

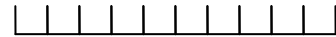
UNIVERSITE DE NANTES

U.F.R DE PHARMACIE

---

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2012



# **Bases moléculaires de la résistance aux antifongiques azolés chez *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus***

---

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, médecine et santé

Spécialité : Parasitologie et Mycologie Médicale

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Florent MORIO**

*Le 5 juillet 2012, devant le jury ci-dessous*

**Pr Dominique Sanglard** (président du jury et rapporteur), Université de Lausanne  
**Pr Frédéric Dalle** (rapporteur), Université de Bourgogne  
**Dr Eric Dannaoui** (examinateur), Université Paris Descartes  
**Dr Alain Haloun** (examinateur), Centre Hospitalier Universitaire de Nantes  
**Dr Michel Miegville** (examinateur), Université de Nantes  
**Pr Patrice Le Pape** (examinateur), Université de Nantes

*Directeur de thèse :*

**Pr Patrice Le Pape**

*“Les hommes peuvent atteindre un but commun sans emprunter les mêmes voies.”*  
**Amadou Hampâté Bâ**

*“If you do not expect to, you will not discover the unexpected.”*  
**Heraclitus**

## Liste des publications et communications

### Articles publiés dans des revues internationales avec comité de lecture

- Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* *ERG11* gene of azole-susceptible and -resistant clinical isolates: new mutations and a review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. 2010;66(4):373-84.**
- Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegeville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012. Sous presse.**
- Morio F, Aubin G, Danner-Boucher I, Haloun A, Sacchetto E, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Miegeville M, Le Pape P. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012 Mai 11. [Epub ahead of print].**

### Communications en congrès

- Morio F, Besse M, Pagniez F, Gay-Andrieu F, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in *Candida albicans* lanosterol demethylase : From nucleotide sequencing to the design of new antifungals. **Colloque « New European Partnerships in Drug Discovery », Journées Scientifiques de l'Université de Nantes, 16 juin 2008, Nantes.**
- Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegeville M, Le Pape P. Erg3 amino acid substitutions as the cause of fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **5<sup>th</sup> Trends in Medical Mycology (TIMM-5), 2-5 October 2011, Valencia, Spain.**
- Morio F, Aubin G, Miegeville M, Danner I, David V and Le Pape P. Prevalence of azole-resistance in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients with cystic fibrosis: utility of itraconazole-containing agar plates in routine practice. **5<sup>th</sup> Trends in Medical Mycology (TIMM-5), 2-5 October 2011, Valencia, Spain.**
- Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegeville M, Le Pape P. Implication des mutations sur le gène *ERG3* dans la résistance de *Candida albicans* aux antifongiques azolés. **Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, SFMM, Paris, 18-19 novembre 2011.**
- Morio F, Pagniez F, Besse M, Gay-Andrieu F, Miegeville M, Le Pape P. Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance d'isolats cliniques de *Candida albicans* aux antifongiques azolés. **Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, SFMM, Paris, 18-19 novembre 2011.**
- Morio F, Aubin G, Miegeville M, Danner-Boucher I, David V, Garcia-Hermoso D, Le Pape P. Prévalence et mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques azolés chez *Aspergillus fumigatus* au sein d'une cohorte de patients atteints de mucoviscidose. **Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, SFMM, Paris, 18-19 novembre 2011.**

# Table des matières

<b>Liste des Abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des Figures .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des Tableaux .....</b>	<b>12</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b><u>Chapitre I</u> : Analyse bibliographique.....</b>	<b>16</b>
I. Biologie de <i>Candida albicans</i> et d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	17
I.1. Historique .....	17
I.2. Classification.....	17
I.3. Morphologie.....	19
I.4. Le génome .....	23
II. Pouvoir pathogène de <i>Candida albicans</i> et d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	24
II.1. Facteurs de virulence .....	24
II.2. Spectre clinique.....	25
II.3. Impact médico-économique.....	30
II.4 Antifongiques disponibles .....	31
II.4.1. Les azolés .....	32
II.4.2. Les polyènes .....	39
II.4.3. Les échinocandines.....	41
II.4.4. Les pyrimidines .....	42
II.4.5. Les allylamines.....	43
II.4.6. Les morpholines .....	43
III. Etat des connaissances sur la résistance aux azolés chez <i>Candida albicans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	44
III.1. Méthodes d'étude et définition de la résistance .....	45
III.2. Prévalence de la résistance aux azolés .....	47
III.3. Mécanismes moléculaires de la résistance aux azolés .....	48
III.3.1. Altération de la cible des azolés (14 $\alpha$ -déméthylase).....	49
III.3.2. Surexpression de la cible des azolés (14 $\alpha$ -déméthylase) .....	59
III.3.3. Déviation de la voie de biosynthèse des stéroïdes .....	65
III.3.4. Surexpression des transporteurs d'efflux .....	70
III.3.5. Plasticité génomique .....	85

<b><u>Chapitre II : Etudes expérimentales</u></b> .....	<b>87</b>
I. Résistance aux antifongiques azolés chez <i>Candida albicans</i> .....	88
<u>Etude n°1</u> : Etude du polymorphisme du gène <i>ERG11</i> dans une collection d'isolats cliniques de <i>Candida albicans</i> , sensibles et résistants aux antifongiques azolés : nouvelles mutations et revue de la littérature .....	89
<u>Etude n°2</u> : Mutation sur le gène <i>ERG3</i> , codant la C5 désaturase, et résistance de <i>Candida albicans</i> aux antifongiques azolés : description de deux nouveaux mutants présentant une virulence atténuée .....	113
<u>Etude n°3</u> : Mutations sur les gènes codant les facteurs de transcription Tac1, Mrr1 et Upc2 dans une collection d'isolats cliniques de <i>Candida albicans</i> résistants au fluconazole .....	136
II. Résistance aux antifongiques azolés chez <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	155
<u>Etude n°1</u> : Prévalence élevée de la résistance d' <i>Aspergillus fumigatus</i> aux triazolés, principalement due à la mutation TR/L98H, dans une cohorte française de patients atteints de mucoviscidose .....	156
<b><u>Chapitre III : Conclusion générale et perspectives</u></b> .....	<b>169</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>185</b>

## Liste des abréviations

<b>ABC</b>	ATP-Binding Cassette
<b>ABPA</b>	Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
<b>AD</b>	Activation Domain
<b>AFSSAPS</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
<b>AMB</b>	Amphotéricine B
<b>APECED</b>	Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Distrophy
<b>API</b>	Aspergillose pulmonaire invasive
<b>ARE</b>	Azole-Responsive Enhancer
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>BEE</b>	Basal Expression Element
<b>BPCO</b>	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
<b>BRE</b>	Benomyl Response Element
<b>CAP1</b>	<i>Candida albicans</i> AP-1
<b>CAS</b>	Caspofungine
<b>CDR1</b>	<i>Candida</i> Drug Resistance 1 gene
<b>CDR2</b>	<i>Candida</i> Drug Resistance 2 gene
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>DBD</b>	DNA Binding Domain
<b>DRE</b>	Drug Responsive Element
<b>ECV</b>	Epidemiological Cutoff Value
<b>ERG3</b>	C5 désaturase gene
<b>ERG4</b>	C24 désaturase gene
<b>ERG5</b>	C22 désaturase gene
<b>ERG11</b>	14 $\alpha$ -déméthylase gene
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FLC</b>	Fluconazole
<b>GOF</b>	Gain Of Function
<b>HRE</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Response Element
<b>ITC</b>	Itraconazole
<b>LOF</b>	Loss Of Function
<b>LOH</b>	Loss Of Heterozygosity
<b>MDRE</b>	MDR1 Drug Response Element
<b>MDR1</b>	MultiDrug Resistance 1 gene
<b>MFS</b>	Major Facilitator Superfamily
<b>MHR</b>	Middle Homology Region
<b>MRR1</b>	Multidrug Resistance Regulator 1-gene
<b>MTL</b>	Mating Type Locus
<b>NBD</b>	Nucleotide Binding Domain
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>NRE</b>	Negative Regulatory Element
<b>Pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>POS</b>	Posaconazole
<b>SDR</b>	Short Direct Repeat Sequence
<b>SRE</b>	Sterol Regulatory Element

<b>TAC1</b>	Transcriptional Activator of CDR genes
<b>TMD</b>	TransMembrane Domain
<b>TR</b>	Tandem Repeat
<b>UDR</b>	Upc2-Dependent Region
<b>UIR</b>	Upc2-Independent Region
<b>UPC2</b>	UPtake Control 2 gene
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>VRC</b>	Voriconazole
<b>WT</b>	Wild-Type
<b>YRE</b>	YAP1 Response Element

## Liste des Figures

Figure 1 : Morphologie de <i>C. albicans</i> sous forme levures (A), pseudofilaments (B) et filaments (C)	17
Figure 2 : Morphologie d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	18
Figure 3 : Représentation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>C. albicans</i>	19
Figure 4 : Représentation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>A. fumigatus</i>	19
Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation de la paroi de <i>C. albicans</i>	20
Figure 6 : Aspect clinique d'un intertrigo candidosique palmaire	24
Figure 7 : Aspect clinique d'une candidose buccale	24
Figure 8 : Aspect clinique d'un onyxis candidosique avec périonyxis	25
Figure 9 : Aspect radiologique (A) et histologique (B) d'une aspergillose pulmonaire invasive	27
Figure 10 : Explosion du développement des antifongiques systémiques des années 50 aux années 2000.	29
Figure 11 : Cibles des principales classes d'antifongiques	30
Figure 12 : Pharmacomodulation des azolés.	31
Figure 13 : Structures chimiques des principaux antifongiques azolés	33
Figure 14 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>C. albicans</i>	35
Figure 15 : Structures chimiques de l'amphotéricine B et de la nystatine	38
Figure 16 : Structures chimiques de la caspofungine (A), de l'anidulafungine (B) et de la micafungine (C).	39
Figure 17 : Structures chimiques de la 5-fluorocytosine (A) et de son métabolite actif le 5-fluorouracile (B).	40
Figure 18 : Alignement des séquences protéiques de MtCyp51, CaCyp51 et AfCyp51A et structure tridimensionnelle de MtCyp51 (encadré).	49
Figure 19 : Localisation des principales substitutions impliquées dans la résistance aux azolés dans la structure tridimensionnelle de CaCyp51	50
Figure 20 : Résidus de CaCyp51 impliqués dans l'interaction avec le voriconazole (A) et le posaconazole (B)	51
Figure 21 : Localisation des principales substitutions décrites au sein de la structure tridimensionnelle de l'enzyme Cyp51A d' <i>A. fumigatus</i> (AfCyp51A)	54
Figure 22 : Résidus potentiellement impliqués dans l'interaction avec le posaconazole (A) et le voriconazole (B) dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme Cyp51A d' <i>A. fumigatus</i> (AfCyp51A)	55
Figure 23 : Position des éléments cis-régulateurs dans la région promotrice du gène <i>ERG11</i> de <i>C. albicans</i>	58
Figure 24 : Position des éléments cis-régulateurs dans la région promotrice du gène <i>UPC2</i> de <i>C. albicans</i>	60
Figure 25 : Déviation de la voie de biosynthèse en présence d'une perte de fonctionnalité de la C5 désaturase (Erg3) chez <i>C. albicans</i>	64
Figure 26 : Déviation de la voie de biosynthèse des stérols en présence d'une perte de fonctionnalité de la C22 désaturase (Erg5) chez <i>C. albicans</i>	67
Figure 27 : Représentation schématique de la structure des transporteurs d'efflux de type CDR	69
Figure 28 : Position des éléments cis-régulateurs décrits dans la région promotrice du gène <i>CDR1</i> de <i>C. albicans</i>	71



