominaux sont fréquents chez les patients qui développent une péritonite secondaire ou tertiaire. Le risque est d'autant plus important que la perforation digestive est haute, que le patient est colonisé à *Candida* et qu'il existe un antécédent de chirurgie digestive récente. L'isolement de *Candida spp* à partir du liquide péritonéal en per-opératoire est associé à une plus forte mortalité [11].

2.2.5 Pronostic des candidoses invasives

Les candidémies sont associées à une taux de mortalité élevée de 20 à 49%, qui peut dépasser 50% en USI [39, 38, 17, 7]. Dans une étude multicentrique française, les auteurs rapportent une létalité de 40%. Un programme de surveillance active des épisodes de candidémie dans 24 hôpitaux de soins tertiaires de la région parisienne entre octobre 2002 et septembre de 2010 a montré une augmentation significative en USI de la mortalité à 30 jours de 41,5 à 56,9% entre la 1^{ère} et la dernière année ($p = 0,001$) mais aussi de la mortalité précoce (< 8 jours) de 28,7 à 38,8% ($p = 0,0292$) [116].

Plusieurs facteurs de risque de mortalité ont été identifiés comme l'initiation tardive d'un traitement antifongique, la présence d'un cathéter central, une ventilation mécanique, un traitement par corticoïdes ou la présence d'un choc septique [39, 74, 167, 127]. Le taux de mortalité des autres CI est également élevé, avec près de 60% de mortalité à 1 an pour les endocardites [8] et entre 27% et 39% de mortalité pour les candidoses abdominales [13].

L'impact économique est aussi important, puisque les CI sont associées à une prolongation de la durée du séjour (entre 10 et 20 jours) et une augmentation du coût des soins médicaux [69, 81]. En dépit des progrès réalisés depuis le début des années 2000, en matière de diagnostic, de mise à disposition de nouveaux antifongiques et la publication de nombreuses recommandations, la prise en charge des CI demeure un enjeu majeur.

2.3 Diagnostic mycologique conventionnel par culture

Le diagnostic des candidoses invasive est difficile à établir. La culture (sang, sites profonds) reste la technique de référence qui permet d'affirmer le diagnostic, d'identifier et d'isoler l'espèce responsable pour déterminer sa sensibilité aux antifongiques. En pratique, l'hémoculture reste l'examen le plus pratiqué et le plus accessible. Les autres prélèvements sont guidés par la localisation de l'infection (biopsies, liquide céphalorachidien, liquide péritonéal, bile, liquide de ponction articulaire...). Des prélèvements de sites périphériques non stériles (ORL, selles, urines, respiratoires) peuvent être réalisés de façon hebdomadaire pour un suivi dynamique de la colonisation.

2.3.1 Examen direct et mise en culture

La première étape du diagnostic consiste à réaliser un examen microscopique direct du prélèvement qui peut permettre une orientation rapide. Il s'effectue soit directement à l'état frais (entre lame et lamelle), soit après coloration (May-Grünwald-Giemsa, imprégnation argentique comme le Gomori-Grocott ou le Musto). D'autres méthodes utilisant des réactifs fluorescents permettent d'améliorer le rendement de l'examen direct (calcofluor, fungiquil A). On recherchera des formes levures (ovales, bourgeonnantes) associées ou non à du pseudomycélium voire du mycélium. Pour les tissus prélevés par biopsie, l'analyse anatomo-pathologique (examen direct, hybridation in situ, PCR) est primordiale. En parallèle, le prélèvement est ensemencé sur une gélose Sabouraud additionnée d'antibiotiques (chloramphénicol ou gentamicine). On l'associe à un milieu chromogène de type CHROMagar Candida (Becton-Dickinson) contenant des substrats chromogènes qui confèrent aux colonies qui s'y développent une coloration particulière, variable en fonction de l'espèce. Ces milieux permettent notamment d'identifier et de révéler les mélanges d'espèces.

Les prélèvements sanguins ensemencés dans des flacons d'hémocultures sont incubés dans des automates de type BacT/ALERT (Biomérieux) ou Bactec (Becton-Dickinson) dès réception au laboratoire.

2.3.2 Identification de l'espèce

Dans les candidoses invasives, l'identification fiable et rapide de l'espèce en cause est indispensable et permet au clinicien de prescrire une molécule adaptée (par exemple, *C. krusei* est résistant au fluconazole). Plusieurs méthodes sont disponibles pour l'identification des espèces isolées en culture. Jusqu'à récemment, l'identification était basée sur l'analyse des caractères métaboliques et morphologiques : étude de la morphologie dans différentes conditions (tests de germination, de production de chlamydo-spores), étude du profil d'assimilation et de fermentation de certains sucres et d'activité enzymatique (galeries d'identification commerciales type API32C). Ces tests nécessitent toutefois un délai supplémentaire de 24 à 48 heures pour identifier l'espèce en cause. Des tests immunologiques basés sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques ou enzymatiques basés sur une activité enzymatique spécifique d'espèce permettent une identification simple et rapide de *C. albicans* (Bichrolatex albicans), *C. dubliniensis* (Bichro-Dubli), *C. krusei* (Krusei-color), ou de *C. glabrata* (Glabrata RTT®). Plus récemment, la spectrométrie de masse type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of flight) a révolutionné la pratique quotidienne dans les laboratoires et amélioré la prise en charge des infections bactériennes et fongiques en réduisant considérablement le délai de réponse au clinicien. Elle permet d'identifier les levures en quelques minutes. La colonie de levure est déposée sur une plaque métallique, recouverte d'acide formique qui facilite l'extraction des protéines, puis d'une matrice composée d'acétonitrile, d'acide trifluoroacétique et d'eau (50/2,5/47,5). La plaque est ensuite placée dans la chambre d'ionisation où elle est soumise au tir d'un laser à azote sur chaque dépôt. La matrice absorbe l'énergie, ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon (désorption) puis l'ionisation des molécules. Les ions en phase gazeuse sont ensuite accélérés et séparés dans une colonne de vide selon leur masse. Les particules sont détectées en fin de colonne par un détecteur. Pour chaque dépôt, un profil spectral est ainsi réalisé et comparé aux spectres de référence [28]. Cette technique de spectrométrie de masse permet d'établir une empreinte protéique spécifique d'espèce. Elle est simple, reproductible, fiable, rapide, économique et plus performante que les identifications biochimiques par galerie API, et aussi performante que l'identification moléculaire par séquençage (discrimination des espèces au sein des complexes d'espèces, identification des espèces rares et émergentes). Par ailleurs, l'application du MALDI-TOF directement sur le flacon d'hémoculture rendu positif par l'automate sans passer par la phase de culture est actuellement réalisable. Une limite de cette technique est l'exhaustivité des banques de données.

L'identification des espèces permet de déterminer l'épidémiologie locale des infections à *Candida*.

Candida albicans reste l'espèce majoritairement isolée dans les candidémies mais sa prévalence diminue au profit des non-albicans, notamment *C. glabrata* et *C. parapsilosis* pour les plus fréquentes, mais aussi *C. tropicalis*, *C. krusei* et d'autres espèces rares émergentes, aujourd'hui responsables de la moitié des cas, et dont certaines posent le problème d'une sensibilité diminuée aux antifongiques. Chez les patients d'onco-hématologie et de néonatalogie, les espèces non-*albicans* sont plus fréquemment responsables de candidémies. En Amérique latine et en Europe du Sud (Espagne, Italie), *C. parapsilosis* représente une grande proportion des non-*albicans*, alors qu'aux Etats-Unis c'est *C. glabrata* qui est le plus prévalent. Les données de plusieurs études épidémiologiques sont représentées dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 – Distribution des espèces de *Candida spp* isolées dans les candidémies

	Incidence /1 000 hospit	<i>C.alb</i>	<i>C.gla</i>	<i>C.par</i>	<i>C.tro</i>	<i>C.kru</i>	Référence
1997-2001 USA	ND	55%	21%	11%	9%	2%	[147]
1997-2001 Amérique latine	ND	45%	6%	25%	16%	1%	[147]
1997-2001 Europe	ND	58%	10%	19%	7%	1%	[147]
1998-2001 Iowa	ND	58%	20%	7%	11%	2%	[48]
2001-2005 Brésil adulte oncologie	2,68	29.3%	6.1%	19.2%	32.3%	5%	[195]
2001-2005 Brésil oncopédiatrie	19,14	28.5%	0.8%	39.2%	15.4%	3.8%	[195]
2002-2010 Hopitaux Paris USI	6,9	55.4%	19.4%	8.8%	8.8%	2.9%	[16]
2002-2010 Hopitaux Paris non-USI	0,6	53%	16.6%	13.3%	9.2%	2.7%	[16]
2003 Monde	ND	48.7%	17.2%	17.3%	10.8%	1.9%	[124]
2004-2007 Finlande	2,86	67.3%	18.6%	5.3%	1.8%	3.1%	[159]
2004-2008 USA et Canada	ND	51.4%	23.0%	12.2%	6.9%	2.7%	[141]
2005-2009 Europe Cancer	ND	40.4%	9.8%	9.4%	13.1%	8.4%	[39]
2005-2009 Onco-hématologie	ND	22%	4.3%	7.9%	21.4%	14.3%	[39]
2008-2009 Monde	ND	48.4%	18.2%	17.1%	10.6%	2%	[151]
2008-2010 Italie et Espagne	1,55	56%	7,9%	18,7%	8,9%	ND	[12]
2010-2012 Chine	ND	39.5%	14.5%	26.4%	15%	0.5%	[143]
2010-2014 Turquie Onco-pédiatrie	5,2	37%	3%	7%	7%	24%	[78]
Europe Fongémie acquise à l'hôpital et hospitalisés en réanimation.	ND	57.1%	15.3%	10.2%	6.1%	1%	[135]
2010-2011 Espagne	8,1	45.4%	13.4%	24.9%	7.7%	2%	[164]
2011-2012 Iowa	NR	42%	36%	8%	7%	1%	[121]
2013 Monde	ND	66.1%	23.3%	20%	14.4%	4.5%	[30]

2.4 Techniques de diagnostic non basées sur la culture, les biomarqueurs sériques

La faible sensibilité des hémocultures (50-70%) et le délai de positivité long (2 à 8 jours) sont loin d'être idéaux [37, 103]. Elles sont par ailleurs négatives en cas de candidose profonde. Dans ce cas, les cultures de tissus ou de sites profonds infectés sont également limitées par la nécessité d'interventions invasives et leur faible sensibilité. Or, il a été clairement établi que le délai d'initiation du traitement antifongique a un impact significatif sur la mortalité. Plus récemment, de nouveaux outils diagnostiques non basés sur la culture ont été développés afin d'améliorer la précocité du diagnostic et la spécificité des modèles prédictifs cliniques. Ils permettent la détection dans le sang des composants de la paroi cellulaire fongique (mannanes, β -D-glucane), d'anticorps (anti-mannanes, anti-mycélium (CAGTA)) ou de l'ADN.

Le β -(1-3)-D-glucane (BDG) se positive précocement au cours des candidoses invasives (CI) et constitue un biomarqueur sensible mais non spécifique puisqu'il se positive aussi lors d'une aspergillose invasive ou d'une pneumocystose. Une méta-analyse récente de 11 études rapporte une sensibilité de 57-97% et une spécificité de 56-93% du BDG pour le diagnostic des CI [96]. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque deux tests consécutifs sont positifs. Plusieurs causes de fausse positivité ont été

décrites : dialyse avec membrane de cellulose, bactériémie à Streptocoques, certains lots d'antibiotiques (bétalactamines), administration de produits dérivés du sang (immunoglobulines intraveineuses, albumine...), mucite sévère [96]. Le test actuellement commercialisé, le Fungitell (Cape Cod, Inc., USA), est approuvé par la FDA. Des taux supérieurs à 80 pg/mL chez les patients à risque sont considérés comme positifs et sont obtenus 24 à 72 heures avant la positivité des hémocultures [161]. Son utilisation en complément des modèles prédictifs est maintenant incluse dans les recommandations de plusieurs sociétés savantes pour le diagnostic des candidoses invasives [192, 42, 38] et en particulier celui des candidoses intra-abdominales [11].

Le mannane et l'anticorps anti-mannane L'antigène mannane (Mn) est un biomarqueur spécifique, mais peu sensible pour le diagnostic des CI et qui se positive plus tardivement que le BDG au cours de l'infection. Une méta-analyse de 14 études, dont 7 menées chez des patients non neutropéniques, rapporte une sensibilité et une spécificité du Mn et des IgG anti-Mn de 58 et 93%, et de 59 et 83%, respectivement. La sensibilité et la spécificité de la détection combinée Mannane/Anti-Mannane étaient de 83 et 86%, avec les meilleures performances obtenues pour les infections à *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* [125]. Les tests actuellement commercialisés sont le Platelia Candida Antigen Plus (Ag Plus™) et l'Antibody Plus (Ab Plus™, Bio-Rad Laboratories). Ils peuvent être positifs 6 jours avant les hémocultures et sont recommandés dans le diagnostic des candidémies et des candidoses hépato-spléniques [42].

Des tests d'immunofluorescence ou de chimioluminescence (*Candida albicans* IgG, VIRCELL, Espagne) sont disponibles dans le commerce pour la détection d'anticorps spécifiques anti-mycélium (CAGTA). Son utilité dans le diagnostic de la candidémie associée à une infection profonde a été récemment documentée, avec une spécificité et une valeur prédictive positive de 95% [120].

La détection d'ADN de *Candida* n'a toujours pas trouvé sa place en pratique clinique de routine, en raison de l'absence de validation multicentrique et de l'hétérogénéité des techniques développées. La technique semble toutefois prometteuse, puisqu'une méta-analyse a évalué sa sensibilité globale à 95% et sa spécificité globale à 92% [9].

La place de ces biomarqueurs sériques reste imprécise. Leurs performances varient quelque peu selon le type de patient, de CI, le nombre de prélèvements positifs requis et le seuil de positivité choisi. Leur utilisation nécessite de concevoir des algorithmes diagnostiques les incluant et les combinant entre eux, et de les évaluer afin d'identifier au mieux les patients à risque élevé de CI pouvant éventuellement bénéficier d'un traitement antifongique précoce.

2.5 Détermination de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques

L'objectif de l'étude de la sensibilité aux antifongiques est double : donner au clinicien la sensibilité de la souche isolée et suivre l'épidémiologie de la résistance aux antifongiques.

Un antifongigramme doit être réalisé pour toute souche isolée d'un prélèvement profond. Il est particulièrement recommandé chez des patients traités préalablement par un antifongique, en cas d'échec clinique, lorsque la souche isolée est rare, ou lorsqu'elle est connue pour être résistante ou moins sensible à certains antifongiques.

Il existe plusieurs techniques permettant de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antifongiques.

2.5.1 Techniques de références

Les techniques de référence ont été développées par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) et par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). La mesure de la CMI pour un antifongique donné est standardisée et reproductible. Elle repose sur la méthode de microdilution en milieu liquide : une suspension de levure calibrée est mise en contact avec des concentrations croissantes de l'antifongique à tester. Les deux techniques proposées diffèrent quelque peu. Les recommandations du CLSI sont d'utiliser un inoculum fongique de $0,5 \cdot 10^3$ à $2,5 \cdot 10^3$ cellules/mL dans une solution de RPMI 1640 additionné de 0.2% de glucose, alors que l'EUCAST préconise un inoculum 100 fois plus faible dans du RPMI 1640 à 2.0% de glucose. La lecture est réalisée après 24h d'incubation à 35°C, visuellement pour le CLSI et par spectrophotométrie à 490 nm pour l'EUCAST. Elle permet de déterminer la CMI, plus petite concentration d'antifongique qui donne une réduction visible de la croissance de l'inoculum par rapport au témoin, exprimée en mg/L.

En étudiant la distribution des CMIs de souches sauvages, il est possible de calculer la valeur seuil épidémiologique (*Epidemiological cutoff values = ECV* ou *ECOFF*).

La catégorisation d'une souche comme « sensible » ou « résistante » repose ensuite sur la définition des valeurs seuils critiques d'interprétation clinique (*Clinical breakpoints = BPs*). La détermination d'un BP tient compte de l'ensemble des données pharmacocinétiques, pharmacodynamiques (étude chez l'animal), microbiologiques (ECV) et thérapeutiques (résultats d'essais thérapeutiques, risque d'échec thérapeutique estimé par la simulation de Monte Carlo). Un isolat présentant une CMI supérieure au BP est considéré comme résistant.

Tableau 2.4 – Distribution des CMIs et détermination de la valeur seuil épidémiologique de la micafungine (MIC) pour *C. albicans* (EUCAST) [62]

La distribution des CMIs suivante a été utilisée par l'EUCAST pour définir la valeur seuil épidémiologique (ECV). Pour les souches ayant acquis un mécanisme de résistance, dans la majorité des cas la valeur de la CMI est supérieure à celle de l'ECV.

CMI en mg/l	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	>2	ECV
<i>C. albicans</i>	0	290	360	243	39	5	1	0	0	2	0	0,015

La simulation de Monte Carlo permet d'évaluer la probabilité de succès thérapeutique lors d'un traitement par la micafungine en fonction des CMI_{MIC} . Pour *C. albicans*, le pourcentage de succès pour souche avec une CMI_{MIC} de 0,016 mg/L est estimé à 89,2%.

Le BP a donc été défini à 0,016 mg/L.

Les CMIs mesurées par la méthode CLSI ont tendance à être plus élevées que celles mesurées par la méthode EUCAST, sauf pour la caspofungine pour laquelle on observe la tendance inverse. Les CMIs sont particulièrement bien corrélées pour la micafungine avec moins de 1% des CMIs mesurées présentant plus de 2 dilutions d'écart [144]. L'adéquation des CMIs en anidufungine est moins bonne pour *C. glabrata* (45,2%) et *C. albicans* (82,5%). Concernant la caspofungine, l'adéquation entre les CMIs est correcte, la moins bonne de 91,7% étant observée pour *C. tropicalis*. Cependant, pour le classement de la souche testée en « Sensible » ou « Résistant », la catégorisation basée sur les BPs (ou les ECVs) n'est pas très bonne pour la caspofungine notamment pour *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, et *C. krusei*, en raison de la grande variabilité intra- et interlaboratoire (figure 2.7) observée lors de la détermination des CMIs [59]. Dans certains centres, la proportion de *C. glabrata* ayant une CMI en caspofungine supérieure à >0,12 mg/L avoisine les 100% [97, 149, 180] et la majorité des souches testées sont ainsi classées intermédiaire ou résistante. Ceci a par ailleurs conduit l'EUCAST à ne pas proposé de BPs pour la caspofungine.

Ces techniques de référence sont cependant trop lourdes à mettre en œuvre en routine et des techniques plus simples ont donc été développées. Pour être utilisées, elles doivent être parfaitement corrélées avec les techniques de référence (distribution des CMIs en miroir), permettre de détecter les isolats

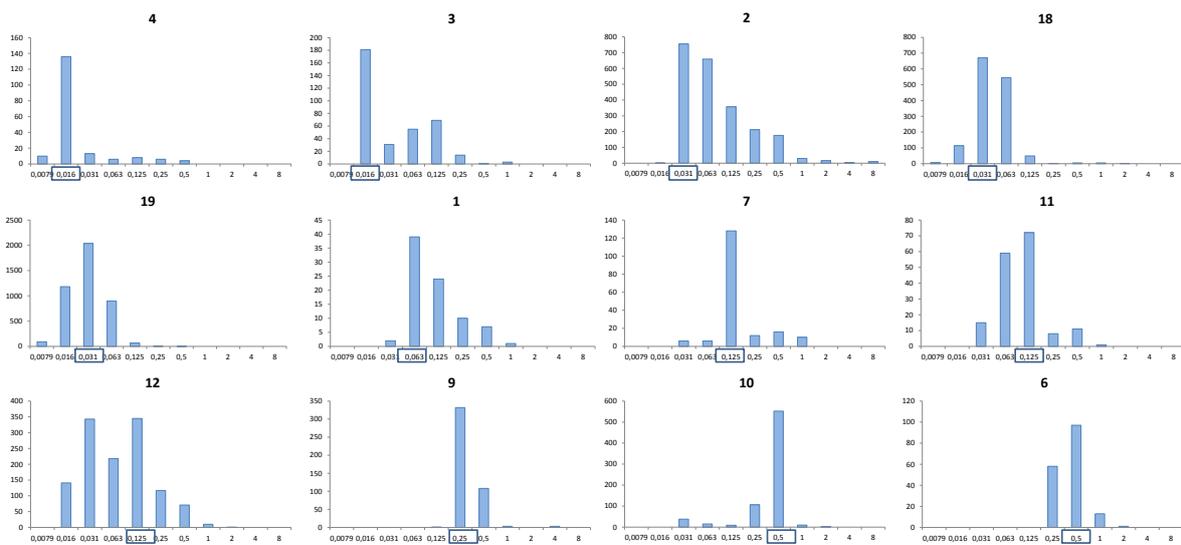
résistants et de bien catégoriser les isolats sensibles, et enfin présenter une bonne reproductibilité intra et inter laboratoires (CQ et CMI50).

Tableau 2.5 – Valeurs seuils d’interprétation clinique pour les échinocandines définies par le CLSI et l’EUCAST [146, 63]

Antifongique	Espèces	BP CLSI		BP EUCAST	
		S	R	S	R
Anidulafungine	<i>C. albicans</i>	≤ 0,25	> 0,5	≤ 0,03	> 0,03
	<i>C.glabrata</i>	≤ 0,12	> 0,25	≤ 0,06	> 0,06
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,25	> 0,5	≤ 0,06	> 0,06
	<i>C. krusei</i>	≤ 0,25	> 0,5	≤ 0,06	> 0,06
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	> 4	≤ 0,002	> 4
	<i>C. guilliermondi</i>	≤ 2	> 4	ND	ND
Caspofungine	<i>C. albicans</i>	≤ 0,25	> 0,5	ND	ND
	<i>C.glabrata</i>	≤ 0,12	> 0,25	ND	ND
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,25	> 0,5	ND	ND
	<i>C. krusei</i>	≤ 0,25	> 0,5	ND	ND
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	> 4	ND	ND
	<i>C. guilliermondi</i>	≤ 2	> 4	ND	ND
Micafungine	<i>C. albicans</i>	≤ 0,25	> 0,5	≤ 0,016	> 0,016
	<i>C.glabrata</i>	≤ 0,06	> 0,12	≤ 0,03	> 0,03
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,25	> 0,5	ND	ND
	<i>C. krusei</i>	≤ 0,25	> 0,5	ND	ND
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	> 4	≤ 0,002	> 2
	<i>C. guilliermondi</i>	≤ 2	> 4	ND	ND

Figure 2.7 – Distribution des CMI en caspofungine chez *C. albicans*, mesurées par la méthode CLSI par 12 laboratoires d’après [59]

Au total, 11 560 isolats de *C. albicans* ont été testés. La distribution des CMI est représentée pour chaque centre. Le mode est encadré.

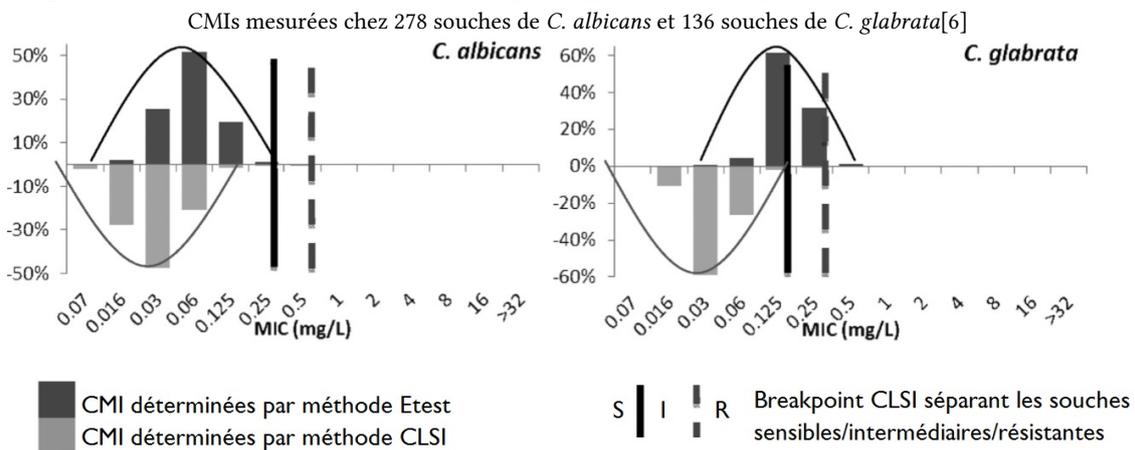


2.5.2 Techniques de routine : l'exemple de l'Etest®

Les Etest® sont des bandelettes contenant un gradient prédéfini d'antifongique. Une boîte de gélose à base de RPMI 1640 additionné de MOPS est ensemencée par un inoculum fongique calibré à 0,5 McFarland. Lorsque la bandelette est déposée sur la gélose, l'antifongique va diffuser dans la gélose. Après une incubation de 24h à 48h, la CMI est lue sur l'échelle graduée, à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette.

L'Etest® Caspofungine L'utilisation des BPs révisés du CLSI et de l'EUCAST permettent une bonne catégorisation des isolats de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*. Par contre, avec les BPs proposés par le CLSI, 73,1% des isolats sensibles de *C. krusei* et 33,1% des isolats sensibles *C. glabrata* sont classés intermédiaires et 1,5% des isolats de *C. glabrata* sont même classés résistants [6]. Pour *C. glabrata*, les CMIs mesurées par la méthode Etest® sont plus élevées qu'avec les techniques CLSI et EUCAST [22, 171]. Arendrup et al. [6] ont donc proposé pour *C. glabrata* et *C. krusei* d'utiliser un BP à 0,5 mg/L (initialement fixés respectivement à 0,125 et 0,25 mg/L) ou d'évaluer la sensibilité à la caspofungine d'après la CMI obtenue pour l'anidulafungine.

Figure 2.8 – Distribution des CMIs en caspofungine mesurées par les méthodes CLSI et Etest



L'Etest® Micafungine Bougnoux et al. [21] ont montré une excellente corrélation entre les CMIs obtenues par méthodes EUCAST et Etest, avec 98,5% de corrélation à 2 dilutions d'écart et 90,2% à une dilution. Les souches testées ont été bien catégorisées dans 98,2% des cas. Cette bonne corrélation a également été montrée avec la technique CLSI (88% à deux dilutions d'écart) [179, 60].

L'Etest® Anidulafungine Pour l'anidulafungine, la corrélation à deux dilutions d'écart de 94% entre les CMIs obtenues par méthodes Etest et CLSI est également très bonne [179].

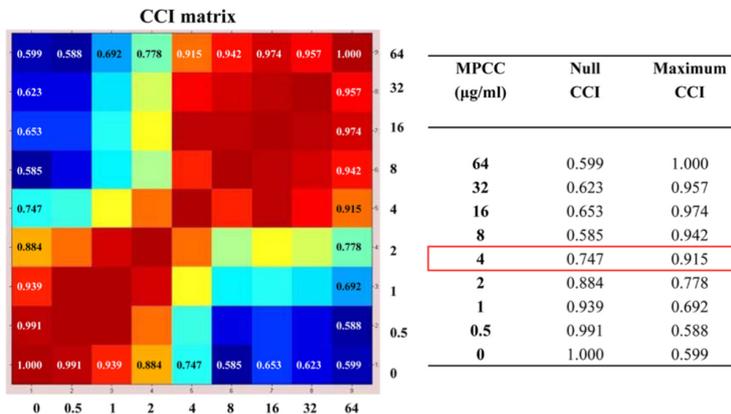
Les autres techniques commerciales pouvant être utilisées en routine sont le Sensititre YeastOne Test Panel et les galeries Vitek 2 Yeast [41].

2.5.3 Détermination de la sensibilité aux antifongiques par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

En 2012, une étude prometteuse a évalué la capacité de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à déterminer la sensibilité à la caspofungine de souches du genre *Candida* sauvages ou mutées pour les gènes *FKS*. Cette technique consiste en la comparaison des différents spectres obtenus pour une souche

donnée lorsque celle-ci est cultivée pendant 15h en milieu liquide (i) sans antifongique et (ii) additionné de 8 concentrations différentes de caspofungine (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/L). Après l'acquisition de l'ensemble des 9 spectres de la souche étudiée, ceux obtenus pour les concentrations extrêmes (0 mg/L et 64 mg/L) sont utilisés comme des références et comparés à ceux obtenus pour les 7 autres concentrations. La concentration pour laquelle le spectre est le plus proche de celui obtenu pour 64 mg/L de caspofungine et le plus proche aussi de celui obtenu pour 0 mg/L, appelée la concentration de caspofungine qui induit le moins de modification du spectre (MPCC), est déterminée. Cette technique basée sur la modification du protéome en présence de caspofungine [91] a montré une excellente corrélation entre la valeur de la MPCC et les CMI obtenues par méthode de microdilution (avec des écarts de deux dilutions) pour les 32 souches testées. Seuls 2 isolats n'étaient pas correctement identifiés comme étant « sensibles » ou « résistants » à la caspofungine, conduisant à un taux de corrélation de 94,1% avec les BPs de référence du CLSI [27]. Les spectromètres de masse de type MALDI-TOF étant de plus en plus disponibles dans les laboratoires hospitaliers, cette technique encore expérimentale aujourd'hui présage de très novatrices applications de ces appareils.

Figure 2.9 – Détermination de la concentration de caspofungine qui induit le moins de modification du spectre [27]



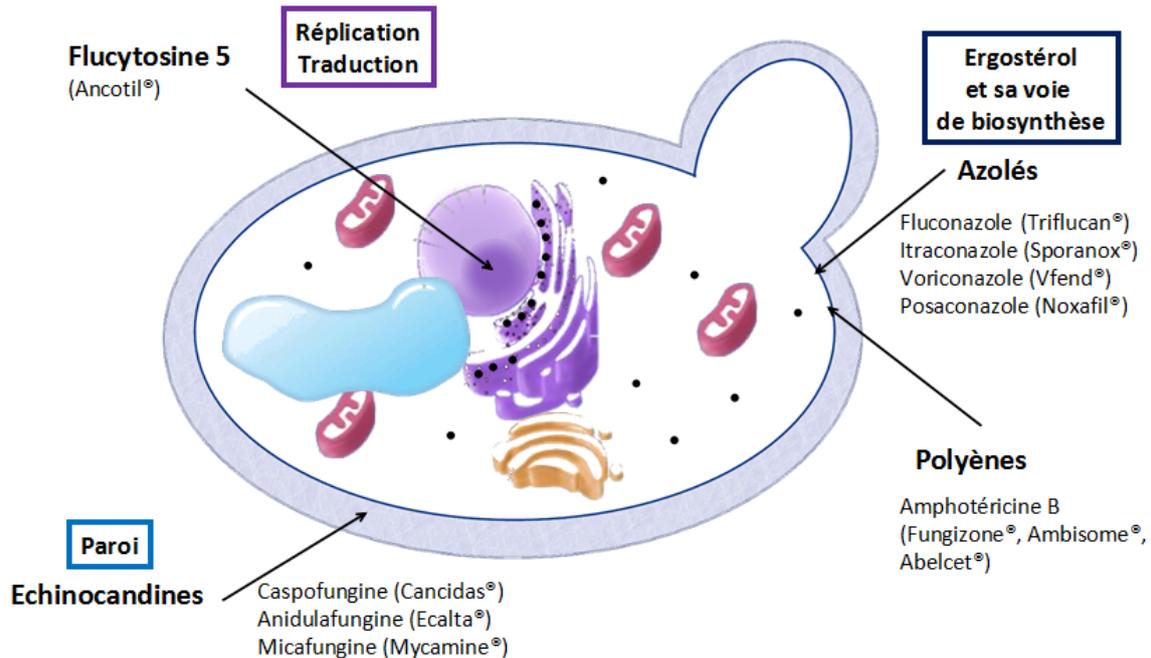
La matrice des index de corrélation composite (CCI) représente la concordance des spectres obtenus entre deux concentrations, pour la souche DSP155 de *C. glabrata*. La concentration pour laquelle le spectre est le plus proche de celui obtenu pour 64 mg/L de caspofungine et de celui obtenu pour 0 mg/L, appelée la concentration de caspofungine qui induit le moins de modification du spectre (MPCC) de cette souche est de 4 mg/L.

2.6 Les antifongiques systémiques

2.6.1 Cibles des antifongiques

Le traitement des candidoses invasives (CI) repose sur l'utilisation d'antifongiques systémiques. Les levures étant des micro-organismes eucaryotes, les cibles des antifongiques doivent être spécifiques des champignons, et sont donc limitées. Quatre familles d'antifongiques systémiques sont actuellement disponibles, ciblant trois voies métaboliques distinctes : les polyènes, les fluoropyrimidines, les dérivés azolés et les échinocandines.

Figure 2.10 – Cibles des antifongiques systémiques



2.6.2 Les polyènes

Structure L'amphotéricine B (AmB), chef de file des polyènes, est un macrolide cyclique constitué d'un cycle macrolactone à 40 atomes de carbone, sur lequel est branché un groupement mycosamine en position C19 [109]. Les polyènes possèdent un caractère amphotère lié au regroupement de plusieurs doubles liaisons conjuguées hydrophobes (d'où leur nom de "polyène") sur une face du cycle macrolactone et de groupements hydroxyles hydrophiles sur l'autre face. Ce sont des dérivés naturels, synthétisés par des bactéries du genre *Streptomyces*. Des formes lipidiques ont été développées afin de diminuer les effets indésirables de l'AmB déoxycholate comme l'AmB en complexe lipidique (Abelcet®) qui est une suspension d'amphotéricine B et de phospholipides, ou l'AmB incorporée dans des liposomes (Ambisome®).

Mécanisme d'action L'amphotéricine B a une affinité très forte pour l'ergostérol qui est le principal stérol de la membrane plasmique fongique.

Trois mécanismes ont été décrits (figure 2.11) :

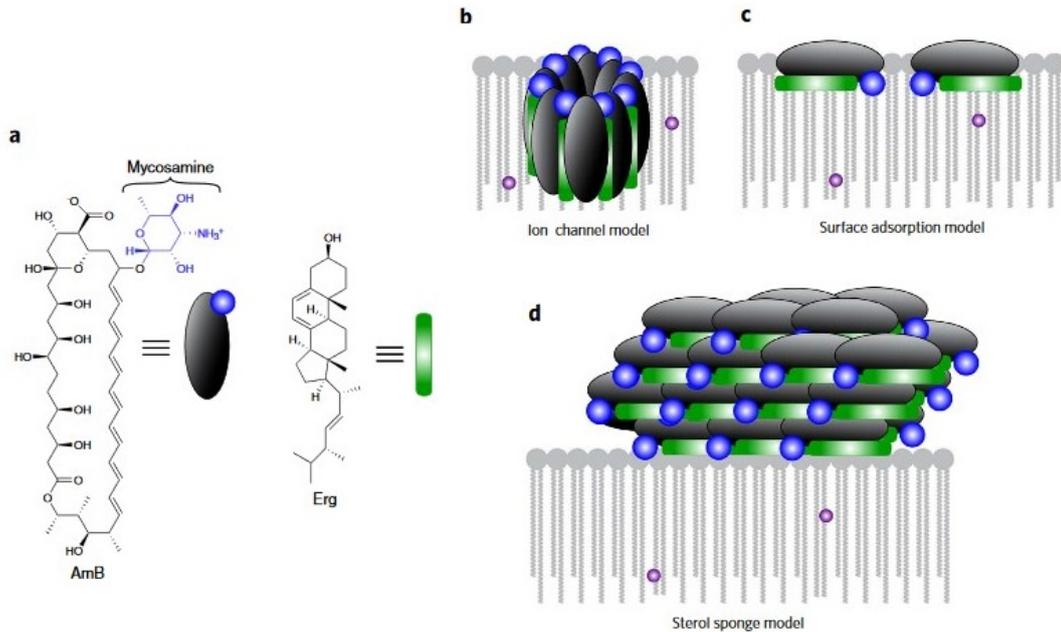
- « modèle du canal transmembranaire » : 8 molécules d'AmB s'associent à 8 molécules d'ergostérol par leur partie polyénique tandis que les faces hydrophiles ménagent un canal central de 70 à 100 nm de diamètre [109],

- « modèle de l'adsorption en surface » : fixation de l'AmB à la surface de la membrane avec séquestration de l'ergostérol,
- « modèle de l'éponge à stérol » : formation d'importants agrégats extramembranaires, responsables de l'extraction de l'ergostérol de la bicouche lipidique [2].