Figure 29 : Position des mutations gain de fonction sur le facteur de transcription Tac1 de <i>C. albicans</i> .....	73
Figure 30 : Représentation schématique de la structure des transporteurs d'efflux de type MFS à 12 domaines transmembranaires .....	75
Figure 31 : Position des éléments cis-régulateurs dans la région promotrice du gène <i>MDR1</i> de <i>C. albicans</i> .....	78
Figure 32 : Position des mutations gain de fonction décrites sur le facteur de transcription Mrr1 de <i>C. albicans</i> .....	80
Figure 33 : Représentation schématique des voies d'activation du gène <i>MDR1</i> chez <i>C. albicans</i>	81
Figure 34 : Représentation schématique de l'organisation de l'isochromosome i(5L) de <i>C. albicans</i> .....	84

## Liste des Tableaux

Tableau I : Données comparatives du génome de <i>C. albicans</i> et d' <i>A. fumigatus</i> .....	22
Tableau II : Profil de sensibilité aux azolés des principales espèces de <i>Candida</i> spp. ....	36
Tableau III : Distribution des CMI et valeurs seuils d'interprétation pour la détermination de la sensibilité aux azolés de <i>C. albicans</i> définies par le CLSI.....	44
Tableau IV : Distribution des CMI et valeurs seuils d'interprétation définies par l'EUCAST pour la détermination de la sensibilité aux azolés d' <i>A. fumigatus</i> .....	44
Tableau V : Mutations décrites sur le gène <i>ERG11</i> de <i>C. albicans</i> et dont l'implication a été confirmée par mutagenèse dirigée.....	48
Tableau VI : Mutations décrites sur le gène <i>CYP51A</i> et leur implication potentielle dans la résistance aux azolés chez <i>A. fumigatus</i> .....	53
Tableau VII : Mutations décrites sur le gène <i>UPC2</i> de <i>C. albicans</i> et leur implication dans la surexpression du gène <i>ERG11</i> .....	59
Tableau VIII : Mutations décrites sur le gène <i>TAC1</i> de <i>C. albicans</i> .....	72
Tableau IX : Mutations décrites sur le gène <i>MRR1</i> de <i>C. albicans</i> et leur implication dans la résistance aux azolés .....	79

# Introduction

*Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* sont deux champignons cosmopolites d'importance médicale majeure. *Candida albicans* fait partie de la flore commensale normale chez l'homme, un portage au niveau des muqueuses notamment digestives étant retrouvé chez 30 à 60 % des individus. *Aspergillus fumigatus* est largement présent dans notre environnement représentant 2 à 3 % de la flore fongique atmosphérique, chaque individu inhalant quotidiennement plusieurs centaines de spores aspergillaires (Latgé, 1999 ; Moran *et al.*, 2012). Chez les patients immunodéprimés ou pris en charge en unités de soins intensifs, ces champignons peuvent être à l'origine d'infections invasives. A l'échelle mondiale, l'incidence des candidémies et des aspergilloses invasives est évaluée à 300 000 et 200 000 respectivement chaque année (Fungal Research Trust, 2011). Ces infections sont par ailleurs associées à une mortalité élevée comprise entre 30 à 50 %. A coté de ces infections invasives, *C. albicans* et *A. fumigatus* sont responsables d'infections superficielles ou allergiques, parfois chroniques, dont l'impact est également important en santé publique. Ainsi, près de 75 % des femmes en âge de procréer ont développé ou développeront une candidose vulvo-vaginale et l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) au décours de l'asthme concernerait quatre millions d'individus à l'échelle mondiale (Sobel, 2007 ; Fungal Research Trust, 2011).

Pour toutes ces raisons, une prise en charge précoce, en particulier dans le cas des infections invasives est nécessaire. Dans ce cadre, les antifongiques azolés possèdent une place de choix dans l'arsenal thérapeutique. Le fluconazole est largement utilisé pour la prise en charge des candidémies, le voriconazole constitue le traitement de première ligne pour la prise en charge de l'aspergillose pulmonaire invasive et l'itraconazole a une place importante dans l'ABPA (Stevens *et al.*, 2000 ; Walsh *et al.*, 2008 ; Pappas *et al.*, 2009 ; Kousha *et al.*, 2011). Cependant, des cas de résistance acquise à cette famille d'antifongiques peuvent survenir et compromettre la prise en charge et le succès thérapeutique de ces infections.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à une revue bibliographique. Après un rappel de la biologie de ces agents infectieux, du spectre de manifestations cliniques qui leur sont associées et de leur impact médico-économique, les différents antifongiques disponibles y sont également présentés et en particulier les azolés qui constituent une famille thérapeutique de choix pour la prise en charge de ces infections. Les mécanismes moléculaires de la résistance aux azolés chez *C. albicans* et *A. fumigatus*, qui constituent l'axe central de notre activité de recherche, sont ensuite traités.

Dans le second chapitre de ce manuscrit, nous présentons les résultats de nos travaux sous la forme d'articles acceptés ou en cours de rédaction. Enfin, le dernier chapitre est dédié à la discussion de ces travaux de recherche mis en perspective par rapport aux données récentes issues de la littérature.

Chapitre I  
Analyse bibliographique

## I. Biologie de *Candida albicans* et d'*Aspergillus fumigatus*

### I.1. Historique

Alors que Langenbeck fût le premier à rapporter la présence du champignon associé au muguet buccal en 1839, c'est en 1847 que le mycologue français Charles-Philippe Robin, établit réellement le lien entre le champignon qu'il dénomme *Oidium albicans* et le muguet buccal (Skinner, 1947). Hill et plus tard Martin et Jones, placent *Oidium albicans* dans le genre *Monilia* regroupant de nombreux phytopathogènes. Pourtant à cette époque plusieurs mycologues dont Christine Berkhout avaient déjà établi les différences morphologiques entre ce champignon associé au muguet et ceux du genre *Monilia* (Martin et Jones, 1940). En 1923, Berkhout propose de reclasser *Oidium albicans* dans le genre *Candida* (Barnett, 2004). Cet évènement fut rétrospectivement considéré comme le premier pas vers une systématique plus rationnelle des levures ne produisant pas d'ascospores. Pourtant sa position taxonomique resta confuse pendant de nombreuses années. Ciferro, Redaelli et Cavallero rapportaient en 1938 l'existence de 45 appellations synonymes dans la littérature pour cette espèce, alors que quelques années plus tard, en 1944, Conant et collaborateurs en notaient 172 ! (Skinner, 1947). C'est seulement en 1954, lors du huitième Congrès de Botanique qu'est officiellement approuvé *Candida albicans* comme « conservandum nomen » mettant ainsi fin à l'incertitude qui dura près de deux siècles (Barnett, 2004).

Concernant le genre *Aspergillus*, c'est en 1729 que Michelli proposera le nom d'*Aspergillus* à ces moisissures du fait de leur ressemblance avec le goupillon d'église (« *Aspergillus* » en latin) (Klich, 2002). L'espèce *A. fumigatus* sera décrite en 1863 par Frésenius soit plusieurs dizaines d'années après *A. glaucus*, première espèce décrite par Link (Klich, 2002). A noter enfin qu'un mode de reproduction sexuée à été identifié chez ces deux espèces fongiques (Alby *et al.*, 2009 ; O'Gorman *et al.*, 2009).

### I.2. Classification

Les *Candida* sont des levures, champignons micro-organismes eucaryotes et unicellulaires, dont la multiplication est assurée par bourgeonnement (multiplication asexuée). Elles s'opposent ainsi aux levures se multipliant par scissiparité (exemple : *Blastoschizomyces*) et

aux champignons filamenteux (exemple : *Aspergillus*, *Penicillium*, etc.). D'un point de vue taxonomique, les *Candida* font partie du Phylum des *Ascomycota*, sous-Phylum des *Saccharomycotina*, Classe des *Saccharomycetes*, à l'Ordre des *Saccharomycetales* et à la Famille des *Saccharomycetaceae* (Hibbett *et al.*, 2007). A ce jour, plus de 150 espèces de *Candida* ont été décrites (Moran *et al.*, 2012). En pratique médicale, si le nombre d'espèces rencontrées reste limité, celui-ci ne cesse de croître du fait de la plus grande précision des méthodes d'identification résultant en particulier de l'essor des méthodes d'identification moléculaire.

A ce jour, près de 40 espèces de *Candida* ont été impliquées en pathologie humaine mais *C. albicans* reste de loin l'espèce la plus fréquente (Johnson, 2009).

Les *Aspergillus* appartiennent, comme les *Candida*, au Phylum des *Ascomycota*, mais au sous-Phylum des *Pezizomycotina*, à la classe des *Eurotiomycetes*, sous-classe des *Eurotiomycetidae* et à l'ordre des *Eurotiales* (Geiser, 2009). Depuis la description de 180 espèces d'*Aspergillus* par Pitt en 2000, ce nombre ne cesse également de croître du fait de la description régulière de nouvelles espèces (Pitt, 2000 ; Novakova *et al.*, 2012). En parallèle, la taxonomie du genre *Aspergillus* a été profondément modifiée avec l'apparition de sous-genres et de sections, ces dernières regroupant des espèces difficilement différenciables sur la base des seuls critères morphologiques.

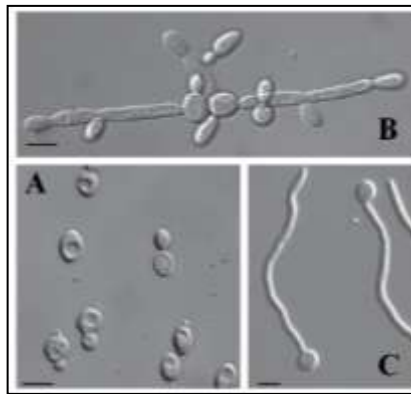
Le genre *Aspergillus* est ainsi découpé en sept sous-genres (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Circumdati* et *Stilbothamnium*) eux-mêmes décomposés en une ou plusieurs sections, ces dernières comprenant un nombre plus ou moins important d'espèces (Klich, 2002). Ainsi, le sous-genre *Fumigati* comprend deux sections, *Cervini* et *Fumigati*. La section *Fumigati* rassemble au moins 33 espèces génétiquement distinctes mais morphologiquement difficilement différenciables, dont *A. fumigatus* au sens strict et d'autres espèces présentant une moindre sensibilité aux azolés comme *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. fumigatiaffinis*, *A. viridinutans* et *Neosartorya pseudofisheri* (Balajee *et al.*, 2005 ; Samson *et al.*, 2007 ; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008a ; Van der Linden *et al.*, 2011c).

*Aspergillus fumigatus* reste l'espèce de la section *Fumigati* la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine mais son identification formelle requiert une stratégie polyphasique incluant notamment le séquençage du gène de la  $\beta$ -tubuline (Samson *et al.*, 2007 ; Balajee *et al.*, 2009 ; Etienne *et al.*, 2009).



### I.3. Morphologie

En culture, l'aspect macroscopique de *C. albicans* est celui d'une colonie blanche à crème, lisse et crémeuse, à bords nets. Sa croissance est rapide et possible sur la plupart des milieux de culture utilisés au laboratoire. A l'examen microscopique, *C. albicans* se présente sous la forme de levures arrondies ou ovoïdes plus ou moins bourgeonnantes (appelées blastoconidies ou blastospores), de 6 à 10  $\mu\text{m}$  de long sur 4 à 7  $\mu\text{m}$  de large, associées à des filaments mycéliens et du pseudomycélium (Figure 1). En conditions exigeantes, *C. albicans* produit des chlamydoconidies, cellules réfringentes et sphériques à paroi épaisse.