Les polyènes possèdent également une affinité non négligeable pour le cholestérol, ce qui leur confère une forte toxicité à l'origine de multiples effets secondaires.

Figure 2.11 – L'amphotéricine B

(a) Structure de la molécule. (b,c,d) Modélisation des interactions avec l'ergostérol membranaire : formation de canaux transmembranaires (b), adsorption à la surface (c), formation d'amas extracellulaires (d). D'après [2]



Pharmacocinétique L'amphotéricine B (AmB) est très peu hydrosoluble et donc très peu absorbée au niveau de la muqueuse gastro-intestinale. Elle doit être administrée par voie intraveineuse, en association avec le désoxycholate de sodium (DAmB). L'AmB se lie fortement aux protéines plasmatiques. Les concentrations élevées d'AmB sont trouvées dans le foie (14 à 41 % de la dose administrée), les reins (0,3 à 2 %) et les poumons (1,2 à 6 %). Le DAmB possède une bonne pénétration intra-macrophagique

La pharmacocinétique des formes lipidiques diffère quelque peu. Pour l'Ambisome®, les concentrations tissulaires les plus élevées sont retrouvées dans le foie (13 à 23 % de la dose délivrée) et la rate, et la demi-vie est augmentée. Il n'y a pas d'élimination rénale de l'AmB.

Effets indésirables La formulation initiale, développée dans les années 1950s, est l'amphotéricine B désoxycholate (DAmB). Lors d'un traitement entre 40% et 90% des patients présentent une réaction aigüe (fièvre, vomissement, maux de tête) et 30% une altération de la fonction rénale avec hypokaliémie, hypomagnésémie et acidose métabolique [169, 3].

La tolérance des formes lipidiques est meilleure, avec pour l'Ambisome® deux fois moins d'augmentation de la créatinine et moins de réaction immédiate [199].

Mécanisme de résistance et spectre d'activité. Les cas de résistance à cette molécule sont rares. Les mécanismes impliqués sont une altération des stérols membranaires, une défense contre le stress oxydatif ou des mutations des gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

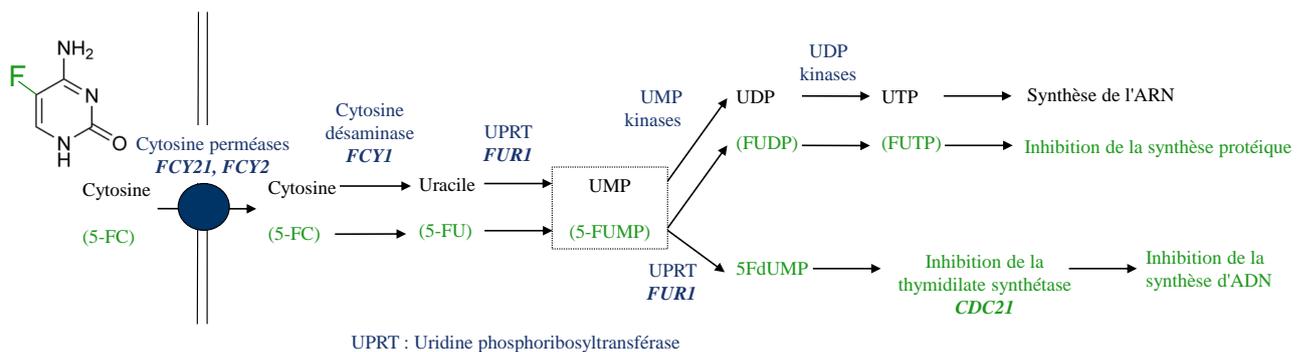
Le spectre d'activité est étendu. L'AmB est active sur quasiment toutes les levures et les champignons filamenteux. Elle est également utilisée dans le traitement des leishmanioses.

2.6.3 Les fluoropyrimidines

Structure Les fluoropyrimidines sont représentées en thérapeutique antifongique par la 5-fluorocytosine (5-FC) (Ancotil®). La 5-FC est un analogue de synthèse de la cytosine. Elle est captée par les champignons via les cytosine perméases, qui transportent également d'autres molécules comme la cytosine, l'adénine et l'hypoxanthine. Les cellules humaines ne possèdent pas de cytosine désaminase, et ne sont donc pas exposées à l'effet toxique de la 5-FC.

Mécanisme d'action La 5-FC est rapidement désaminée en 5-fluorouracile (5-FU), qui est métabolisé en 5-fluorouridine triphosphate puis intégré à l'acide ribonucléique (ARN) où il perturbe la synthèse des protéines. Le 5-FU peut également être transformé par l'uridine monophosphate pyrophosphorylase en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate (FdUMP) qui inhibe la thymidylate synthétase, une enzyme clé de la synthèse de l'ADN [92, 196, 166].

Figure 2.12 – Métabolisme et mécanisme d'action de la flucytosine [92]



Pharmacocinétique En raison de sa grande hydrosolubilité et de sa petite taille, l'absorption de la 5-FC est très rapide et sa biodisponibilité orale est excellente (entre 76 et 89%) [43]. La molécule diffuse très bien, notamment dans le liquide cérébro-spinal, le péritoine, l'humeur vitrée et les articulations. Son élimination est essentiellement rénale sous forme non métabolisée [196].

Mécanisme de résistance et spectre d'activité Les limites de son utilisation sont l'activité fongistatique et l'apparition rapide de mutants résistants sous traitement. La résistance peut être liée à la diminution de la captation de l'antifongique par les cellules fongiques, à la diminution du métabolisme du 5-FC en 5-FUMP ou à l'induction du métabolisme des pyrimidines, qui entrent alors en compétition avec l'antifongique [92, 166].

La 5-FC est active sur les levures du genre *Candida* et sur *Cryptococcus neoformans*. Son importante diffusion en fait une molécule de choix dans le traitement des endocardites, des endophtalmies et des infections du tractus urinaire, en association avec un autre antifongique (pour limiter l'acquisition de résistance).

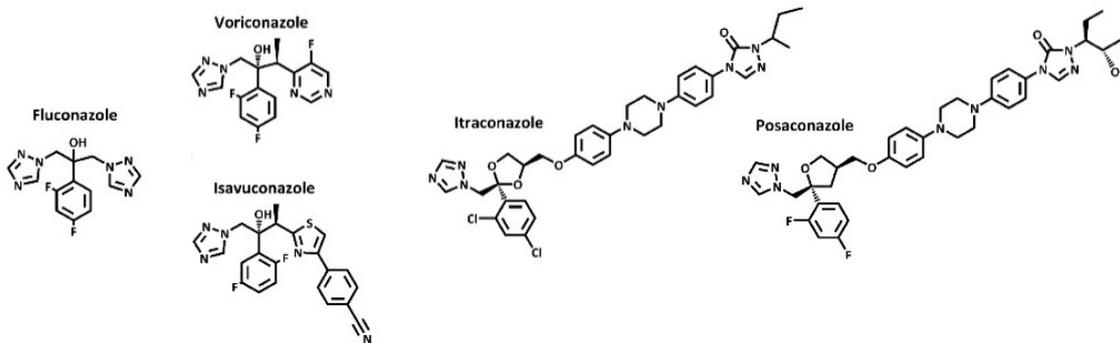
2.6.4 Les triazolés

Structure Le kétoconazole est le premier antifongique azolé systémique à avoir été mis sur le marché en 1981. La base de la molécule est un noyau imidazolé. Il était disponible uniquement par voie orale, et son absorption était très variable. Les interactions médicamenteuses étaient nombreuses et il a finalement été retiré du marché en juin 2011, notamment à cause de son hépatotoxicité [4].

Le fluconazole est le premier triazolé commercialisé dans les années 1990. La substitution du cycle imidazolé par un noyau triazolé permet d'accroître la spécificité vis-à-vis du cytochrome P450 fongique (C14 α -déméthylase), et d'en diminuer le métabolisme [134]. L'itraconazole, commercialisé en 1992, présente un spectre élargi aux *Aspergillus*.

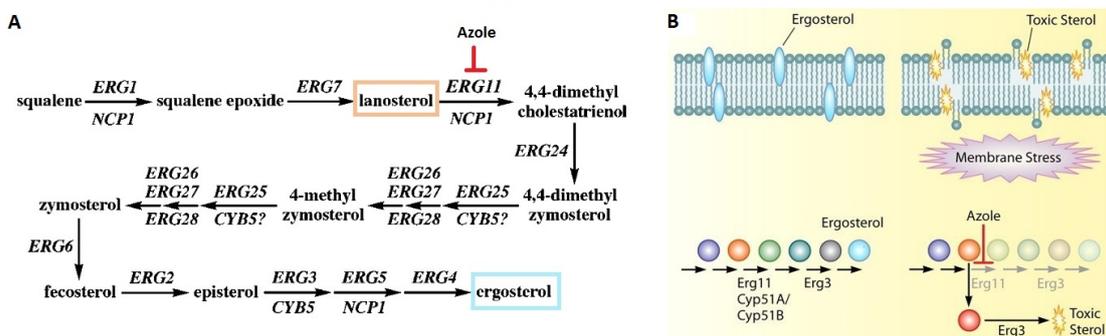
Les triazolés de seconde génération, le voriconazole et le posaconazole et l'isavuconazole récemment mis sur le marché sont intrinsèquement plus actifs, et leur spectre est également élargi aux *Aspergillus spp* et à certains Zygomycètes.

Figure 2.13 – Les antifongiques systémiques azolés [168]



Mécanisme d'action Les antifongiques azolés inhibent une enzyme de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, la lanostérol C14 α -déméthylase (également appelée CYP51 ou Erg11). Il en résulte une déplétion en ergostérol qui assure la fluidité membranaire, et une accumulation de lanostérol. Ce dernier est métabolisé par l'enzyme Erg3 ce qui conduit à la synthèse de stérols méthylés toxiques.

Figure 2.14 – Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *C. albicans* (A) et représentation schématique de l'action des azolés (B) [155, 172]



Pharmacocinétique Les triazolés possèdent des paramètres pharmacocinétiques très différents. Tous sont administrables par voie orale, avec des biodisponibilités variables. Le fluconazole et le voriconazole possèdent une excellente biodisponibilité orale (>90%), alors que celle de l'itraconazole n'excède pas 55% dans des conditions optimales d'administration (forme gélule, une prise au moment d'un repas et sans association à un médicament augmentant le pH gastrique). Il existe une forme injectable

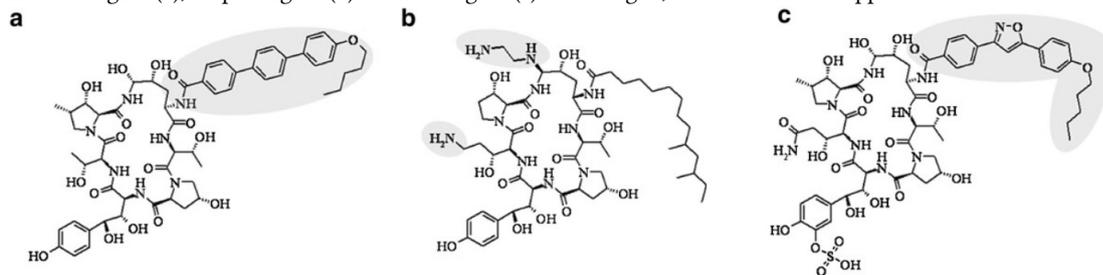
pour le fluconazole et le voriconazole. L'itraconazole et le posaconazole, et dans une moindre mesure le voriconazole, sont très fortement liés aux protéines plasmatiques, ce qui en fait des molécules non dialysables. Le fluconazole et le voriconazole ont une bonne diffusion cérébrale. Le fluconazole est éliminé majoritairement sous forme active dans les urines [162, 140, 134].

Mécanisme de résistance et spectre d'activité La résistance acquise aux azolés est la résistance aux antifongiques la plus diversifiée. Elle peut apparaître via de multiples mécanismes : une augmentation de la synthèse de la protéine Erg11, une altération du site de fixation des azolés sur la protéine Erg11, une augmentation de l'efflux par les pompes Cdr1, Cdr2, ou Mdr1.

2.6.5 Les échinocandines

Structure Les échinocandines sont des lipo-hexapeptides cycliques semi-synthétiques, issus de produits de fermentation de différents ascomycètes : la pneumocandine B₀ de *Glarea lozoyensis* pour la caspofungine, le dérivé FR901370 de *Coleophoma empedri* pour la micafungine et l'échinocandine B₀ d'*Aspergillus nidulans* pour l'anidulafungine. Leur biosynthèse initiale par des champignons résulte d'une synthèse peptidique non ribosomique, assurée par plusieurs synthétases incorporant successivement des acides aminés. Cela aboutit à la production de peptides complexes associant pour les échinocandines un cycle hexapeptidique et une chaîne lipidique [15].

Figure 2.15 – Structure chimique des trois échinocandines actuellement commercialisées anidulafungine (a), caspofungine (b) et micafungine (c). En surligné, les modifications apportées sur la molécule initiale[55]



Mécanisme d'action Les échinocandines altèrent la synthèse de la paroi fongique en inhibant de manière non compétitive la β -(1-3)-D-glucane synthétase (GS). Cette enzyme catalyse la polymérisation de l'uridine diphosphate glucose (UDP-glucose) en β -(1,3)-D-glucane, constitué de 60 à 80 résidus de glucose reliés par des liaisons β -(1,3).

Pharmacocinétique et pharmacodynamie Leur biodisponibilité orale étant limitée, les échinocandines sont administrées par voie intraveineuse. Une dose de charge est recommandée le premier jour pour la caspofungine (70 mg/j, puis 50 mg/j) et l'anidulafungine (200 mg puis 100 mg/j) mais pas pour la micafungine (100 mg/j). Chez les patients de plus de 80kg, pour la caspofungine, la posologie initiale de 70mg/ doit être maintenue. Les échinocandines sont fortement liées aux protéines plasmatiques (>84%), et non dialysables. Les concentrations tissulaires les plus élevées sont retrouvées au niveau pulmonaire, hépatique, splénique et rénal tandis que les concentrations dans l'urine, le LCR et le vitré sont négligeables. Les échinocandines sont dégradées en métabolites inactifs soit chimiquement par le sang (anidulafungine), soit par le foie (micafungine et caspofungine), par un mécanisme différent du cytochrome P450. En cas d'insuffisance hépatique modérée (score Child-Pugh entre 7 et 9), la dose d'entretien de la caspofungine doit être de 35 mg/jour. Il n'est pas nécessaire d'ajuster les doses pour la micafungine et l'anidulafungine [156].

L'anidulafungine présente quelques caractéristiques de pharmacocinétique qui lui sont propres. Elle n'est pas dégradée par le foie, présente le pic plasmatique le plus faible et se fixe moins aux protéines. Son volume de distribution et sa demi-vie sont plus élevés [58].

Les interactions médicamenteuses avec les échinocandines sont très limitées. Elles n'interagissent pas avec le cytochrome P450, ni avec la glycoprotéine P. Le dosage des immunosuppresseurs est recommandé lors d'un traitement par micafungine (ciclosporine, sirolimus) et par caspofungine (tacrolimus). Les concentrations de caspofungine sont diminuées lors d'une co-administration avec de la rifampicine.

L'action dépend de la concentration plasmatique en antifongique, avec une prédiction de l'efficacité par la mesure du ratio de l'aire sous la courbe sur la CMI (AUC/CMI). Les échinocandines possèdent un effet post-antifongique prolongé. Après une heure d'exposition aux échinocandines puis élimination de l'antifongique, il persiste une décroissance de l'inoculum fongique [36, 183, 77]. Les échinocandines présentent une excellente efficacité sur le biofilm.

Mécanisme de résistance et spectre d'activité Les échinocandines possèdent une activité fongicide dépendante de la concentration vis à vis de toutes les espèces de *Candida spp*. Les CMIs en échinocandines sont plus élevées chez les *Candida* du complexe parapsilosis (*C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* et *C. orthopsilosis*) et pour *C. guilliermondii* en raison d'un polymorphisme génétique dans le gène de la β -(1-3)-D-glucane synthétase. L'anidulafungine présente en général les CMIs les plus basses et la caspofungine les plus élevées.

Vis à vis d'*Aspergillus spp*, les échinocandines sont considérées comme fongistatiques, même si elles entraînent une lyse apicale des hyphes [94].

Les échinocandines sont inactives sur les zygomycètes, *Fusarium solani*, *Scedosporium prolificans*, *Cryptococcus spp* et *Trichosporon spp*.

2.7 Recommandations thérapeutiques

Le traitement des candidoses invasives fait l'objet de recommandations de la part de plusieurs sociétés savantes, en particulier l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) et l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Il dépend essentiellement du statut immunitaire de l'hôte (neutropénique ou non neutropénique) et de l'organe atteint. L'arsenal thérapeutique est varié mais le pouvoir fongicide important des échinocandines vis à vis des *Candida spp*, associé à l'absence d'effet secondaire majeur et leur action sur les biofilms font qu'elles sont positionnées en première ligne de traitement curatif des candidoses invasives dans toutes les recommandations récentes. Les échinocandines sont recommandées en première intention dans : les candidémies du sujet neutropénique et non neutropénique ; les candidoses abdominales en association avec la chirurgie ; les infections ostéoarticulaires ; les endocardites, les infections de matériel intra-vasculaire, les thrombophlébites (à fortes doses 150 mg pour la caspofungine et la micafungine, 200 mg pour l'anidulafungine). Elles ne sont pas recommandées dans les infections oculaires, les infections du système nerveux central et les infections du tractus urinaire en raison de leur très faible diffusion dans ces organes, ni dans les infections des muqueuses digestives ou génitales en raison des alternatives thérapeutiques disponibles [136].

2.8 Modification de l'écologie fongique sous traitement par échinocandines

Un traitement antifongique entraîne une pression de sélection sur la flore commensale, ayant pour conséquences un risque de sélection de levures résistantes à l'antifongique et une modification de l'écologie. Deux études ont montré, en analyse multivariée, qu'un traitement antérieur par une échinocandine est un facteur de risque indépendant de développer une infection avec une souche de sensibilité diminuée à ces molécules (Odds-ratio de 5,25 et 5,3) [193, 19].

L'étude de la répartition des espèces de *Candida* responsables de candidémies montre qu'une exposition à un antifongique dans les 30 jours précédents modifie leur distribution. Dans le cas d'une pré-exposition au fluconazole, *C. glabrata* et *C. krusei* sont plus fréquemment isolés, alors qu'une pré-exposition aux échinocandines sélectionne *C. parapsilosis*, *C. glabrata* et *C. krusei* [115]. Une augmentation de la proportion des candidémies à *C. parapsilosis* liée à l'augmentation de la prescription des échinocandines a été montrée en France [67, 139] et aux Etats-Unis [65, 182], mais n'a pas été observée au Danemark [5].

L'évolution globale de l'épidémiologie des candidémies en lien avec la consommation d'antifongique reste difficile à montrer.

3.1 Mécanismes de résistance

3.1.1 Généralités sur la résistance aux antifongiques

3.1.1.1 Le type de résistance aux antifongiques

La résistance primaire ou intrinsèque se réfère à la sensibilité naturelle d'une espèce à un antifongique donné. Ce niveau inné de sensibilité est indépendant de l'exposition à l'antifongique. Par exemple, *C. krusei* est intrinsèquement résistant au fluconazole en raison d'une inhibition plus faible de la C14 α -déméthylase [133].

A l'inverse, la résistance secondaire ou acquise survient uniquement après une exposition à l'antifongique. Deux types de situations sont possibles : soit l'espèce de *Candida spp* responsable de la colonisation ou de l'infection initialement sensible, devient résistante par mutation génétique sous la pression du traitement antifongique, soit le patient est colonisé ou infecté par plusieurs souches d'une même espèce ou plusieurs espèces et sous l'effet du traitement l'espèce ou la souche intrinsèquement résistante à l'antifongique sera sélectionnée.

3.1.1.2 Les différents mécanismes moléculaires de résistance

Un défaut d'accumulation de l'antifongique L'antifongique doit pénétrer dans la levure afin d'exercer son action. La 5-FC utilise des transporteurs comme la cytosine perméase (FCY2) pour pénétrer dans le cytoplasme. Toute altération de la FCY2 va entraîner une diminution de la concentration intracellulaire en 5-FC.

L'antifongique peut également être rejeté de l'extérieur de la cellule par des pompes d'efflux. Deux principales familles de transporteurs sont impliquées dans la résistance aux azolés. Elles se distinguent par l'énergie nécessaire à leur fonctionnement et par les différents substrats antifongiques qui peuvent les emprunter. Les transporteurs de type MF (Major Facilitator), codés par le gène MDR1 chez *C. albicans*, fonctionnent à l'aide d'un gradient électrochimique de protons. Ces pompes n'effluent que le fluconazole. Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette), codés par les gènes CDR1 et CDR2 chez *C. albicans*, utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) pour exporter hors du cytoplasme la plupart des antifongiques azolés. En situation normale, les transporteurs Mdr ou Cdr sont exprimés à un niveau de base dans la cellule fongique, même en l'absence d'antifongique. La résistance résulte de la surexpression des gènes et de l'accumulation des pompes dans la membrane.

Une altération de la cible de l'antifongique conduit à une diminution de l'affinité pour l'antifongique. C'est le mécanisme le plus fréquemment retrouvé, et il touche toutes les classes d'antifongiques.

Pour les échinocandines, des mutations du gène *FKS* codant la β -1,3-D-glucane synthétase vont induire une résistance croisée à toutes les échinocandines.

La résistance aux antifongiques azolés est médiée par des mutations de la C14- α -déméthylase. Certaines mutations sont responsables d'une résistance isolée au fluconazole, tandis que pour d'autres la résistance est croisée avec le voriconazole ou avec l'ensemble des azolés.

La surexpression des gènes de la thymidylate synthase ou de la C14- α -déméthylase aboutissent respectivement à une résistance à la 5-FC ou aux azolés.

L'altération des enzymes de métabolisme de l'antifongique va entraîner un défaut d'activation de l'antifongique. L'altération de la cytosine désaminase (FCY1) empêche la transformation du 5-FC en 5-FU, et est responsable d'une résistance au 5-FC.

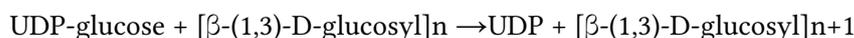
L'adaptation de la cellule fongique par l'activation de voies métaboliques de sauvetage ou la synthèse de biofilm conduit également à une résistance aux antifongiques.

3.1.2 Bases moléculaires de la résistance aux échinocandines

3.1.2.1 Les gènes *FKS* codent pour une glucane synthase (Fks)

Le gène *FKS*, cible des échinocandines, qui code pour la β -(1-3)-D-glucane synthétase, a été décrit dans les années 1990 par des équipes qui étudiaient chez la levure la voie de la calcineurine et l'action des immunosuppresseurs comme le tacrolimus (FK506) et la cyclosporine (CsA). En 1993, Parent *et al.* ont décrit une souche de *Saccharomyces cerevisiae* 100 à 1000 fois plus sensible au tacrolimus (FK506) qu'ils ont appelé « mutant *fks1* » [137]. Mais quelle est la relation entre une mutation dans le gène codant une sous-unité de la glucane synthase et l'hypersensibilité au tacrolimus ? La réponse a été apportée par la découverte chez *S. cerevisiae* du gène orthologue *FKS2*, codant une protéine ayant 87% d'identité avec Fks1, dont certaines fonctions sont redondantes avec celles de Fks1 et dont la régulation dépend de la calcineurine. Chez ces « mutants *fks1* » l'altération de l'activité de la protéine Fks1 est donc compensée par Fks2. Lors d'un traitement par le tacrolimus, la transcription du gène *FKS2* n'étant plus induite, cela se traduit par une sensibilité accrue des mutants au tacrolimus.

Fks1 et Fks2 sont des protéines transmembranaires dont le domaine central cytoplasmique porte l'activité glucane synthétase.



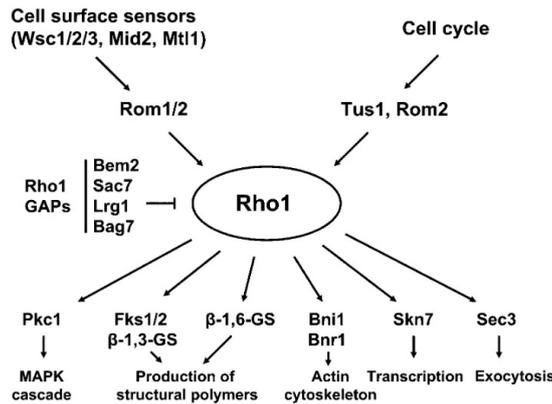
La protéine Rho1 est indispensable à l'activité de ces sous-unités catalytiques. Il s'agit d'une protéine régulatrice majeure portant une activité GTPase qui est impliquée dans le contrôle de l'intégrité de la paroi fongique. Elle joue un rôle central dans de nombreux processus cellulaires (figure 3.1).

C'est au final trois gènes paralogues de *FKS* qui ont été identifiés chez les levures (*FKS1*, *FKS2*, *FKS3*). *FKS1* et *FKS2* codent des protéines de grande taille (> 200 kDa), présentant plusieurs hélices transmembranaires et un domaine cytoplasmique central porteur de l'activité catalytique. L'expression des deux sous-unités Fks1p et Fks2p est complexe et varie en fonction des espèces fongiques, du cycle cellulaire et des facteurs environnementaux. Le gène *FKS1* est le gène principal du point de vue fonctionnel chez *C. albicans* et chez les autres espèces de *Candida* spp., alors que chez *C. glabrata* les gènes *FKS1* et *FKS2* sont fonctionnellement redondants [98, 131].

Le gène *FKS3* est exprimé à très bas niveau chez *Saccharomyces cerevisiae* et il est impliqué dans la formation des spores [95].

L'inhibition enzymatique des sous-unités Fks par les échinocandines est responsable d'une diminution de la synthèse des β -1,3-glucanes et conduit à un déséquilibre osmotique et à une lyse cellulaire particulièrement marquée chez les levures du genre *Candida* (effet fongicide). Toutefois, le mécanisme d'interaction précis entre les échinocandines et la β -1,3- glucane synthétase reste inconnu.

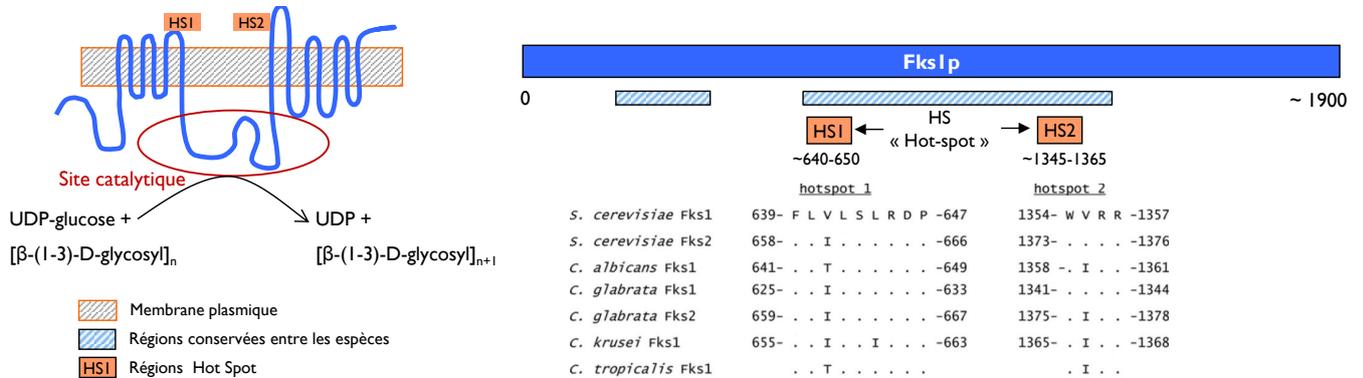
Figure 3.1 – Illustration du rôle central de Rho1 dans la régulation de l'intégrité de la paroi
L'activité de Rho1 est régulée par le cycle cellulaire et par des senseurs de stress cellulaire (guanosine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs)). Rho1 module l'activité de 6 effecteurs impliqués dans la synthèse de la paroi, la polymérisation de l'actine, l'exocytose et la transcription [132]



3.1.2.2 Notion de « Hot-Spot »

Le gène *FKS1*, notamment sa partie centrale, est très conservé au sein des différentes espèces fongiques. La majorité des mutations impliquées dans la résistance aux échinocandines ont été décrites dans deux régions appelées « Hot Spot », situées sur la protéine Fks1 de *S. cerevisiae* entre les acides aminés 639 et 647 pour le HS1, et 1354 et 1357 pour le HS2. Les mutations de résistance sont essentiellement situées sur le gène *FKS1*, sauf chez *C. glabrata* où elles apparaissent également sur le gène *FKS2*.

Figure 3.2 – Représentation schématique de la protéine Fks1 et des séquences des régions « Hot-spot » d'après [138, 99]



3.1.2.3 Rôle et régulation des différents gènes *FKS*

Chez *Saccharomyces cerevisiae* [95, 122]

Chez *S. cerevisiae*, Fks1 et Fks2 possèdent des fonctions essentielles redondantes. La perte de la fonction d'un des gènes *FKS1* ou *FKS2* n'est donc pas létale.

Les mutants *fks1*Δ ont une croissance plus lente. Leur paroi contient moins de β-glucanes mais plus de chitine et de mannoprotéines.

La délétion du gène *FKS2* n'est pas responsable de modification notable au niveau de la paroi.

Les doubles mutants *fks1*Δ*fks2*Δ ne sont pas viables.

La régulation de ces deux gènes est complexe :

- *FKS1* est le plus exprimé. Son expression est variable en fonction du cycle cellulaire, avec une accumulation périodique des ARNm pendant le cycle. En amont du gène *FKS1*, des éléments impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ont été identifiés, comme le MCB (Mlu I cell cycle box) ou le CCB (cell cycle box).
- *FKS2* est 10 fois moins exprimé que *FKS1* dans les conditions de croissance végétative. Lors de la reproduction sexuée, la synthèse de Fks2p est rapidement induite, avec des niveaux d'ARNm multipliés par 7 à 10 en 75 minutes [95, 122]. Dans le même temps, le taux ARNm de *FKS1* est divisé par 3. L'expression de *FKS2* est régulée par la carence en glucose, l'exposition aux phéromones et en présence de calcium (système calcium/calcineurine).

Fks2 et Fks3 sont fortement impliqués dans la formation des spores. Chez les mutants *fks2*Δ, des anomalies morphologiques sont observées en microscopie électronique et la composition des différentes couches de la paroi est modifiée. Cependant, l'expression de *FKS1* par le promoteur de *FKS2* permet de palier à ces défauts, suggérant un rôle important de la régulation du gène *FKS2* et une redondance partielle de fonction entre Fks1 et Fks2. Fks3, bien que de structure proche de Fks1 et Fks2, ne posséderait pas de fonction glucane synthétase, mais aurait un rôle de régulation [111].

Chez *Candida glabrata* [72, 98]

Bien que proche de *S. cerevisiae*, aucun Mating ou méiose n'a été observé chez *C. glabrata*. Les gènes *FKS1* et *FKS2* semblent redondants lors de la croissance de la levure. En effet, les délétants *fks1* ou *fks2* ne présentent aucune anomalie morphologique. Le gène *FKS2* est plus exprimé que chez *S. cerevisiae*, avec un ratio *FKS1*/*FKS2* se situant entre 0.49 et 0.67 [72]. Les doubles délétants *fks1*Δ*fks2*Δ ne sont pas viables. Le gène *FKS2* est régulé par le système Calcium/Calcineurine.

Chez *Candida albicans* [73, 130, 126]

Les gènes *FKS* de *C. albicans* peuvent être nommés différemment : *GSC1* pour *FKS1*, *GSL2* pour *FKS2* et *GSL1* pour *FKS3*. Mio et al., ont étudié la souche CAI4 de *C. albicans* dans laquelle le gène *GSC1* est dupliqué. Cette souche particulière comporte donc 3 copies du gène *FKS1* alors que *C. albicans* est diploïde. Ainsi, les souches délétées pour 1 ou 2 des allèles *GSC1* ne présentaient aucun défaut de croissance. Leur paroi contenait toutefois moins de β-glucanes. *GSC1* (*FKS1*) est essentiel chez *C. albicans*. C'est également le gène le plus exprimé, 3 fois plus que *FKS2* et 27 fois plus que *FKS3*. L'expression des gènes *FKS2* et *FKS3* est accrue chez les souches portant une mutation dans le gène *FKS1*, et ce d'autant plus que la mutation est homozygote.

Espèce du Complexe parapsilosis [71]

Un polymorphisme naturel au niveau du HS1 de Fks1 est présent chez *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, et *C. metapsilosis*. En position 600 de la protéine Fks1, la proline est remplacée par une alanine (A600P). Ce polymorphisme est situé sur le 9ème acide aminé du HS1. Cela confère à ces espèces des valeurs de

CMI intrinsèquement élevées par rapport aux autres *Candida spp* (x20 à 50 fois par rapport à *C. albicans* ou *C. glabrata*). L'étude enzymatique de la glucane synthase montre une diminution de son efficacité (V_{max} diminuée). L'expression du gène *FKS2* est plus élevée que celle de *FKS1* chez *C. parapsilosis*.

Figure 3.3 – Expression des gènes *FKS* chez différentes espèces de levures [71]

TABLE 4. Relative expression ratios between *FKS* genes

Organism	Strain	FKS1-HS1 sequence ^a	Expression ratio ^b	
			<i>FKS2</i> / <i>FKS1</i>	<i>FKS3</i> / <i>FKS1</i>
<i>C. parapsilosis</i>	22019	FLTL S LRDA	6.94	2.88
<i>C. parapsilosis</i>	H4	FLTL S LRDA	4.04	3.23
<i>C. albicans</i>	90028	FLTL S LRDP	0.21	0.03
<i>C. albicans</i>	36082	FLTL S LRDP	0.39	0.02
<i>C. albicans</i>	M122	FLTL S LRDH	0.28	0.04
<i>C. glabrata</i>	90030	FL L SLRDP	1.53	0.02
<i>C. glabrata</i>	T51916	FL L SLRDT	0.81	0.005

^a FKS2-HS1 sequences are shown for *C. glabrata* strains. Substituted amino acids are in bold.

^b Differences (*n*-fold) relative to *FKS1* levels.

3.1.2.4 Mutations *FKS*

La résistance aux échinocandines apparait sous traitement et résulte d'une altération dans le gène *FKS1*, ou *FKS2* pour *C. glabrata*. Il s'agit principalement de mutations, mais des délétions ainsi que l'apparition d'un codon stop ont également été décrites. Toutes les mutations ne sont pas équivalentes. Les mutations associées à la plus forte élévation des CMI impliquent 1er et le 5ème acide aminé du HS1 de *FKS1* ou *FKS2*, et se traduisent par une résistance croisée aux trois échinocandines. Ces mutations sont particulièrement décrites et étudiées chez *C. glabrata*.

Tableau 3.1 – Localisation et fréquence des altérations des protéines Fks1 et Fks2 chez *C. glabrata*, d'après [51]

HS1 Fks1p position 625-	F	L	V	L	S	R	D	P	I
HS1 Fks2p position 659-									
Fréquence	20%				62%		6%		

Les mutations faux-sens entraînent la substitution d'un acide aminé dans la région HS1 des protéines Fks1p et Fks2p chez *C. glabrata*, préférentiellement sur le 5ème et le 1er acide aminé.

Le complexe de la β -1,3-D-glucane synthétase est composé de deux isoenzymes Fksp. Dans la plupart des cas, lorsqu'une mutation se produit, seule une des protéines est concernée par la substitution de l'acide aminé. Chez ces simples mutants *fks*, l'étude de la cinétique de la glucane synthase ne montre pas de mélange d'enzyme, suggérant que les protéines Fksp forment un complexe multimérique fonctionnant comme une seule entité et qu'une mutation modifie le profil du complexe entier. Chez *C. albicans*, la résistance est d'autant plus élevée que les deux allèles sont touchés ou qu'il y a une perte d'hétérozygotie [130].

3.2 Détection et caractérisation des souches de sensibilité diminuée aux échinocandines

3.2.1 Détection des souches de sensibilité diminuée aux échinocandines par analyse phénotypique

En routine, une souche de sensibilité diminuée aux échinocandines est détectée par la mesure des CMI, qui seront supérieures aux seuils critiques d'interprétation clinique (BPs). Les nouveaux BPs adaptés à l'espèce, déterminés par les méthodes de référence de dilution en milieu liquide, permettent en général de classer les souches *fks*-muté en souches résistantes. En effet, la plupart des mutants ont des CMI plus élevées que les souches sauvages. Dans leur étude, limitée à 120 souches de *C. glabrata*, dont seulement 10 portaient une mutation dans les gènes *FKS*, Shields et al. [180] ont montré une excellente spécificité des BPs établis par le CLSI pour la micafungine et l'anidulafungine pour identifier les souches *fks*-muté (tableau 3.2). L'application de ces BPs à une collection de 566 isolats cliniques de *C. glabrata* dont 55 étaient porteurs d'une mutation *fks* [149] a confirmé ces résultats.

La sensibilité des BPs est cependant moins bonne, puisque certains mutants *fks* conservent des valeurs de CMI basses en échinocandines. Comme le montre la figure 3.4, dans l'étude de Pfaller et al., la courbe de distribution des CMI des 55 isolats mutés chevauche celle des souches *FKS* sauvage et 27% (15/55) d'entre-eux ont même une CMI en micafungine inférieure au BP défini ($\leq 0,06$ mg/L). La sensibilité des BPs peut-être augmentée en abaissant leur seuil d'une dilution. Les BPs définis peuvent être appliqués à la méthode Etest pour catégoriser les isolats.

Tableau 3.2 – Sensibilité et spécificité des différents seuils critiques d'interprétation clinique (BPs) en fonction des molécules pour l'identification des souches *fks*-muté

	Caspofungine			Micafungine			Anidulafungine			Réf
	Seuil	Se	Sp	Seuil	Se	Sp	Seuil	Se	Sp	
CMI méthode CLSI	0,5	70% (7/10)	93% (102/110)	> 0,06	60% (6/10)	94% (103/110)	>0,12	60% (6/10)	99% (109/110)	[180]
	0,5	52% (29/55)	99% (509/511)	> 0,06	72% (40/55)	98% (504/511)	N/A	NT	NT	D'après [149]
Etest	0,25	100% (10/10)	94% (103/101)	> 0,06	60% (6/10)	100% (110/110)	>0,12	70% (7/10)	100% (110/110)	[179]

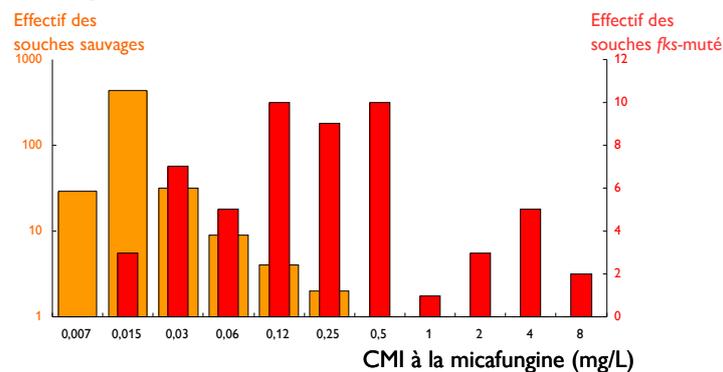
Se (sensibilité) = pourcentage d'isolats *fks*-muté avec des CMI supérieures aux BPs

Sp (Spécificité) = pourcentage d'isolats *fks*-muté avec des CMI inférieures aux BPs

La valeur de la CMI permet également d'évaluer le risque d'échec thérapeutique. Ainsi, Shields et al. [180] ont montré qu'une CMI en caspofungine par méthode Etest > 0.25 mg/L avait une valeur prédictive d'échec thérapeutique de 79%. Des études expérimentales chez les animaux ont montré qu'une CMI en anidulafungine supérieure à 1 mg/L (CLSI) était un facteur de risque de mauvaise réponse au traitement [64].

Figure 3.4 – Distribution des CMI_s CLSI à la micafungine d'isolats cliniques de *C. glabrata* isolés dans le Monde

L'histogramme représente la distribution des CMI_s en micafungine des 566 souches de *C. glabrata* étudiée par Pfaller et al. [149]. Les souches *FKS*-sauvage sont représentées en rouge clair et les 55 souches *fks*-muté en rouge foncé. Les distributions des CMI_s des souches sauvages et mutées se chevauchent, et l'on observe des isolats *fks*-muté classifiés sensible à la micafungine (CMI_{MIC} ≤ 0,06 mg/L)



L'implication dans la résistance aux échinocandines des mutations dans les gènes *FKS* a été démontrée par la mesure de l'activité enzymatique de la glucane synthétase (GS). L'enzyme est extraite à partir de la membrane plasmique de souches sauvages ou résistantes aux échinocandines. Les paramètres cinétiques sont déterminés en présence d'uridine 5-diphosphoglucose radioactif ($[^3\text{H}]$ -UDPG) et de GTP- γ -S [72, 138] : vitesse maximale (V_m), constante d'affinité de Michaelis (K_m), nature de l'interaction entre la GS et les échinocandines et constante d'inhibition. Les échinocandines inhibent de manière non compétitive la GS. La présence d'une mutation dans la région HS entraîne une diminution de la V_m , plus ou moins importante en fonction des mutants, sans modification de la constante d'affinité. Ce résultat confirme que le site de fixation des échinocandines sur la GS est différent du site de fixation du substrat (UDPG). Cette technique permet d'évaluer *in-vitro* l'activité d'enzymes mutées, mais est complexe à mettre en place et nécessite des locaux spécialement conçus pour la manipulation de molécules radioactives.

3.2.2 Détection des mutants *fks* par étude génotypique

Il a été démontré en analyse multivariée que la présence d'une mutation dans le gène *FKS* est un facteur de risque indépendant d'échec thérapeutique [178]. Shields et al. ont étudié rétrospectivement chez 39 patients atteints de CI due à *C. glabrata*, dont 7 étaient infectés par une souche mutée, la réponse au traitement par une échinocandine. Les mutations concernaient le gène *FKS1* (D632H et D632Y) ou *FKS2* (F659del, F659L). 86% (6/7) des patients infectés par un mutant *fks* étaient en échec thérapeutique, un seul ayant eu une évolution favorable. Dans cette étude, le génotype *FKS* s'est avéré un meilleur indicateur d'échec thérapeutique que la CMI seule. Cela suggère l'intérêt de pouvoir détecter en routine les mutations dans les gènes *FKS* chez *C. glabrata* et les autres espèces de *Candida*.

3.2.2.1 Le séquençage nucléotidique

Le séquençage permet de détecter et de caractériser les mutations dans les gènes *FKS1* et/ou *FKS2*. Chez *C. glabrata*, les gènes *FKS1* et *FKS2* mesurent respectivement 7 332 et 7 941 paires de bases (pb). Le séquençage complet de ces gènes par la méthode de Sanger doit donc être réalisé à l'aide de plusieurs amorces, la taille des séquences compatible avec le séquençage étant de 500 à 800 pb. Saraya et al. [170] ont dû réaliser 13 réactions de séquences à l'aide de 13 amorces distantes de 500 pb pour séquencer chacun des gènes *FKS1* et *FKS2* dans leur intégralité. La séquence entière a été analysée après

la mise bout à bout des différents fragments qui se chevauchent. En raison de la complexité du séquençage complet, le séquençage des gènes *FKS* se limite le plus souvent aux régions HS. De nouvelles techniques de séquençage haut débit (NGS) se sont développées ces dernières années. Leur principal avantage réside dans leur capacité à fournir de grandes quantités de séquences ou de travailler sur un grand nombre d'échantillons en parallèle [75]. Cependant, la taille des séquences analysées n'excède pas quelques centaines de paires de bases, le NGS se limite également aux régions HS pour les gènes *FKS*.

3.2.2.2 L'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Connaissant la séquence nucléotidique à amplifier, il est possible de dessiner des amorces oligonucléotidiques spécifiques, qui ne s'hybrident qu'à l'ADN matrice extrait de la souche mutée à étudier et non à celui d'une souche sauvage. Dudiuk et al. [51] ont ainsi développé une technique de PCR en point final pour détecter chez *C. glabrata* dix mutations localisées dans le HS1 (F625S, S629P, D632G/E/Y dans la protéine Fks1, F659S/V/L et S663P/F dans la protéine Fks2). Cette technique, peu coûteuse, permet chez les isolats cliniques de *C. glabrata* de dépister plus de 87,7% des mutations décrites dans la littérature. Elle ne permet cependant pas d'identifier des mutations localisées dans d'autres régions des gènes *FKS*, ni de détecter des délétions comme la F659 Δ dans Fks2p. Selon une approche similaire, Balashov et al. [10] ont recherché chez *C. albicans* des mutations par PCR en temps réel. Pham et al. [153] ont décrit une stratégie de détection rapide des mutations en utilisant la technologie Luminex MagPix. Dans notre travail, nous avons utilisé cette technique afin de détecter des souches de *C. lusitaniae* ayant intégré l'allèle *fks1* muté

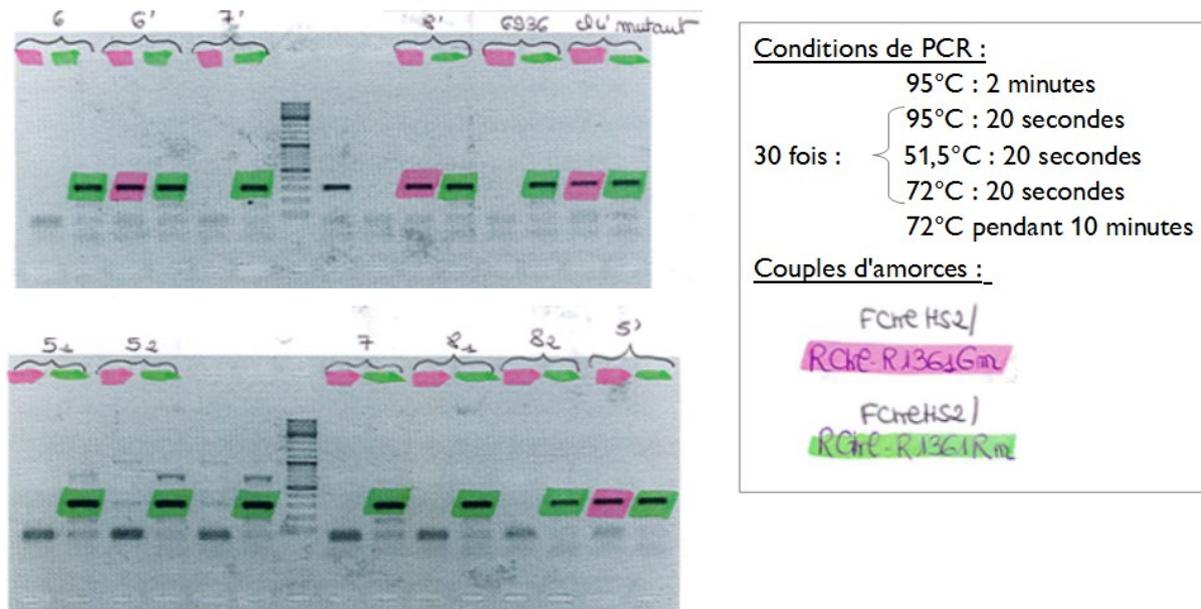
Tableau 3.3 – Exemple de PCR pour la recherche de mutations ponctuelles

Deux amorces ont été synthétisées dans le but de détecter la substitution de la cytosine en guanine (gras). La spécificité de l'amorce est améliorée en utilisant des amorces de petite taille, dont la dernière base est spécifique soit de l'allèle muté (RCtrl-R1361Gm), soit de l'allèle sauvage (RCtrl-R1361R) et en introduisant un non-appariement sur la 3ème base en 3' de l'amorce (souligné) [89, 113]

	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	
Hot-Spot 2 <i>FKS1</i>	W	I	R	R	Y	T	L	S	I	
A : 5'-GCT GTG GAT RCtrl-R1361Rm	TGG	ATT	AGA	CGT	TAC	ACA	TTG	TCT	ATT	TTC ATT GTT -3'
			3'-	GCC	ATG	TGT	AAC	AGA	TA	
B : 5'-GCT GTG GAT RCtrl-R1361Gm	TGG	ATT	AGA	GGT	TAC	ACA	TTG	TCT	ATT	TTC ATT GTT -3'
			3'-	CCC	ATG	TGT	AAC	AGA	TA	

Figure 3.5 – PCR en point final pour la détection des mutants R1361G

Dans les conditions de PCR décrites, l'amorce RCtrl-R1361G (rose) ne s'hybride qu'à l'ADN des souches mutées. Ainsi, on n'observe aucune amplification avec les amorces FCtrlHS2/RCtrl-R1361G pour la souche sauvage (6936) et l'amplification d'un fragment de 300 pb attendu pour les mutants R1361G (cl 4' mutant). Cette technique permet de dépister rapidement les souches ayant acquis la mutation ponctuelle recherchée.



3.3 Epidémiologie de la résistance aux échinocandines

3.3.1 Incidence des mutations *fks* et sensibilité aux antifongiques

La résistance aux échinocandines demeure assez rare et implique plus fréquemment *C. glabrata*. Les données du réseau mondial de surveillance de la sensibilité aux antifongiques (SENTRY) sont rapportées dans le tableau 3.4. En 2013, sur les 1514 souches de *Candida spp* responsables de CI testées, 4,4% des *C. glabrata* et 2,8% des *C. tropicalis* étaient résistants aux échinocandines. Le séquençage des régions HS a mis en évidence 5 mutants *fks* (3 *C. glabrata* mutés dans le HS1 du gène *FKS2* et 2 *C. tropicalis* dans le HS1 du gène *FKS1*) [30]. Les données du réseau montrent que depuis 2008 des mutants *fks* de *C. glabrata* sont isolés chaque année, contrairement aux autres espèces de *Candida spp*, et qu'il n'y a pas de tendance à l'augmentation de la résistance aux échinocandines dans le Monde.

Tableau 3.4 – Epidémiologie de la résistance aux échinocandines pour les différentes espèces de *Candida* dans le Monde (programme SENTRY)

	2008-2009 [151]*			2010-2011 [150]§			2012 [29]¥			2013 [30]		
	ANI	CAS	MIC	ANI	CAS	MIC	ANI	CAS	MIC	ANI	CAS	MIC
<i>C. alb</i>	0 %/0.25 %	0 %/0.5 %	0 %/0.25 %	0 %	0.2 %	0.1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
<i>C. gla</i>	1.1 %/ 3.8 %	2.2 %/5.1 %	0 %/3.2 %	1.8 %	1.6 %	1.2 %	1.5 %	1.5 %	1.1 %	2.4 %	2 %	0.8 %
<i>C. par</i>	0 %/0 %	0 %/0 %	0 %/0 %	0.5 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
<i>C. tro</i>	0 %/0 %	0 %/0 %	0 %/0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1.7 %	0.6 %	0.6 %
<i>C. kru</i>	0 %/0 %	0 %/8.7 %	0 %/0 %	0 %	0 %	0 %	2.8 %	2.8 %	0 %	0 %	0 %	0 %

* 1354 souches, communautaires et nosocomiales. 12 isolats de *C. glabrata* ont été séquencés, 6 présentent une mutation *FKS*

§ 3110 souches, 13 mutants *fks* (10 *C. glabrata*, 3 *C. albicans*)

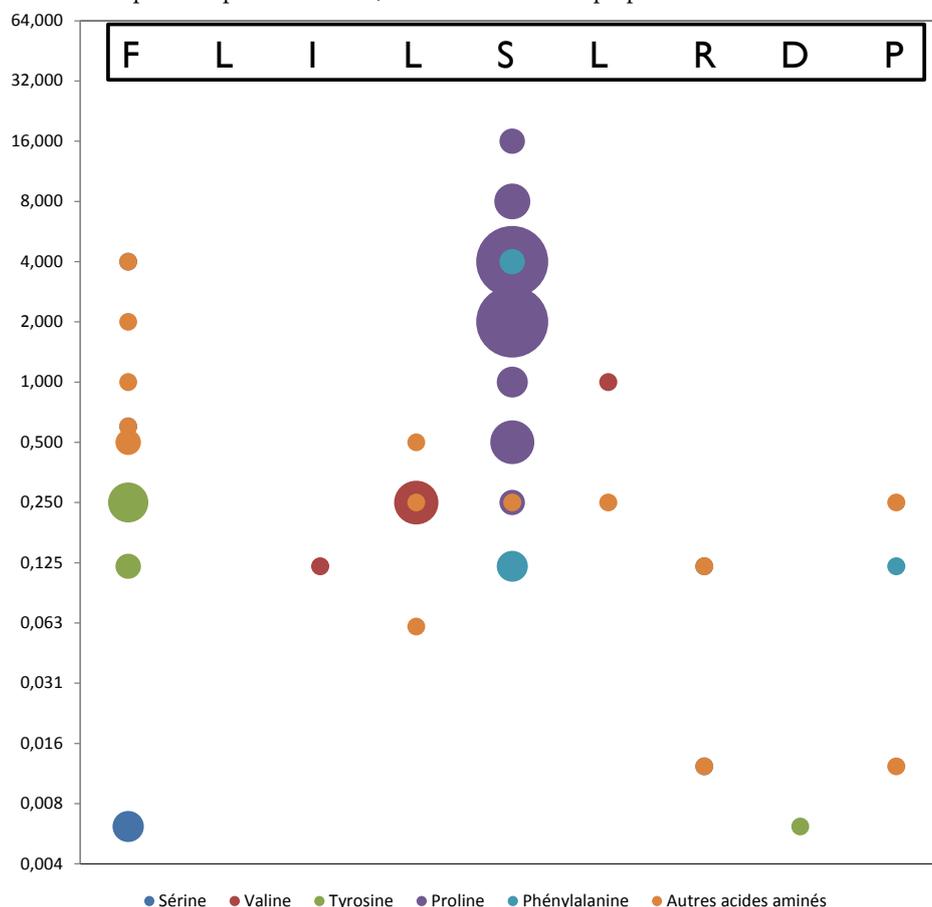
¥ 1487 souches, 8 mutants *fks* (5 *C. glabrata*, 1 *C. dubliniensis*, 1 *C. kefyr*, 1 *C. krusei*)

Des études européennes rapportent également une prévalence relativement faible de résistance aux échinocandines, pour *C. glabrata*, 3,4% en Espagne (2010-2011) [164], 1,6% en Allemagne et en Autriche

(2008-2012) [101], 3,9% en France [21]. Aux Etats-Unis, les données sont plus alarmantes. Alexander et al. [1] ont montré que la résistance des isolats cliniques de *C. glabrata* avait augmenté de 4,9% en 2001 à 12,3% en 2010 à l'hôpital de Duke. Vallabhaneni et al. [193] rapportent une résistance de 4,2% en 2008 et de 7,8% en 2014. La plus forte proportion d'isolats cliniques résistants était retrouvée en Géorgie avec une augmentation de 3,4% à 14,5% entre 2008 et 2014. Les données épidémiologiques de la résistance aux échinocandines publiées reposent sur la détermination des CMI. Or, il apparaît que pour les mutants *fks*, les CMI sont très variables. En effet, les CMI en micafungine pour des isolats de *C. glabrata* porteurs de la même mutation S629P dans le HS1 de *FKS2* peuvent varier de 0,125 mg/L à 4 mg/L [154]. Le graphique 3.6 illustre cette importante hétérogénéité à travers la courbe de distribution des CMI en micafungine de 97 *C. glabrata* mutés dans le HS1 de *FKS2*. Cela suggère l'existence d'autres mutations situées en dehors des régions étudiées (HS des gènes *FKS*) ou d'autres mécanismes de résistance associés.

Figure 3.6 – Distribution des CMI en micafungine de 97 isolats de *C. glabrata* mutés dans le HS1 de *FKS2*

Les CMI en micafungine des mutants *fks2* de *C. glabrata* décrits dans la littérature [31, 149, 51, 177, 146, 44, 152, 1] sont représentés sur le graphique. Chaque colonne représente une position sur le HS1, dont la séquence est affichée en haut. Chaque acide-aminé est représenté par une couleur, la taille du cercle est proportionnelle au nombre de souches décrites.



La mesure systématique des CMI en échinocandines pour les isolats de *Candida spp* responsables d'infection invasive est essentielle pour mettre en œuvre un traitement adapté et surveiller l'émergence des résistances. Cependant elle semble insuffisante et le raccourci "mutant-*fks* = résistance" doit être argumenté par l'étude du rôle des différentes mutations dans la résistance.

3.3.2 Démonstration de l'implication des mutations *fks* dans la résistance aux échinocandines

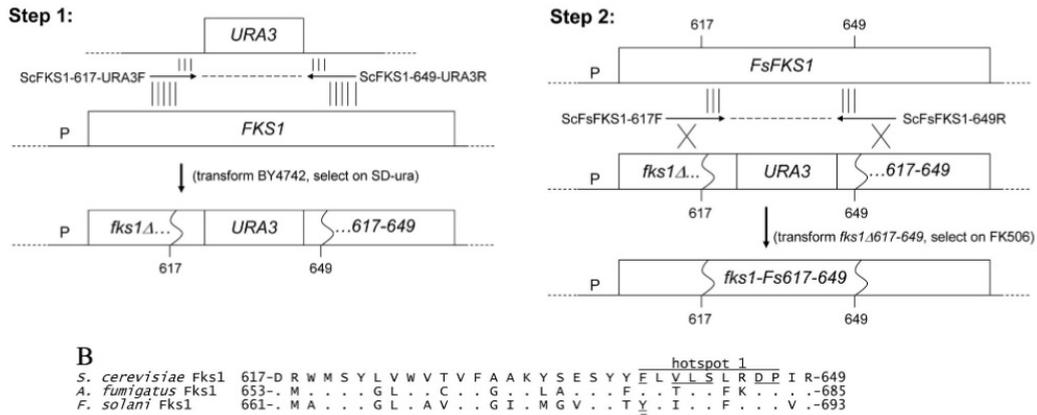
La difficulté est de faire la distinction entre des mutations qui contribuent seulement à la variabilité génétique de l'allèle, et des mutations qui sont directement responsables de la résistance. Dans la grande majorité des cas, le rôle d'une mutation dans la résistance n'est que supposé, du fait que la mutation est présente dans une ou des souches résistantes, et absente dans des souches sensibles. Or la démonstration de l'impact réel des mutations *fks* dans la résistance aux échinocandines ne peut se faire que par du remplacement d'allèle dans une levure modèle. La technique la plus utilisée est la recombinaison homologue qui implique l'appariement et l'échange de matériel génétique entre deux molécules d'ADN homologues. Chez *S. cerevisiae*, une analogie de séquence d'une vingtaine de paires de base est suffisante pour le remplacement d'allèle au locus souhaité. Cette aptitude est très utilisée en biologie synthétique.

Des études de mutagenèse dirigée utilisant *S. cerevisiae* comme modèle d'expression ont été réalisées pour démontrer l'implication d'une mutation *fks* dans la résistance aux échinocandines. Il s'agit de modifier une ou plusieurs bases sur une séquence d'ADN afin de changer la traduction en acide aminé. La séquence d'ADN est ensuite transformée chez la levure, qui après recombinaison homologue exprimera la protéine modifiée. Garcia-Effron et al. [71] ont ainsi démontré le rôle de la proline en position 660 dans la sensibilité diminuée aux échinocandines de *C. parapsilosis*. Les auteurs ont introduit en position 647 chez *S. cerevisiae* une proline en lieu et place d'une alanine et ont montré une augmentation des CMI et des concentrations d'inhibition de la glucane synthétase purifiée chez la souche de *S. cerevisiae* P649A (tableau 2.5). La même technique a été utilisée pour caractériser le polymorphisme génétique de *Fusarium solani* qui possède une tyrosine comme premier acide aminé du HS (au lieu d'une phénylalanine). La souche de *S. cerevisiae* F639Y mutée présentait des CMI en caspofungine 16 fois plus élevée que la souche initiale.

Tableau 3.5 – Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentration d'inhibition (CI 50%) de la glucane synthétase des souches étudiées, d'après [71, 99]

Organisme	Souche	Séquence HS1 <i>FKS1</i> ou génotype	CMI (µg/mL)			CI ₅₀ (ng/mL)		
			ANF	CSF	MCF	ANF	CSF	MCF
<i>C. parapsilosis</i>	22019	FLTLSLRDA	1,10	1,40	1,60	442	21	245
<i>S. cerevisiae</i>	BY4742	FLTLSLRDP	0,03	0,03	0,03	107	65	159
<i>S. cerevisiae</i>	BY4247-P649A	FLTLSLRDA	0,5	0,5	0,5	1663	1328	5199
<i>S. cerevisiae</i>	BY4742-FKS1Δ	<i>fks1D453-649</i> : : <i>URA3</i>	0,015	0,02	0,015	ND	ND	ND
<i>S. cerevisiae</i>	BY4247-F639Y	YTLTLRDA	ND	0,5	0,5	ND	ND	ND
<i>S. cerevisiae</i>		<i>fks1-Fs617-649</i>	ND	0,25	0,25	ND	ND	ND

Selon la même méthode, cette équipe a remplacé 96 pb du gène *FKS1* de *S. cerevisiae* comprenant le HS 1 et la région en amont, par la séquence correspondante de *F. solani* (figure 3.7). La protéine Fks1 synthétisée par *S. cerevisiae* était une protéine chimérique composée du HS1 de *F. solani* et des 22 acides aminés en amont, au sein de la protéine Fks1 de *S. cerevisiae*. Il en résulte que la structure tridimensionnelle de la protéine synthétisée peut être affectée et sa fonctionnalité modifiée. En effet, un remplacement plus large de la région HS1 de *S. cerevisiae* par les acides aminés 453 à 649 de *F. solani* a conduit à la synthèse d'une protéine Fks hybride qui présentait une perte de l'activité glucane synthétase.

Figure 3.7 – Stratégie de remplacement d’une partie du gène *FKS1* de *S. cerevisiae* (A) par la séquence 617-649 de *F. solani* (B) [99]

3.4 Modifications compensatrices chez les mutants *fks* et coût énergétique

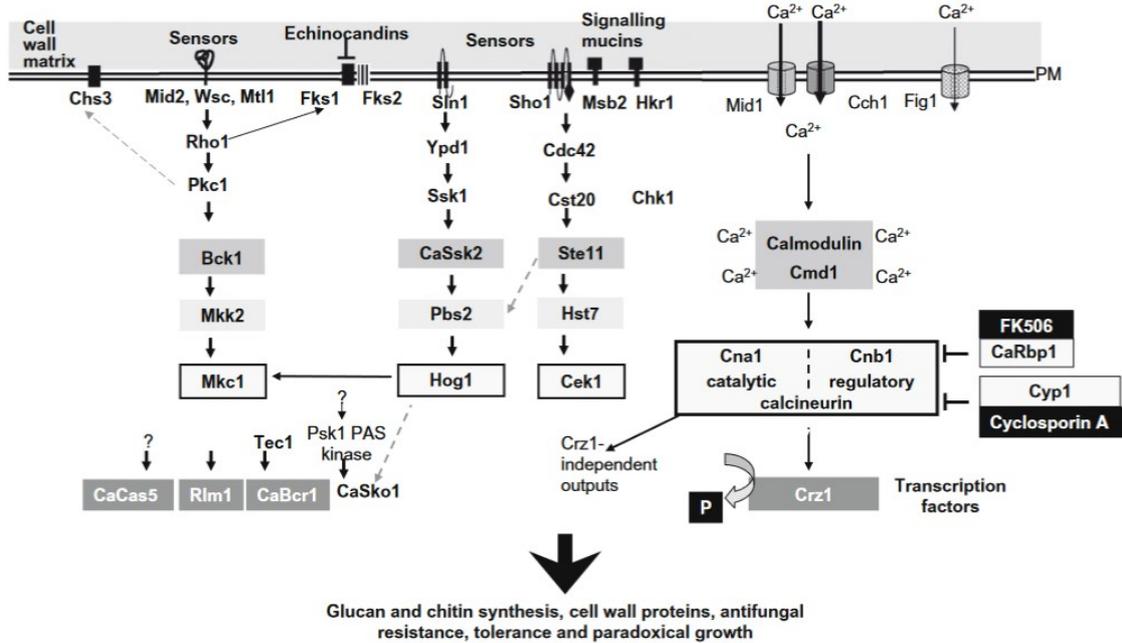
3.4.1 Autres mécanismes de résistance

3.4.1.1 Réponse adaptative au stress

La paroi fongique est une structure dynamique dont la composition et l’organisation sont régulées par le cycle cellulaire et en réponse à des changements environnementaux (conditions de stress, perturbation de la synthèse de la paroi). La chitine et les glucanes sont indispensables au maintien de l’intégrité cellulaire. Plusieurs voies de régulation sont mises en jeu lors d’un stress cellulaire : la voie de la protéine kinase C (PKC), du Ca²⁺/calcineurine, de la protéine chaperonne HSP90 et de la kinase HOG (high osmolarity glycerol), ainsi que l’augmentation de la synthèse en chitine.

L’augmentation de la teneur en chitine dans la paroi se traduit chez *C. albicans* par une diminution de sa sensibilité aux échinocandines *in vitro* et *in vivo* [107]. Une culture *in vitro* dans du milieu YPD additionné de 16 µg/mL de caspofungine et de Calcofluor White, a permis à Walker et al. [198] d’isoler deux populations de *C. albicans* : une population sensible aux échinocandines et l’autre résistante. Chez la population résistante, la paroi des levures contenait une quantité plus importante de chitine. Après 24 h de culture en l’absence d’échinocandine, la teneur en chitine de la paroi avait retrouvé son niveau de base (perte en 3 à 4 générations). Plusieurs voies de régulation sont impliquées (voies de la PKC, de HOG et de la calcineurine), ce qui se traduit par une augmentation de l’activité des chitine-synthétases de classe I (Chs2p and Chs8p). L’utilisation d’un inhibiteur sélectif des chitine synthétases de classe I, la nikkomycine Z, rend les levures hypersensibles à la caspofungine, ce qui confirme le rôle des chitine synthétases dans leur capacité d’adaptation à l’action des échinocandines sur leur paroi [198].

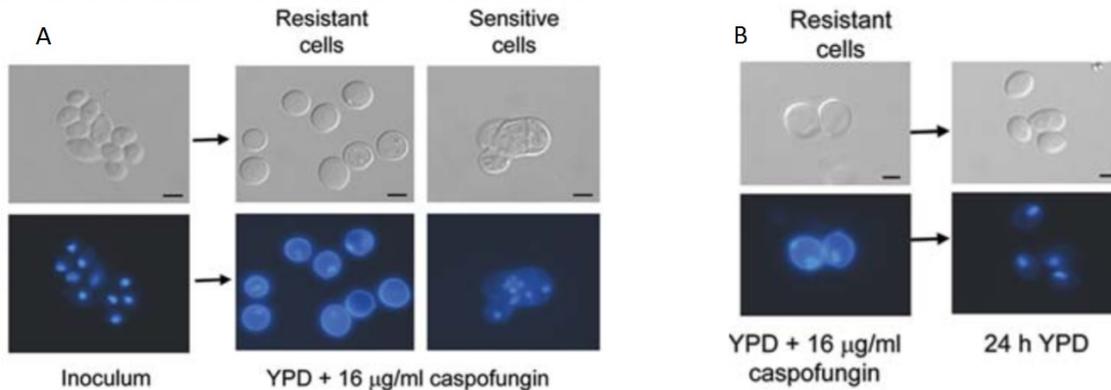
Figure 3.8 – Voies de signalisation impliquées dans l'organisation de la paroi de *C. albicans*



Les voies de signalisation de HOG1, CEK1, de la PKC/MAP kinase et du Ca²⁺/Calcineurine sont impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires, incluant la synthèse de la paroi fongique et le maintien de son intégrité. Plusieurs protéines cellulaires (Wsc, Mid2, Mtl1, Sho1 et Sln1) détectent les altérations de la paroi et participent à l'activation de la voie des MAP kinases. La voie de la protéine kinase C est activée par la protéine Rho1 qui est également la sous-unité régulatrice de la β-1,3-D-glucane synthétase. Cette voie est activée par l'influx de calcium qui pénètre dans les cellules via les canaux Cch1 et Mid1. Le calcium se lie à la calmoduline (Cmd1) et l'active. La calmoduline active à son tour la calcineurine (Cna) qui va déphosphoryler le facteur de transcription Crz1 qui va migrer dans le noyau et activer l'expression de différents gènes [197, 111].

Figure 3.9 – Adaptation des levures à l'action exercée par les échinocandines sur la paroi par augmentation de la synthèse de chitine [198]

(A) : Chez les levures résistantes la teneur en chitine pariétale est augmentée. (B) : En l'absence de caspofungine, la teneur en chitine revient à son niveau basal en 24 h.



La voie du Ca²⁺/calcineurine joue un rôle important dans la tolérance aux antifongiques (échinocandines mais également azolés). En effet, les mutants pour la sous-unité B régulatrice de la calcineurine (*cnb1*) présentent une sensibilité accrue aux antifongiques. Le facteur de transcription Crz1 est activé par la calcineurine par déphosphorylation. Les mutants *crz1* de *C. glabrata* sont plus sensibles aux 3 échinocandines, alors que ceux de *C. albicans*, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* ne le sont qu'à la micafungine. Les mutants *crz1* de *C. lusitaniae* présentent, eux, la même sensibilité que les souches sauvages aux 3 échinocandines [202]. Yu et al. [202] suggèrent donc l'existence de mécanismes d'action différents en

fonction des échinocandines, et de l'espèce fongique. Ils ne sont pas caractérisés à l'heure actuelle.