**Figure 1 : Morphologie de *C. albicans* sous forme levures (A), pseudofilaments (B) et filaments (C)**  
 Source : Sudbery, 2011

A la différence des *Candida*, les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux dont le thalle septé va donner naissance à des conidiophores, structures renflées à leur sommet, formant une vésicule recouverte de phialides parfois associées à des métules et assurant la production des spores (ou phialoconidies). L'ensemble constitue la « tête aspergillaire » (Klich, 2002). L'espèce *A. fumigatus* se caractérise par un conidiophore relativement court, lisse et incolore, dont la vésicule en forme de massue porte directement les phialides (absence de métules) (Figure 2). Celles-ci, parallèles, occupent la partie supérieure de la vésicule, conférant un aspect en colonne compacte. Les conidies d'*A. fumigatus* sont globuleuses, lisses à finement échinulées et mesurent 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre (Klich, 2002). Leur caractère hydrophobe et leur petite taille favorisent leur dissémination aérienne (Latgé, 1999). L'aspect en culture d'*A. fumigatus* est celui d'une colonie initialement blanche puis rapidement gris-verte à gris voire brun en cultures âgées. Sa croissance est rapide et extensive (4 à 7 cm en sept jours à 25-37°C) sur les milieux usuels de mycologie (Klich, 2002).



**Figure 2 : Morphologie d'*Aspergillus fumigatus***  
 Source : Samson *et al.*, 2007

Comme tous les champignons, la membrane des *Candida* et des *Aspergillus* est principalement constituée d'ergostérol et non de cholestérol comme chez les mammifères. L'ergostérol joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires et contribue à la fluidité et au maintien de l'intégrité membranaire (Bard *et al.*, 1993). Sa voie de biosynthèse, complexe et principalement étudiée chez *Saccharomyces cerevisiae*, est fortement conservée dans le règne fongique et comprend plus de 20 étapes. Du fait de son rôle important, cette voie a été rapidement considérée comme une cible de choix pour le développement de thérapeutiques antifongiques. Ainsi, comme nous le verrons ultérieurement, cinq enzymes de cette voie constituent les cibles spécifiques d'antifongiques : la squalène époxydase (codée par le gène *ERG1*), la C14 réductase (*ERG24*), la C8 stérol isomérase (*ERG2*), la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase (*ERG11*) et la stérol C22 désaturase (*ERG5*) (White *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'ergostérol lui-même constitue la cible des antifongiques de la famille des polyènes.

Bien que cette voie soit fortement conservée dans le règne fongique, il existe quelques particularités propres à ces deux espèces. Ainsi, bien que la voie de *C. albicans* (Figure 3) apparaisse fortement homologue à celle de *S. cerevisiae*, il subsiste une incertitude sur le substrat réel de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase qui pourrait être l'éburicol et non le lanostérol chez *C. albicans* (Martel *et al.*, 2010b). Par ailleurs, les trois dernières étapes de la voie de synthèse impliquant successivement les enzymes Erg3, Erg5 et enfin Erg4 pourrait suivre un enchaînement différent chez *C. albicans* impliquant d'abord Erg4 puis Erg5 et enfin Erg3 (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008b). Enfin, cette dernière partie de la voie de biosynthèse est extrêmement complexe chez *A. fumigatus* (Figure 4), faisant intervenir trois voies distinctes, impliquant les trois mêmes enzymes pouvant aboutir à l'ergostérol (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008b).

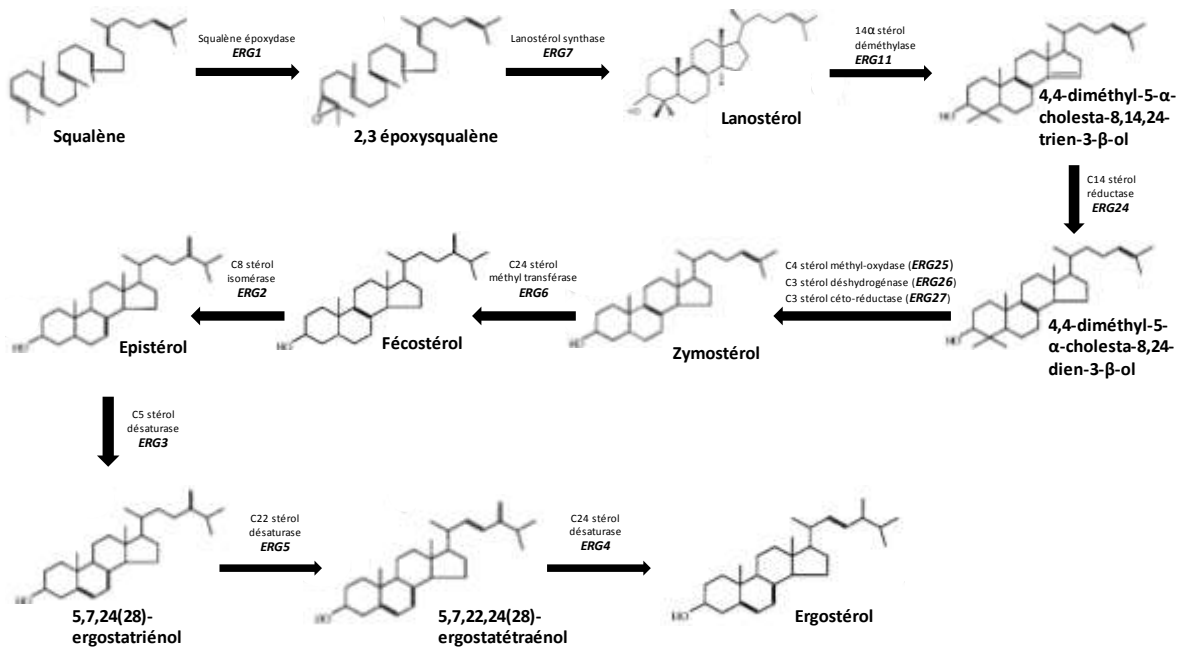


Figure 3 : Représentation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *C. albicans*  
 Source : d'après Sanglard *et al.*, 2003 et <http://pathway.candidagenome.org/>

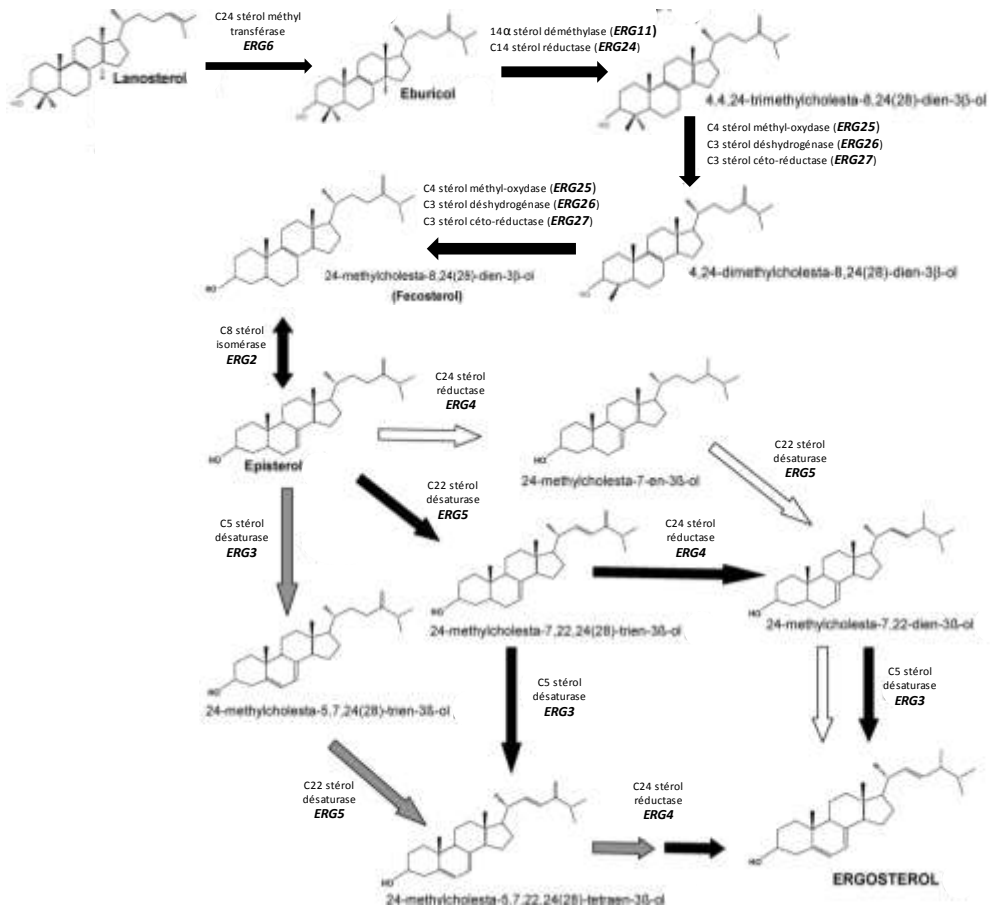
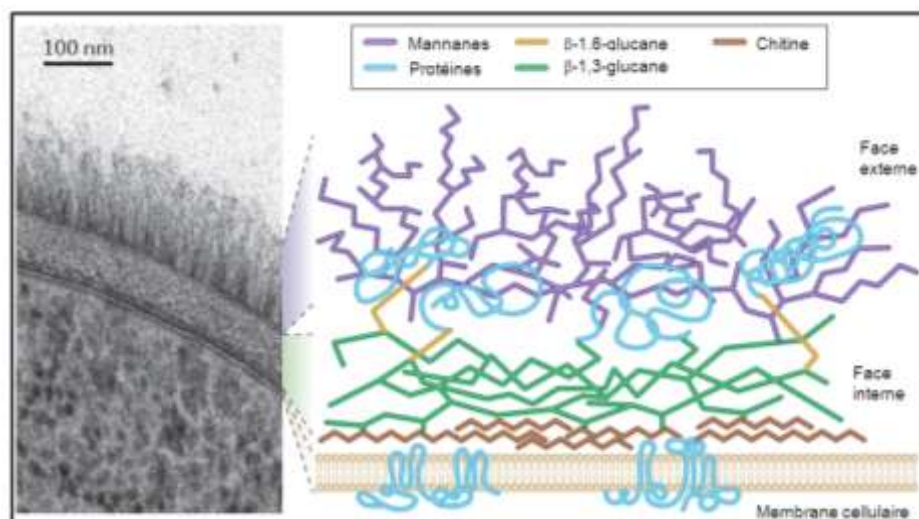


Figure 4 : Représentation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *A. fumigatus*  
 Source : d'après Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008b

La paroi de ces champignons joue un rôle important notamment dans le maintien de l'intégrité cellulaire et le processus d'adhésion. Elle constitue une cible thérapeutique pour les antifongiques de la famille des échinocandines. La structure de la paroi des *Candida* est complexe et comprend une très grande majorité de polysaccharides (90 %) associés à des protéines et des lipides (Figure 5) (Chaffin, 2008). Ces polysaccharides regroupent les glucanes (polymères de glucose de type  $\beta$ 1-3 et  $\beta$ 1-6-glucanes), la chitine (polymère de N-acétylglucosamine) et des mannoprotéines (polymères de mannose ou mannanes, liés de manière covalente à des protéines). Alors que la chitine et les glucanes se localisent préférentiellement sur la face interne de la paroi, les mannoprotéines sont principalement retrouvées du côté extracellulaire (Chaffin, 2008). Chez *C. albicans*, la proportion des glucanes au sein de la paroi est de 47 à 60 %, celle des mannoprotéines de 30 à 40 %, la chitine représentant 0.6 à 9 % (Chaffin, 2008). Toutefois, cette composition est dynamique et la proportion des différents constituants évolue en fonction de la morphologie de la levure (Chaffin, 2008). Ainsi, la proportion de chitine est trois fois plus importante sous la forme filamenteuse que sous la forme levure (Chaffin, 2008).



**Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation de la paroi de *C. albicans***  
 Source : d'après Gow *et al.*, 2011

La paroi d'*A. fumigatus* est majoritairement composée de polysaccharides (au moins 90 %) et de protéines (Gastebois *et al.*, 2009 ; Abad *et al.*, 2010). La fraction polysaccharidique est composée de 20 à 35 % de  $\beta$ (1-3)-glucanes, 35 à 46 % de  $\alpha$ (1,3)-glucanes, de 20 à 25 % de

galactomannane, de 10 % de  $\beta(1,3)/(1,4)$ -glucanes et de chitine (Gastebois *et al.*, 2009 ; Abad *et al.*, 2010).

#### I.4. Le génome

Ces deux espèces fongiques ont fait l'objet d'un projet de séquençage de leur génome.

Le génome de *C. albicans* est diploïde et a été obtenu à partir du séquençage des souches de référence SC5314 et WO-1 (Jones *et al.*, 2004 ; Braun *et al.*, 2005 ; Butler *et al.*, 2009). Sa taille est d'environ 14 Mb (par génome haploïde) et contient un peu plus de 6100 gènes répartis sur 8 chromosomes, nommés de 1 à 7 (par ordre de taille décroissante) et un chromosome nommé R. Chacun de ces chromosomes présente une région centromérique d'environ 3 à 4.5 kb mais la formation de néocentromères a été décrite (Sanyal *et al.*, 2004 ; Mishra *et al.*, 2007 ; Ketel *et al.*, 2009). Comme pour *S. cerevisiae*, seule un faible nombre des gènes de *C. albicans* possèdent des introns. La taille moyenne des gènes est de 1439 pb, similaire à celle des autres espèces de *Candida* (Butler *et al.*, 2009). *C. albicans* présente un taux de polymorphisme relativement important, de l'ordre d'une mutation toutes les 330 à 390 pb soit bien supérieur aux autres espèces du genre (Butler *et al.*, 2009). A noter que ce polymorphisme n'est pas également distribué le long du génome mais est plus fréquent dans certaines régions dont la région MTL (Mating-Type Locus) située sur le chromosome 7. Une caractéristique importante de *C. albicans*, également partagée par d'autres espèces de *Candida* (*C. dubliniensis*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* notamment), toutes regroupées au sein du clade « CTG », concerne son code génétique dans lequel le codon CTG, codant habituellement une leucine, code une sérine. Enfin, l'importante plasticité du génome de *C. albicans* va jouer un rôle majeur dans l'acquisition de la résistance aux antifongiques (Selmecki *et al.*, 2010).

Le génome de la souche Af293 d'*A. fumigatus* a été publié en 2005 (Nierman *et al.*, 2005). Son génome, haploïde, représente 29.4 Mb soit plus du double de celui de *C. albicans*. Il contient près de 10 000 gènes, distribués sur huit chromosomes. A la différence de *C. albicans*, le génome d'*A. fumigatus* possède de nombreux introns (1.8 en moyenne/gène). Par ailleurs, certains gènes apparaissent dupliqués dont ceux impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol comme *ERG3* et *ERG11* (Nierman *et al.*, 2005).

Les principales caractéristiques du génome de *C. albicans* et d'*A. fumigatus* sont présentées dans le Tableau I.

**Tableau I : Données comparatives du génome de *C. albicans* et d'*A. fumigatus***Source : d'après Nierman *et al.*, 2005 ; Butler *et al.*, 2009

Espèces	Taille du génome haploïde (Mb)	% GC	Nombre de gènes	Taille moyenne des gènes (pb)	Longueur moyenne des séquences intergéniques (pb)	Ploïdie
<i>Candida albicans</i> WO-1	14.4	33.5 %	6159	1444	921	diploïde
<i>Candida albicans</i> SC5314	14.3	33.5 %	6107	1468	858	diploïde
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	29.4	49.9 %	9926	1431	1226	haploïde

## II. Pouvoir pathogène de *Candida albicans* et d'*Aspergillus fumigatus*

*Candida albicans* et *A. fumigatus* sont des champignons cosmopolites. Le premier est un commensal saprophyte des muqueuses digestives et génitales chez l'Homme, le second est une moisissure ubiquiste très répandue dans le milieu extérieur se situant au 4<sup>ème</sup> rang des spores fongiques de l'air. Pathogènes opportunistes, ces deux champignons peuvent être à l'origine d'un large spectre de manifestations cliniques, affectant plus particulièrement l'arbre respiratoire dans le cas d'*A. fumigatus*. La survenue et la sévérité sont largement conditionnées par l'existence de multiples facteurs favorisant le plus souvent liés à l'hôte.

### II.1. Facteurs de virulence

En plus des nombreux facteurs de risque liés à l'hôte, *C. albicans* possède la capacité d'exprimer une multitude de facteurs de virulence susceptibles de favoriser la colonisation et l'invasion de l'hôte. Il s'agit d'une large gamme d'adhésines, molécules de surface, capables d'interférer avec les récepteurs membranaires de l'hôte comme la famille des ALS (Agglutinin-Like-Sequence) dont Als3, la famille des HSP70 comme Ssa1, de Hwp1 ou bien de l'adhésine Camp65 (Phan *et al.*, 2007 ; Sun *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2011). L'invasion tissulaire, largement dépendante d'une rupture de l'intégrité de l'épithélium va pouvoir être facilitée par la sécrétion de protéinases comme celles de la famille des Sap (Secretyl Aspartyl Proteinase) voire de phospholipases (Naglik *et al.*, 2003 ; Zhu *et al.*, 2010). Le dimorphisme de *C. albicans*, à savoir sa capacité de transition de la forme levure à une forme filamenteuse est

également un élément important participant à l'invasion tissulaire (Whiteway et Bachewich, 2007 ; Sudbery, 2011 ; Brand, 2012).

En ce qui concerne *A. fumigatus*, la petite taille des spores, leur permettant d'atteindre les alvéoles pulmonaires et sa thermotolérance, constituent autant de facteurs participant à sa virulence (Dagenais et Keller, 2009). *Aspergillus fumigatus* est aussi capable de produire un grand nombre de composés toxiques susceptibles de jouer un rôle dans le processus invasif comme des ribonucléases, l'haemolysine ainsi que des métabolites secondaires (Latgé, 2001 ; Dagenais et Keller, 2009). La gliotoxine est capable d'induire l'apoptose des cellules de l'hôte et d'inhiber la phagocytose alors que la fumagilline et l'acide helveolique altèrent tous deux la fonction mucociliaire et participent à la dégradation de l'épithélium respiratoire (Latgé, 2001 ; Dagenais et Keller, 2009). Par ailleurs, la sécrétion de catalases et de superoxyde dismutases permet une meilleure résistance au stress oxydatif sans compter la production d'un large éventail de protéases (sérines protéases, aspartyl protéases et métalloprotéases) et de phospholipases (Latgé, 2001 ; Hohl et Feldmesser, 2007). Enfin, la production de divers pigments joue également un rôle dans la virulence notamment en modulant la réponse cytokinique de l'hôte (Chai *et al.*, 2010).

## **II.2. Spectre clinique**

Le spectre clinique des infections dues à *C. albicans* et à *A. fumigatus* est large et dépendant de la présence de nombreux facteurs favorisants.

### **II.2.1. Infections à *Candida albicans***

*Candida albicans* est de loin l'espèce la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine, quel que soit le type d'infection considérée (Develoux et Bretagne, 2005). Le rôle des facteurs favorisants est essentiel car ils peuvent conditionner le type d'infection, superficielle ou profonde. Les atteintes superficielles sont les plus fréquentes et sont généralement bénignes. Il s'agit d'infections cutanées affectant les plis comme l'intertrigo candidosique (Figure 6), d'infections des muqueuses buccales, œsophagiennes, digestives ou bien encore anales. La candidose oropharyngée est en particulier fréquente chez le patient infecté par le VIH, pouvant être révélatrice de l'infection (Figure 7). Son extension à l'œsophage est en lien direct avec la

diminution du taux des lymphocytes T CD4+ sous le seuil de 100 éléments/mm<sup>3</sup> (Vazquez, 2011). L'atteinte de la muqueuse vaginale est fréquente, ainsi près de 75 % des femmes en âge de procréer ont déjà souffert d'une candidose vulvo-vaginale, *C. albicans* étant encore une fois l'espèce la plus fréquemment impliquée (Sobel, 2007).



**Figure 6 : Aspect clinique d'un intertrigo candidosique palmaire**  
Source : Cd-Rom ANOFEL 4



**Figure 7 : Aspect clinique d'une candidose buccale**  
Source : Cd-Rom ANOFEL 4

L'atteinte des ongles, ou onyxis, s'accompagne généralement d'un périonyxis et siège préférentiellement au niveau des mains (Figure 8). Les principaux facteurs favorisant ces infections superficielles sont multiples, locaux (humidité, macération, altération de la barrière cutanéomuqueuse) et/ou généraux (diabète, âges extrêmes de la vie, antibiothérapie à large spectre, usage de corticoïdes en topique, immunodépression, etc.) (Develoux et Bretagne, 2005).

Dans le cas particulier de la candidose cutanéomuqueuse chronique, affection rare, le rôle de mutations situées au niveau des gènes impliqués dans l'immunité innée a pu être démontré (Ferwerda *et al.*, 2009 ; Puel *et al.*, 2011 ; Van de veerdonk *et al.*, 2011).





**Figure 8 : Aspect clinique d'un onyxis candidosique avec périonyxis**

Source : Cd-Rom ANOFEL 4

A côté de ces infections superficielles et le plus souvent bénignes, *C. albicans* peut être responsable d'infections invasives de mauvais pronostic. La manifestation la plus fréquente de ces formes invasives est la septicémie à *Candida* ou candidémie résultant le plus souvent d'une translocation digestive (Voss *et al.*, 1994 ; Nucci et Anaissie, 2001 ; Miranda *et al.*, 2009). Tous les organes peuvent être atteints, notamment en cas de dissémination hémotogène, mais les atteintes cutanées, rénales, oculaires voire cardiaques sont les plus fréquentes (Vazquez, 2011). Les levures du genre *Candida* occupent le 4<sup>ème</sup> rang des microorganismes responsables de septicémies (10 à 15 %). La majorité des infections fongiques nosocomiales est due aux *Candida* et à *C. albicans* dans 50 à 75 % des cas (Pittet, 2010). Dans une étude épidémiologique rétrospective de 187 épisodes de candidémies, survenus entre 2004 et 2010 au Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, *C. albicans* était l'espèce la plus fréquente (52 %, n=100) devant *C. parapsilosis* (14 %, n=28), *C. tropicalis* (10 %, n=19) et *C. glabrata* (10 %, n=19) (Tadec *et al.*, 2012). Comme pour les candidoses superficielles, la survenue d'une infection invasive, va être conditionnée par la présence de facteurs de risque, nombreux et fréquemment associés chez un même patient. Parmi ces facteurs de risque, il faut retenir l'immunodépression et en particulier la neutropénie, la transplantation d'organes, un séjour prolongé en réanimation, un antécédent récent de chirurgie digestive, la présence d'un dispositif intravasculaire ou bien encore l'existence d'une colonisation préalable à *Candida* (Pfaller et Diekema, 2007). C'est donc logiquement que ces infections vont principalement survenir dans les unités de soins intensifs notamment les services de réanimation chirurgicale, les services d'onco-hématologie, les services accueillant des polytraumatisés ou les grands-brûlés.