La réponse au stress oxydatif est régulée par une protéine majeure, Cap1 (Candida activator protein 1), qui est un facteur de transcription. En présence d'eau oxygénée dans l'environnement, Cap1 est transloquée du cytoplasme vers le noyau et va réguler la transcription de gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif. L'exposition à 0,5 mM de peroxyde d'hydrogène pendant 60 minutes entraîne une diminution de la sensibilité à la caspofungine [100]. Cette réponse au stress oxydatif est également observée en présence de caspofungine,

3.4.1.2 Effet paradoxal (EP)

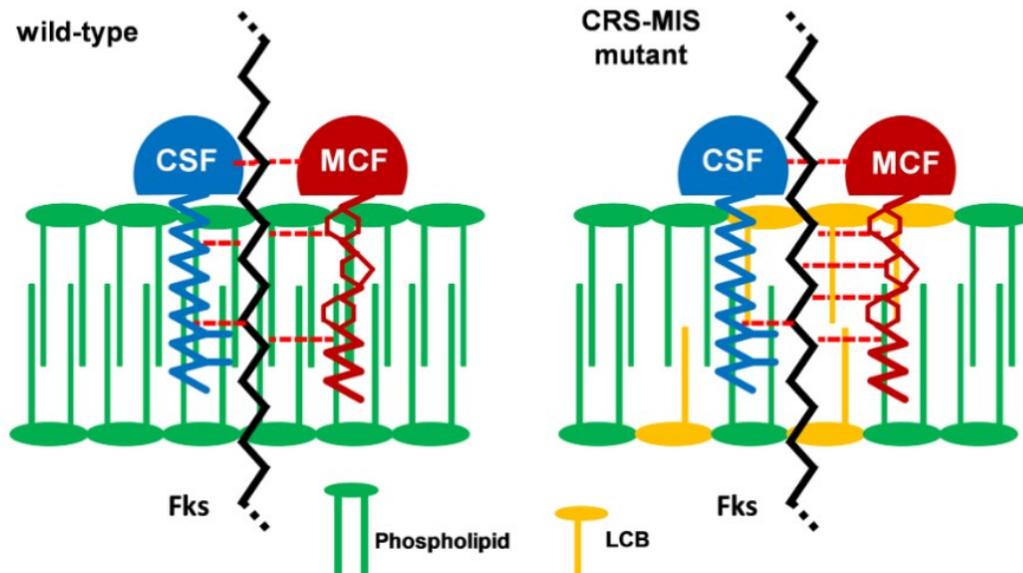
L'EP correspond à la croissance d'une levure en présence de concentrations en échinocandine supérieures à la CMI alors que la croissance est inhibée en présence de faibles concentrations. Ce phénomène a été décrit pour de nombreuses espèces de *Candida*, mais qu'exceptionnellement pour *C. glabrata* [174]. Il varie selon la molécule et l'espèce fongique. Chamilos et al. [34] ont observé cet EP pour respectivement 90%, 60%, 40% et 10% des souches de *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. krusei* après une culture en milieu liquide en présence de caspofungine. L'étude de la composition de la paroi des levures qui présentent une croissance paradoxale montre une diminution de la teneur en β -1,3-glucane et une augmentation de la teneur en chitine (x4 à 6,6) [18]. L'EP est décrit plus fréquemment chez les levures qui ont adhéré à un support et synthétisé un biofilm que chez des levures en culture planctonique [123].

L'impact clinique et thérapeutique de l'EP ne semble pas majeur. Il est atténué en présence de sérum et inhibé par une courte exposition à 8 mg/L de caspofungine (concentration correspondant au pic plasmatique de la caspofungine) [176, 174]. L'EP est également inhibé par des inhibiteurs de la voie de la calcineurine et par la nikkomycine Z (inhibiteur de chitine synthétase).

3.4.1.3 Sphingolipides

Healey et al. [85] ont décrit des souches de *C. glabrata* de sensibilité diminuée à la caspofungine (CMI entre 0,12 et 0,5 mg/L) et hypersensibles à la micafungine (CMI entre 0,00025 et 0,004 mg/L). Ces souches présentaient une altération de la synthèse des sphingolipides se traduisant par une accumulation de métabolites intermédiaires (intermédiaires LCB). La structure de la caspofungine et de la micafungine diffère par leur chaîne lipidique. La différence de sensibilité pour les 2 molécules de ces souches pourrait s'expliquer par une modification de l'interaction entre les sphingolipides, les échinocandines et les protéines Fks. En présence d'une augmentation des intermédiaires LCB, l'interaction entre la micafungine et les régions HS de Fks serait renforcée [86]. Ce mécanisme de résistance reste très exceptionnel.

Figure 3.10 – Illustration du mécanisme potentiel par lequel une accumulation de LCB est responsable d'une résistance à la caspofungine et une sensibilité accrue à la micafungine.



3.4.1.4 Multi-résistance

Une étude épidémiologique portant sur 1669 isolats de *C. glabrata* responsables de candidémies entre 2006-2010 dans le monde et aux Etats-Unis a montré que 9,7% des isolats étaient résistants aux antifongiques azolés et que 13% de ces isolats étaient également résistants aux échinocandines [142]. A l'hôpital de Duke aux Etats-Unis, entre 2001 et 2010, la résistance aux azolés de 313 souches de *C. glabrata* isolées de candidémies a augmenté de 18 à 30%. Sur les 78 isolats résistants au fluconazole, 14,1 % étaient également résistants à une ou plusieurs échinocandines et 7,9% d'entre-eux étaient porteurs d'une mutation *fks* [1]. Les échinocandines et les azolés ne présentent ni les mêmes cibles, ni les mêmes mécanismes de résistance. Une étude très récente a montré que la multi-résistance peut s'expliquer par des mutations dans des gènes de réparation de l'ADN de la famille des MMR (mismatch repair) et DSBR (double-strand break repair). Healey et al. [87] ont étudié 357 souches de *C. glabrata* dont 23,2% étaient résistantes au fluconazole, 4,2% aux échinocandines et 9,5% multirésistantes. 65% des souches résistantes au fluconazole et 62% des souches multi-résistantes présentaient une mutation dans le gène *MSH2* qui code pour une protéine de réparation de l'ADN de type MMR. Les mutations *msh2* conduisent à une instabilité génétique avec un risque d'acquérir plus rapidement une résistance aux antifongiques [87].

3.4.1.5 Perspectives thérapeutiques

Les voies de sauvetage mises en place en réponse à l'action des échinocandines sont des cibles thérapeutiques possibles.

Les inhibiteurs de la calcineurine ou de la protéine chaperonne Hsp90 présentent des effets immunosuppresseurs trop importants pour pouvoir être utilisés en thérapeutique [181].

La recherche d'inhibiteurs des chitine synthétases intéresse des dérivés de la polyoxine D, de la nikkomycine Z, de l'uridine, de la coumadine ou d'autres molécules extraites de plantes [117]. Chez *C. albicans*, un dérivé de l'uridine a montré une activité antifongique *in vitro* (CMI de 1 mg/L) et un effet synergique en association avec la caspofungine (FIC index de 0,28) [102]. Hormis pour la nikkomycine Z, le développement de ces inhibiteurs n'a cependant pas atteint l'étape des tests *in vivo*.

La dernière voie pouvant être modulée est le métabolisme des sphingolipides. Chez *C. albicans* l'ex-

pression du gène *FEN12* est diminuée de 40% lors d'un traitement par la caspofungine, ce qui entraîne une augmentation des intermédiaires LCB. Cette modification du métabolisme des sphingolipides par la caspofungine pourrait augmenter l'activité de la micafungine [84, 114]. Healey et al. [84] suggèrent qu'un traitement séquentiel par la caspofungine suivi de la micafungine pourrait améliorer la réponse aux échinocandines.

3.4.2 Coût énergétique

Il existe une relation étroite entre la composition de la paroi fongique et la reconnaissance par le système immunitaire. La modification de la teneur en glucanes et en chitine de la paroi chez des mutants *FKS* ou lors du traitement par les échinocandines va entraîner des modifications de la reconnaissance des *Candida spp* par les cellules du système immunitaire. Ben-ami et al. [14] ont étudié la virulence de souches de *C. albicans fks*-muté. Ils ont montré que les mutants S645P et S645F présentent une augmentation du taux de chitine pariétale, une altération de la croissance et un défaut de filamentation. L'altération de la fonction de l'enzyme Fks1 entraîne la mise en place des mécanismes compensatoires via les voies précédemment décrites dans le paragraphe 2.2.1, à l'origine de l'augmentation de la teneur en chitine de la paroi. La virulence des souches a été étudiée dans un modèle murin de candidose disséminée. Chez les souris infectées par un souche muté, l'examen anatomopathologique des reins montre une charge fongique plus faible et l'absence de formes filamenteuses. Lors d'une co-infection par une souche mutée et une souche sauvage, seule la souche sauvage est retrouvée dans les reins après 4 jours d'infection, confirmant le défaut de virulence des souches mutées [14]. Récemment, Imbert et al. [93] ont rapporté chez un patient infecté par un isolat de *C. glabrata* muté dans le gène *FKS2* (S663P-Fks2p) la perte de la mutation de résistance après l'arrêt du traitement antifongique. Ces études corroborent l'existence d'un coût énergétique pour les souches présentant un allèle *fks* muté, pouvant expliquer leur virulence plus faible.

Conception et construction de la
souche de *Candida lusitaniae*
génétiquement modifiée pour l'étude
des mutations de résistance aux
échinocandines identifiées chez des
isolats cliniques

Le mécanisme principal de résistance aux échinocandines est l'altération de l'enzyme cible par l'acquisition de mutations ponctuelles dans les gènes *FKS1* et *FKS2*. Ces mutations sont responsables d'une diminution de l'affinité de liaison de l'antifongique à la protéine Fks. Une grande majorité de ces mutations intervient dans les régions « Hot-Spot » de la protéine. Les mutants présentent une élévation des concentrations minimales inhibitrices, généralement à l'ensemble des échinocandines, ainsi qu'une diminution de l'activité enzymatique de la β -(1-3)-D-glucane synthétase. La présence de ces mutations est un facteur de risque d'échec thérapeutique.

La caractérisation de ces souches de levures résistantes aux échinocandines repose sur des études phénotypiques et génotypiques. L'étude phénotypique passe par la mesure des concentrations minimales inhibitrices aux échinocandines et par la mesure de l'activité enzymatique. L'analyse génotypique repose sur le séquençage nucléotidique complet du gène *FKS1* (et *FKS2* chez *Candida glabrata*), suivi d'une comparaison des séquences nucléotidiques. Les gènes étudiés peuvent également être exprimés dans une levure modèle par expression hétérologue. Du fait de la grande taille du gène *FKS*, la majorité des études génotypiques se limitent aux régions HS et non pas à la totalité du gène *FKS*.

Saccharomyces cerevisiae est la levure la plus souvent utilisée pour les expériences d'expression hétérologue ou de mutagenèse dirigée car c'est une levure haploïde et qui est très facilement manipulable sur les plans génétique et moléculaire. Une homologie d'une vingtaine de bases entre la cassette à intégrer et la région d'intérêt est suffisante pour une intégration au locus désiré chez plus de 50% des transformants [119]. Toutefois, cette espèce ne présente pas que des avantages. Elle n'utilise pas tout à fait le même code génétique que le clade des levures *Candida* qui décodent le codon CUG en sérine, alors que *S. cerevisiae* le décode en leucine. Par ailleurs, la régulation des gènes *FKS* est différente chez *S. cerevisiae*, puisque la délétion du gène *FKS1* n'est pas létale, le gène *FKS2* présentant une redondance partielle de fonction avec *FKS1*. De plus, certains systèmes de transformation génétique employés reposent sur des plasmides épisomiques à répllication autonome qui vont apporter plusieurs copies d'un même gène à la cellule. *Saccharomyces cerevisiae* n'est donc pas le modèle optimal pour l'étude des mutations de résistances aux échinocandines chez les levures du genre *Candida*.

Candida albicans a rarement été utilisé pour effectuer du remplacement d'allèle, car c'est une espèce diploïde qui requiert un double remplacement d'allèle [186].

Candida guilliermondii est une levure haploïde qui réalise une reproduction sexuée et pour laquelle des outils de transformation par recombinaison homologue sont disponibles [66]. Cependant, les CMI en échinocandines des souches de cette espèce sont assez élevées : plus de 60% des isolats testés ont

une CMI en caspofungine supérieure à 0,25 mg/L [148].

Candida lusitaniae est une levure opportuniste, haploïde, qui possède un cycle de reproduction sexuée, dont le génome de 12 Mb est entièrement séquencé. Des systèmes de transformation intégrative par recombinaison homologue ont été développés pour permettre le remplacement ou l'inactivation d'allèles ciblés [54, 68]. Cette levure appartient au clade CTG des *Candida*, et constitue donc un modèle de choix pour l'expression homologue ou hétérologue d'allèles *FKS* mutés.

L'objectif de ce travail était de construire une souche de *Candida lusitaniae* génétiquement modifiée afin de lui faire exprimer des gènes *FKS* entiers porteurs de mutations de résistance identifiées chez des isolats cliniques résistants.

5.1 Matériel biologique et conditions de culture

5.1.1 Souches de *Candida lusitaniae* utilisées et conditions de culture

L'ensemble des souches de *C. lusitaniae* utilisées et construites dans ce travail est présenté dans le tableau 5.1. La souche de référence utilisée était la souche CBS 6936 (ATCC 38533), dont le génome est connu suite au séquençage haut débit NGS réalisé par l'équipe. La souche 35TA, auxotrophe pour l'uracile et le tryptophane, a été utilisée pour les transformations génétiques ayant conduit à la construction de la souche de *C. lusitaniae* utilisée pour étudier les mutations de résistance aux échinocandines.

Tableau 5.1 – Souches de *Candida lusitaniae* utilisées et construites au cours de ce travail. Les souches obtenues lors de ce travail apparaissent en gras.

Nom de la souche	Génotype	Description et Métabolisme
6936	Sauvage	Souche de référence CBS
Sauvage <i>ura3</i> Δ990	<i>ura3</i> [Δ990]	Auxotrophe pour l'uracile
35TA	<i>ura3</i> [Δ360] <i>trp1</i> [Δ798]	Auxotrophe pour l'uracile et le tryptophane
35TA, <i>TRP1</i>	<i>ura3</i> Δ360, <i>IG5'FKS1::TRP1</i>	Auxotrophe pour l'uracile et prototrophe pour le tryptophane.
35TA, <i>TRP1</i>, <i>URA3</i>	<i>IG5'FKS1::TRP1</i> , <i>IG3'FKS1::URA3</i>	Prototrophe pour l'uracile et le tryptophane
35TA, <i>trp1</i>Δ/2, <i>URA3</i>	<i>IG5'FKS1::trp1</i> Δ/2, <i>IG3'FKS1::URA3</i>	Auxotrophe pour le tryptophane. Prototrophe pour l'uracile
35TA, <i>trp1</i>Δ/2, <i>ura3</i>Δ/2	<i>IG5'FKS1t::trp1</i> Δ/2, <i>IG3'FKS1::ura3</i> Δ/2	Auxotrophe pour l'uracile et le tryptophane. Souche réceptrice pour l'étude des mutations de résistance

Les souches de levures sont cultivées sur milieu complet YPD et sur milieu minimum YNB (tableau 5.2). Le milieu YNB est supplémenté en tryptophane (50 µg/mL) et/ou en uracile (50 µg/mL) pour la culture des souches auxotrophes pour ces molécules. Les antimétabolites toxiques, l'acide 5-fluoro-anthranilique et l'acide 5-fluoro-orotique, sont utilisés aux concentrations respectives de 0,3 mg/mL et 0,8 mg/mL. La stérilisation des milieux se fait par autoclavage à 110°C pendant 30 min. Les cultures en milieu liquide sont incubées à 35°C sous agitation constante de 230 rpm. Les milieux solides sont obtenus par ajout d'agar 2 % (m/v) et les cultures sont incubées à 30°C de 24h à 48h.

Tableau 5.2 – Liste des milieux utilisés et leur composition

YPD	Yeast extract 1% (m/v), bacto-peptone 2% (m/v), D-glucose 2% (m/v) YNB Yeast Nitrogen Base (YNB Difco) sans acides aminés 0,76% (m/v), D-glucose 2% (m/v), sulfate d'ammonium 0,5% (m/v)
RPMI	RPMI 1640 pré-formulé, D-glucose 2% (m/v), MOPS 65 mM, pH 7
LB	Yeast extract 0,5% (m/v), tryptone 1% (m/v), NaCl 0,5% (m/v), pH 7,5
LAXI	LB+ ampicilline 50 mg/L, IPTG 0,5 mmol/L, X-Gal 75 µg/mL SOC 2% tryptone, 0,5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , and 20 mM glucose

5.1.2 Souches d'*Escherichia coli*

La souche d'*Escherichia coli* thermocompétente Stellar™ (Clontech), utilisée pour les expériences de clonage, est cultivée dans du milieu LB (tableau 5.2) supplémenté en ampicilline (concentration finale de 50 µg/mL), à 37°C et sous agitation constante (230 rpm).

5.1.3 Plasmides

Le plasmide pUC19 (Promega) a été utilisé pour le clonage à l'aide du kit commercial In-Fusion. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline et le gène lacZ α , au milieu duquel se situe le multi-site de clonage. Les recombinants sont sélectionnés sur milieu LAXI (tableau 5.2).

5.2 Techniques de biologie moléculaire

5.2.1 Préparation des acides nucléiques

5.2.1.1 Extraction et purification d'ADN génomique de levure

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

5.2.1.2 Extraction et purification d'ADN plasmidique d'*E. coli*

Miniprep Express Matrix® Un volume de 1,5 ml de culture stationnaire de bactéries cultivées dans du LB-AMP est centrifugé 5 min à 2800 g. Le culot bactérien est repris dans 300 µL de tampon de lyse STET (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM; Triton X-100 5 %) contenant 5µL de lysosyme à 50 mg/ml. La suspension cellulaire est lysée à 100°C (2 min) puis centrifugée (16000 g, 5 min). L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est ensuite purifié à l'aide de 200 µl de matrice (Miniprep Express Matrix®). Après centrifugation et rinçage à l'éthanol à 70%, la résine séchée est remise en suspension dans 75 µl d'eau. L'ADN plasmidique élué est récupéré dans le surnageant après une dernière centrifugation.

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

L'amplification par PCR est effectuée pour la construction des cassettes de gène, ainsi que pour la vérification du génotype des transformants d'intérêt. Les différentes ADN polymérases utilisées sont :

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

Les mélanges réactionnels suivent les recommandations du fournisseur. Les réactions de PCR sont réalisées dans les thermocyclers Eppendorf selon les conditions décrites dans le tableau 5.3.

Tableau 5.3 – Paramètres des réactions d'amplification utilisé pour les réactions d'amplification utilisant la *GoTaq* et la *Pfu*

Dénaturation initiale	95°C pendant 2 minutes
Dénaturation	95°C pendant 20 secondes
Hybridation des amorces	(T_m amorce-5°C) pendant 30 secondes }30 cycles
Elongation	72°C pendant 1min/kb ¹
Elongation finale	72°C pendant 10 minutes

¹ pour la PFU : 2 minutes/kb pour un fragment de taille supérieure à 1kb

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

5.2.1.4 Purification des produits de PCR (QiaQuick, Qiagen)

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

5.2.1.5 Clonage des produits de PCR (In-Fusion, Clontech)

Les différents fragments à cloner possèdent une zone d'homologie de 15 bases à leurs extrémités, générée à l'aide d'amorces spécifiques. Ils sont recombinaisonnés entre-eux dans un plasmide préalablement

linéarisé (ici, le plasmide pUC19) suite à l'activité 3'→5' exonucléase de l'ADN polymérase d'un poxvirus. Les quantités d'ADN des différents fragments sont calculées pour 50 ng de plasmide pUC19 (d'une taille 2,7 kb), selon la formule suivante : $Quantité\ du\ fragment\ (en\ ng) = 2 * \frac{2,7 * 50}{taille\ insert\ (kb)}$.

L'enzyme du kit va progressivement exciser des nucléotides en 3' des fragments d'ADN, créant des régions complémentaires de 15 bases qui vont spontanément s'apparier. Une transformation chez *Escherichia coli* est indispensable pour rendre l'appariement covalent et corriger les erreurs (combler un trou de nucléotide ou un défaut d'appariement des bases).

5.2.1.6 Transformation des bactéries par choc thermique

Un volume de 100 µL de suspension de bactéries thermocompétentes commerciales StellarTM est incubé avec 5 µL de la solution de recombinaison obtenue grâce au kit In-Fusion ; pendant 20 minutes dans la glace, puis 50 secondes à 42°C, et 2 minutes dans la glace. Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans 900 µl de milieu SOC (tableau 5.2) liquide préchauffé à 37°C, puis incubées pour l'expression phénotypique (1 h, à 37°C, sous agitation à 200 rpm). La suspension estensemencée sur milieu gélosé LAXI (tableau 5.2). La culture est incubée pendant 16 h à 37°C.

5.2.1.7 Transformation des levures par électroporation

Une culture de levures est réalisée dans 50 mL de YPD à 35°C sous agitation (230 rpm) jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (DO_{600nm}=1,3). Les levures sont centrifugées à 2500 g pendant 10 minutes puis remises en suspension dans du tampon LiDTT Sorbitol (100 mM acétate de lithium, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM Dithiothréitol, 1 M Sorbitol) et incubées 1 heure à température ambiante. Après deux lavages au sorbitol 1 M glacé, les levures sont resuspendues dans 400 µL de sorbitol 1M. A 40 µl de levures sont ajoutés 5-20 µL d'ADN transformant (environ 2 µg). Le mélange est placé dans des cuvettes d'électroporation d'espace interélectrodes égal à 0,2 cm. La transformation est réalisée par électroporation (1,5 kV, 200 Ω, 25 µF). Les échantillons sont dilués dans 1 ml de sorbitol 1 M puis étalés sur milieu YNB supplémenté en sorbitol 1 M (YNBS) et incubés à 30°C pendant 48 à 72 heures. Pour la transformation avec les cassettes contenant les demi marqueurs *TRP1* et *URA3*, une étape d'expression phénotypique de 12 h en milieu solide YPD est nécessaire avant l'étalement sur boîtes de contre-sélection contenant l'acide 5-fluoro-anthranilique ou l'acide 5-fluoro-orotique.

5.2.1.8 Séquençage nucléotidique

Il est réalisé selon le protocole du kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction® v3.1 (Applied Biosystems) de produits de PCR purifiés (20 ng) ou d'ADN plasmidique (100 ng). L'amplification linéaire de séquençage comprend 30 cycles (10 s à 96°C ; 5 s à 50°C ; 4 min à 60°C). La purification et le séquençage sont réalisés par la société MWG.

5.2.1.9 Southern Blot

Les 5 sondes ont été élaborées par des PCR réalisées en présence de dUTP marqués à la digoxigénine (rapport DIG-dUTP/dUTP de 1/6) grâce au kit PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche®) selon les recommandations du fabricant. La réaction de synthèse est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les ADN sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (0,8%). Après dépurination, dénaturation et neutralisation du gel d'agarose, ils sont transférés sur membrane de nylon (Hybond N+®, General Electric) par capillarité, durant 16 h dans du tampon 20x SSC (3 M NaCl, 300 mM citrate de sodium, pH 7). L'ADN est alors fixé à la membrane par exposition 1 min aux UV. Après une étape de préhybridation (3 h à

42°C dans du tampon DIG-Easy Hyb®, Roche), la sonde dénaturée (5 min à 100°C) est ajoutée et l'hybridation s'effectue dans un four à hybridation (16 h à 42°C). La détection est réalisée en utilisant le kit « DIG Luminescent Detection Kit » (Roche). Après plusieurs lavages et après saturation, la membrane est mise en présence de l'anticorps anti-digoxigénine conjugué à une phosphatase alcaline (Anti-DIG AP®, Roche). Le substrat (CSPD®, Roche) est ajouté et l'ensemble est incubé 5 min à température ambiante puis 10 min à 37°C. La membrane est ensuite exposée à une caméra CCD (ImageQuant Las 4010) pendant 5 à 30 min afin de permettre la détection des hybrides par chémiluminescence. La membrane est ensuite traitée pendant 15 min à 37°C par une solution de stripping (2% SDS, 0,2 M NaOH) afin de pouvoir réhybrider la membrane par une nouvelle sonde.

5.2.1.10 Analyses bioinformatiques

Les bases de données suivantes ont été utilisées :

- *Candida lusitaniae* database (www.broad.mit.edu/annotation/genome/candida_lusitaniae/Home.html)
- *Saccharomyces cerevisiae* genome database (<http://www.yeastgenome.org/>)
- *Candida albicans* database (<http://www.candidagenome.org/>)
- Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

L'analyse des chromatogrammes des séquençages nucléotidiques est effectuée avec le logiciel BioEdit.

5.2.1.11 Tests de sensibilité aux antifongiques

Les tests de sensibilité ont été réalisés par diffusion en milieu solide avec des bandelettes Etest Caspofungine, Micafungine et Anidulafungine (Biomérieux), utilisées selon les recommandations du fournisseur. Les bandelettes sont déposées sur du milieu RPMI ensemencé à l'écouvillon par une suspension fongique à 0,5 McFarland. La lecture visuelle de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en µg/mL est réalisée à 24 et 48h. La CMI correspond à l'intersection de l'ellipse d'inhibition avec l'échelle graduée de la bandelette.

6.1 Conception de la souche de *Candida lusitaniae* génétiquement modifiée

6.1.1 Pré-requis : analyse bio-informatique pour l'identification du gène *FKS1* de *C. lusitaniae*.

La Broad Institute a réalisé le séquençage et l'annotation du génome de la souche ATCC 42720 de *C. lusitaniae*. La localisation du gène *FKS1* dans ce génome a été possible grâce aux travaux d'une autre équipe (Desnos et al.) [46] qui a identifié l'ORF CLUG_01702 sur le supercontig2, contenant une région homologue au HS2 du gène *FKS1* de *C. albicans*. Des alignements de séquences des gènes *FKS1* de *Candida glabrata* (GenBank XM_446406) et *Candida albicans* (GenBank D88815.1), nous ont permis de confirmer ces données. Cependant, la séquence de la souche ATCC 42720 dans cette région du génome est incomplète et comporte plusieurs erreurs : La séquence d'une partie codante du gène *FKS1* d'environ 100 pb n'a pas pu être déterminée et l'ORF identifié comme *FKS1* code une protéine hypothétique dont la taille est de 688 acides aminés, bien plus petite que les protéines Fks1p de *C. albicans* et *C. glabrata* qui font près de 2000 acides aminés. Récemment, notre équipe a fait réaliser le séquençage NGS de la souche de référence CBS 6936 par la plateforme génomique de Bordeaux. L'analyse de ces données a permis d'identifier le gène *FKS1* dans son intégralité. Situé sur le chromosome 2 (Supercontig 2), ce gène de 5661 nucléotides code une protéine de 1886 acides aminés. Le gène *FKS1* de *C. lusitaniae* code une protéine ayant 80% d'identité et 84% de similarité avec la protéine orthologue de *C. albicans* (GenBank D88815.1) et 72% d'identité et 78% de similarité avec la protéine orthologue de *C. glabrata* (GenBank XM_446406). Par ailleurs, une analyse de synténie montre une organisation génomique comparable autour des gènes *FKS1* de *C. albicans* et de *C. lusitaniae*. En amont se trouve un gène codant pour l'eukaryotic translation initiation factor 2A (EIF2A) et en aval un gène codant pour une galactosyl-transférase.

Nous avons également identifié les gènes *FKS2* et *FKS3* (CLUG_03658 et CLUG_00402-403). Par recombinaison homologue, nous avons altéré la séquence codante des gènes *FKS1*, *FKS2* et *FKS3*. Nous n'avons pas réussi à obtenir des recombinants *fks1* Δ , suggérant que le gène *FKS1* est essentiel chez *C. lusitaniae*. Les mutants *fks2* Δ et *fks3* Δ sont viables et ne présentent pas d'anomalies de la croissance.

6.1.2 Conception de la souche génétiquement modifiée de *Candida lusitanae*

Plusieurs contraintes ont dû être prises en compte :

Le gène *FKS1* n'est pas sélectionnable par lui-même.

Une contrainte pour faire du remplacement d'allèle est de lier physiquement à l'allèle remplaçant, un marqueur génétique qui permettra de sélectionner les levures ayant réalisé le remplacement. Ceci oblige à effectuer des constructions moléculaires compliquées, constituées de l'allèle remplaçant fusionné au marqueur génétique, lui-même flanqué par une séquence du locus où l'ensemble devra s'intégrer.

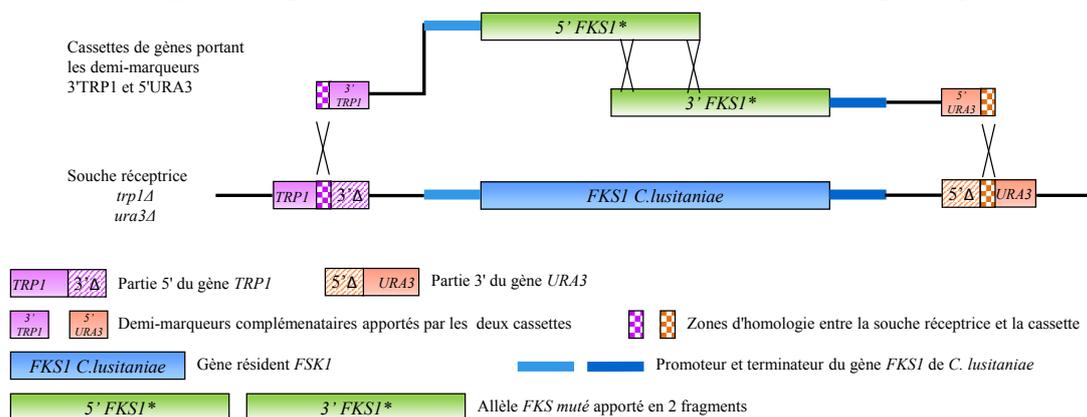
Candida lusitanae est capable de faire à la fois de la recombinaison homologe et de la recombinaison hétérologue

En d'autres termes, tout marqueur génétique de sélection peut éventuellement s'intégrer de façon ectopique, n'importe où dans le génome. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'utiliser des demi-marqueurs de sélection dont une moitié est implantée dans le génome près de l'allèle à remplacer, et l'autre moitié est apportée par l'ADN transgénique, de façon à ce que seul un événement de recombinaison au locus cible puisse reconstituer un marqueur génétique fonctionnel. Seules les levures exprimant le marqueur génétique auront effectué le remplacement d'allèle au locus cible

Le gène *FKS* est de grande taille (5661 nucléotides).

Le remplacement d'allèle par recombinaison homologe nécessite de synthétiser une cassette de gène composée de l'allèle *FKS* que l'on souhaite étudier et du demi-marqueur de sélection, encadrés par les deux séquences nucléotidiques de *C. lusitanae* spécifiques de la région où l'on souhaite réaliser la recombinaison homologe. La taille de cette cassette constituerait une limite pour sa construction. Notre choix s'est tourné vers l'utilisation de deux cassettes de gènes, portant chacune un marqueur de sélection et une partie du gène *FKS1*. Cette stratégie n'avait jamais, à notre connaissance, été utilisée chez une levure du clade CTG des *Candida*.

Figure 6.1 – Concept du remplacement d'allèle dans la souche de *C. lusitanae* génétiquement modifiée



La souche réceptrice est auxotrophe pour le tryptophane et l'uracile. Elle possède la partie 5' non fonctionnelle du gène *TRP1* en amont du gène *FKS1* et la partie 3' du gène *URA3* en aval de *FKS1*. La recombinaison homologe s'effectue par l'apport de deux cassettes contenant chacune la partie complémentaire du marqueur d'auxotrophie, et une partie du gène *FKS1* muté.

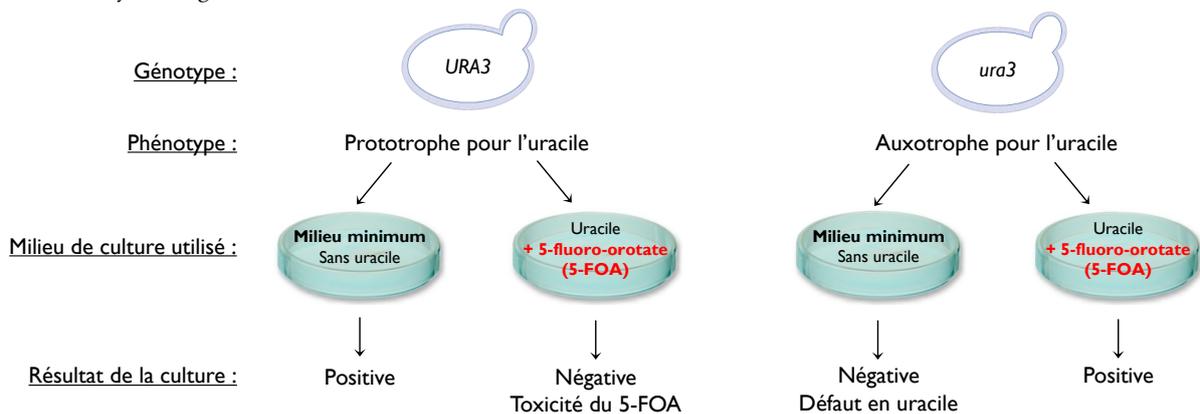
Le choix des marqueurs de sélection s'est tourné vers deux gènes codant des enzymes essentielles, impliquées dans la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Il s'agit du gène *URA3* codant pour l'orotate phosphoribosyl transférase qui intervient dans la voie de biosynthèse de l'uracile, et le gène *TRP1* codant la phosphoribosyl-anthranilate isomérase, impliquée dans la biosynthèse du tryptophane. En l'absence du gène *URA3* et du gène *TRP1* (souches *ura3Δ* et *trp1Δ*), les levures ne peuvent survivre

qu'après un apport exogène d'uracile et de tryptophane, on parle d'auxotrophie pour ces molécules. Lors de la transformation des levures avec un fragment d'ADN portant le gène *URA3* ou *TRP1*, les levures qui auront reconstitué le marqueur d'auxotrophie (*URA3* ou *TRP1*) seront sélectionnées sur un milieu sans uracile ou sans tryptophane. Celles n'ayant pas intégré le marqueur de sélection (*ura3Δ* ou *trp1Δ*) seront incapables de croître sur ce milieu.

Il est également possible de sélectionner les souches déficientes (souches *ura3Δ*, *trp1Δ*) en utilisant des molécules qui tuent les souches ayant des gènes *URA3* et *TRP1* fonctionnels. Le 5-fluoro-orotate (5-FAO) est métabolisé par l'orotate phosphoribosyl transférase (Ura3) en 5-fluoro-uracile qui est toxique pour la cellule. Une levure dont le gène *URA3* est fonctionnel et qui est cultivée sur un milieu contenant du 5-fluoro-orotate ne survivra pas. De même, le 5-fluoro-anthranilate (5-FAA) est métabolisé par l'enzyme Trp1 en 5-fluoro-tryptophane toxique. Cette contre-sélection est utilisée pour sélectionner des levures pour lesquelles les gènes d'auxotrophie ont été délétés. La sélection d'une souche qui a perdu le gène *URA3* sera réalisée sur un milieu contenant de l'uracile (souche devenue auxotrophe pour l'uracile) et du 5-fluoro-orotate afin d'éliminer les levures n'ayant pas perdu le marqueur de sélection [68, 190].

Figure 6.2 – Principe de la sélection et de la contre-sélection

La sélection des souches *URA3* est réalisée sur un milieu minimum (YNB sans uracile), sur lequel les souches *ura3* sont incapables de croître. Les souches *ura3* sont sélectionnées sur un milieu avec uracile et 5-fluoro-orotate, milieu toxique pour les levures ayant un gène *URA3* fonctionnel.



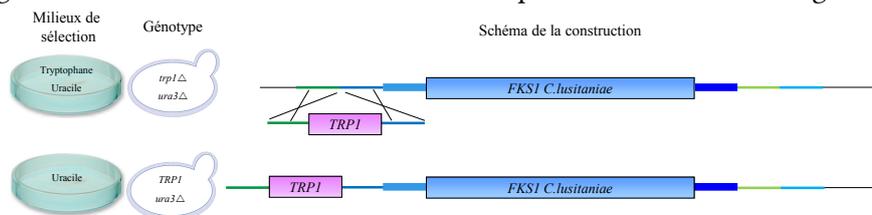
6.1.3 Construction de la souche génétiquement modifiée de *C. lusitaniae*

L'organisme modèle *C. lusitaniae* est une souche dérivée de la souche de référence 6936, rendue auxotrophe pour l'uracile et le tryptophane par délétion d'une partie des marqueurs *URA3* et *TRP1* (*ura3Δ360*, *trp1Δ798*), précédemment construite par l'équipe. L'insertion des demi-marqueurs de sélection au locus *FKS1* passe par deux étapes. L'insertion du marqueur complet dans un premier temps, puis la délétion d'une partie de marqueur. Il est impossible d'insérer directement les demi-marqueurs de sélection en amont et en aval de *FKS1* car l'intégration d'un gène non fonctionnel chez une souche auxotrophe n'est pas sélectionnable (la souche *ura3Δ* ou *trp1Δ* restera *ura3Δ* ou *trp1Δ*).

6.1.3.1 Insertion des marqueurs *TRP1* et *URA3* en amont et en aval du gène *FKS1* de *C. lusitaniae*

Dans une première étape, nous avons apporté le gène *TRP1* dans la région 5' non-codante du gène *FKS1* de *C. lusitaniae*, grâce à une cassette constituée du gène *TRP1* bordé par les séquences homologues de la région d'insertion (région 5' non-codante).

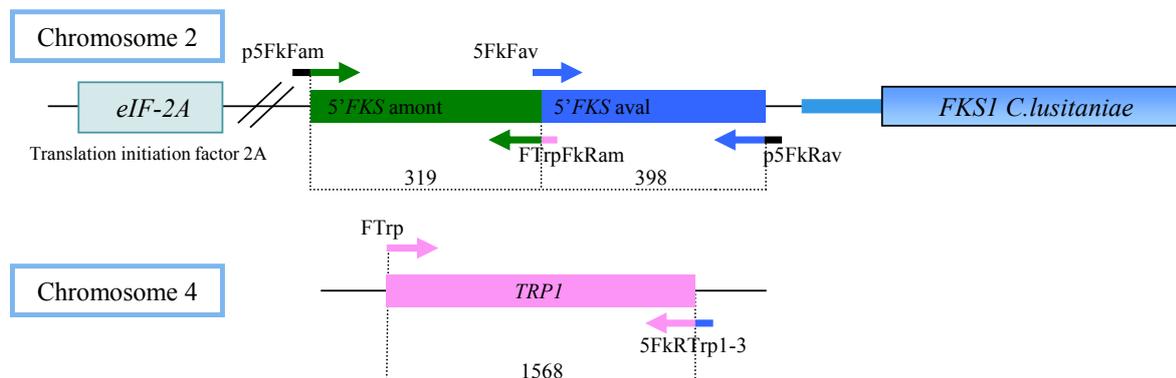
Les levures transformées ayant intégré le gène *TRP1* sont prototrophes pour le tryptophane et sont sélectionnées sur un milieu minimum YNB sans tryptophane et supplémenté en uracile.

Figure 6.3 – Illustration de l'insertion du marqueur *TRP1* en amont du gène *FKS1*

Nous avons ensuite inséré de la même manière le gène *URA3* dans la région 3' non codante du gène *FKS1*, et sélectionné les recombinants sur milieu YNB sans uracile et sans tryptophane. Les différentes cassettes construites sont composées du gène codant pour le marqueur de sélection, entouré en amont et aval par les séquences d'ADN homologues à la région où l'on souhaite intégrer le marqueur.

La cassette *TRP1* est constituée du gène *TRP1* (ORF et régions 5'UTR et 3'UTR), encadré par les deux séquences d'ADN de la région intergénique 5' du gène *FKS1* où le marqueur sera inséré.

Les régions d'intérêt (*5'FKSamont* et *5'FKSaval* de la région intergénique IG5' du gène *FKS1* sur le chromosome 2 et le gène *TRP1* sur le chromosome 4) sont amplifiées à l'aide de l'enzyme de haute fidélité *Pfu*, en utilisant l'ADN de la souche 6936 comme matrice. La partie 3' des amorces est spécifique de la région à amplifier, et la partie 5' est composée de 15 bases complémentaires à la région avec laquelle on souhaite appairer le fragment.

Figure 6.4 – Représentation schématique des amorces utilisées pour la construction de la cassette *TRP1*

Après vérification de l'amplification sur gel d'agarose (figure 6.5.A), les 3 fragments d'ADN et le plasmide linéarisé pUC19 sont fusionnés en une seule molécule grâce aux 15 bases de leur extrémité 5' qui s'apparient pour reconstituer un plasmide circulaire (figure 6.5.B, figure 6.6). Ce plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline et la cassette de gènes est insérée au niveau du site de clonage, situé dans le gène de la β -galactosidase (*LacZ α*). Le plasmide est transféré aux bactéries *E. coli* Stellar par choc thermique (figure 6.5.C, figure 6.6) et la sélection est réalisée sur milieu contenant de l'ampicilline et du X-Gal (figure 6.5.D, figure 6.6). Les bactéries contenant le plasmide d'intérêt sont résistantes à l'ampicilline et de couleur blanche (gène de la β -galactosidase inactivé). Une PCR sur colonie est réalisée pour détecter la cassette d'intérêt à l'aide des amorces 5FkFam et 5FkRav (figure 6.5.E). La séquence nucléotidique de la cassette *TRP1* est ensuite vérifiée par séquençage.

Figure 6.5 – Construction de la cassette *TRP1* et intégration dans la région 5' du gène *FKS1* de *C. lusitaniae*

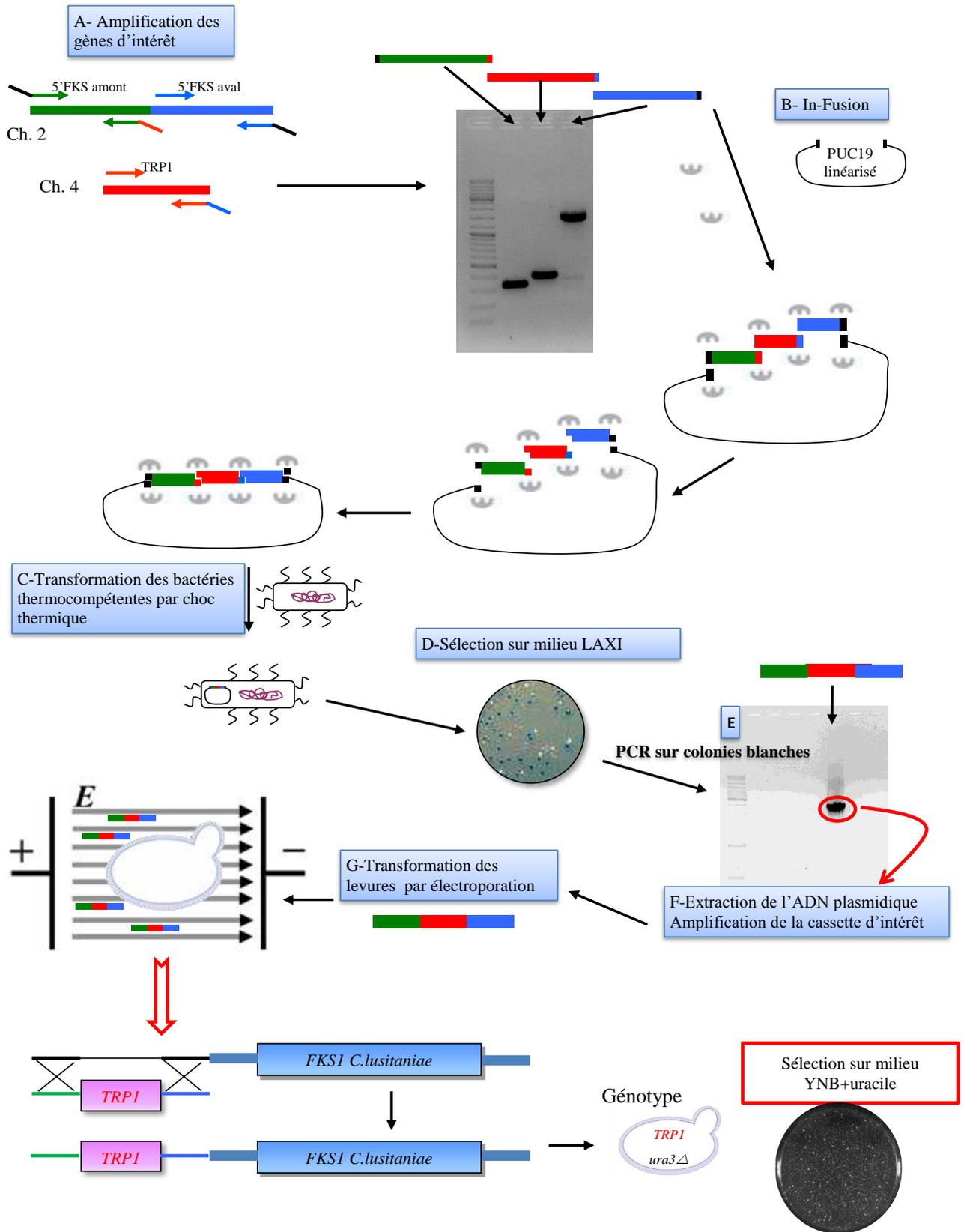
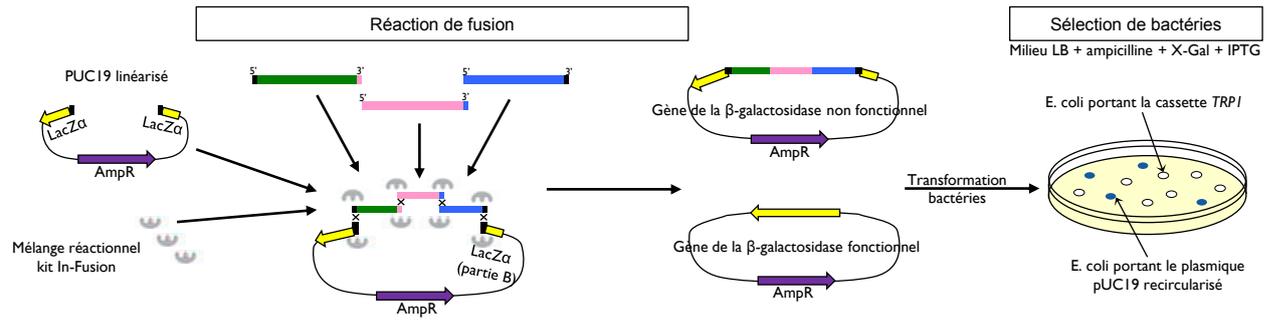


Figure 6.6 – Représentation schématique de la réaction de fusion et de la sélection des bactéries transformées



Pour réaliser la recombinaison homologue chez la levure, le fragment d'ADN transformé doit être linéaire avec des extrémités homologues à la région où l'on souhaite l'insérer. Il est donc nécessaire d'amplifier la cassette *TRP1* à partir de l'ADN plasmidique purifié. La PCR est réalisée avec l'enzyme de haute fidélité *Pfu* et à l'aide des amorces 5FkFam et 5FkRav. Les levures de la souche 35TA *ura3Δ/2*, *trp1Δ/2* sont transformées par électroporation par la cassette *TRP1* ainsi obtenue, et les transformants sont sélectionnés sur du milieu YNB supplémenté en uracile. Cependant, tous les transformants n'ont pas intégré le gène *TRP1* dans la région 5'IG-FKS1, des phénomènes de recombinaison non-homologue peuvent également intervenir. La détection des transformants ayant intégré la cassette *TRP1* dans la région 5' du gène *FKS1* est réalisée par des PCR croisées, sur colonies, en utilisant différents couples d'amorces (Figure 6.7) : Le couple 5FkFam/5FkRam bordant la cassette permettant d'amplifier un fragment de 2285 pb chez les transformants ayant intégré *TRP1* dans la région 5' du gène *FKS1*, et de 700 pb chez les transformants ayant intégré *TRP1* de façon ectopique. Des couples d'amorces comprenant une amorce externe au locus couplée à une amorce interne à la cassette (5FCtrlFkAm/5RCtrlTRP et 5FCtrlTRP/5RCtrlFkAv) permettent de confirmer l'intégration de *TRP1* dans la région 5' de *FKS1*.

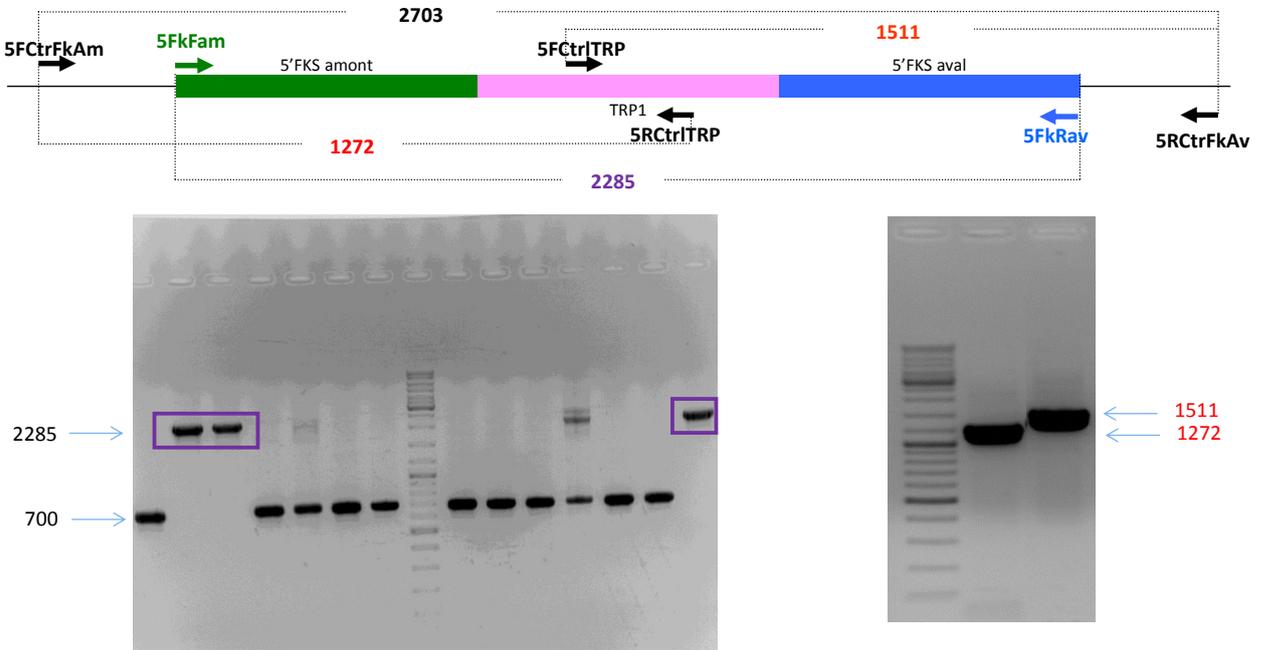
Sur 14 clones testés, 3 avaient intégré le gène *TRP1* dans la région 5'IG. Les autres clones correspondaient soit à une recombinaison au locus *TRP1* situé sur le chromosome 4, soit à une recombinaison non homologue (figure 6.7).

Figure 6.7 – Résultats des PCR sur les transformants *TRP1*

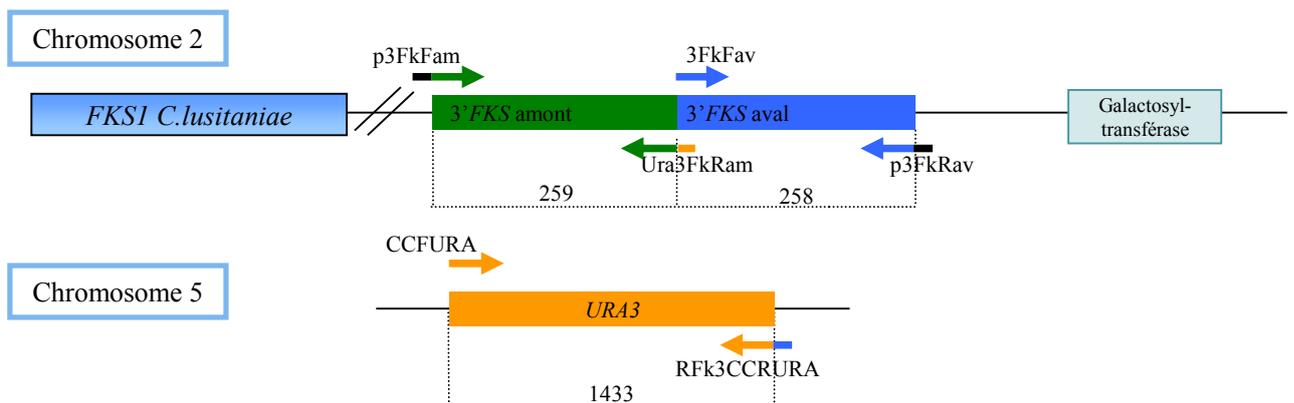
La représentation du locus 5' *FKS1* après l'insertion de la cassette, ainsi que la position des différentes amorces sont illustrées sur le schéma.

Dans un premier temps nous avons réalisé une PCR 5FkFam/5FkRam (photographie de gauche) sur l'ADN de 14 clones obtenus sur milieu YNB+uracile. Nous observons deux tailles de bandes : une bande à 700 pb qui correspond à la région 5' *FKS1* sans le gène *TRP1* (taille des fragments vert et bleu), et une bande de 2282 pb qui correspond à la taille de la cassette entière.

Sur les 3 clones possédant uniquement le fragment à 2282 pb, des PCR utilisant une amorce externe ont été réalisées. La photographie de droite montre les bandes obtenues à l'aide des amorces 5FctrIFkAm/5RCtrITRP et 5FctrITRP/5RCtrIFkAv sur le clone 2. La taille des fragments est conforme à la taille attendue, confirmant l'insertion de la cassette au locus 5' *FKS*.

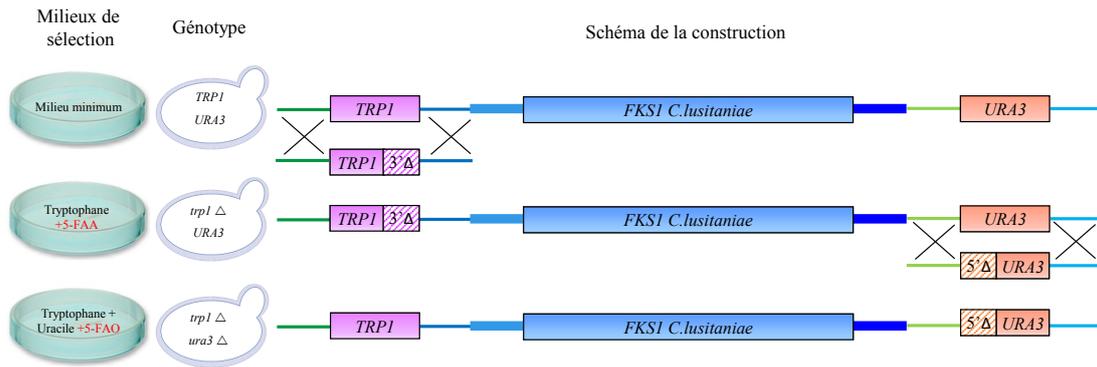


La cassette *URA3* est composée du gène *URA3* (ORF et régions 5'UTR et 3'UTR), encadré par les deux séquences d'ADN de la région intergénique 3' du gène *FKS1*. De la même façon, les trois fragments sont fusionnés dans le plasmide pUC19. Après transformation des levures, les recombinants sont sélectionnés sur milieu YNBS sans uracile et sans tryptophane.

Figure 6.8 – Représentation schématique des amorces utilisées pour la construction de la cassette *URA3*

6.1.3.2 Délétion d'une partie des marqueurs *TRP1* et *URA3*

Dans une troisième étape, la moitié du gène *TRP1* est éliminée par l'insertion, en lieu et place de la cassette *TRP1*, d'une cassette qui ne contient qu'une partie non fonctionnelle de la séquence codante du gène *TRP1* (partie 5').

Figure 6.9 – Représentation de la délétion des marqueurs *TRP1* et *URA3*

La cassette *TRP1* est utilisée comme matrice pour amplifier les fragments, ce qui permet de s'affranchir d'une nouvelle fusion entre la région 5' *FKS1* amont et le gène *TRP1*. Les amorces p5FkFam/5FkFavRdel sont utilisées pour amplifier le premier fragment nommé 5' FKS-*TRP1del*. Le fragment 5' *FKS* aval est identique à celui de la cassette *TRP1* (amorces 5FkFav/p5FkRav). La fusion des 2 fragments introduit une délétion de 766 pb dans la partie 3' codante et non codante du gène *TRP1*.

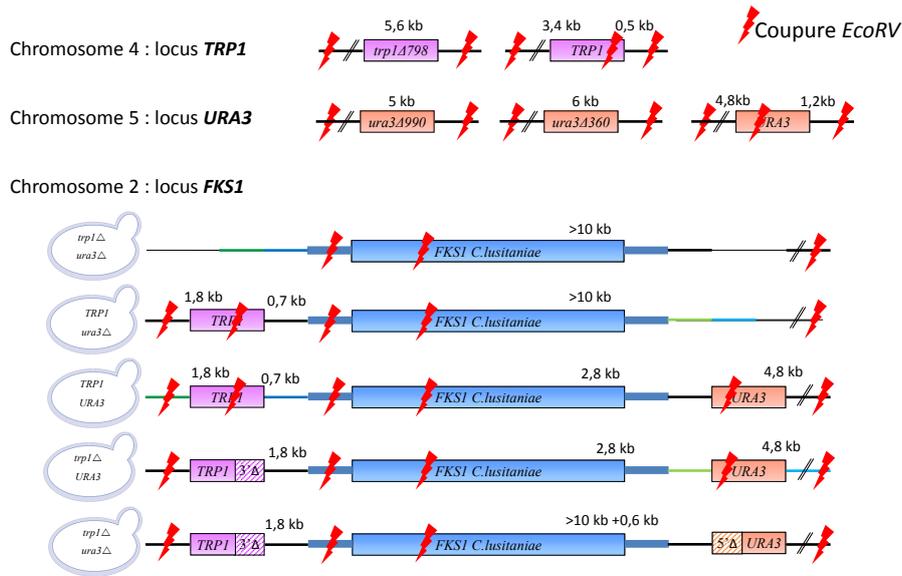
Les levures transformées par la cassette *TRP1del* redeviennent auxotrophes pour le tryptophane, ce qui leur confère de façon concomitante l'aptitude à résister à l'antimétabolite toxique, l'acide 5-fluoroanthranilique (5-FAA). Cette étape de contre-sélection sur 5-FAA doit être précédée d'une étape d'expression phénotypique qui consiste en une culture sur milieu riche YPD (additionné de sorbitol). Cette étape est indispensable pour permettre aux levures transformées de réaliser le crossing-over nécessaire à l'intégration du gène *TRP1del* et à l'élimination du gène *TRP1* fonctionnel. En effet, en l'absence de cette pré-culture sur milieu YPDS, la toxicité du 5-FAA s'exercerait avant le remplacement du gène *TRP1* par le gène *TRP1del* non fonctionnel. Les levures ayant réalisé le crossing-over sont alors sélectionnées sur un milieu YNB additionné de 5-FAA (0,3 mg/mL) et de tryptophane (50 µg/mL).

La dernière étape de la construction de la souche est d'implanter à la souche précédente la partie non fonctionnelle du gène *URA3* (partie 3') dans la région intergénique du côté 3' non-codant du gène *FKS1*. Une délétion de 853 pb est introduite dans la partie 5' du gène *URA3* en utilisant les amorces CCF2URA/p3FkRav. Les levures ayant perdu la moitié du gène *URA3* sont auxotrophes pour l'uracile et résistantes à l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA). Elles sont sélectionnées après expression phénotypique sur un milieu YNB additionné de 5-FOA (0,8 mg/mL) et d'uracile (50 µg/mL).

La délétion partielle des marqueurs *URA3* et *TRP1* a été contrôlée par méthodes phénotypique et génotypique. Nous avons vérifié que les souches sont incapables de croître en l'absence d'uracile ou de tryptophane. Nous avons ensuite séquencé les régions 5' et 3' de *FKS1* où sont insérés les demi-marqueurs de sélection. Les séquences obtenues correspondaient aux séquences théoriques.

6.1.4 Vérification de l'insertion des marqueurs

Une hybridation par Southern-Blot a été réalisée pour confirmer l'insertion des cassettes portant les marqueurs d'auxotrophie au niveau des loci souhaités. Les ADN génomiques des 7 souches décrites dans le tableau 5.1 ont été digérés par l'enzyme EcoRV. Après migration et transfert sur membrane, les ADN ont été hybridés par les différentes sondes.

Figure 6.10 – Localisation des différents sites de coupure de l'enzyme EcoRV aux loci *TRP1*, *FKS1* et *URA3*

6.1.4.1 Sondes *URA3* : co-hybridation des sondes 5'*URA3* et 3'*URA3*

La souche de référence 6936 possède un site de coupure par EcoRV au sein de son ORF, générant 2 fragments (de 4,8 kb et 1,2 kb), chacun hybridé par une des sondes. Les souches de référence $\Delta 990$ et $\Delta 360$ possèdent une délétion dans l'ORF qui enlève le site de restriction dans *URA3* ainsi que le site de fixation de la sonde 3'*URA3*. Un seul fragment est hybridé, d'une taille de 5 kb pour la souche $\Delta 990$ et 5,6 kb pour la $\Delta 360$. La souche 35TA (*ura3Δ360*) a été utilisée pour créer les souches (35TA, *TRP1*); (35TA, *TRP1*, *URA3*); (35TA, *trp1Δ*, *URA3*); (35TA, *trp1Δ*, *ura3Δ*). Lorsque l'on insère le gène *URA3* en aval de *FKS1*, un site de coupure est ajouté : on obtient en plus de l'hybridation au locus *URA3* (5,6 kb), deux bandes de 2,8 et 4,8 kb. La délétion de la partie 5' du gène *URA3* supprime le site de restriction ainsi que la fixation de la sonde 5'*URA3* : une bande de 6,8 kb est révélée. Il n'y a pas de bande supplémentaire à celles attendues, confirmant une insertion du gène *URA3* au locus *FKS1* seul.

6.1.4.2 Sonde *FKS1*

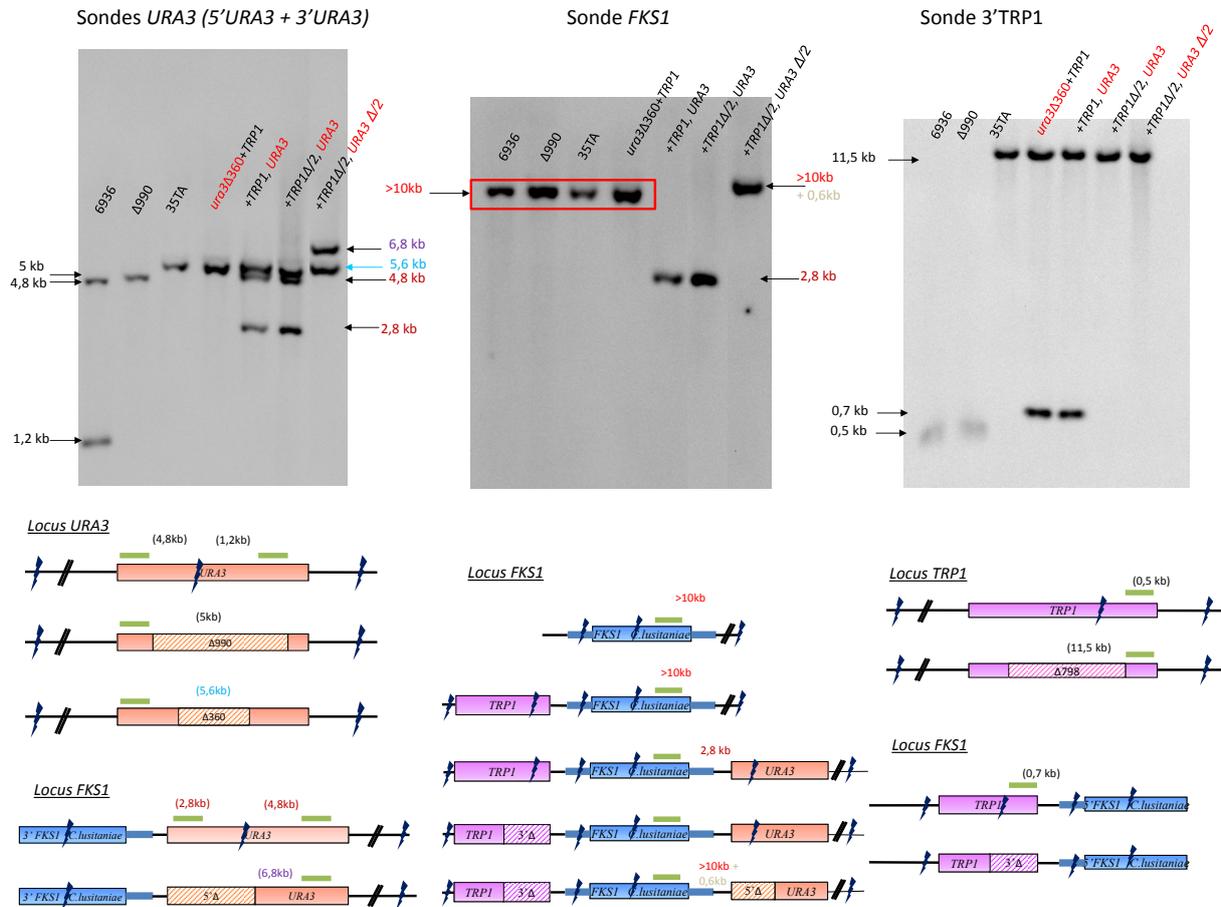
La sonde se fixe au niveau de la région HS2 du gène *FKS*. Une coupure par EcoRV est effectuée une centaine de bases en amont de la fixation de la sonde, et très en aval du gène *FKS1* (sans que le site de coupure soit identifié). L'introduction du gène *URA3* en aval de *FKS1* introduit un site de coupure supplémentaire, avec l'apparition d'un fragment de 2,8 kb. La délétion supprime ce site de coupure, et l'on retrouve un fragment de grande taille, d'une taille plus grande de 0,6 kb. Cette hybridation confirme l'insertion au locus 3'IG *FKS1* de *URA3*, sans modification de la séquence *FKS1*.

6.1.4.3 Sonde 3' *TRP1*

Le locus sauvage *TRP1* possède un site de restriction dans la zone 5'UTR. La sonde se fixe au niveau de cette région, et l'on obtient un fragment d'une taille 0,5 kb. Dans la souche portant la délétion $\Delta 790$ (35TA), le site de coupure est éliminé, mais la sonde se fixe toujours dans la région 3' : le fragment révélé par hybridation mesure 11,5 kb. On retrouve le fragment de 11,5 kb chez toutes les souches qui dérivent de la souche 35TA. Lors de l'insertion du gène *TRP1* entier dans la région 5'IG de *FKS1*, un fragment

de 0,7 kb est créé. La délétion de la partie 3' du gène *TRP1* supprime le site de fixation de la sonde, la bande obtenue précédemment disparaît.

Figure 6.11 – Résultats des hybridations à l'aide des différentes sondes (*URA3*, *FKS1*, 3'*TRP1*)



L'hybridation par la sonde 5'*TRP1* ne révèle également que les bandes attendues.

Dans l'ensemble des hybridations réalisées à l'aide des différentes sondes, aucune bande surnuméraire n'a été mise en évidence. La taille des fragments générés par l'action de l'enzyme *EcoRV* est conforme aux cartes de restriction théoriques. Tout cela confirme l'insertion aux seuls loci souhaités des différentes cassettes de gènes transformées.

6.2 Preuve du concept : remplacement d'allèle *FKS1* et étude des mutations de résistance aux échinocandines

Le remplacement de l'allèle résident *FKS1* a été effectué par l'apport de deux fragments d'ADN portant chacun une partie d'un allèle *FKS1* muté et la séquence manquante du marqueur d'auxotrophie.

La première cassette porte la partie 3' du gène *TRP1* et la partie 5' de l'allèle *FKS1* muté, et la deuxième cassette la partie 3' de l'allèle *FKS1* muté et la partie 5' du gène *URA3*. Ces deux fragments co-transformés dans la souche réceptrice, subissent une recombinaison entre-eux puis une intégration au locus par double crossing-over. Cela conduit à une souche prototrophe pour l'uracile et le tryptophane, qui est sélectionnée sur milieu minimum, et qui exprime l'allèle *FKS1* muté.

Choix des mutations Trois mutations connues et décrites dans la littérature ont été choisies pour valider notre modèle. Le choix de ces mutations a été basé sur l'augmentation des CMI décrite dans la littérature chez les souches cliniques portant ces mutations. Il s'agit de :

1. La mutation S645P décrite chez *C. albicans* dans laquelle une proline remplace la sérine au niveau du 5ème acide aminé du HS1. Elle correspond aux mutations S630P et S663P sur les protéines orthologues *FKS1* et *FKS2* chez *C. glabrata*. C'est la mutation la plus fréquemment décrite et qui induit une importante élévation de CMI. Son implication dans la résistance aux échinocandines a été démontrée par Park et al. [138].
2. La mutation F641V décrite chez *C. albicans*, dans laquelle la phénylalanine en 1ère position du HS1 est remplacée par une valine. C'est également la 2ème mutation décrite par ordre de fréquence chez *C. glabrata* (F625V dans *FKS1* et F659V dans *FKS2*). Elle est associée à une élévation plus modérée des CMI aux échinocandines.
3. La mutation R1368G décrite chez *C. krusei*, située dans le HS2 de *FKS1*, correspondant à la mutation R1361G chez *C. albicans*. La souche mutée de *C. krusei*, étudiée par Park et al., présentait une CMI à la caspofungine de 32 mg/L.

Stratégie pour introduire les mutations Les fragments sont synthétisés par PCR en utilisant l'ADN de la souche de *C. lusitaniae* 35TA, *TRP1*, *URA3* génétiquement modifiée comme matrice. Le premier fragment est obtenu à l'aide d'une amorce « Forward » dans le gène *TRP1* (FCtrlTRP), positionnée 166 pb en amont de la délétion, et d'une amorce « Reverse » de 40 bases dans l'allèle *FKS1*, comprenant la mutation à introduire (« R-mutation ») (figure 6.12). Le deuxième fragment est obtenu à l'aide de l'amorce « Forward » de 40 bases (« F-mutation »), complémentaire à l'amorce « Reverse » du fragment précédent, et d'une amorce « Reverse » (UraR2del) située 211 pb en aval de la délétion *URA3*. Les amorces « F-mutation » et « R-mutation » de 40 pb sont complémentaires entre-elles et portent chacune la mutation que l'on souhaite introduire. Les deux fragments amplifiés portent ainsi une zone d'homologie de 40 bases entre-eux dans la région de la mutation, et chacun d'eux ne porte qu'une partie non fonctionnelle des marqueurs d'auxotrophie *TRP1* et *URA3*. Les deux fragments ont été co-transformés dans la souche réceptrice de *C. lusitaniae* 35TA, *trp1* Δ /2, *ura3* Δ /2 par électroporation et les recombinants sélectionnés sur un milieu sans uracile et sans tryptophane. Pour chaque co-transformation avec les fragments d'ADN portant les mutations *FKS1*, 8 clones ont été testés pour la sensibilité à la caspofungine par la méthode Etest et une partie du locus *FKS1* a été séquencée pour vérifier la présence de la mutation.

La souche sauvage de *C. lusitaniae* est sensible à la caspofungine et présente une CMI de 0,125 mg/L.

Le remplacement de l'allèle sauvage par un allèle muté se traduit par une augmentation de la CMI à 1,5 mg/L pour la mutation F641V et à plus de 32 mg/L pour les mutations S645P et R1361G.