Comme nous le verrons, les antifongiques de la famille des azolés, occupent une place de choix dans la stratégie thérapeutique de ces infections invasives.

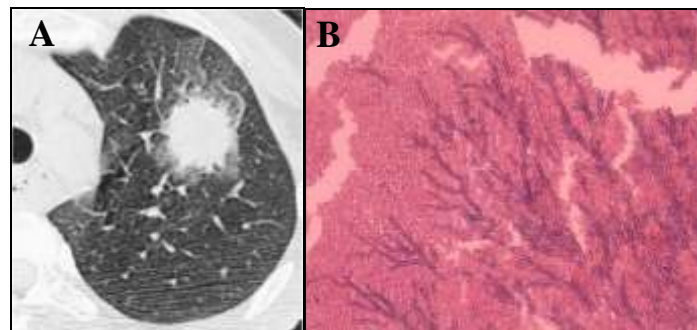
### II.2.2. Infections à *Aspergillus fumigatus*

Parmi le genre *Aspergillus*, l'espèce *A. fumigatus* est de loin la plus fréquente en pathologie humaine, impliquée dans 80 à 90 % des cas, l'implication des autres espèces (dont *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* et *A. nidulans*) étant nettement plus rare. Pathogène opportuniste, son développement chez l'hôte est sous la dépendance de nombreux facteurs favorisant, locaux (caverne tuberculeuse, broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), dilatation des bronches, mucoviscidose, etc.) et/ou généraux (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, chimiothérapies aplasiantes, etc.). Des facteurs environnementaux comme l'abondance des spores aspergillaires dans l'air inhalé mais également liés au champignon comme la petite taille des spores, sa thermotolérance et des facteurs de virulence vont également contribuer à la fréquence de la pathologie aspergillaire.

Le spectre clinique des aspergilloses notamment dues à *A. fumigatus*, concerne principalement l'arbre respiratoire même si des atteintes superficielles sont décrites, les plus fréquentes étant les otomycoses, plus rarement des onyxis voire des kératites. *Aspergillus fumigatus* peut être à l'origine de sinusites, d'alvéolites allergiques extrinsèques résultant de l'inhalation massive et répétée de spores aspergillaires, de surinfections bronchiques au cours des BPCO et de la mucoviscidose. Au cours de la mucoviscidose, la colonisation des voies aériennes par *A. fumigatus* est un évènement fréquent concernant de 16 à 57 % des patients et susceptible de contribuer à la dégradation de la fonction respiratoire même si les données disponibles sont contradictoires (Pihet *et al.*, 2009 ; Amin *et al.*, 2010 ; De Vrankrikjer *et al.*, 2011). Chez ces patients comme chez le sujet asthmatique, la persistance de spores aspergillaires au niveau trachéobronchique, en particulier d'*A. fumigatus*, peut déclencher des réactions d'hypersensibilité pouvant conduire à l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA). On estime ainsi la prévalence de l'ABPA à 2 % chez les patients présentant un asthme mais elle est bien plus importante, entre 7 et 14 %, chez les patients nécessitant une corticothérapie (Stevens *et al.*, 2003). De la même manière, 1 à 15 % des patients souffrant de mucoviscidose sont à risque d'ABPA (Stevens *et al.*, 2003).

Chez le patient immunocompétent, la clinique est dominée par l'aspergillome, infection liée au développement du champignon au sein d'une cavité préformée, bronchique ou pulmonaire, séquellaire d'une tuberculose ou d'une sarcoïdose le plus souvent. Au sein de cette cavité, la croissance du champignon s'effectue sous la forme d'une balle fongique ou truffe, qui se traduit par l'image radiologique dite en « grelot » (Kousha *et al.*, 2011).

Les aspergilloses invasives, formes les plus graves, sont quasi-exclusivement l'apanage des patients profondément immunodéprimés. Le foyer primitif est le plus souvent pulmonaire (Figure 9) et résulte de l'invasion du parenchyme pulmonaire par le champignon avec destruction tissulaire et hémorragie conférant dans les stades précoces de l'infection, l'aspect radiologique d'un (ou plusieurs) nodule(s) entouré(s) d'une couronne de verre dépoli ou signe du « halo » (Caillot *et al.*, 2001 ; Kousha *et al.*, 2011).



**Figure 9 : Aspect radiologique (A) et histologique (B) d'une aspergillose pulmonaire invasive**  
Source : Caillot *et al.*, 2001 ; collection personnelle

Les atteintes extra-pulmonaires sont généralement le résultat d'une dissémination hématogène à de rares exceptions près comme dans le cas des endocardites aspergillaires (Morio *et al.*, 2008 ; Kousha *et al.*, 2011). Le principal facteur de risque de l'aspergillose pulmonaire invasive (API) est l'existence d'une neutropénie profonde (moins de 500 éléments/mm<sup>3</sup>) et prolongée (plus de 10 jours) mais il en existe de nombreux autres, comme l'administration de thérapeutiques immunosuppressives dont la ciclosporine et les corticostéroïdes au long cours à doses élevées (plus de 0.3 mg/kg pendant plus de trois semaines) plus rarement les déficits immunitaires sévères (Baddley, 2010). Ce sont donc naturellement les patients d'hémo-oncologie ayant bénéficié d'une chimiothérapie d'induction aplasante, les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques ou présentant une réaction du greffon contre l'hôte (GVH) ainsi que ceux ayant bénéficié d'une transplantation d'organes solides, en particulier pulmonaire, qui constituent la principale population à risque (Baddley, 2010). L'incidence de l'API chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques est plus importante après allogreffe qu'autogreffe se situant entre 2.3 et 15 % en fonction des études (Kousha *et al.*, 2011). Les mesures de prévention du risque aspergillaire sont donc primordiales dans les services cliniques hébergeant ces patients à risque afin de prévenir le risque d'acquisition nosocomiale d'*A. fumigatus* à partir de souches de l'environnement hospitalier (Pelaez *et al.*, 2012a).

Malgré les progrès thérapeutiques, la mortalité associée à l'API reste élevée proche de 50 % à 12 semaines, dans une étude multi-centrique récente menée en France (Lortholary *et al.*, 2011). Comme nous le verrons plus loin, les antifongiques de la famille des azolés occupent une place de choix dans la stratégie thérapeutique et les schémas prophylactiques de prise en charge des aspergilloses.

### II.3. Impact médico-économique

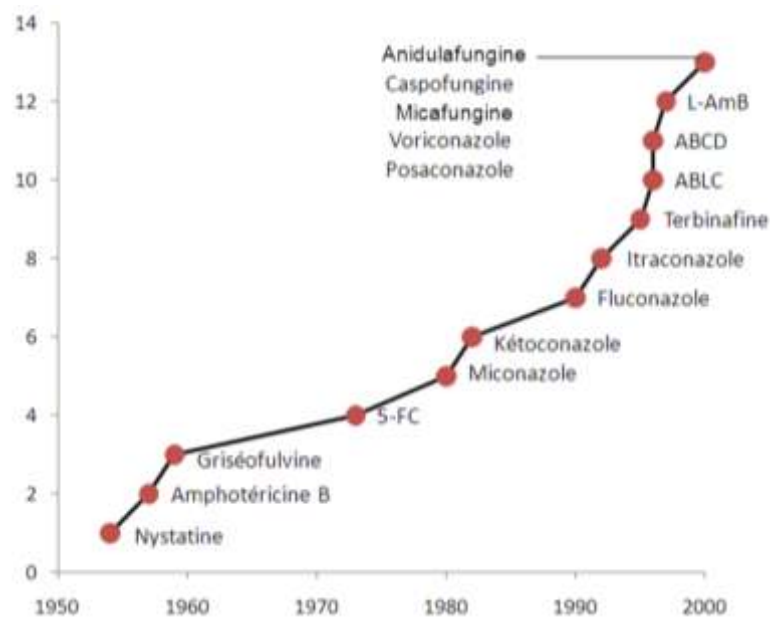
L'impact médico-économique de ces infections est important aussi bien du point de vue économique que médical, la morbidité et mortalité associées aux infections invasives étant élevées. Cela est particulièrement bien illustré avec les candidoses invasives. En effet, bien que leur incidence soit plus faible que celle des bactériémies (Martin *et al.*, 2003), de l'ordre de 2 % admissions en moyenne dans les services de soins intensifs, elle est encore supérieure chez les patients d'hématologie (Tadec *et al.*, 2012). La survenue d'une candidémie est un facteur de mauvais pronostic car associée à une mortalité globale élevée oscillant entre 30 et 50 % en fonction des études (Tortorano *et al.*, 2006 ; Horn *et al.*, 2009 ; Bassetti *et al.*, 2011 ; Ortega *et al.*, 2011 ; Tadec *et al.*, 2012). Cependant, la mortalité réellement attribuable à l'épisode de candidémie est en effet difficile à déterminer car elle résulte de nombreux paramètres liés notamment à la pathologie sous-jacente. Elle est de ce fait extrêmement variable en fonction des études, mais toujours supérieure à celle due aux épisodes de bactériémies oscillant entre 20 et 50 % (Wey *et al.*, 1988 ; Gudlaugsson *et al.*, 2003 ; Morgan *et al.*, 2005 ; Zaoutis *et al.*, 2005).

Outre l'impact de ces infections fongiques sur la mortalité, l'impact économique de la prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives est également considérable et évalué entre 40 000 et 50 000 \$ par épisode, résultat de l'augmentation de la durée du séjour à l'hôpital, du coût élevé des traitements antifongiques et des procédures diagnostiques (Morgan *et al.*, 2005 ; Pfaller et Diekema, 2007 ; Hassan *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2011).

Enfin, au coût de la prise en charge thérapeutique à visée curative, il faut également considérer dans le cadre des aspergilloses invasives, le coût des traitements prophylactiques important dans le cadre de l'utilisation du posaconazole mais permettant néanmoins de limiter l'incidence des infections (Cornely *et al.*, 2007 ; Ullmann *et al.*, 2007 ; Michallet *et al.*, 2011).