Figure 6.12 – Stratégie et jeux d'amorces utilisés pour le remplacement de l'allèle FKS1 résident par co-transformation de 2 fragments d'ADN

Les fragments sont générés par les amorces 5FCtrlTRP/R-S645P et F-S645P/UraR2del en utilisant comme matrice l'ADN de la souche 35TA, *TRP1*, *URA3* qui possède les deux marqueurs entiers en amont et en aval de *FKS1*. La mutation S645P (rouge) a été introduite dans les deux amorces utilisées pour générer une homologie de 40 pb entre les 2 fragments. Chaque fragment possède une partie non codante du marqueur d'autotrophie. Ils sont co-transformés chez la levure réceptrice où des crossing-over vont avoir lieu entre les fragments (40 pb d'homologie) et entre les parties communes des marqueurs sur la cassette et l'ADN de la souche réceptrice (166 et 211 pb d'homologie pour *TRP1* et *URA3*)

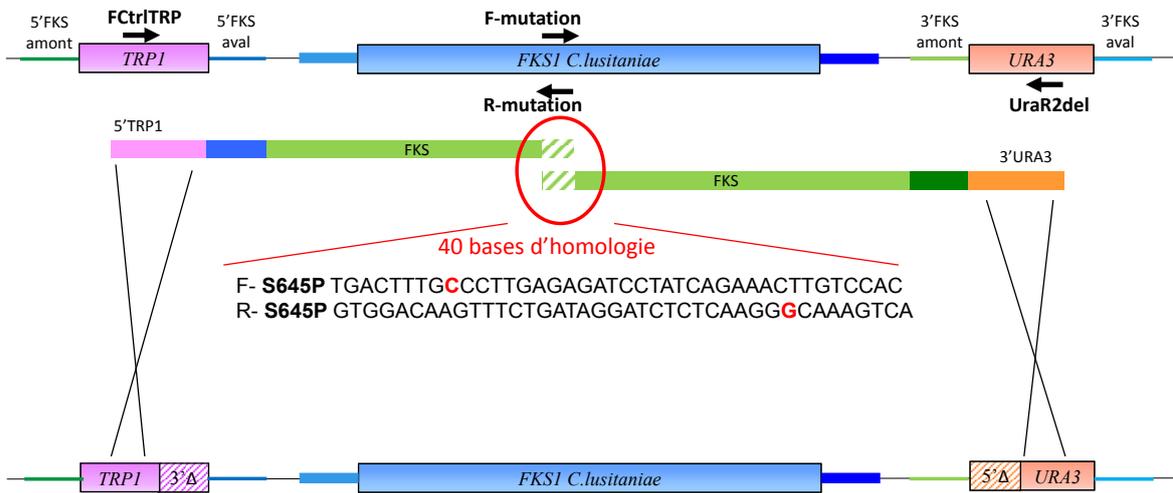
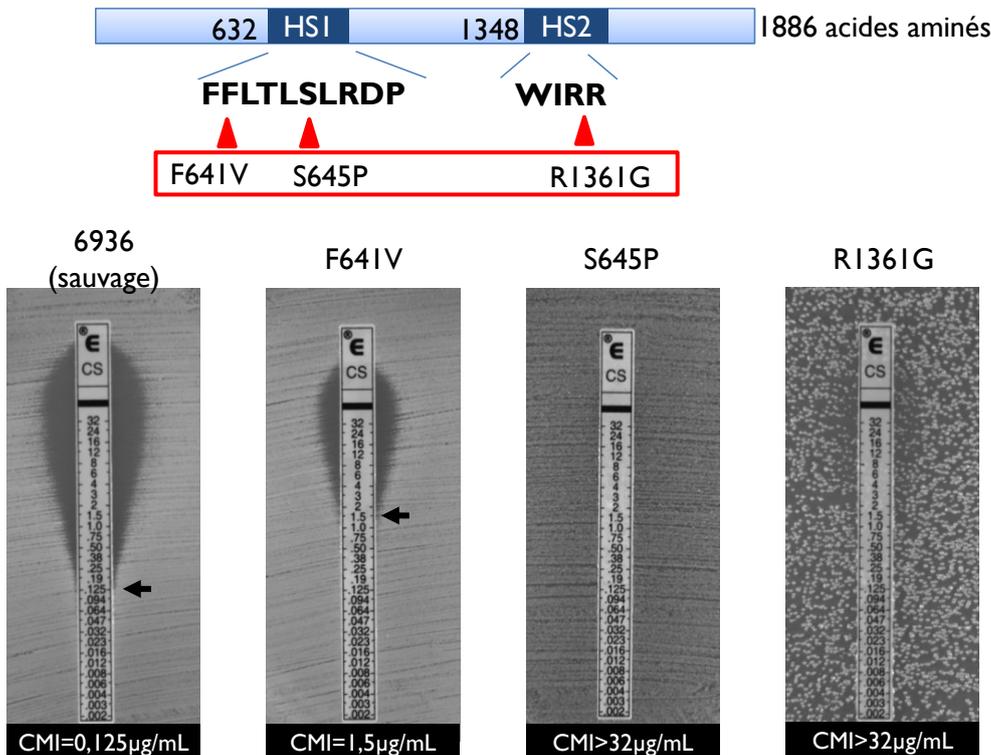


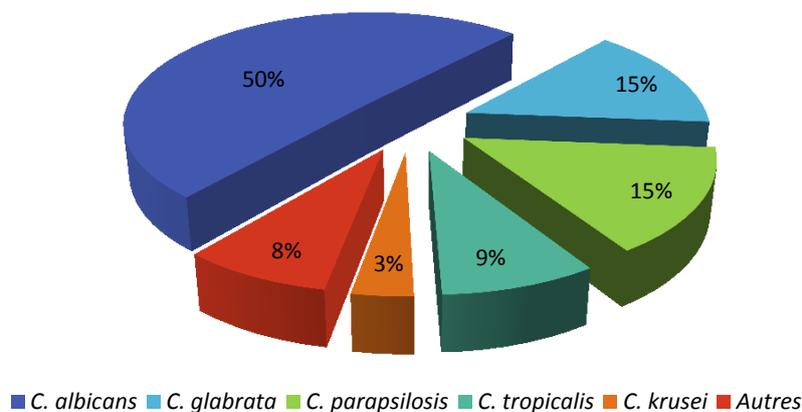
Figure 6.13 – CMI à la caspofungine de la souche sauvage et des 3 mutants, après 48 h d'incubation. L'emplacement des 3 mutations introduites sur la protéine Fks1 de *C. lusitaniae* est représenté sur le schéma. Les photographies montrent le résultat des CMI Etest à la caspofungine pour les différentes souches après 48h d'incubation.



EPIDÉMIOLOGIE DE LA RÉSISTANCE AUX ÉCHINOCANDINES AU CHU
DE BORDEAUX

Entre novembre 2013 et septembre 2016, 971 antifongogrammes pour des levures du genre *Candida* ont été réalisés au laboratoire de mycologie du CHU de Bordeaux, *C. albicans* étant l'espèce majoritairement testée (n=499), suivie de *C. glabrata* (n=167), *C. parapsilosis* (n=92) et *C. tropicalis* (n=79). Parmi ces 971 souches, 272 ont été isolées d'hémoculture et 230 de prélèvements digestifs profonds (liquide péritonéal, liquide de drains, abcès...). Dans les candidémies, *C. albicans* est l'espèce la plus fréquente (50% des isolats), *C. glabrata* et *C. parapsilosis* représentent chacun 15% des souches isolées (figure 7.1).

Figure 7.1 – Répartition des espèces isolées dans les candidémies



Les CMI ont été déterminées par méthode Etest selon les recommandations fournisseur (BioMérieux). La détermination des CMI d'un grand nombre de souches pour une espèce donnée et un antifongique donné permet de construire l'histogramme de distribution des CMI qui définit la population sauvage de l'espèce fongique. A partir de cette distribution, on peut déterminer le seuil épidémiologique (ECOFF ou ECV) qui permet de distinguer les souches sauvages des souches non sauvages, potentiellement résistantes et ce, par simple inspection visuelle de l'histogramme de distribution des CMI. Le seuil peut être également évalué par des méthodes d'analyse statistique, comme l'outil ECOFFinder développé par J. Turnidge [191], disponible sur le site du CLSI et basé sur un modèle de régression non-linéaire. La CMI modale correspond à la valeur de CMI la plus fréquente dans le panel de souches testées. Nous avons donc pu déterminer les ECOFFs de chaque échinocandine pour les 4 espèces de

Candida les plus fréquemment isolées.

Tableau 7.1 – Valeur seuil épidémiologique (ECOFF) des échinocandines pour les 4 espèces de *Candida* les plus fréquemment isolées au CHU de Bordeaux et comparaison aux ECOFFs publiées par le CLSI et l'EUCAST pour ces espèces [62, 61, 146]

	Valeur seuil épidémiologique (ECOFF) (mg/L)								
	Caspofungine			Micafungine			Anidulafungine		
	Bordeaux	EUCAST	CLSI	Bordeaux	EUCAST	CLSI	Bordeaux	EUCAST	CLSI
<i>C. albicans</i>	0,25	NR	0,12	0,06	0,015	0,03	0,008	0,03	0,12
<i>C. glabrata</i>	0,5	NR	0,12	0,06	0,03	0,03	0,03	0,06	0,25
<i>C. tropicalis</i>	0,5	NR	0,12	0,06	0,06	0,12	0,03	0,06	0,12
<i>C. parapsilosis</i>	2	NR	1	4	2	4	4	4	4

Tableau 7.2 – CMI modales des échinocandines pour les 4 espèces de *Candida* les plus fréquemment isolées au CHU de Bordeaux et comparaison aux ECOFFs publiées par le CLSI et l'EUCAST pour ces espèces

	Mode (mg/L)								
	Caspofungine			Micafungine			Anidulafungine		
	Bordeaux	EUCAST	CLSI	Bordeaux	EUCAST	CLSI	Bordeaux	EUCAST	CLSI
<i>C. albicans</i>	0,03	NR	0,03	0,016	0,008	0,015	0,004	0,004	0,03
<i>C. glabrata</i>	0,125	NR	0,03	0,016	0,008	0,015	0,016	0,016	0,06
<i>C. tropicalis</i>	0,125	NR	0,03	0,03	0,016	0,015	0,016	0,016	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	0,5	NR	0,25	1	1	1	2	1	2

L'intérêt est de déterminer les ECOFFs, avec la technique utilisée en routine au laboratoire (méthode Etest) pour les tests de sensibilité aux antifongiques. La connaissance de son épidémiologie locale permet alors de détecter plus sensiblement les souches présentant une moindre sensibilité aux échinocandines, qui auraient donc potentiellement acquis un mécanisme de résistance. Globalement, puisqu'un écart de 2 dilution est admis, les ECOFFs « locaux » calculés pour chacune des 4 espèces de *Candida spp* testées sont comparables à ceux définis par le CLSI et l'EUCAST par les méthodes de référence en milieu liquide [62, 61, 146] (tableau 7.1 et 7.2), à l'exception de l'anidulafungine. Pour cette molécule, les ECOFFs du CLSI sont beaucoup plus élevés. Pour être sensible, un seuil d'interprétation clinique ou « breakpoint » (BP) ne doit pas être plus élevé que l'ECOFF, mais sans être trop inférieur à l'ECOFF, au risque de perdre en spécificité, ce qui adapté à notre écologie n'est valable que pour les BPs proposées pour la caspofungine par le CLSI et ceux proposés pour la micafungine par l'EUCAST. Ces résultats confirment l'importance de connaître son épidémiologie.

En utilisant, les BPs du CLSI (tableau 2.5) respectivement 0,82%, 21,5%, 1,26% et 8,9% des souches de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* testées sont classées comme non-sensibles à au moins une échinocandine (tableau 7.3). Parmi les 36 isolats de *C. glabrata* non sensibles, tous sont classés intermédiaires ou résistants à la caspofungine, alors que seulement le quart le sont à l'anidulafungine et à la micafungine (tableau 7.3).

En utilisant, les ECOFFs locaux, respectivement 2,6%, 9,5%, 1,3% et 14% des souches de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* testées sont classées comme non-sensibles à au moins une échinocandine. Ces pourcentages sont légèrement supérieurs à ceux retrouvés en utilisant les BP du CLSI, sauf pour *C. glabrata*.

Pour *C. glabrata*, le BP CLSI de 0,25 mg/L, bien qu'inférieur à l'ECOFF local (0,5 mg/L) ne semble pas adapté. Comme nous l'avons évoqué, la catégorisation des souches en sensibles ou résistante basée sur

les BPs épidémiologiques ou les ECOFFs n'est pas satisfaisante pour la caspofungine (paragraphe 2.5.2). Les ECOFFs de l'anidulafungine pour *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* sont très bas (compris entre 0,008 et 0,003 mg/L) comparés à ceux de la caspofungine (compris entre 0,25 et 0,5 mg/L). Nos résultats confirment les recommandations d'Arendrup et al. [6] d'évaluer la sensibilité à la caspofungine d'après la CMI obtenue pour l'anidulafungine, en utilisant les BPs d'interprétation définis par l'EUCAST, les BPs du CLSI étant trop élevés pour permettre de suspecter une résistance acquise.

Tableau 7.3 – Pour les 4 espèces de *Candida* testées, nombre d'isolats présentant une CMI en échinocandine supérieure à la valeur du BP du CLSI ou de l'ECOFF calculé
Entre parenthèse, le nombre d'isolat qui présente une mutation *fks* dont la CMI est supérieur au BP ou à l'ECOFF, par rapport au nombre de mutants-*fks* testés

	BP CLSI (*)			ECOFF Bordeaux		
	CAS	MIC	ANI	CAS	MIC	ANI
<i>C. albicans</i>	3 (1/1)	3 (1/1)	0 (0/0)	4 (1/1)	11 (1/1)	9 (0/0)
<i>C. glabrata</i>	36 (6/6)	9 (5/6)	8 (4/6)	11 (5/6)	11 (6/6)	19 (6/6)
<i>C. tropicalis</i>	0 (0/1)	1 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	1 (1/1)	3 (1/1)
<i>C. parapsilosis</i>	3 (1/1)	3 (1/1)	9 (0/0)	3 (1/1)	1 (1/1)	8 (0/0)

(*) : *C. albicans* et *C. tropicalis* $\geq 0,5$ mg/L ; *C. parapsilosis* ≥ 4 mg/L pour l'ensemble des échinocandines
C. glabrata, $\geq 0,25$ mg/L pour la caspofungine et l'anidulafungine, $\geq 0,12$ mg/L pour la micafungine

Au total, seize souches de *Candida spp*, toutes isolées avant le 1er janvier 2016, présentaient des valeurs de CMIs supérieures aux ECOFFs calculés pour au moins deux échinocandines. Le séquençage nucléotidique des régions HS a montré que 9 d'entre elles portaient des mutations au niveau des régions HS des gènes *FKS* (tableau 7.4). La mutation la plus fréquemment décrite dans la littérature affectant la sérine en 5ème position du HS1 a été identifiée chez 6 souches : (i) une souche de *C. albicans* (mutation homozygote) ; (ii) 4 souches de *C. glabrata* provenant d'un même patient (S629P-Fks1p) ; (iii) une souche de *C. glabrata* (S663P-Fks2p). Les 4 souches de *C. glabrata* isolées du même patient, porteuse de la mutation S629P-Fks1p, présentent des valeurs de CMIs différentes. En effet, la souche isolée d'une hémoculture (n°1185) présentait des CMIs peu élevées (0,25 mg/L pour la caspofungine, et 0,094 mg/L pour la micafungine et l'anidulafungine), tandis que la souche urinaire (n°1195) avait des CMIs élevées aux échinocandines (>32 mg/L pour la caspofungine et 8 mg/L pour la micafungine et l'anidulafungine) et au fluconazole (>256 mg/L). Cet exemple illustre la problématique de la large distribution des CMIs des souches mutées sur les gènes *FKS*, responsable de la difficulté à établir des BPs adaptés à l'espèce et à la détection des mutants *FKS*. Les autres mutations identifiées affectent le 1er ($\Delta 641$ *C. glabrata*) ou le 7ème acide aminé (*C. tropicalis*, mutation hétérozygote) de la protéine *FKS*. Une mutation à proximité immédiate du HS2 a aussi été retrouvée chez un isolat de *C. parapsilosis*, cette mutation n'ayant, à notre connaissance, jamais été décrite. Les 9 mutants *FKS* ont été classés comme résistants à au moins une échinocandine (tableau 7.3 et 7.4). Dans la pratique, c'est l'analyse combinée des valeurs de CMI obtenues pour les 3 échinocandines qui permet une bonne classification de ces mutants *FKS*.

Figure 7.2 – Répartition des CMI en échinocandines pour *C. albicans* et *C. glabrata*

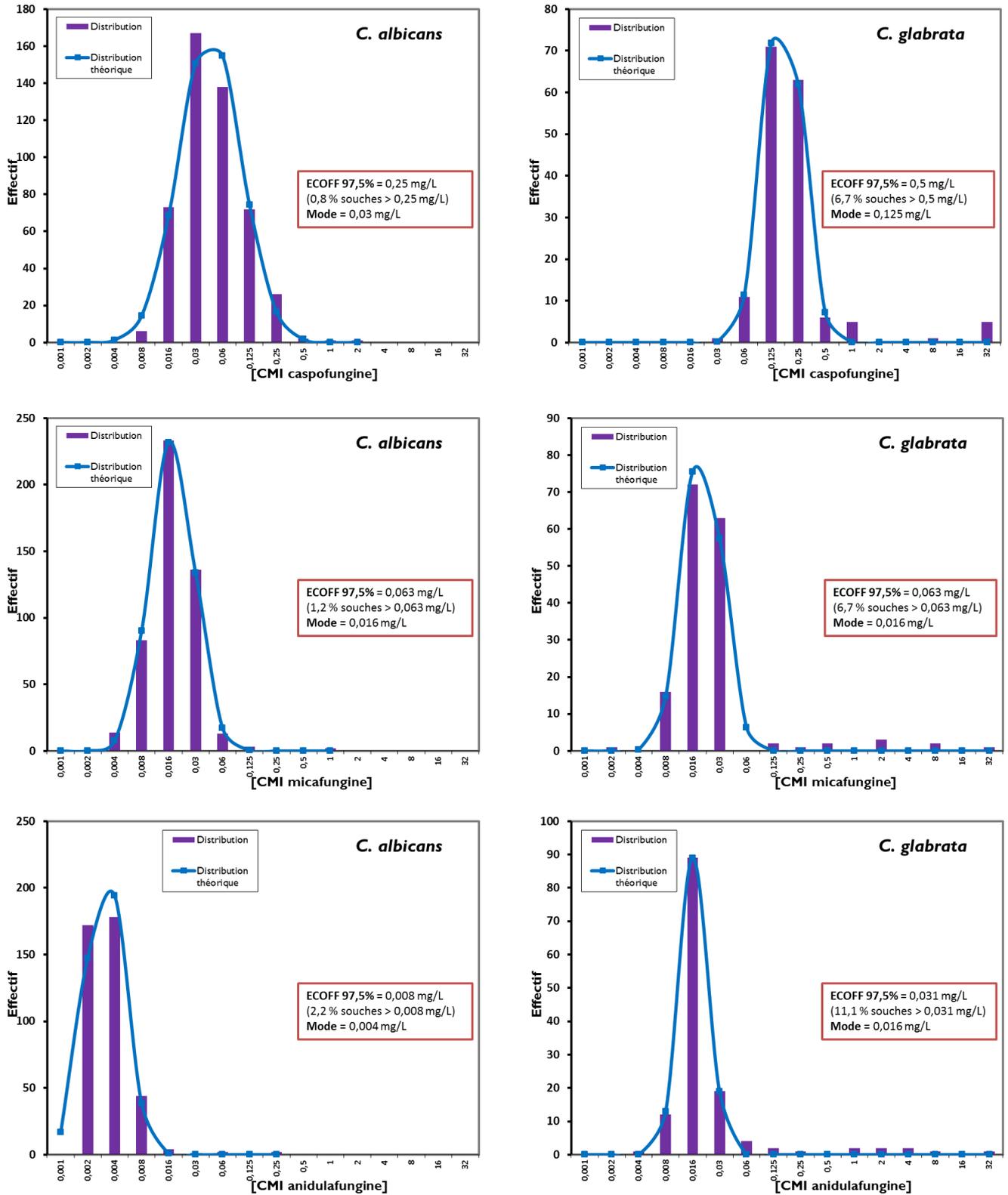


Figure 7.3 – Répartition des CMI en échinocandines pour *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*

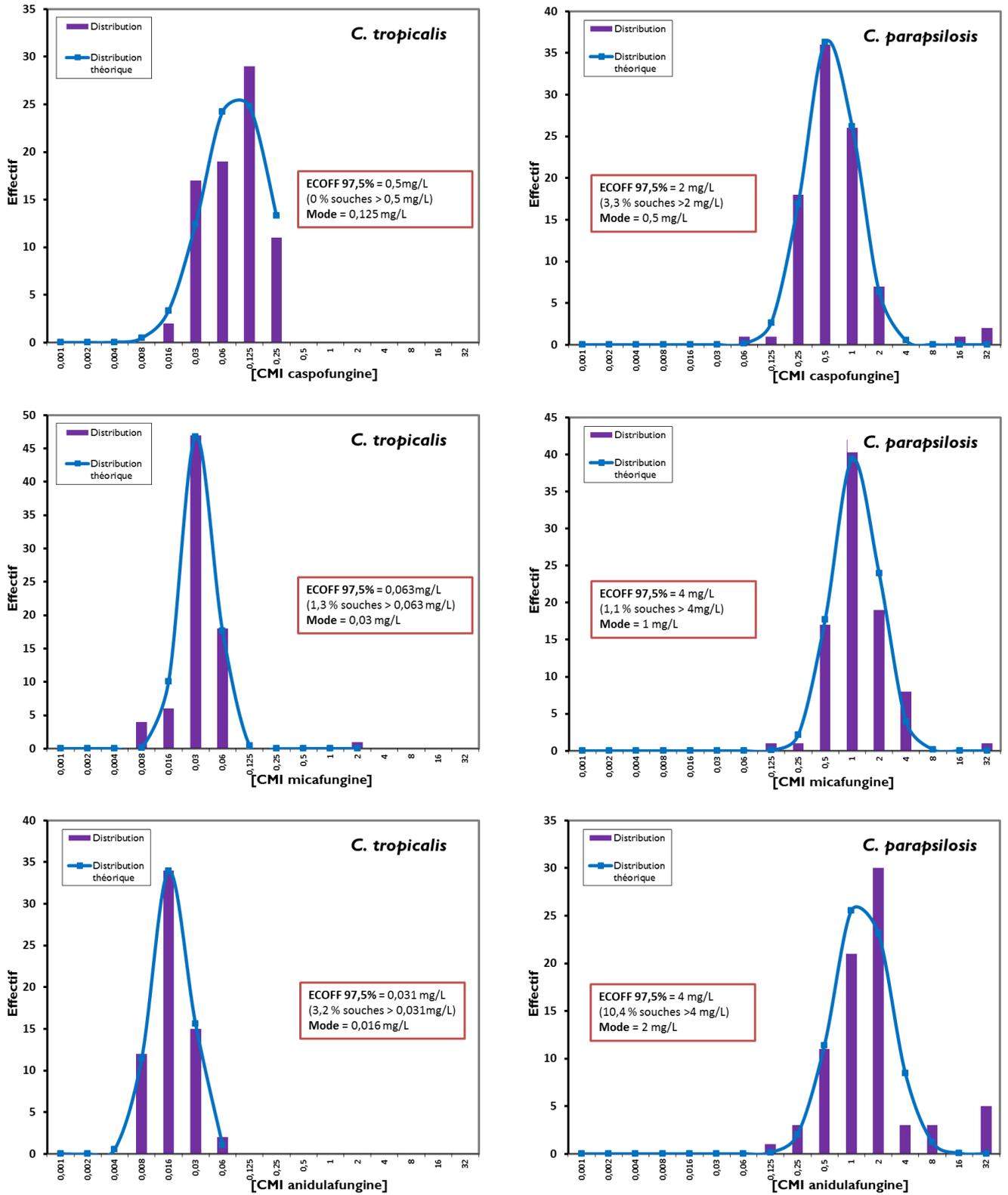


Tableau 7.4 – Sensibilité aux échinocandines des souches de *Candida spp* présentant une mutation *fkS* isolées au CHU de Bordeaux (2014-2016)

Patient	Numéro d'isolat	Espèce	Localisation de l'isolement	Concentrations minimales inhibitrices par méthode				Séquences des gènes <i>FKS</i>	
				CAS	MIC	ANI	FLC	HS1- <i>FKS1</i>	HS2- <i>FKS1</i>
1	1078	<i>C. tropicalis</i>	Liquide péritonéal	0,25	1	0,25	0,5	FFLTLSLGDPIR	NT
2	500	<i>C. parapsilosis</i>	Hémoculture	> 32	4	NT		FFLTLSLRDAIR	DWRRYTLSIFTV
3	1040	<i>C. glabrata</i>	Hémoculture	> 32	> 32	> 32	> 256	YFLLSLRDPPIR	DWVRRYTL
4	1185	<i>C. glabrata</i>	Hémoculture	0,25	0,094	0,094	4	YFLLPLRDPPIR	DWRRYTL
	1195	<i>C. glabrata</i>	Urine	>32	8	8	> 246	YFLLSLRDPPIR	DWVRRYTL
	1205	<i>C. glabrata</i>	Bile	>32	6	3	8	YFLLPLRDPPIR	DWRRYTL
	1206	<i>C. glabrata</i>	Bile	0,75	0,19	0,19	>256	YFLLSLRDPPIR	DWRRYTL
5	1454	<i>C. glabrata</i>	Urine	8	2	2	32	YΔLILSLRDPPIR	DWVRRYTL
6	751	<i>C. albicans</i>	Liquide péritonéal	2	0,75	NT	4	FFTLPLRDPPIR	DWRRYTL

Typiquement, la résistance aux échinocandines survient après un traitement prolongé, même si on peut parfois l'observer rapidement après l'initiation du traitement. 5 patients ont été pré-exposés aux échinocandines avant l'isolement des souches *fks*-muté :

- Le patient n°1 a été traité de manière discontinue par caspofungine durant près de 60 jours avant l'isolement de la souche de *C. tropicalis*.
- Le patient n°2, allogreffé de moelle osseuse, a reçu durant les 3 mois précédant l'isolement de la souche de *C. parapsilosis* résistante, 3 fois de la caspofungine, par période de 10 à 15 jours.
- Le patient n°3, également allogreffé de moelle osseuse, qui n'a pas été suivi qu'au CHU de Bordeaux, a été traité au mois d'Août pour une candidémie à *C. glabrata* (souche 1040 isolée en décembre).
- Lors de l'isolement de la souche de *C. glabrata* chez le patient n°5, ce dernier recevait de la caspofungine depuis 30 jours.
- Le patient n°6 a reçu près de 60 jours de traitement par caspofungine dans les 3 mois précédant l'isolement de la souche de *C. albicans* résistante.

Aucune notion de traitement antérieur par une échinocandine n'a pu être retrouvé dans le dossier patient informatisé du patient n°4.

Deux des 6 patients (patients 2 et 3) ont présenté une candidémie due à une souche mutée dans les 30 jours suivant leur exposition aux échinocandines. La pré-exposition aux échinocandines est un facteur de risque connu de développer une candidémie due à une espèce de moindre sensibilité aux échinocandines [193, 19]. Trois souches mutées dans le gène *FKS* ont été isolées d'un prélèvement abdominal. Dans leur étude portant sur 25 patients atteints de candidose intra abdominale et traités par une échinocandine pendant une période médiane de 42 jours (4 à 438 jours), Shields et *al.* [175] ont montré que 24% (6/25) d'entre eux étaient infectés par une souche mutée dans les gènes *FKS*. La durée médiane d'exposition à l'échinocandine était plus longue chez les patients infectés par le mutant *FKS* que chez ceux infectés par un isolat de type sauvage (119 vs 27 jours ; $P < 0,01$). D'après les auteurs, les souches de *Candida spp fks*-muté émergent dans la cavité abdominale, l'arbre biliaire ou les abcès en raison de l'exposition prolongée dans ces sites profonds à des concentrations sous inhibitrices en échinocandine. Il apparaît donc important de connaître son épidémiologie locale et de surveiller l'apparition de ces souches de *Candida spp* de sensibilité diminuée aux échinocandines par la détermination des CMI en échinocandines et le séquençage des gènes *FKS* en cas d'élévation anormale de la CMI par rapport à celle de la population sauvage, en particulier chez des patients pré-exposés.

Depuis la mise sur le marché en 2001 de la caspofungine, puis de la micafungine et de l'anidulafungine, l'utilisation des échinocandines s'est développée, plaçant la caspofungine en deuxième position des antifongiques les plus consommés dans les services de réanimation [52]. Malgré cette consommation accrue, l'incidence des souches résistantes aux échinocandines reste limitée. Le principal mécanisme moléculaire de résistance repose sur l'acquisition de mutations dans les gènes *FKS* codant l'enzyme inhibée par les échinocandines, la β -(1-3)-D-glucane synthétase. La présence d'une mutation des gènes *FKS*, en particulier dans les deux régions « Hot-Spot » (HS1 et HS2), a été décrite comme un facteur de risque d'échec au traitement par échinocandines [180, 178]. Le diagnostic phénotypique de la résistance aux échinocandines repose sur la détermination *in vitro* des CMI en échinocandines. Les valeurs seuil d'interprétation clinique (BPs) des CMI établies par le CLSI et l'EUCAST ont été révisées en 2012 et adaptées à l'espèce de *Candida* afin de permettre une meilleure classification des souches mutées dans les gènes *FKS* en souches résistantes. La surveillance de l'épidémiologie locale avec la détermination des valeurs seuils épidémiologiques (ou ECOFFs) pour les principales espèces de *Candida* isolées est essentielle pour optimiser la sensibilité du diagnostic phénotypique et son utilité clinique. Le diagnostic moléculaire de la résistance aux échinocandines par la recherche des mutations dans les régions HS des gènes *FKS1* et *FKS2* est en plein essor. Différentes techniques ont été développées comme la PCR en temps réel, le séquençage nouvelle génération, ou la technique Luminex, certaines permettant d'analyser dans le même temps des gènes impliqués dans la résistance à d'autres classes d'antifongiques [153, 51, 10, 75]. La principale limite de ces tests est qu'ils ne s'intéressent qu'aux régions HS des gènes *FKS*. Or, compte tenu de la disparité des CMI en échinocandines chez des souches portant la même mutation, de la description de souches résistantes sans mutation identifiée [83], l'implication de mutations dans des régions non étudiées ou la mise en place de mécanismes adaptatifs peuvent être suspectées. Par ailleurs, la démonstration de l'impact de la mutation sur la résistance n'a pas toujours été effectuée et leur caractérisation n'a jamais été réalisée par un remplacement d'allèle complet dans une levure du clade CTG des *Candida*.

Dans ce travail, nous avons construit une souche de *Candida lusitaniae* génétiquement modifiée pour effectuer un remplacement d'allèle complet *FKS1*, dans un fond génétique double mutant auxotrophe (Ura- et Trp-). Cette souche a été construite en lui apportant en amont et en aval du gène *FKS1* des demi-marqueurs d'auxotrophie (5' *TRP1* et 3' *URA3*). Ces demi-marqueurs sont physiquement et fonctionnellement restaurés lors du remplacement d'allèle *FKS1*. Cette souche « réceptrice » a été contrôlée de façon multiple au niveau moléculaire par des approches de PCR, du séquençage nucléotidique et une

caractérisation approfondie par Southern-Blot.

Pour pallier les problèmes liés à la grande taille du gène *FKS* (environ 6 kb), le remplacement d'allèle a été effectué en transformant cette souche avec deux fragments d'ADN, portant chacun la partie complémentaire des marqueurs d'auxotrophie, et une partie d'un allèle *FKS1* muté. Nous avons démontré qu'une recombinaison *in-cellulo* des deux fragments dans *C. lusitaniae* était possible pour des zones de chevauchement de 40 à 400 pb, et pour une taille de fragments jusqu'à 5,5 kb. Bien que cette technique ait déjà été développée chez *S. cerevisiae* [76, 118] et *K. lactis* [56], aucune donnée n'était disponible quant à la faisabilité de cette approche chez des levures du clade CTG des *Candida*.

Nous avons validé notre modèle cellulaire en le transformant avec des allèles de *FKS1* portant des mutations dans les régions Hot-Spot. Ces mutations avaient été décrites comme responsables d'une augmentation des CMI vis-à-vis des échinocandines [138, 149, 189]. Nous retrouvons une augmentation de CMI d'un facteur 10 pour la mutation F641V et d'un facteur 200 pour les mutations S645P et R1361G. Ces résultats sont en accord avec les CMI décrites chez des souches résistantes isolées de patients. Les premiers isolats cliniques présentant des mutations des gènes *FKS* ont été découverts dès l'utilisation de la caspofungine, dans l'étude clinique portant sur l'évaluation de l'efficacité et de la sécurité de la caspofungine entre 2000 et 2002 [138].

Le modèle cellulaire développé constitue donc un nouvel outil permettant de caractériser de façon fiable, simple et rapide les mutations *fks* par remplacement d'allèle *FKS1* complet. C'est un outil accessible et facile à manipuler. L'introduction de la mutation à étudier est réalisée par une simple réaction de PCR à l'aide d'amorces spécifiques et transformation de la souche « réceptrice » 35TA, *trp1Δ/2*, *ura3Δ/2* par électroporation. L'expression de l'allèle *FKS1* transformé est régulée dans la levure modèle par le promoteur et le terminateur du gène *FKS1* de *C. lusitaniae*. Tous les mutants obtenus possèdent le même fond génétique, ce qui permet de les comparer entre eux et à la souche sauvage de *C. lusitaniae* et d'évaluer l'impact des mutations *FKS* introduites. Par ailleurs, dans notre modèle *C. lusitaniae*, la régulation des gènes *FKS* est proche de celle des autres espèces du genre *Candida* en comparaison aux modèles d'expression utilisant *S. cerevisiae*, phylogénétiquement assez éloigné du clade CTG des *Candida*.

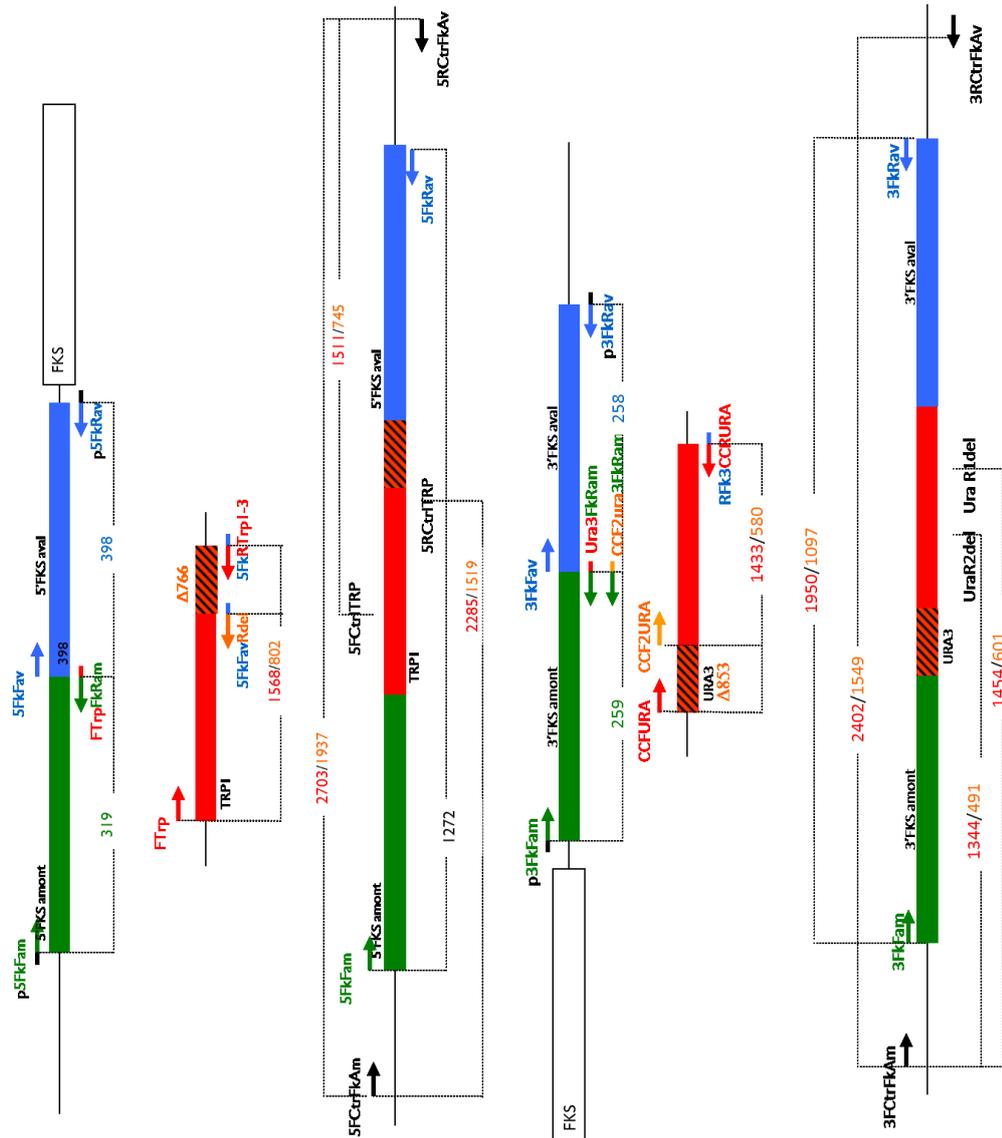
D'autres mutations ont été caractérisées (Master 2, Camille Letellier). L'allèle *FKS1* sauvage de *C. parapsilosis*, espèce naturellement moins sensible aux échinocandines, possède une substitution P660A dans le HS1 (FLTSLRDA). L'introduction de cette mutation dans l'allèle *FKS1* de *C. lusitaniae* s'est traduite par une augmentation de la CMI en caspofungine d'un facteur 6 (CMI 0,125 → 0,75 mg/L). Notre modèle cellulaire a donc permis de confirmer pour la première fois dans une levure du clade CTG des *Candida*, que le polymorphisme naturel à l'extrémité C-terminale de la région HS1 du gène *FKS1* de *C. parapsilosis* est bien responsable des valeurs de CMI intrinsèquement plus élevées chez cette espèce. L'allèle *FKS1* muté de l'isolat clinique de *C. parapsilosis* (isolat n°500, patient 2, tableau 7.4) résistant aux échinocandines (CMI > 32 mg/L) est porteur du polymorphisme P660A et de la mutation I1380T, située en dehors des régions HS et qui n'a jamais été décrite dans la littérature. L'expression de cette mutation chez *C. lusitaniae* entraîne une augmentation de la CMI d'un facteur 12 (CMI 0,125 → 1,5 mg/L). La possibilité de remplacer l'allèle *FKS1* complet a permis de démontrer qu'une mutation située en dehors des régions HS peut également entraîner une élévation des CMI et surtout que c'est l'association des deux mutations, P660A et I1380T, qui est responsable du phénotype de résistance de l'isolat clinique de *C. parapsilosis* (CMI > 32 mg/L). Le modèle pourra donc permettre d'étudier d'autres mutations, notamment les mutations du gène *FKS2* de *C. glabrata* pour qui la prévalence des mutations de résistance aux échinocandines est en constante augmentation, ou d'étudier également l'effet de l'association de plusieurs mutations sur la résistance, et ainsi d'affiner la localisation des sites

de fixation des échinocandines sur la protéine Fks1p. Ce modèle ouvre également de nouvelles voies d'étude des mutations des gènes *FKS*, avec la possibilité d'étudier par expression hétérologue des allèles complets d'autres espèces fongiques.

Au cours de l'infection, les cellules phagocytaires de l'immunité innée, macrophages et polynucléaires neutrophiles jouent un rôle essentiel dans l'élimination des espèces du genre *Candida* par des mécanismes de phagocytose, de NETose et de relargage de peptides antimicrobiens. L'action de ces cellules protectrices nécessite la reconnaissance du pathogène via des récepteurs de la famille des Pattern-Recognition Receptors (PRRs) capables de reconnaître des motifs conservés spécifiques des pathogènes : les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Chez les *Candida spp.*, les PAMPs comprennent principalement des composés de la paroi cellulaire tels que les mannoprotéines, les sucres β -D-glucanes, le mannose et la chitine. La paroi fongique étant impliquée dans l'interaction avec l'hôte, les souches génétiquement modifiées portant des mutations dans le gène *FKS1* pourraient être utilisées pour des expériences *in vitro* ou *in vivo* visant à étudier le rôle direct ou indirect que peuvent jouer les mutations *fks* lors de l'interaction des isolats résistants de *Candida spp* avec les cellules immunitaires de l'hôte. Comme évoqué dans l'étude de Lackner et *al.* [105], c'est probablement le nombre et la position des mutations dans les gènes *FKS* des *Candida spp.* qui déterminent l'augmentation des CMI, la réponse au traitement *in vivo* et la virulence.

Liste des amorces utilisées pour la construction de la souche de *Candida lusitanae* génétiquement modifiée

5invURA3	ATGCCTCTGCAAGTGAAGTG
CCF2ura3FkFam	CCGCCTTTTCAACCTGTACAAATGGAAACATCGAGCCG
5FCtrITRP-2	TGGCTACGAACACACAGAGG
5FCtrITRP	CAACAATTGCGAGCCATGATCT
3FCtrIFkAm	GAAGCCAACAAGACTTATCAGACCAC
3RCtrIFkAv	GGCTATGTTGCCCTCCCTGAG
3RCtrIURA	CTTGTGCCCTCTTTCAACC
5FCtrIFkAm	TGGCATCGCGTGAATAATCTC
5RCtrIFkAv	AGTACTCGCCACCCTGTTGAA
5RCtrITRP	ACACCAACTAAGAGGGACCGT
5FkFavRdel	TTACATAATCTTCTTGTCTTCACTCCCATGTAGCTGG
5FkRTRP1-3	TTACATAATCTTCTAGTCTTGGCGGAAACGCTCG
p3FkFam	CGGTACCCGGGATCCCTCTGTGGCGTCTAAGTTC
3FkFam	CCTGTGTGGCGTCTAAGTTC
Ura3FkRam	TCTGCCATCAACGGGTGACAAATGGAAACATCGAGCCG
RFk3CCRURA	ATACATTAATGTACCGAGATGACATTCCTCATTCAAATGCT
RFk3UraR2del	ATACATTAATGTACTGGTATTCCCCATAGGCCAA
3FkFav	GTACATTTAATGTATTCTATTGCTAAATCACTTCGTAGG
3FkRav	CCTCATGGTCTGATCTGCC
p3FkRav	CGACTAGAGGATCCCTCATGCTGTGATCTGCC
ccFURA	CCCGTTGATGGCAGAGTTGGT
ccRURA	CGAGATGACATTTCCATTCAAATGCT
5FkFam	CGATCTACAATAGACACACAAATACGG
p5FkFam	CGGTACCCGGGATCCGATCTACAATAGACACCAATACGG
FTrp5FkRam	GAACCTTCAACAAGGTTCTCAGACAAAGCAACCCAC
FTrp	CCTTGTGAAAGTTACCCGATTTTGG
5FkFavRTrp	TTACATAATCTTCTCCCGAGAGTGAAGCAGATAC
5FkFav	AGGAAGATTATGAAGGCGATGAACACTAC
5FkRav	AGATATCAACCACGAAGTTCCGAATCAAG
p5FkRav	CGACTAGAGGATCAGATATCAACCACGAAGTTCGAATCAAG



- [1] B. D. ALEXANDER, M. D. JOHNSON, C. D. PFEIFFER, C. JIMÉNEZ-ORTIGOSA, J. CATANIA, R. BOOKER, M. CASTANHEIRA, S. A. MESSER, D. S. PERLIN, AND M. A. PFALLER, *Increasing Echinocandin Resistance in Candida glabrata : Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations*, *Clinical Infectious Diseases*, 56 (2013), pp. 1724–1732.
- [2] T. M. ANDERSON, M. C. CLAY, A. G. CIOFFI, K. A. DIAZ, G. S. HISAO, M. D. TUTTLE, A. J. NIEUWKOOP, G. COMELLAS, N. MARYUM, S. WANG, B. E. UNO, E. L. WILDEMAN, T. GONEN, C. M. RIENSTRA, AND M. D. BURKE, *Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge*, *Nature Chemical Biology*, 10 (2014), pp. 400–406.
- [3] E. ANDRÈS, M. TIPHINE, V. LETSCHER-BRU, AND R. HERBRECHT, *Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B*. *Revue de la littérature*, *La revue de médecine interne*, 22, pp. 141–150.
- [4] ANSM, *Recommandations du Comité des médicaments à usage humain (CHMP) relatives à l'utilisation du métoprolol, du kétoconazole par voie orale et des incrétinomimétiques.*, July 2013.
- [5] M. C. ARENDRUP, E. DZAJIC, R. H. JENSEN, H. K. JOHANSEN, P. KJÆLDGAARD, J. D. KNUDSEN, L. KRISTENSEN, C. LEITZ, L. E. LEMMING, L. NIELSEN, B. OLESEN, F. S. ROSENVINGE, B. L. RØDER, AND H. C. SCHØNHEYDER, *Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia : data from a nationwide fungaemia surveillance programme*, *Clinical Microbiology and Infection*, 19 (2013), pp. E343–E353.
- [6] M. C. ARENDRUP, M. A. PFALLER, AND T. D. F. S. GROUP, *Caspofungin Etest Susceptibility Testing of Candida Species : Risk of Misclassification of Susceptible Isolates of C. glabrata and C. krusei when Adopting the Revised CLSI Caspofungin Breakpoints*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (2012), pp. 3965–3968.
- [7] M. C. ARENDRUP, S. SULIM, A. HOLM, L. NIELSEN, S. D. NIELSEN, J. D. KNUDSEN, N. E. DRENCK, J. J. CHRISTENSEN, AND H. K. JOHANSEN, *Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungaemia ?*, *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (2011), pp. 3300–3308.
- [8] C. J. ARNOLD, M. JOHNSON, A. S. BAYER, S. BRADLEY, E. GIANNITSIOTI, J. M. MIRÓ, P. TORNOS, P. TATTEVIN, J. STRAHILEVITZ, D. SPELMAN, E. ATHAN, F. NACINOVICH, C. Q. FORTES, C. LAMAS, B. BARSIC, N. FERNÁNDEZ-HIDALGO, P. MUÑOZ, AND V. H. CHU, *Candida infective endocarditis : an observational cohort study with a focus on therapy*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (2015), pp. 2365–2373.
- [9] T. AVNI, L. LEIBOVICI, AND M. PAUL, *PCR Diagnosis of Invasive Candidiasis : Systematic Review and Meta-Analysis*, *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (2011), pp. 665–670.
- [10] S. V. BALASHOV, S. PARK, AND D. S. PERLIN, *Assessing Resistance to the Echinocandin Antifungal Drug Caspofungin in Candida albicans by Profiling Mutations in FKS1*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2006), pp. 2058–2063.
- [11] M. BASSETTI, M. MARCHETTI, A. CHAKRABARTI, S. COLIZZA, J. GARNACHO-MONTERO, D. H. KETT, P. MUNOZ, F. CRISTINI, A. ANDONIADOU, P. VIALE, G. D. ROCCA, E. ROILIDES, G. SGANGA, T. J. WALSH, C. TASCINI, M. TUMBARELLO, F. MENICCHETTI, E. RIGHI, C. ECKMANN, C. VISCOLI, A. F. SHORR, O. LEROY, G. PETRIKOS, AND F. G. D. ROSA, *A research agenda on the management of intra-abdominal candidiasis : results from a consensus of multinational experts*, *Intensive Care Medicine*, 39 (2013), pp. 2092–2106.
- [12] M. BASSETTI, M. MERELLI, E. RIGHI, A. DIAZ-MARTIN, E. M. ROSELLO, R. LUZZATI, A. PARRA, E. M. TRECARCHI, M. SANGUINETTI, B. POSTERARO, J. GARNACHO-MONTERO, A. SARTOR, J. RELLO, AND M. TUMBARELLO, *Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility, and Outcome of Candidemia across Five Sites in Italy and Spain*, *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (2013), pp. 4167–4172.

Bibliographie

- [13] M. BASSETTI, E. RIGHI, F. ANSALDI, M. MERELLI, C. SCARPARO, M. ANTONELLI, J. GARNACHO-MONTERO, A. DIAZ-MARTIN, I. PALACIOS-GARCIA, R. LUZZATI, C. ROSIN, L. LAGUNES, J. RELLO, B. ALMIRANTE, P. G. SCOTTON, G. BALDIN, G. DIMOPOULOS, M. NUCCI, P. MUNOZ, A. VENA, E. BOUZA, V. DE EGEE, A. L. COLOMBO, C. TASCINI, F. MENICETTI, E. TAGLIAFERRI, P. BRUGNARO, M. SANGUINETTI, A. MESINI, G. SGANGA, C. VISCOLI, AND M. TUMBARELLO, *A multicenter multinational study of abdominal candidiasis : epidemiology, outcomes and predictors of mortality*, Intensive Care Medicine, 41 (2015), pp. 1601–1610.
- [14] R. BEN-AMI, G. GARCIA-EFFRON, R. E. LEWIS, S. GAMARRA, K. LEVENTAKOS, D. S. PERLIN, AND D. P. KONTOYIANNIS, *Fitness and Virulence Costs of Candida albicans FKS1 Hot Spot Mutations Associated With Echinocandin Resistance*, Journal of Infectious Diseases, 204 (2011), pp. 626–635.
- [15] G. BILLS, Y. LI, L. CHEN, Q. YUE, X.-M. NIU, AND Z. AN, *New insights into the echinocandins and other fungal non-ribosomal peptides and peptaibiotics*, Natural Product Reports, 31 (2014), pp. 1348–1375.
- [16] D. BITAR, O. LORTHOLARY, F. DROMER, B. COIGNARD, AND D. CHE, *Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI 2001-2010 : incidence, létalité et tendances*, Bull Epidémiol Hebd., 12-13 (2013), pp. 109–114.
- [17] D. BITAR, O. LORTHOLARY, Y. LE STRAT, J. NICOLAU, B. COIGNARD, P. TATTEVIN, D. CHE, AND F. DROMER, *Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010*, Emerging Infectious Diseases, 20 (2014), pp. 1149–1155.
- [18] F. C. BIZERRA, A. S. A. MELO, E. KATCHBURIAN, E. FREYMÜLLER, A. H. STRAUS, H. K. TAKAHASHI, AND A. L. COLOMBO, *Changes in Cell Wall Synthesis and Ultrastructure during Paradoxical Growth Effect of Caspofungin on Four Different Candida Species*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55 (2011), pp. 302–310.
- [19] E. BLANCHARD, O. LORTHOLARY, K. BOUKRIS-SITBON, M. DESNOS-OLLIVIER, F. DROMER, D. GUILLEMOT, AND T. F. M. S. GROUP, *Prior Caspofungin Exposure in Patients with Hematological Malignancies Is a Risk Factor for Subsequent Fungemia Due to Decreased Susceptibility in Candida spp. : a Case-Control Study in Paris, France*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55 (2011), pp. 5358–5361.
- [20] B. BODAGHI, *Les endophtalmies endogènes d'origine fongique*, Journal Français d'Ophtalmologie, 34 (2011), pp. 40–45.
- [21] M. E. BOUGNOUX, E. DANNAOUI, I. ACCOCEBERRY, A. ANGOULVANT, E. BAILLY, F. BOTTEREL, S. CHEVRIER, T. CHOUAKI, M. CORNET, F. DALLE, A. DATRY, A. DUPUIS, A. FEKKAR, J. P. GANGNEUX, J. GUITARD, C. HENNEQUIN, Y. LEGOVIC, P. L. PAPE, D. MAUBON, S. RANQUE, M. SAUTOUR, B. SENDID, AND J. CHANDENIER, *Multicenter comparison of the Etest® and EUCAST for antifungal susceptibility testing of Candida isolates to micafungin*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (2016).
- [22] N. BOURGEOIS, C. LAURENS, S. BERTOUT, Y. BALARD, D. KRASTEVA, P. RISPAIL, AND L. LACHAUD, *Assessment of caspofungin susceptibility of Candida glabrata*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 33 (2014), pp. 1247–1252.
- [23] S. M. BOWMAN AND S. J. FREE, *The structure and synthesis of the fungal cell wall*, BioEssays, 28 (2006), pp. 799–808.
- [24] S. BRUNKE AND B. HUBE, *Two unlike cousins : Candida albicans and C. glabrata infection strategies*, Cellular Microbiology, 15 (2013), pp. 701–708.
- [25] G. CAGGIANO, F. PUNTILLO, C. CORETTI, M. GIGLIO, I. ALICINO, F. MANCA, F. BRUNO, AND M. T. MONTAGNA, *Candida Colonization Index in Patients Admitted to an ICU*, International Journal of Molecular Sciences, 12 (2011), pp. 7038–7047.
- [26] S. CARLE, *Les antifongiques dans le traitement des infections invasives*, Pharmactuel, 36 (2003).
- [27] E. D. CAROLIS, A. VELLA, A. R. FLORIO, P. POSTERARO, D. S. PERLIN, M. SANGUINETTI, AND B. POSTERARO, *Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Caspofungin Susceptibility Testing of Candida and Aspergillus Species*, Journal of Clinical Microbiology, 50 (2012), pp. 2479–2483.
- [28] C. CASSAGNE, A.-C. NORMAND, C. L'OLLIVIER, S. RANQUE, AND R. PIARROUX, *Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification*, Mycoses, (2016).
- [29] M. CASTANHEIRA, S. A. MESSER, P. RHOMBERG, R. DIETRICH, R. N. JONES, AND M. A. PFALLER, *Activity of Echinocandins and Triazoles Against a Contemporary (2012) Worldwide Collection of Yeast and Moulds Collected from Invasive Infections*, Poster 1431 IDWEEK, 2013, p. Poster 1431 IDWEEK.
- [30] M. CASTANHEIRA, S. A. MESSER, P. R. RHOMBERG, AND M. A. PFALLER, *Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates : results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013)*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 85 (2016), pp. 200–204.
- [31] M. CASTANHEIRA, L. N. WOOSLEY, D. J. DIEKEMA, S. A. MESSER, R. N. JONES, AND M. A. PFALLER, *Low Prevalence of fks1 Hot Spot 1 Mutations in a Worldwide Collection of Candida Strains*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54 (2010), pp. 2655–2659.
- [32] D. CHABASSE, *Classification des champignons d'intérêt médical*, Encycl Méd Chir (Elsevier Masson, Paris), (2008).

Bibliographie

- [33] W. L. CHAFFIN, *Candida albicans Cell Wall Proteins*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72 (2008), pp. 495–544.
- [34] G. CHAMILOS, R. E. LEWIS, N. ALBERT, AND D. P. KONTOYIANNIS, *Paradoxical Effect of Echinocandins across Candida Species In Vitro : Evidence for Echinocandin-Specific and Candida Species-Related Differences*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51 (2007), pp. 2257–2259.
- [35] F. CHOUKRI, M. BENDERDOUCHE, AND P. SEDNAOUI, *In vitro susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of Candida spp. to topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agents*, Journal De Mycologie Médicale, 24 (2014), pp. 303–307.
- [36] C. J. CLANCY, H. HUANG, S. CHENG, H. DERENDORF, AND M. H. NGUYEN, *Characterizing the Effects of Caspofungin on Candida albicans, Candida parapsilosis, and Candida glabrata Isolates by Simultaneous Time-Kill and Postantifungal-Effect Experiments*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50 (2006), pp. 2569–2572.
- [37] C. J. CLANCY AND M. H. NGUYEN, *Finding the “Missing 50%” of Invasive Candidiasis : How Nonculture Diagnostics Will Improve Understanding of Disease Spectrum and Transform Patient Care*, Clinical Infectious Diseases, 56 (2013), pp. 1284–1292.
- [38] O. A. CORNELLY, M. BASSETTI, T. CALANDRA, J. GARBINO, B. J. KULLBERG, O. LORTHOLARY, W. MEERSSEMAN, M. AKOVA, M. C. ARENDRUP, S. ARIKAN-AKDAGLI, J. BILLE, E. CASTAGNOLA, M. CUENCA-ESTRELLA, J. P. DONNELLY, A. H. GROLL, R. HERBRECHT, W. W. HOPE, H. E. JENSEN, C. LASS-FLÖRL, G. PETRIKKOS, M. D. RICHARDSON, E. ROILIDES, P. E. VERWEIJ, C. VISCOLI, A. J. ULLMANN, AND FOR THE ESCMID FUNGAL INFECTION STUDY GROUP (EFISG), *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012 : non-neutropenic adult patients*, Clinical Microbiology and Infection, 18 (2012), pp. 19–37.
- [39] O. A. CORNELLY, B. GACHOT, H. AKAN, M. BASSETTI, O. UZUN, C. KIBBLER, O. MARCHETTI, P. D. BURGHGRAEVE, S. RAMADAN, L. PYLKKANEN, L. AMEYE, M. PAESMANS, P. J. DONNELLY, O. B. O. T. E. I. D. GROUP, O. A. CORNELLY, B. GACHOT, H. AKAN, M. BASSETTI, O. UZUN, C. C. KIBBLER, O. MARCHETTI, J. BILLE, P. D. BURGHGRAEVE, L. PYLKKANEN, L. AMEYE, M. PAESMANS, AND P. J. DONNELLY, *Epidemiology and Outcome of Fungemia in a Cancer Cohort of the Infectious Diseases Group (IDG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC 65031)*, Clinical Infectious Diseases, 61 (2015), pp. 324–331.
- [40] L. CORONADO-CASTELOTE AND Y. JIMÉNEZ-SORIANO, *Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis*, Journal of Clinical and Experimental Dentistry, 5 (2013), pp. e279–286.
- [41] M. CUENCA-ESTRELLA, A. GOMEZ-LOPEZ, A. ALASTRUEY-IZQUIERDO, L. BERNAL-MARTINEZ, I. CUESTA, M. J. BUITRAGO, AND J. L. RODRIGUEZ-TUDELA, *Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for In Vitro Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates*, Journal of Clinical Microbiology, 48 (2010), pp. 1782–1786.
- [42] M. CUENCA-ESTRELLA, P. E. VERWEIJ, M. C. ARENDRUP, S. ARIKAN-AKDAGLI, J. BILLE, J. P. DONNELLY, H. E. JENSEN, C. LASS-FLÖRL, M. D. RICHARDSON, M. AKOVA, M. BASSETTI, T. CALANDRA, E. CASTAGNOLA, O. A. CORNELLY, J. GARBINO, A. H. GROLL, R. HERBRECHT, W. W. HOPE, B. J. KULLBERG, O. LORTHOLARY, W. MEERSSEMAN, G. PETRIKKOS, E. ROILIDES, C. VISCOLI, A. J. ULLMANN, AND FOR THE ESCMID FUNGAL INFECTION STUDY GROUP (EFISG), *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012 : diagnostic procedures*, Clinical Microbiology and Infection, 18 (2012), pp. 9–18.
- [43] R. E. CUTLER, A. D. BLAIR, AND M. R. KELLY, *Flucytosine kinetics in subjects with normal and impaired renal function*, Clinical Pharmacology & Therapeutics, 24 (1978), pp. 333–342.
- [44] E. DANNAOUI, M. DESNOS-OLLIVIER, D. GARCIA-HERMOSO, F. GRENOUILLET, S. CASSAING, M.-T. BAIXENCH, S. BRETAGNE, F. DROMER, O. LORTHOLARY, AND THE FRENCH MYCOSES STUDY GROUP, *Candida spp. with Acquired Echinocandin Resistance, France, 2004–20101*, Emerging Infectious Diseases, 18 (2012), pp. 86–90.
- [45] B. DE PAUW, T. J. WALSH, J. P. DONNELLY, D. A. STEVENS, J. E. EDWARDS, T. CALANDRA, P. G. PAPPAS, J. MAERTENS, O. LORTHOLARY, C. A. KAUFFMAN, D. W. DENNING, T. F. PATTERSON, G. MASCHMEYER, J. BILLE, W. E. DISMUKES, R. HERBRECHT, W. W. HOPE, C. C. KIBBLER, B. J. KULLBERG, K. A. MARR, P. MUÑOZ, F. C. ODDS, J. R. PERFECT, A. RESTREPO, M. RUHNKE, B. H. SEGAL, J. D. SOBEL, T. C. SORRELL, C. VISCOLI, J. R. WINGARD, T. ZAOUTIS, AND J. E. BENNETT, *Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group*, Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 46 (2008), pp. 1813–1821.
- [46] M. DESNOS-OLLIVIER, O. MOQUET, T. CHOUAKI, A.-M. GUÉRIN, AND F. DROMER, *Development of Echinocandin Resistance in Clavispora lusitanae during Caspofungin Treatment ?*, Journal of Clinical Microbiology, 49 (2011), pp. 2304–2306.

Bibliographie

- [47] B. P. DHAKAL, C. G. TRIBBLE, J. D. BERGIN, S. WINFREY, AND W. H. CARTER, *Recurrent candida prosthetic endocarditis over fifteen years managed with medical therapy and four valvular surgeries : a case report and review of literature*, Journal of Cardiothoracic Surgery, 10 (2015).
- [48] D. J. DIEKEMA, S. A. MESSER, A. B. BRUEGGEMANN, S. L. COFFMAN, G. V. DOERN, L. A. HERWALDT, AND M. A. PFALLER, *Epidemiology of Candidemia : 3-Year Results from the Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms Study*, Journal of Clinical Microbiology, 40 (2002), pp. 1298–1302.
- [49] D. J. DIEKEMA, S. A. MESSER, R. J. HOLLIS, R. P. WENZEL, AND M. A. PFALLER, *An outbreak of Candida parapsilosis prosthetic valve endocarditis*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 29 (1997), pp. 147–153.
- [50] C. F. D’OSTIANI, G. DEL SERO, A. BACCI, C. MONTAGNOLI, A. SPRECA, A. MENCACCI, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, AND L. ROMANI, *Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus Candida albicans. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo*, The Journal of Experimental Medicine, 191 (2000), pp. 1661–1674.
- [51] C. DUDIUK, S. GAMARRA, F. LEONARDELI, C. JIMENEZ-ORTIGOSA, R. G. VITALE, J. AFELTRA, D. S. PERLIN, AND G. GARCIA-EFFRON, *Set of Classical PCRs for Detection of Mutations in Candida glabrata FKS Genes Linked with Echinocandin Resistance*, Journal of Clinical Microbiology, 52 (2014), pp. 2609–2614.
- [52] C. DUMARTIN, A. M. ROGUES, F. L’HÉRITTEAU, AND C. ATB-RAISIN, *M-28 : Première étude multicentrique de la consommation des antifongiques en établissements de santé*, Médecine et Maladies Infectieuses, 44 (2014), p. 73.
- [53] P. EGGIMANN AND D. PITTET, *Candida colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients : 20 years later*, Intensive Care Medicine, 40 (2014), pp. 1429–1448.
- [54] S. EL-KIRAT-CHATEL, K. DEMENTHON, AND T. NOËL, *A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast Candida lusitanae*, Yeast, 28 (2011), pp. 321–330.
- [55] T. EMRI, L. MAJOROS, V. TÓTH, AND I. PÓCSI, *Echinocandins : production and applications*, Applied Microbiology and Biotechnology, 97 (2013), pp. 3267–3284.
- [56] N. ERDENIZ, U. H. MORTENSEN, AND R. ROTHSTEIN, *Cloning-Free PCR-Based Allele Replacement Methods*, Genome Research, 7 (1997), pp. 1174–1183.
- [57] L. P. ERWIG AND N. A. R. GOW, *Interactions of fungal pathogens with phagocytes*, Nature Reviews Microbiology, 14 (2016), pp. 163–176.
- [58] G. ESCHENAUER, D. D. DEPESTEL, AND P. L. CARVER, *Comparison of echinocandin antifungals*, Therapeutics and Clinical Risk Management, 3 (2007), pp. 71–97.
- [59] A. ESPINEL-INGROFF, M. C. ARENDRUP, M. A. PFALLER, L. X. BONFIETTI, B. BUSTAMANTE, E. CANTON, E. CHRYSSANTHOU, M. CUENCA-ESTRELLA, E. DANNAOUI, A. FOTHERGILL, J. FULLER, P. GAUSTAD, G. M. GONZALEZ, J. GUARRO, C. LASS-FLÖRL, S. R. LOCKHART, J. F. MEIS, C. B. MOORE, L. OSTROSKY-ZEICHNER, T. PELAEZ, S. R. B. S. PUKINSKAS, G. ST-GERMAIN, M. W. SZESZS, AND J. TURNIDGE, *Interlaboratory Variability of Caspofungin MICs for Candida spp. Using CLSI and EUCAST Methods : Should the Clinical Laboratory Be Testing This Agent ?*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57 (2013), pp. 5836–5842.
- [60] A. ESPINEL-INGROFF, E. CANTON, J. PAMAN, AND E. MARTÍN-MAZUELO, *Comparison of Anidulafungin MICs Determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Method (M27-A3 Document) and Etest for Candida Species Isolates*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54 (2010), pp. 1347–1350.
- [61] . EUCAST, *Anidulafungin and Candida spp. Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 2.0*, tech. report, 2013.
- [62] . EUCAST, *Micafungin and Candida spp. Rationale for the EUCAST clinical breakpoints.*, tech. report, 2013.
- [63] . EUCAST, *Breakpoint tables for interpretation of MICs V8.0*, tech. report, 2015.
- [64] F. FERNÁNDEZ-SILVA, M. LACKNER, J. CAPILLA, E. MAYAYO, D. SUTTON, M. CASTANHEIRA, A. W. FOTHERGILL, C. LASS-FLÖRL, AND J. GUARRO, *In vitro antifungal susceptibility of Candida glabrata to caspofungin and the presence of FKS mutations correlate with treatment response in an immunocompromised murine model of invasive infection*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58 (2014), pp. 3646–3649.
- [65] G. N. FORREST, E. WEEKES, AND J. K. JOHNSON, *Increasing incidence of Candida parapsilosis candidemia with caspofungin usage*, Journal of Infection, 56 (2008), pp. 126–129.
- [66] E. FOUREAU, V. COURDAVAULT, A. J. SIMKIN, O. PICHON, J. CRÈCHE, N. GIGLIOLI-GUIVARC’H, M. CLASTRE, AND N. PAPON, *Optimization of the URA-blaster disruption system in Candida guilliermondii : efficient gene targeting using the URA3 marker*, Journal of Microbiological Methods, 91 (2012), pp. 117–120.
- [67] P. FOURNIER, C. SCHWEBEL, D. MAUBON, A. VESIN, B. LEBEAU, L. FORONI, R. HAMIDFAR-ROY, M. CORNET, J.-F. TIMSIT, AND H. PELLOUX, *Antifungal use influences Candida species distribution and susceptibility in the intensive care unit*, The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66 (2011), pp. 2880–2886.

- [68] F. FRANÇOIS, F. CHAPELAND-LECLERC, J. VILLARD, AND T. NOËL, *Development of an integrative transformation system for the opportunistic pathogenic yeast Candida lusitanae using URA3 as a selection marker*, *Yeast*, 21 (2004), pp. 95–106.
- [69] J. J. GAGNE AND N. I. GOLDFARB, *Candidemia in the in-patient setting : treatment options and economics*, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8 (2007), pp. 1643–1650.
- [70] M. N. GAMALETSSOU, D. P. KONTOYIANNIS, N. V. SIPSAS, B. MORIYAMA, E. ALEXANDER, E. ROILIDES, B. BRAUSE, AND T. J. WALSH, *Candida Osteomyelitis : Analysis of 207 Pediatric and Adult Cases (1970–2011)*, *Clinical Infectious Diseases*, 55 (2012), pp. 1338–1351.
- [71] G. GARCIA-EFFRON, S. K. KATIYAR, S. PARK, T. D. EDLIND, AND D. S. PERLIN, *A Naturally Occurring Proline-to-Alanine Amino Acid Change in Fks1p in Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis Accounts for Reduced Echinocandin Susceptibility*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (2008), pp. 2305–2312.
- [72] G. GARCIA-EFFRON, S. LEE, S. PARK, J. D. CLEARY, AND D. S. PERLIN, *Effect of Candida glabrata FKS1 and FKS2 Mutations on Echinocandin Sensitivity and Kinetics of 1,3- β -D-Glucan Synthase : Implication for the Existing Susceptibility Breakpoint*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2009), pp. 3690–3699.
- [73] G. GARCIA-EFFRON, S. PARK, AND D. S. PERLIN, *Correlating Echinocandin MIC and Kinetic Inhibition of fks1 Mutant Glucan Synthases for Candida albicans : Implications for Interpretive Breakpoints*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2009), pp. 112–122.
- [74] K. W. GAREY, M. REGE, M. P. PAI, D. E. MINGO, K. J. SUDA, R. S. TURPIN, AND D. T. BEARDEN, *Time to Initiation of Fluconazole Therapy Impacts Mortality in Patients with Candidemia : A Multi-Institutional Study*, *Clinical Infectious Diseases*, 43 (2006), pp. 25–31.
- [75] C. GARNAUD, F. BOTTEREL, N. SERTOUR, M.-E. BOUGNOUX, E. DANNAOUI, S. LARRAT, C. HENNEQUIN, J. GUINEA, M. CORNET, AND D. MAUBON, *Next-generation sequencing offers new insights into the resistance of Candida spp. to echinocandins and azoles*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70 (2015), pp. 2556–2565.
- [76] D. G. GIBSON, G. A. BENDERS, K. C. AXELROD, J. ZAVERI, M. A. ALGIRE, M. MOODIE, M. G. MONTAGUE, J. C. VENTER, H. O. SMITH, AND C. A. HUTCHISON, *One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic Mycoplasma genitalium genome*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (2008), pp. 20404–20409.
- [77] S. GIL-ALONSO, N. JAUREGIZAR, E. ERASO, AND G. QUINDÓS, *Postantifungal Effect of Micafungin against the Species Complexes of Candida albicans and Candida parapsilosis*, *PLOS ONE*, 10 (2015), p. e0132730.
- [78] D. G. GOKCEBAY, N. YARALI, P. ISIK, C. BAYRAM, A. OZKAYA-PARLAKAY, A. KARA, AND B. TUNC, *Candida Associated Bloodstream Infections in Pediatric Hematology Patients : A Single Center Experience*, *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 8 (2016).
- [79] N. A. GOW, F. L. VAN DE VEERDONK, A. J. BROWN, AND M. G. NETEA, *Candida albicans morphogenesis and host defence : discriminating invasion from colonization*, *Nature reviews. Microbiology*, 10 (2011), pp. 112–122.
- [80] J. GUINEA, *Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia*, *Clinical Microbiology and Infection*, 20, Supplement 6 (2014), pp. 5–10.
- [81] Y. E. HA, K. R. PECK, E.-J. JOO, S. W. KIM, S.-I. JUNG, H. H. CHANG, K. H. PARK, AND S. H. HAN, *Impact of First-Line Antifungal Agents on the Outcomes and Costs of Candidemia*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (2012), pp. 3950–3956.
- [82] R. A. HAJJEH, A. N. SOFAIR, L. H. HARRISON, G. M. LYON, B. A. ARTHINGTON-SKAGGS, S. A. MIRZA, M. PHELAN, J. MORGAN, W. LEE-YANG, M. A. CIBLAK, L. E. BENJAMIN, L. THOMSON SANZA, S. HUIE, S. F. YEO, M. E. BRANDT, AND D. W. WARNOCK, *Incidence of Bloodstream Infections Due to Candida Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program*, *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2004), pp. 1519–1527.
- [83] M. HAKKI, J. F. STAAB, AND K. A. MARR, *Emergence of a Candida krusei Isolate with Reduced Susceptibility to Caspofungin during Therapy*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2006), pp. 2522–2524.
- [84] K. R. HEALEY, K. K. CHALLA, T. D. EDLIND, AND S. K. KATIYAR, *Sphingolipids mediate differential echinocandin susceptibility in Candida albicans and Aspergillus nidulans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2015), pp. AAC.04667–14.
- [85] K. R. HEALEY, S. K. KATIYAR, M. CASTANHEIRA, M. A. PFALLER, AND T. D. EDLIND, *Candida glabrata Mutants Demonstrating Paradoxical Reduced Caspofungin Susceptibility but Increased Micafungin Susceptibility*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (2011), pp. 3947–3949.
- [86] K. R. HEALEY, S. K. KATIYAR, S. RAJ, AND T. D. EDLIND, *CRS-MIS in Candida glabrata : sphingolipids modulate echinocandin-Fks interaction*, *Molecular microbiology*, 86 (2012), pp. 303–313.
- [87] K. R. HEALEY, Y. ZHAO, W. B. PEREZ, S. R. LOCKHART, J. D. SOBEL, D. FARMAKIOTIS, D. P. KONTOYIANNIS, D. SANGLARD, S. J. TAJ-ALDEEN, B. D. ALEXANDER, C. JIMENEZ-ORTIGOSA, E. SHOR, AND D. S. PERLIN, *Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen Candida glabrata promotes multi-drug resistance*, *Nature Communications*, 7 (2016), p. 11128.