## II.4. Antifongiques disponibles

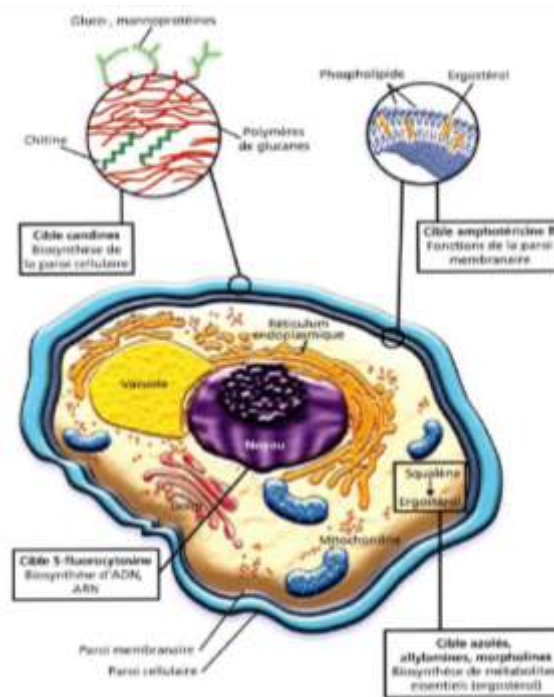
Bien que les antifongiques systémiques soient disponibles depuis les années 1950, durant plusieurs décennies, l'arsenal antifongique était restreint à l'amphotéricine B et à la nystatine, tous deux présentant une forte toxicité rénale, limitant leur utilisation (Figure 10). Les années 1980 ont vu le développement des composés imidazolés puis des premiers triazolés, véritable révolution dans le domaine de la mycologie médicale du fait de formulations orales et intraveineuses et d'une bonne efficacité sur les espèces moins sensibles aux polyènes. Les années 1990 ont été marquées, d'une part, par le développement de nouveaux composés triazolés et, d'autre part, par le développement de formulations lipidiques de l'amphotéricine B, moins néphrotoxiques (Mistro *et al.*, 2012). Au début des années 2000, une nouvelle famille d'antifongiques, les échinocandines, est apparue sur le marché (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010).



**Figure 10 : Explosion du développement des antifongiques systémiques des années 50 aux années 2000.**

**Légende :** 5-FC, 5-fluorocytosine ; ABLC, complexe lipidique d'amphotéricine B ; ABCD, solution colloïdale d'amphotéricine B ; L-AmB, amphotéricine B liposomale

A l'heure actuelle, six grandes classes d'antifongiques sont disponibles pour la prise en charge des infections fongiques : les azolés, les polyènes, les échinocandines, les pyrimidines, les allylamines et les morpholines. Une représentation schématique des cibles thérapeutiques de ces antifongiques est présentée (Figure 11). Toutes n'ont pas une indication pour la prise en charge des candidoses et aspergilloses.



**Figure 11 : Cibles des principales classes d'antifongiques**  
 Source : Collectif, JIDIF, 2003

### II.4.1. Les azolés

Large gamme d'antifongiques, ces composés issus de la synthèse entraînent une perte de l'intégrité de la membrane fongique via l'inhibition de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, enzyme clef dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

#### II.4.1.1. Historique et molécules disponibles

La première description de l'activité antifongique d'un composé azolé, le benzimidazole, est rapportée en 1944 par Woolley, mais il faut attendre 1958, soit l'introduction du chlormidazole pour que les chercheurs s'intéressent aux potentialités antifongiques de cette classe de molécules (Maertens, 2004). Au début des années 60, plusieurs composés à visée topique sont ainsi développés : clotrimazole, miconazole et éconazole. En 1981, le kétoconazole, premier antifongique à usage systémique est mis sur le marché. Il occupera une place importante dans la stratégie thérapeutique pendant de nombreuses années malgré une absorption très variable, une

mauvaise tolérance digestive, l'absence de formulation parentérale et de nombreuses interactions médicamenteuses (Maertens, 2004).

Le noyau triazolé qui a succédé rapidement au noyau imidazolé, pharmacophore caractérisant les premières molécules, permet d'accroître la spécificité vis-à-vis du cytochrome P450 fongique et de ralentir leur métabolisation (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010). Le fluconazole est le premier triazolé autorisé sur le marché américain en 1990. Ses atouts sont l'existence d'une formulation intraveineuse et sa capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique à la différence du kétoconazole. Il sera suivi peu de temps après, en 1992, par le développement de l'itraconazole dont le spectre est élargi aux champignons filamenteux mais dont l'absorption est variable et la tolérance digestive limitée (Pound *et al.*, 2011). Ces dix dernières années, deux composés triazolés dits de « seconde génération », le voriconazole en 2002 et plus récemment le posaconazole en 2006, sont mis sur le marché. Ils constituent le résultat des avancées dans la compréhension des relations structure-activité des composés azolés à potentialité antifongique (Pound *et al.*, 2011). Ainsi, dans le voriconazole par rapport au fluconazole, l'insertion d'un groupement méthyl (A) permet une affinité accrue de l'antifongique pour le site actif de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase et le remplacement d'un noyau triazole par une pyrimidine fluorée (B), se traduit par une augmentation de l'activité *in vitro* et de l'efficacité *in vivo* (Figure 12).

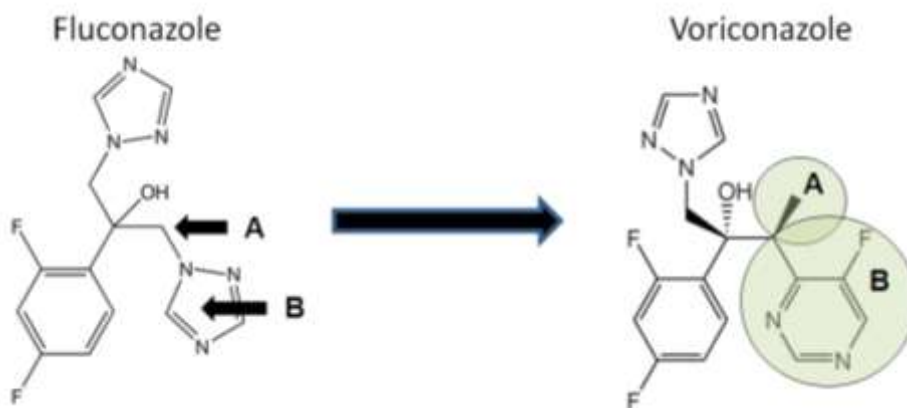


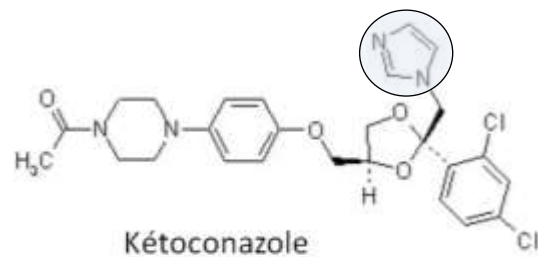
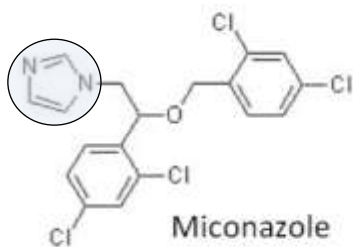
Figure 12 : Pharmocomodulation des azolés

Par rapport aux triazolés de « première génération », ces composés possèdent une activité accrue sur les levures du genre *Candida* et un spectre élargi à certains champignons filamenteux comme les mucorales pour le posaconazole (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2009 ; Cornely *et al.*, 2009).

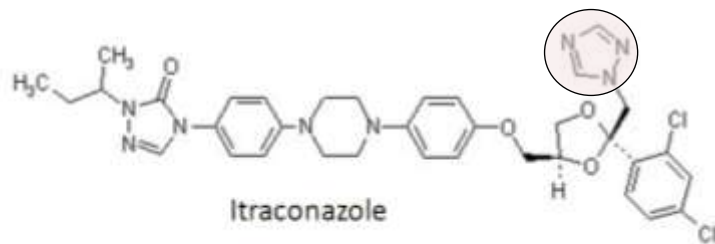
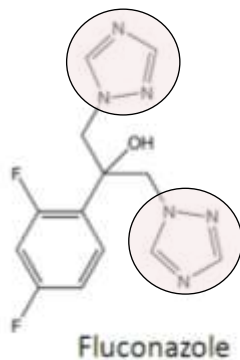
D'autres composés triazolés sont en développement, à un stade plus ou moins avancé. Il s'agit notamment de l'albaconazole (UR-9825 et W0027) dont la phase Iib (Palau Pharma et Stiefel-GSK) est terminée pour l'aspect systémique et plusieurs essais de phase I en topique sont en cours. Les essais cliniques de phases I et II du ravuconazole (BMS-207147 et ER-30346) dans le cadre du traitement des infections fongiques au cours des greffes de cellules souches hématopoïétiques (Bristol Myers Squibb) viennent de s'achever. Enfin, l'isavuconazole (BAL4815 et BAL8557) est actuellement en essai clinique de phase III (Astellas Pharma et Basilea Pharmaceutica) pour le traitement des infections invasives à *Candida* (NCT00413218) et de l'aspergillose invasive (NCT00412893) et en phase I pour l'étude des paramètres pharmacocinétiques chez le patient insuffisant rénal (NCT01555866) (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010 ; Pasqualotto *et al.*, 2010).

La famille des antifongiques azolés est donc probablement la plus réussie en termes de nombre de molécules qui ont pu franchir le cap de leur utilisation en clinique. Ces composés se répartissent en composés imidazolés ou triazolés selon le nombre d'atomes d'azote de l'hétérocycle (deux ou trois respectivement) (Figure 13).

### Imidazolés

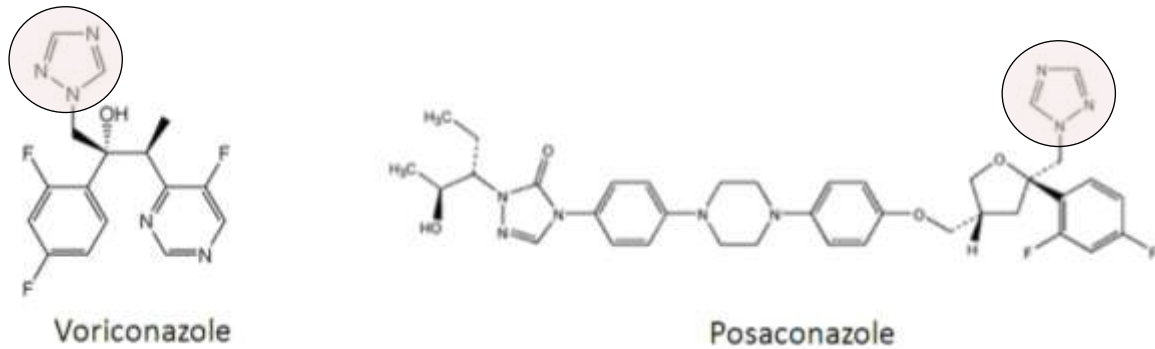


### Triazolés de « première génération »

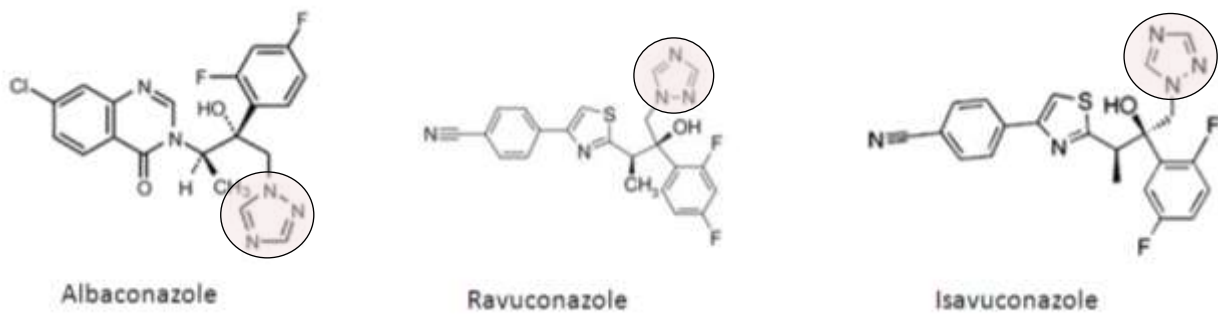




Triazolés de « seconde génération »



Molécules en développement



**Figure 13 : Structures chimiques des principaux antifongiques azolés**  
Légende : le noyau imidazole est encadré en bleu, le noyau triazole en rouge

La plupart des composés imidazolés est réservée à un usage topique du fait de leur toxicité et d'une biodisponibilité réduite, limitant leur utilisation systémique. Ainsi, la forme comprimé du kétoconazole destinée à un usage systémique (NIZORAL<sup>®</sup>) a été retirée du marché par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) en 2011 du fait de sa toxicité hépatique. A l'heure actuelle, les molécules ayant une autorisation de mise sur le marché pour la prise en charge des infections invasives sont toutes des triazolés : fluconazole, itraconazole, voriconazole et posaconazole.

Bien que ces composés triazolés soient tous utilisables par voie orale, ils présentent des paramètres pharmacocinétiques distincts (biodisponibilité, fixation aux protéines plasmatiques, etc.). A titre d'exemple, alors que la biodisponibilité du fluconazole et du voriconazole sont élevées (> 90 %), celle de l'itraconazole est nettement plus faible (± 55 %) tout comme celle du

posaconazole et variables notamment en cas d'administration concomitante d'antiacides ou de matières grasses (Pound *et al.*, 2011). La métabolisation des azolés par divers cytochromes dont le CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 est variable en fonction des molécules (Pound *et al.*, 2011).

#### **II.4.1.2. Mode d'action des azolés**

L'ergostérol est le principal composant de la membrane plasmique des champignons (Parks et Casey, 1996). Il contribue au maintien de la fluidité et de l'intégrité de la membrane et au bon fonctionnement des enzymes membranaires tels que les protéines associées au transport des nutriments (Lupetti *et al.*, 2002 ; Abé *et al.*, 2009). Sa voie de biosynthèse est complexe et fait intervenir de nombreuses étapes enzymatiques (Figure 14).

Le mode d'action des azolés repose sur l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol via l'inhibition spécifique de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, enzyme cytochrome P-450 dépendante (Hitchcock *et al.*, 1990 ; Heimark *et al.*, 2002 ; Munayyer *et al.*, 2004). Cette enzyme, clef dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Figure 14), assure l'enlèvement d'un groupement méthyle au niveau du carbone en position 14 (C14) permettant la conversion du lanostérol en 4,4-diméthylergosta- 8,14,24-triénol, réalisée en trois étapes successives aboutissant à la formation de dérivés 14-hydroxyméthyl, 14-carboxyaldehyde et 14-formyl avant d'aboutir finalement à la réduction de la double liaison entre les carbones C14 et C15 (Aoyama *et al.*, 1989). A noter que l'éburicol est également substrat de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase et pourrait, selon certains auteurs, être son principal substrat chez *C. albicans* (Martel *et al.*, 2010b ; Warrilow *et al.*, 2010).

Sur le plan moléculaire, l'inhibition de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase par les antifongiques azolés est liée à leur fixation covalente, en tant que sixième ligand, à l'atome de fer de l'hème via un des atomes d'azote de l'hétérocycle (Joseph-Horne *et al.*, 1997). Cette fixation covalente, qui empêche la fixation de l'oxygène, bloque donc le processus oxydatif et abouti *in fine* à une déviation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol vers la formation d'intermédiaires de type 14 $\alpha$ -methyl stérols (dont le 14 $\alpha$ -methyl-3,6-diol) toxiques pour la cellule fongique (Figure 14) (Yoshida *et al.*, 1987 ; Watson *et al.*, 1989 ; Kelly *et al.*, 1995).

Si la cible historique des azolés est la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase une seconde cible, la C22 désaturase (Erg5) a été décrite postérieurement (Skaggs *et al.*, 1996 ; Lamb *et al.*, 1999).

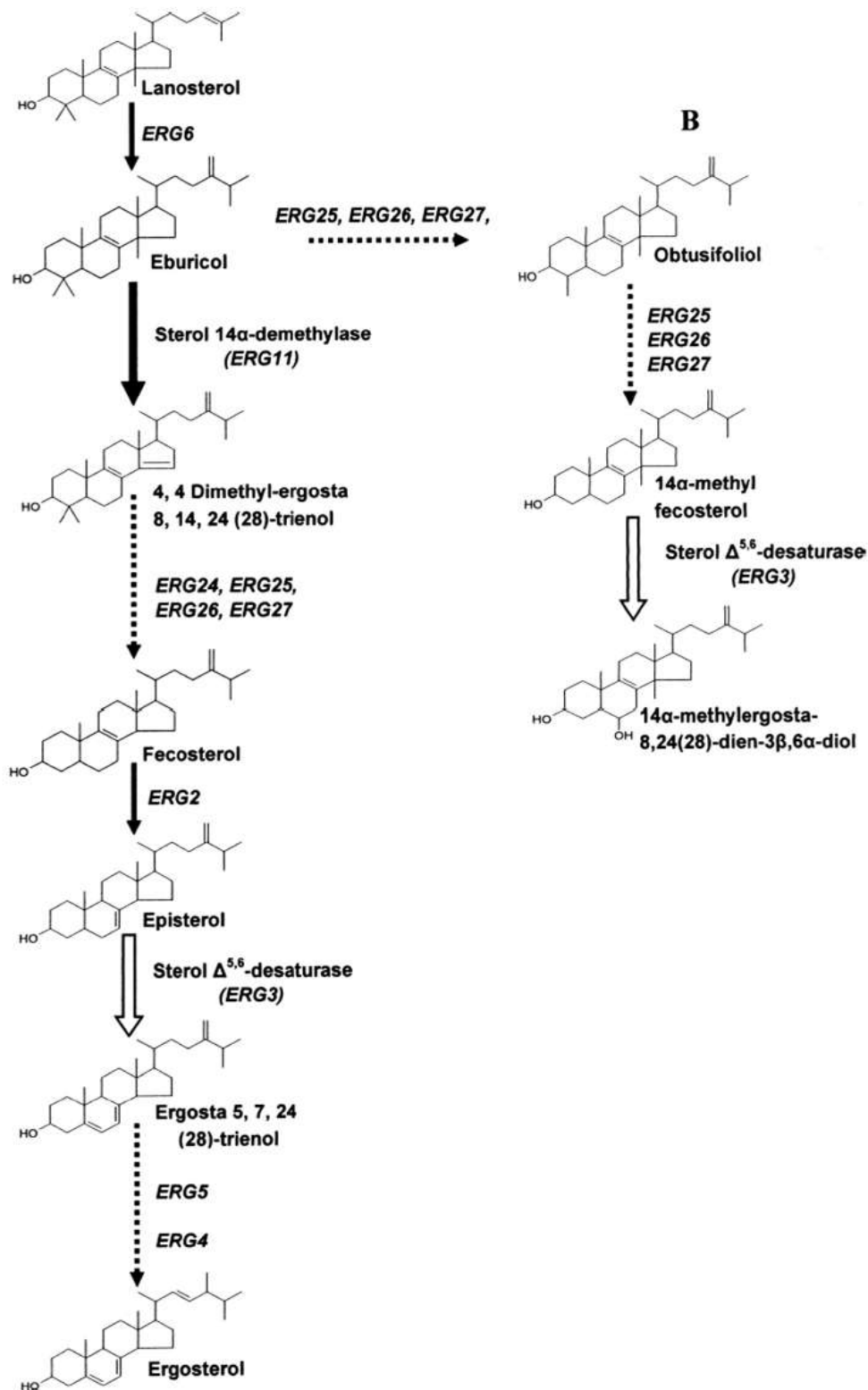


Figure 14 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *C. albicans*

Légende : Flèches en gras : une seule étape enzymatique ; flèches pointillées : plusieurs étapes enzymatiques.

Remarque : En présence d'un azolé, on observe une déviation de la voie de biosynthèse avec accumulation d'intermédiaires de type 14 $\alpha$ -méthyl stérols résultant de l'inhibition de Erg11.

Source : d'après Martel *et al.*, 2010b

Les antifongiques azolés pénètrent dans la cellule fongique par diffusion facilitée bien que les transporteurs impliqués n'ont pas encore pu être identifiés (Mansfield *et al.*, 2010). *In vitro*, ils possèdent un effet fongistatique sur les levures du genre *Candida* et fongicides sur les *Aspergillus*.

### II.4.1.3. Spectre d'activité

*In vitro*, les antifongiques de la famille des azolés présentent un large spectre d'activité et sont actifs sur la plupart des levures du genre *Candida* (Tableau II) (Pfaller *et al.*, 2004 ; Sabatelli *et al.*, 2006). Il existe toutefois des spécificités propres à chacune des molécules en particulier concernant certaines espèces de levures et de champignons filamenteux. Le spectre le plus étroit est celui du fluconazole, limité essentiellement aux *Candida* bien que certaines espèces y soient peu sensibles comme *C. glabrata* ou naturellement résistantes comme *C. krusei* (Tableau II). L'itraconazole possède un spectre d'activité globalement similaire au fluconazole mais élargi aux *Aspergillus*. Le voriconazole et le posaconazole sont considérés comme des antifongiques à large spectre. Le voriconazole possède une activité importante sur la plupart des espèces de *Candida*, en particulier sur les espèces résistantes au fluconazole comme *C. krusei* et sur de nombreux champignons filamenteux comme les *Aspergillus*, *Fusarium* et *Scedosporium* (Diekema *et al.*, 2009 ; Andes *et al.*, 2011). Pour ces derniers, il constitue le traitement de première intention des formes invasives (Troke *et al.*, 2008 ; Walsh *et al.*, 2008). Il n'est en revanche pas actif sur les mucorales contrairement au posaconazole (Greenberg *et al.*, 2006 ; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2009 ; Kondori *et al.*, 2011).

**Tableau II : Profil de sensibilité aux azolés des principales espèces de *Candida* spp.**

Légende : S : sensible ; SDD : sensible dose-dépendant ; R : résistant.

Source : d'après Pappas *et al.*, 2009

Espèce	Fluconazole	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S
<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S
<i>Candida glabrata</i>	SDD à R	SDD à R	SDD à R	SDD à R
<i>Candida krusei</i>	R	SDD à R	S	S
<i>Candida lusitanae</i>	S	S	S	S

Au total, la famille des azolés du fait du large éventail de molécules disponibles et leur forte activité sur les *Candida* et les *Aspergillus*, constituent une famille de choix dans la stratégie thérapeutique des candidoses et aspergilloses. Ainsi, le fluconazole fait partie de l'algorithme de prise en charge des candidémies (Pappas *et al.*, 2009). L'itraconazole joue quant à lui encore une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'ABPA (Walsh *et al.*, 2008 ; Limper *et al.*, 2011). Le voriconazole constitue le traitement de première intention de l'API (Walsh *et al.*, 2008 ; Limper *et al.*, 2011).

De plus, les azolés ont également une place pour la prophylaxie de ces infections. Le fluconazole est par exemple indiqué pour la prophylaxie des infections fongiques invasives en néonatalogie et en hématologie (Pappas *et al.*, 2009). Le posaconazole a montré son efficacité en prophylaxie, chez les patients recevant une chimiothérapie d'induction ou de consolidation pour une leucémie aiguë myéloïde ou un syndrome myélodysplasique ainsi que les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques sous traitement immunosuppresseur dans le cadre d'une GVH (Cornely *et al.*, 2007 ; Ullmann *et al.*, 2007). Enfin, le voriconazole est couramment utilisé pour la prévention de l'API en transplantation pulmonaire notamment chez les patients atteints de mucoviscidose et colonisés à *A. fumigatus* avant la greffe (Neoh *et al.*, 2011).