Bibliographie

- [88] E. D. HERMSEN, M. K. ZAPAPAS, M. MAIEFSKI, M. E. RUPP, A. G. FREIFELD, AND A. C. KALIL, *Validation and comparison of clinical prediction rules for invasive candidiasis in intensive care unit patients : a matched case-control study*, *Critical Care*, 15 (2011), p. R198.
- [89] N. HIROTSU, N. MURAKAMI, T. KASHIWAGI, K. UJIE, AND K. ISHIMARU, *Protocol : a simple gel-free method for SNP genotyping using allele-specific primers in rice and other plant species*, *Plant Methods*, 6 (2010), p. 12.
- [90] D. HIRSBEIN, P. ATTAL, J. GUEUDRY, I. GUET, G. BRASSEUR, AND C. VASSENEIX, *Endophthalmie endogène à Candida secondaire à l'utilisation de la buprénorphine par voie intraveineuse*, *Journal Français d'Ophtalmologie*, 31 (2008), pp. 180–183.
- [91] C. F. HOEHAMER, E. D. CUMMINGS, G. M. HILLIARD, AND P. D. ROGERS, *Changes in the proteome of Candida albicans in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (2010), pp. 1655–1664.
- [92] W. W. HOPE, L. TABERNEIRO, D. W. DENNING, AND M. J. ANDERSON, *Molecular Mechanisms of Primary Resistance to Flucytosine in Candida albicans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (2004), pp. 4377–4386.
- [93] S. IMBERT, L. CASTAIN, A. PONS, S. JACOB, I. MEYER, M. PALOUS, C. VEZINET, O. LANGERON, C. HENNEQUIN, A. MONSEL, AND A. FEKKAR, *Discontinuation of echinocandin and azole treatments led to the disappearance of an FKS alteration but not azole resistance during clonal Candida glabrata persistent candidemia*, *Clinical Microbiology and Infection*.
- [94] C. J. INGHAM AND P. M. SCHNEEBERGER, *Microcolony Imaging of Aspergillus fumigatus Treated with Echinocandins Reveals Both Fungistatic and Fungicidal Activities*, *PLOS ONE*, 7 (2012), p. e35478.
- [95] S. ISHIHARA, A. HIRATA, S. NOGAMI, A. BEAUVAIS, J.-P. LATGE, AND Y. OHYA, *Homologous Subunits of 1,3-Beta-Glucan Synthase Are Important for Spore Wall Assembly in Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryotic Cell*, 6 (2007), pp. 143–156.
- [96] D. E. KARAGEORGOPOULOS, E. K. VOULOUMANOU, F. NTZIORA, A. MICHALOPOULOS, P. I. RAFAILIDIS, AND M. E. FALAGAS, *β -D-Glucan Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections : A Meta-analysis*, *Clinical Infectious Diseases*, 52 (2011), pp. 750–770.
- [97] N. KARTSONIS, J. KILLAR, L. MIXSON, C.-M. HOE, C. SABLE, K. BARTIZAL, AND M. MOTYL, *Caspofungin Susceptibility Testing of Isolates from Patients with Esophageal Candidiasis or Invasive Candidiasis : Relationship of MIC to Treatment Outcome*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2005), pp. 3616–3623.
- [98] S. K. KATIYAR, A. ALASTRUEY-IZQUIERDO, K. R. HEALEY, M. E. JOHNSON, D. S. PERLIN, AND T. D. EDLIND, *Fks1 and Fks2 Are Functionally Redundant but Differentially Regulated in Candida glabrata : Implications for Echinocandin Resistance*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (2012), pp. 6304–6309.
- [99] S. K. KATIYAR AND T. D. EDLIND, *Role for Fks1 in the Intrinsic Echinocandin Resistance of Fusarium solani as Evidenced by Hybrid Expression in Saccharomyces cerevisiae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2009), pp. 1772–1778.
- [100] J. KELLY, R. ROWAN, M. MCCANN, AND K. KAVANAGH, *Exposure to caspofungin activates Cap and Hog pathways in Candida albicans*, *Medical Mycology*, 47 (2009), pp. 697–706.
- [101] U. KLOTZ, D. SCHMIDT, B. WILLINGER, E. STEINMANN, J. BUER, P.-M. RATH, AND J. STEINMANN, *Echinocandin resistance and population structure of invasive Candida glabrata isolates from two university hospitals in Germany and Austria*, *Mycoses*, 59 (2016), pp. 312–318.
- [102] K. KRAL, T. BIEG, U. NAWROT, K. WŁODARCZYK, A. LALIK, P. HAHN, AND I. WANDZIK, *New monomeric and dimeric uridinylic derivatives as inhibitors of chitin synthase*, *Bioorganic Chemistry*, 61 (2015), pp. 13–20.
- [103] B. J. KULLBERG AND M. C. ARENDRUP, *Invasive Candidiasis*, *New England Journal of Medicine*, 373 (2015), pp. 1445–1456.
- [104] C. KURTZMAN, J. W. FELL, AND T. BOEKHOUT, *The Yeasts : A Taxonomic Study*, Elsevier, May 2011.
- [105] M. LACKNER, M. TSCHERNER, M. SCHALLER, K. KUCHLER, C. MAIR, B. SARTORI, F. ISTELE, M. C. ARENDRUP, AND C. LASS-FLÖRL, *Positions and Numbers of FKS Mutations in Candida albicans Selectively Influence In Vitro and In Vivo Susceptibilities to Echinocandin Treatment*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (2014), pp. 3626–3635.
- [106] A. M. L. O. LASHOF, A. ROTHOVA, J. D. SOBEL, M. RUHNKE, P. G. PAPPAS, C. VISCOLI, H. T. SCHLAMM, I. T. OBORSKA, J. H. REX, AND B. J. KULLBERG, *Ocular Manifestations of Candidemia*, *Clinical Infectious Diseases*, 53 (2011), pp. 262–268.
- [107] K. K. LEE, D. M. MACCALLUM, M. D. JACOBSEN, L. A. WALKER, F. C. ODDS, N. A. R. GOW, AND C. A. MUNRO, *Elevated Cell Wall Chitin in Candida albicans Confers Echinocandin Resistance In Vivo*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (2012), pp. 208–217.
- [108] A. LEFORT, J. C. GANTIER, AND O. LORTHOLARY, *Endocardites fongiques*, *Réanimation*, 13 (2004), pp. 197–204.
- [109] A. LEMKE, A. F. KIDERLEN, AND O. KAYSER, *Amphotericin B*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68 (2005), pp. 151–162.

Bibliographie

- [110] C. LEÓN, S. RUIZ-SANTANA, P. SAAVEDRA, B. ALMIRANTE, J. NOLLA-SALAS, F. ALVAREZ-LERMA, J. GARNACHO-MONTERO, M. A. LEÓN, AND EPCAN STUDY GROUP, *A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization*, *Critical Care Medicine*, 34 (2006), pp. 730–737.
- [111] D. E. LEVIN, *Cell Wall Integrity Signaling in Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (2005), pp. 262–291.
- [112] D. E. LEVIN, *Regulation of Cell Wall Biogenesis in Saccharomyces cerevisiae : The Cell Wall Integrity Signaling Pathway*, *Genetics*, 189 (2011), pp. 1145–1175.
- [113] J. LIU, S. HUANG, M. SUN, S. LIU, Y. LIU, W. WANG, X. ZHANG, H. WANG, AND W. HUA, *An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application*, *Plant Methods*, 8 (2012), p. 34.
- [114] T. T. LIU, R. E. B. LEE, K. S. BARKER, R. E. LEE, L. WEI, R. HOMAYOUNI, AND P. D. ROGERS, *Genome-Wide Expression Profiling of the Response to Azole, Polyene, Echinocandin, and Pyrimidine Antifungal Agents in Candida albicans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2005), pp. 2226–2236.
- [115] O. LORTHOLARY, M. DESNOS-OLLIVIER, K. SITBON, A. FONTANET, S. BRETAGNE, F. DROMER, AND FRENCH MYCOSIS STUDY GROUP, *Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia : a prospective multicenter study involving 2,441 patients*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (2011), pp. 532–538.
- [116] O. LORTHOLARY, C. RENAUDAT, K. SITBON, Y. MADEC, L. DENOEU-NDAM, M. WOLFF, A. FONTANET, S. BRETAGNE, AND F. DROMER, *Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002–2010)*, *Intensive Care Medicine*, 40 (2014), pp. 1303–1312.
- [117] P. M. CHAUDHARY, S. G. TUPE, AND M. V. DESHPANDE, *Chitin Synthase Inhibitors as Antifungal Agents*, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13 (2013), pp. 222–236.
- [118] H. MA, S. KUNES, P. J. SCHATZ, AND D. BOTSTEIN, *Plasmid construction by homologous recombination in yeast*, *Gene*, 58 (1987), pp. 201–216.
- [119] P. MANIVASAKAM, S. C. WEBER, J. MCELVER, AND R. H. SCHIESTL, *Micro-homology mediated PCR targeting in Saccharomyces cerevisiae.*, *Nucleic Acids Research*, 23 (1995), pp. 2799–2800.
- [120] M. C. MARTINEZ-JIMENEZ, P. MUNOZ, J. GUINEA, M. VALERIO, R. ALONSO, P. ESCRIBANO, AND E. BOUZA, *Potential role of Candida albicans germ tube antibody in the diagnosis of deep-seated candidemia*, *Medical Mycology*, 52 (2014), pp. 270–275.
- [121] E. MATSUMOTO, L. BOYKEN, S. TENDOLKAR, J. MCDANEL, M. CASTANHEIRA, M. PFALLER, AND D. DIEKEMA, *Candidemia surveillance in Iowa : emergence of echinocandin resistance*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79 (2014), pp. 205–208.
- [122] P. MAZUR, N. MORIN, W. BAGINSKY, M. EL SHERBEINI, J. A. CLEMAS, J. B. NIELSEN, AND F. FOOR, *Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase.*, *Molecular and Cellular Biology*, 15 (1995), pp. 5671–5681.
- [123] A. S. MELO, A. L. COLOMBO, AND B. A. ARTHINGTON-SKAGGS, *Paradoxical Growth Effect of Caspofungin Observed on Biofilms and Planktonic Cells of Five Different Candida Species*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (2007), pp. 3081–3088.
- [124] S. A. MESSER, R. N. JONES, AND T. R. FRITSCH, *International Surveillance of Candida spp. and Aspergillus spp. : Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003)*, *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (2006), pp. 1782–1787.
- [125] M. MIKULSKA, T. CALANDRA, M. SANGUINETTI, D. POULAIN, C. VISCOLI, AND THE THIRD EUROPEAN CONFERENCE ON INFECTIONS IN LEUKEMIA GROUP, *The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis : recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia*, *Critical Care*, 14 (2010), p. R222.
- [126] T. MIO, M. ADACHI-SHIMIZU, Y. TACHIBANA, H. TABUCHI, S. B. INOUE, T. YABE, T. YAMADA-OKABE, M. ARISAWA, T. WATANABE, AND H. YAMADA-OKABE, *Cloning of the Candida albicans homolog of Saccharomyces cerevisiae GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis.*, *Journal of Bacteriology*, 179 (1997), pp. 4096–4105.
- [127] M. MORRELL, V. J. FRASER, AND M. H. KOLLEF, *Delaying the Empiric Treatment of Candida Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained : a Potential Risk Factor for Hospital Mortality*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2005), pp. 3640–3645.
- [128] T. MUADCHEINGKA AND P. TANTIVITAYAKUL, *Distribution of Candida albicans and non-albicans Candida species in oral candidiasis patients : Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities*, *Archives of Oral Biology*, 60 (2015), pp. 894–901.

Bibliographie

- [129] M. G. NETEA, L. A. B. JOOSTEN, J. W. M. VAN DER MEER, B.-J. KULLBERG, AND F. L. VAN DE VEERDONK, *Immune defence against Candida fungal infections*, Nature Reviews Immunology, 15 (2015), pp. 630–642.
- [130] K. NIIMI, B. C. MONK, A. HIRAI, K. HATAKENAKA, T. UMEYAMA, E. LAMPING, K. MAKI, K. TANABE, T. KAMIMURA, F. IKEDA, Y. UEHARA, R. KANO, A. HASEGAWA, R. D. CANNON, AND M. NIIMI, *Clinically significant micafungin resistance in Candida albicans involves modification of a glucan synthase catalytic subunit GSC1 (FKS1) allele followed by loss of heterozygosity*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65 (2010), pp. 842–852.
- [131] H. OKADA, M. ABE, M. ASAKAWA-MINEMURA, A. HIRATA, H. QADOTA, K. MORISHITA, S. OHNUKI, S. NOGAMI, AND Y. OHYA, *Multiple Functional Domains of the Yeast 1,3- β -Glucan Synthase Subunit Fks1p Revealed by Quantitative Phenotypic Analysis of Temperature-Sensitive Mutants*, Genetics, 184 (2010), pp. 1013–1024.
- [132] H. OKADA, S. OHNUKI, C. RONCERO, J. B. KONOPKA, AND Y. OHYA, *Distinct roles of cell wall biogenesis in yeast morphogenesis as revealed by multivariate analysis of high-dimensional morphometric data*, Molecular Biology of the Cell, 25 (2014), pp. 222–233.
- [133] A. S. OROZCO, L. M. HIGGINBOTHAM, C. A. HITCHCOCK, T. PARKINSON, D. FALCONER, A. S. IBRAHIM, M. A. GHANNOUM, AND S. G. FILLER, *Mechanism of Fluconazole Resistance in Candida krusei*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42 (1998), pp. 2645–2649.
- [134] L. OSTROSKY-ZEICHNER, A. CASADEVALL, J. N. GALGIANI, F. C. ODDS, AND J. H. REX, *An insight into the antifungal pipeline : selected new molecules and beyond*, Nature Reviews Drug Discovery, 9 (2010), pp. 719–727.
- [135] J.-A. PAIVA, J. M. PEREIRA, A. TABAH, A. MIKSTACKI, F. B. DE CARVALHO, D. KOULENTI, S. RUCKLY, N. ÇAKAR, B. MISSET, G. DIMOPOULOS, M. ANTONELLI, J. RELLO, X. MA, B. TAMOWICZ, AND J.-F. TIMSIT, *Characteristics and risk factors for 28-day mortality of hospital acquired fungemias in ICUs : data from the EUROBACT study*, Critical Care, 20 (2016).
- [136] P. G. PAPPAS, C. A. KAUFFMAN, D. R. ANDES, C. J. CLANCY, K. A. MARR, L. OSTROSKY-ZEICHNER, A. C. REBOLI, M. G. SCHUSTER, J. A. VAZQUEZ, T. J. WALSH, T. E. ZAOUTIS, AND J. D. SOBEL, *Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis : 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America*, Clinical Infectious Diseases, (2015), p. civ933.
- [137] S. A. PARENT, J. B. NIELSEN, N. MORIN, G. CHREBET, N. RAMADAN, A. M. DAHL, M. J. HSU, K. A. BOSTIAN, AND F. FOOR, *Calcineurin-dependent growth of an FK506- and CsA-hypersensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae*, Journal of General Microbiology, 139 (1993), pp. 2973–2984.
- [138] S. PARK, R. KELLY, J. N. KAHN, J. ROBLES, M.-J. HSU, E. REGISTER, W. LI, V. VYAS, H. FAN, G. ABRUZZO, A. FLATTERY, C. GILL, G. CHREBET, S. A. PARENT, M. KURTZ, H. TEPPLER, C. M. DOUGLAS, AND D. S. PERLIN, *Specific Substitutions in the Echinocandin Target Fks1p Account for Reduced Susceptibility of Rare Laboratory and Clinical Candida sp. Isolates*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49 (2005), pp. 3264–3273.
- [139] A. PAUGAM, M.-T. BAIXENCH, F. TAIEB, C. CHAMPAGNAC, AND J. DUPOUY-CAMET, *Émergence de candidémies à Candida parapsilosis à l'hôpital Cochin. Caractérisation des isolats et recherche de facteurs de risque*, Pathologie Biologie, 59 (2011), pp. 44–47.
- [140] É. PENET, L. BONNEAU, A.-S. PARINAUD, S. GONNIN, M.-A. GAILLARD, AND M. JAVERLIAT, *Pharmacologie des antifongiques systémiques*, Actualités Pharmaceutiques Hospitalières, 7 (2011), pp. 10–20.
- [141] M. A. PFALLER, D. R. ANDES, D. J. DIEKEMA, D. L. HORN, A. C. REBOLI, C. ROTSTEIN, B. FRANKS, AND N. E. AZIE, *Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of Candida in 2,496 Patients : Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008*, PLoS ONE, 9 (2014), p. e101510.
- [142] M. A. PFALLER, M. CASTANHEIRA, S. R. LOCKHART, A. M. AHLQUIST, S. A. MESSER, AND R. N. JONES, *Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazole-Resistant Bloodstream Isolates of Candida glabrata*, Journal of Clinical Microbiology, 50 (2012), pp. 1199–1203.
- [143] M. A. PFALLER, M. CASTANHEIRA, S. A. MESSER, AND R. N. JONES, *In vitro antifungal susceptibilities of isolates of Candida spp. and Aspergillus spp. from China to nine systemically active antifungal agents : data from the SENTRY antifungal surveillance program, 2010 through 2012*, Mycoses, 58 (2015), pp. 209–214.
- [144] M. A. PFALLER, M. CASTANHEIRA, S. A. MESSER, P. R. RHOMBERG, AND R. N. JONES, *Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 Systemically active antifungal agents when tested against Candida spp.*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 79 (2014), pp. 198–204.
- [145] M. A. PFALLER AND D. J. DIEKEMA, *Epidemiology of Invasive Candidiasis : a Persistent Public Health Problem*, Clinical Microbiology Reviews, 20 (2007), pp. 133–163.
- [146] M. A. PFALLER, D. J. DIEKEMA, D. ANDES, M. C. ARENDRUP, S. D. BROWN, S. R. LOCKHART, M. MOTYL, AND D. S. PERLIN, *Clinical breakpoints for the echinocandins and Candida revisited : Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria*, Drug Resistance Updates, 14 (2011), pp. 164–176.

Bibliographie

- [147] M. A. PFALLER, D. J. DIEKEMA, R. N. JONES, H. S. SADER, A. C. FLUIT, R. J. HOLLIS, S. A. MESSER, AND SENTRY PARTICIPANT GROUP, *International surveillance of bloodstream infections due to Candida species : frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program*, Journal of Clinical Microbiology, 39 (2001), pp. 3254–3259.
- [148] M. A. PFALLER, D. J. DIEKEMA, M. MENDEZ, C. KIBBLER, P. ERZSEBET, S.-C. CHANG, D. L. GIBBS, V. A. NEWELL, AND T. G. A. S. GROUP, *Candida guilliermondii, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole : Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program*, Journal of Clinical Microbiology, 44 (2006), pp. 3551–3556.
- [149] M. A. PFALLER, S. A. MESSER, D. J. DIEKEMA, R. N. JONES, AND M. CASTANHEIRA, *Use of Micafungin as a Surrogate Marker To Predict Susceptibility and Resistance to Caspofungin among 3,764 Clinical Isolates of Candida by Use of CLSI Methods and Interpretive Criteria*, Journal of Clinical Microbiology, 52 (2014), pp. 108–114.
- [150] M. A. PFALLER, S. A. MESSER, L. N. WOOSLEY, R. N. JONES, AND M. CASTANHEIRA, *Echinocandin and Triazole Antifungal Susceptibility Profiles for Clinical Opportunistic Yeast and Mold Isolates Collected from 2010 to 2011 : Application of New CLSI Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values for Characterization of Geographic and Temporal Trends of Antifungal Resistance*, Journal of Clinical Microbiology, 51 (2013), pp. 2571–2581.
- [151] M. A. PFALLER, G. J. MOET, S. A. MESSER, R. N. JONES, AND M. CASTANHEIRA, *Candida Bloodstream Infections : Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55 (2011), pp. 561–566.
- [152] C. D. PFEIFFER, G. GARCIA-EFFRON, A. K. ZAAS, J. R. PERFECT, D. S. PERLIN, AND B. D. ALEXANDER, *Breakthrough Invasive Candidiasis in Patients on Micafungin*, Journal of Clinical Microbiology, 48 (2010), pp. 2373–2380.
- [153] C. D. PHAM, C. B. BOLDEN, R. J. KUYKENDALL, AND S. R. LOCKHART, *Development of a Luminex-Based Multiplex Assay for Detection of Mutations Conferring Resistance to Echinocandins in Candida glabrata*, Journal of Clinical Microbiology, 52 (2014), pp. 790–795.
- [154] C. D. PHAM, N. IQBAL, C. B. BOLDEN, R. J. KUYKENDALL, L. H. HARRISON, M. M. FARLEY, W. SCHAFFNER, Z. G. BELDAVS, T. M. CHILLER, B. J. PARK, A. A. CLEVELAND, AND S. R. LOCKHART, *Role of FKS Mutations in Candida glabrata : MIC Values, Echinocandin Resistance, and Multidrug Resistance*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58 (2014), pp. 4690–4696.
- [155] C. A. PIERSON, J. ECKSTEIN, R. BARBUCH, AND M. BARD, *Ergosterol gene expression in wild-type and ergosterol-deficient mutants of Candida albicans*, Medical Mycology, 42 (2004), pp. 385–389.
- [156] B. PILMIS, A. LOPES, O. LORTHOLARY, AND C. CHARLIER, *Les échinocandines : mise au point*, Journal des Anti-infectieux, 15 (2013), pp. 83–94.
- [157] D. PITTET, M. MONOD, P. M. SUTER, E. FRENK, AND R. AUCKENTHALER, *Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients.*, Annals of Surgery, 220 (1994), pp. 751–758.
- [158] E. G. PLAYFORD, J. LIPMAN, M. KABIR, E. S. MCBRYDE, G. R. NIMMO, A. LAU, AND T. C. SORRELL, *Assessment of clinical risk predictive rules for invasive candidiasis in a prospective multicentre cohort of ICU patients*, Intensive Care Medicine, 35 (2009), pp. 2141–2145.
- [159] E. POIKONEN, O. LYYTIKÄINEN, V.-J. ANTTILA, I. KOIVULA, J. LUMIO, P. KOTILAINEN, H. SYRJÄLÄ, AND P. RUUTU, *Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007*, BMC Infectious Diseases, 10 (2010).
- [160] J. POISSY, *Physiopathologie des candidoses invasives*, Réanimation, 24 (2015), pp. 318–327.
- [161] B. POSTERARO, G. DE PASCALE, M. TUMBARELLO, R. TORELLI, M. PENNISI, G. BELLO, R. MAVIGLIA, G. FADDA, M. SANGUINETTI, AND M. ANTONELLI, *Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis : a prospective comparison of (1→3)- β -D-glucan assay, Candida score, and colonization index*, Critical Care, 15 (2011), p. R249.
- [162] M. W. POUND, M. L. TOWNSEND, V. DIMONDI, D. WILSON, AND R. H. DREW, *Overview of treatment options for invasive fungal infections*, Medical Mycology, (2011), pp. 1–20.
- [163] S. J. PRIEST AND M. C. LORENZ, *Characterization of Virulence-Related Phenotypes in Candida Species of the CUG Clade*, Eukaryotic Cell, 14 (2015), pp. 931–940.
- [164] M. PUIG-ASENSIO, B. PADILLA, J. GARNACHO-MONTERO, O. ZARAGOZA, J. M. AGUADO, R. ZARAGOZA, M. MONTEJO, P. MUÑOZ, I. RUIZ-CAMPS, M. CUENCA-ESTRELLA, AND B. ALMIRANTE, *Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in Candida bloodstream infections : a population-based surveillance in Spain*, Clinical Microbiology and Infection, 20 (2014), pp. O245–O254.
- [165] B. RAMMAERT, A. DESJARDINS, AND O. LORTHOLARY, *New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis*, Mycoses, 55 (2012), pp. e74–e84.
- [166] C. RIPERT, *Mycologie médicale*, tec et doc / lavoisier ed., 2013.

Bibliographie

- [167] F. G. D. ROSA, S. CORCIONE, C. FILIPPINI, S. RAVIOLO, L. FOSSATI, C. MONTRUCCHIO, C. ALDIERI, A. PETROLO, R. CAVALLO, AND G. D. PERRI, *The Effect on Mortality of Fluconazole or Echinocandins Treatment in Candidemia in Internal Medicine Wards*, PLOS ONE, 10 (2015), p. e0125149.
- [168] J. M. RYBAK, K. R. MARX, A. T. NISHIMOTO, AND P. D. ROGERS, *Isavuconazole : Pharmacology, Pharmacodynamics, and Current Clinical Experience with a New Triazole Antifungal Agent*, *Pharmacotherapy : The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35 (2015), pp. 1037–1051.
- [169] L. D. SARAVOLATZ, L. OSTROSKY-ZEICHNER, K. A. MARR, J. H. REX, AND S. H. COHEN, *Amphotericin B : Time for a New “Gold Standard”*, *Clinical Infectious Diseases*, 37 (2003), pp. 415–425.
- [170] T. SARAYA, K. TANABE, K. ARAKI, S. YONETANI, H. MAKINO, T. WATANABE, N. TSUJIMOTO, S. TAKATA, D. KURAI, H. ISHII, Y. MIYAZAKI, H. TAKIZAWA, AND H. GOTO, *Breakthrough Invasive Candida glabrata in Patients on Micafungin : a Novel FKS Gene Conversion Correlated with Sequential Elevation of MIC*, *Journal of Clinical Microbiology*, 52 (2014), pp. 2709–2712.
- [171] A. SEREFKO, R. LOS, A. BIERNASIUK, AND A. MALM, *Comparison of microdilution method and E-test procedure in susceptibility testing of caspofungin against Candida non-albicans species*, *The New Microbiologica*, 31 (2008), pp. 257–262.
- [172] R. S. SHAPIRO, N. ROBBINS, AND L. E. COWEN, *Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75 (2011), pp. 213–267.
- [173] X.-Y. SHI, Y.-P. YANG, Y. ZHANG, W. LI, J.-D. WANG, W.-M. HUANG, AND Y.-M. FAN, *Molecular identification and antifungal susceptibility of 186 Candida isolates from vulvovaginal candidiasis in southern China*, *Journal of Medical Microbiology*, 64 (2015), pp. 390–393.
- [174] R. K. SHIELDS, M. H. NGUYEN, C. DU, E. PRESS, S. CHENG, AND C. J. CLANCY, *Paradoxical effect of caspofungin against Candida bloodstream isolates is mediated by multiple pathways but eliminated in human serum*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (2011), pp. 2641–2647.
- [175] R. K. SHIELDS, M.-H. NGUYEN, E. PRESS, AND C. J. CLANCY, *Abdominal Candidiasis Is a Hidden Reservoir of Echinocandin Resistance*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (2014), pp. 7601–7605.
- [176] R. K. SHIELDS, M. H. NGUYEN, E. G. PRESS, AND C. J. CLANCY, *Five-Minute Exposure to Caspofungin Results in Prolonged Postantifungal Effects and Eliminates the Paradoxical Growth of Candida albicans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (2011), pp. 3598–3602.
- [177] R. K. SHIELDS, M. H. NGUYEN, E. G. PRESS, R. CUMBIE, E. DRISCOLL, A. W. PASCULLE, AND C. J. CLANCY, *Rate of FKS Mutations among Consecutive Candida Isolates Causing Bloodstream Infection*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (2015), pp. 7465–7470.
- [178] R. K. SHIELDS, M. H. NGUYEN, E. G. PRESS, A. L. KWA, S. CHENG, C. DU, AND C. J. CLANCY, *The Presence of an FKS Mutation Rather than MIC Is an Independent Risk Factor for Failure of Echinocandin Therapy among Patients with Invasive Candidiasis Due to Candida glabrata*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (2012), pp. 4862–4869.
- [179] R. K. SHIELDS, M. H. NGUYEN, E. G. PRESS, C. L. UPDIKE, AND C. J. CLANCY, *Anidulafungin and Micafungin MIC Breakpoints Are Superior to That of Caspofungin for Identifying FKS Mutant Candida glabrata Strains and Echinocandin Resistance*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57 (2013), pp. 6361–6365.
- [180] R. K. SHIELDS, M. H. NGUYEN, C. L. UPDIKE, E. G. PRESS, AND C. J. CLANCY, *Caspofungin MICs Correlate with Treatment Outcomes among Patients with Candida glabrata Invasive Candidiasis and Prior Echinocandin Exposure*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57 (2013), pp. 3528–3535.
- [181] S. D. SINGH, N. ROBBINS, A. K. ZAAS, W. A. SCHELL, J. R. PERFECT, AND L. E. COWEN, *Hsp90 Governs Echinocandin Resistance in the Pathogenic Yeast Candida albicans via Calcineurin*, *PLoS Pathogens*, 5 (2009).
- [182] N. V. SIPSAS, R. E. LEWIS, J. TARRAND, R. HACHEM, K. V. ROLSTON, I. I. RAAD, AND D. P. KONTOYIANNIS, *Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007)*, *Cancer*, 115 (2009), pp. 4745–4752.
- [183] R. P. SMITH, A. BALTCH, L. H. BOPP, W. J. RITZ, AND P. P. MICHELSEN, *Post-antifungal effects and time-kill studies of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against Candida glabrata and Candida parapsilosis*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71 (2011), pp. 131–138.
- [184] Y. B. SONG, M. K. SUH, G. Y. HA, AND H. KIM, *Antifungal Susceptibility Testing with Etest for Candida Species Isolated from Patients with Oral Candidiasis*, *Annals of Dermatology*, 27 (2015), pp. 715–720.
- [185] D. J. SPALTON, R. A. HITCHINGS, AND P. A. HUNTER, *Atlas d’ophtalmologie clinique*, De Boeck Supérieur, May 1996.
- [186] J. F. STAAB AND P. SUNDSTROM, *URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of Candida albicans genes*, *Trends in Microbiology*, 11 (2003), pp. 69–73.

Bibliographie

- [187] P. SUDBERY, N. GOW, AND J. BERMAN, *The distinct morphogenic states of Candida albicans*, Trends in Microbiology, 12 (2004), pp. 317–324.
- [188] P. E. SUDBERY, *Growth of Candida albicans hyphae*, Nature Reviews Microbiology, 9 (2011), pp. 737–748.
- [189] G. R. THOMPSON, N. P. WIEDERHOLD, A. C. VALLOR, N. C. VILLAREAL, J. S. LEWIS, AND T. F. PATTERSON, *Development of Caspofungin Resistance following Prolonged Therapy for Invasive Candidiasis Secondary to Candida glabrata Infection*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52 (2008), pp. 3783–3785.
- [190] J. H. TOYN, P. L. GUNYUZLU, W. HUNTER WHITE, L. A. THOMPSON, AND G. F. HOLLIS, *A counterselection for the tryptophan pathway in yeast : 5-fluoroanthranilic acid resistance*, Yeast, 16 (2000), pp. 553–560.
- [191] J. TURNIDGE, G. KAHLMETER, AND G. KRONVALL, *Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values*, Clinical Microbiology and Infection, 12 (2006), pp. 418–425.
- [192] A. J. ULLMANN, M. AKOVA, R. HERBRECHT, C. VISCOLI, M. C. ARENDRUP, S. ARIKAN-AKDAGLI, M. BASSETTI, J. BILLE, T. CALANDRA, E. CASTAGNOLA, O. A. CORNELI, J. P. DONNELLY, J. GARBINO, A. H. GROLL, W. W. HOPE, H. E. JENSEN, B. J. KULLBERG, C. LASS-FLÖRL, O. LORTHOLARY, W. MEERSEMAN, G. PETRIKKOS, M. D. RICHARDSON, E. ROILIDES, P. E. VERWEIJ, M. CUENCA-ESTRELLA, AND FOR THE ESCMID FUNGAL INFECTION STUDY GROUP (EFISG), *ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012 : adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT)*, Clinical Microbiology and Infection, 18 (2012), pp. 53–67.
- [193] S. VALLABHANENI, A. A. CLEVELAND, M. M. FARLEY, L. H. HARRISON, W. SCHAFFNER, Z. G. BELDAVS, G. DERADO, C. D. PHAM, S. R. LOCKHART, AND R. M. SMITH, *Epidemiology and Risk Factors for Echinocandin Nonsusceptible Candida glabrata Bloodstream Infections : Data From a Large Multisite Population-Based Candidemia Surveillance Program, 2008–2014*, Open Forum Infectious Diseases, 2 (2015), p. ofv163.
- [194] A. VÁZQUEZ-TORRES AND E. BALISH, *Macrophages in resistance to candidiasis.*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61 (1997), pp. 170–192.
- [195] E. VELASCO AND R. BIGNI, *A prospective cohort study evaluating the prognostic impact of clinical characteristics and comorbid conditions of hospitalized adult and pediatric cancer patients with candidemia*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 27 (2008), pp. 1071–1078.
- [196] A. VERMES, H.-J. GUCHELAAR, AND J. DANKERT, *Flucytosine : a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46 (2000), pp. 171–179.
- [197] L. A. WALKER, N. A. R. GOW, AND C. A. MUNRO, *Fungal echinocandin resistance*, Fungal Genetics and Biology, 47 (2010), pp. 117–126.
- [198] L. A. WALKER, C. A. MUNRO, I. DE BRUIJN, M. D. LENARDON, A. MCKINNON, AND N. A. R. GOW, *Stimulation of Chitin Synthesis Rescues Candida albicans from Echinocandins*, PLoS Pathog, 4 (2008), p. e1000040.
- [199] T. J. WALSH, R. W. FINBERG, C. ARNDT, J. HIEMENZ, C. SCHWARTZ, D. BODENSTEINER, P. PAPPAS, N. SEIBEL, R. N. GREENBERG, S. DUMMER, M. SCHUSTER, W. E. DISMUKES, AND J. S. HOLCENBERG, *Liposomal Amphotericin B for Empirical Therapy in Patients with Persistent Fever and Neutropenia*, New England Journal of Medicine, 340 (1999), pp. 764–771.
- [200] A. WANG, J. CAO, S. HU, Z. ZHAO, M. WANG, AND T. XIAO, *Anterior and pan-endophthalmitis caused by Candida albicans and Aspergillus fumigatus : report of two cases*, Mycopathologia, 176 (2013), pp. 451–456.
- [201] N. YAPAR, *Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis*, Therapeutics and Clinical Risk Management, 10 (2014), pp. 95–105.
- [202] S.-J. YU, Y.-L. CHANG, AND Y.-L. CHEN, *Calcineurin signaling : lessons from Candida species*, FEMS yeast research, 15 (2015), p. fov016.