#### II.4.2. Les polyènes

Produits par des actinomycètes du genre *Streptomyces*, les polyènes sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères, qui possèdent une grande affinité pour l'ergostérol (Chapman *et al.*, 2011). Leur mode d'action repose sur la formation de pores, composés de huit molécules d'amphotéricine B, liées par des liaisons hydrophobes aux stérols membranaires. Ces pores aboutissent *in fine* à une augmentation de la perméabilité membranaire induisant la mort cellulaire par déplétion intracellulaire en potassium (Chapman *et al.*, 2011). L'effet antifongique qui en résulte est de type fongicide sur les levures.

A l'heure actuelle, deux composés sont disponibles, la nystatine (MYCOSTATINE<sup>®</sup>) et l'amphotéricine B (Figure 15). Cette dernière est disponible sous forme conventionnelle (amphotéricine B déoxycholate, FUNGIZONE<sup>®</sup>) ou sous formulations lipidiques : liposomes (AMBISOME<sup>®</sup>), complexes lipidiques (ABELCET<sup>®</sup>) ou dispersion colloïdale (AMPHOCIL<sup>®</sup>).

Seule l'amphotéricine B est utilisée pour la prise en charge des infections invasives du fait d'une formulation intraveineuse.

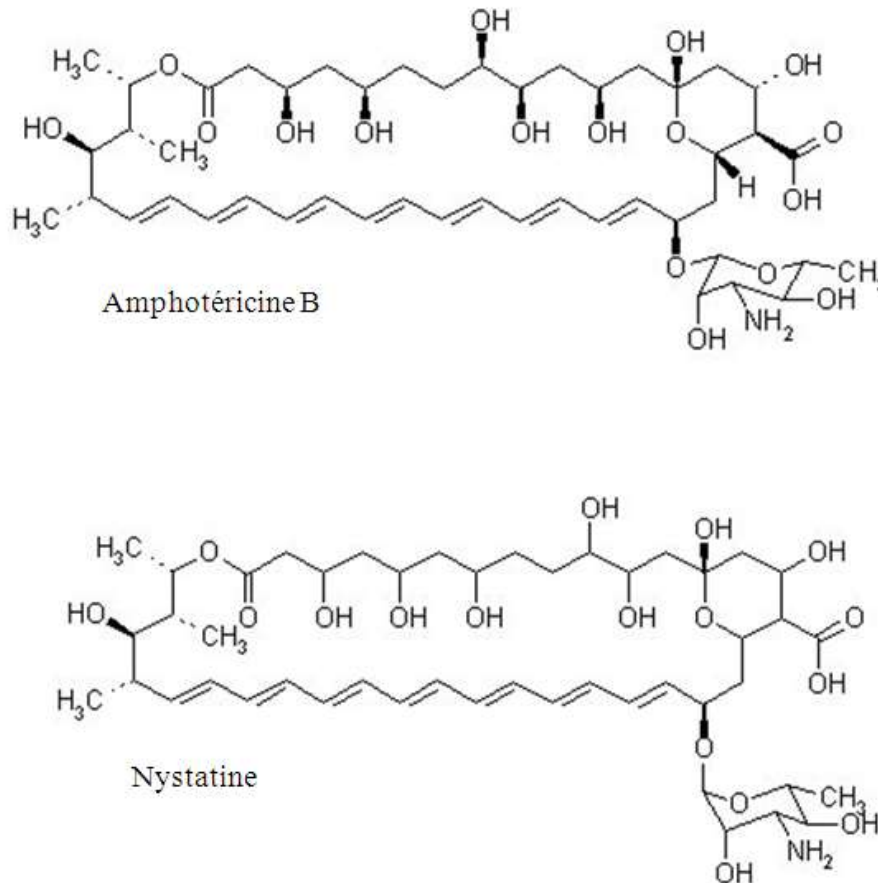


Figure 15 : Structures chimiques de l'amphotéricine B et de la nystatine

L'amphotéricine B présente une excellente activité sur les *Candida* notamment *C. albicans*, la résistance acquise à cet antifongique restant exceptionnelle (Pfaller *et al.*, 2012). A noter cependant le cas particulier de *C. lusitaniae*, espèce naturellement moins sensible à l'amphotéricine B et susceptible de développer une résistance acquise (Sanglard et Odds, 2002 ; Pfaller *et al.*, 2012). Concernant les champignons filamenteux, l'amphotéricine B possède une excellente activité sur les *Aspergillus* (à l'exception d'*A. terreus* et de certaines espèces de la section *Fumigati* comme *A. udagawae* et *A. lentulus*) et les Mucorales (Chapman *et al.*, 2011 ; Van der Linden *et al.*, 2011c). Au contraire, l'amphotéricine B n'est pas active sur les *Scedosporium/Pseudallescheria* et certaines espèces de *Fusarium* (Chapman *et al.*, 2011).

### II.4.3. Les échinocandines

Les échinocandines sont des lipopeptides semi-synthétique d'origine fongique dérivés dans le cas de la caspofungine de la pneumocandine B de *Glarea lozoyensis* (Vicente *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, trois échinocandines sont disponibles: la caspofungine (CANCIDAS<sup>®</sup>), la micafungine (MYCAMINE<sup>®</sup>) et l'anidulafungine (ECALTA<sup>®</sup>) (Figure 16).

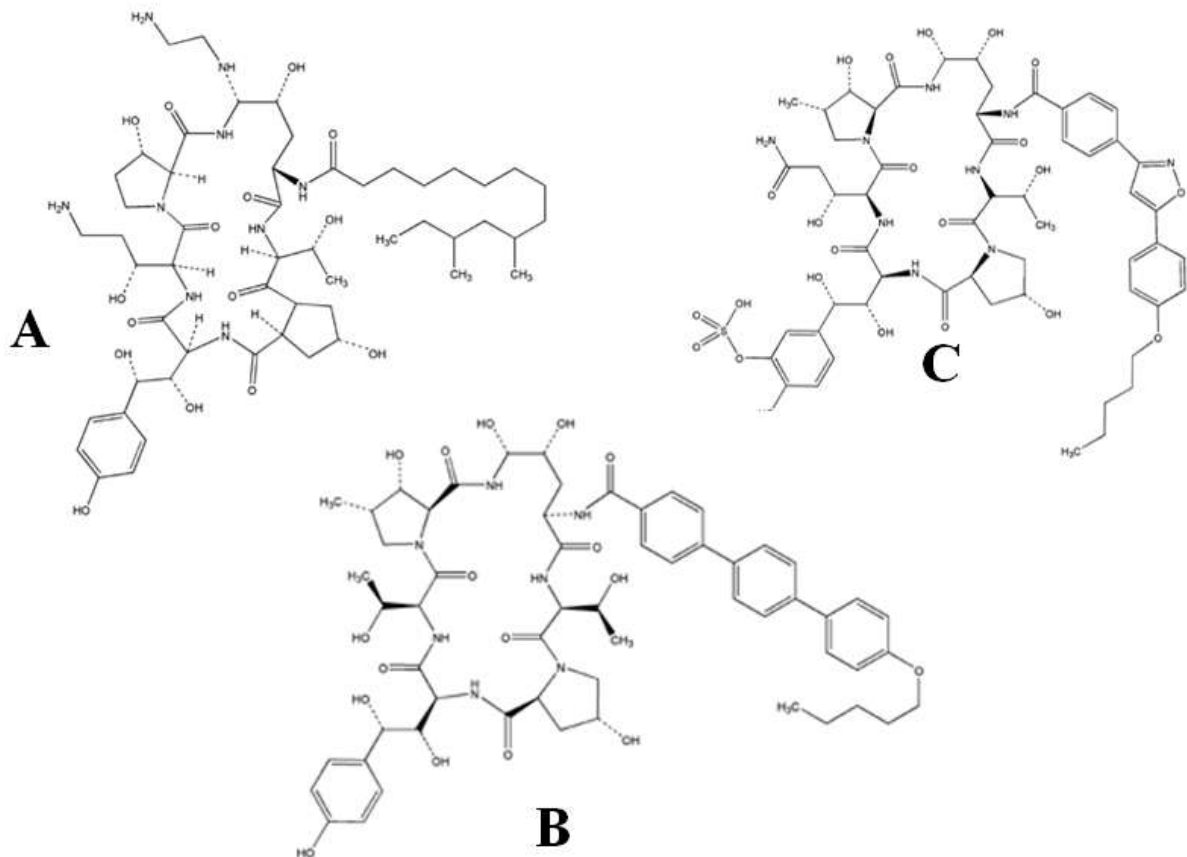


Figure 16 : Structures chimiques de la caspofungine (A), de l'anidulafungine (B) et de la micafungine (C)

Leur activité antifongique repose sur le blocage de la synthèse de la paroi via l'inhibition non compétitive de la  $\beta$ 1,3-glucane synthase, enzyme impliquée dans la synthèse du  $\beta$ 1,3-glucane, polymère de glucose indispensable à la structure et à l'intégrité de la paroi fongique (Denning *et al.*, 2003). La  $\beta$ 1,3-glucane synthase est un complexe enzymatique composé de deux sous-unités, l'une activatrice (Rho1) et l'autre catalytique et codée par les gènes *FKS* (au nombre de deux chez *C. albicans*, *FKS1* et *FKS2*) (Perlin, 2007).

Ces trois échinocandines présentent un spectre d'activité superposable, étant actives *in vitro* sur la très grande majorité des levures du genre *Candida* dont *C. albicans* (Chen *et al.*, 2011). Les échinocandines constituent souvent la première ligne de traitement pour la prise en charge des candidoses invasives (Pappas *et al.*, 2009). Elles possèdent également une action sur les *Aspergillus* et notamment *A. fumigatus* chez lesquels, en plus de leur activité fongistatique, un effet fongicide à été récemment démontré (Ingham *et al.*, 2012).

La résistance aux échinocandines est encore rare mais a déjà été décrite chez *C. albicans* et plusieurs autres espèces de *Candida* comme *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ou bien encore *C. lusitaniae* (Moudgal *et al.*, 2005 ; Hakki *et al.*, 2006 ; Baixench *et al.*, 2007 ; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2010 ; Dannaoui *et al.*, 2012 ; Fournier *et al.*, 2012). Elle repose sur la survenue de mutations au niveau de deux régions conservées (HS1 et HS2) du gène *FKSI* (Park *et al.*, 2005 ; Perlin, 2007). Néanmoins ce mécanisme n'explique pas à lui seul le phénotype de résistance de tous les isolats résistants aux échinocandines (Drakulovski *et al.*, 2011).

#### II.4.4. Les pyrimidines

La 5-fluorocytosine ou flucytosine (ANCOTIL<sup>®</sup>) est une pyrimidine fluorée de synthèse et l'unique représentant de cette classe (Figure 17). Dénuée d'activité antifongique, la 5-FC pénètre la cellule fongique grâce à des transporteurs plus ou moins spécifiques tels que la cytosine-perméase ou des transporteurs de pyrimidines. Une fois dans le milieu intracellulaire, elle est métabolisée en 5-fluorouracile (5-FU) par la cytosine désaminase puis en 5-FU monophosphate par l'uridine phosphoribosyl-transferase (UPRT) (Polak et Scholer, 1975 ; Vermes *et al.*, 2000).

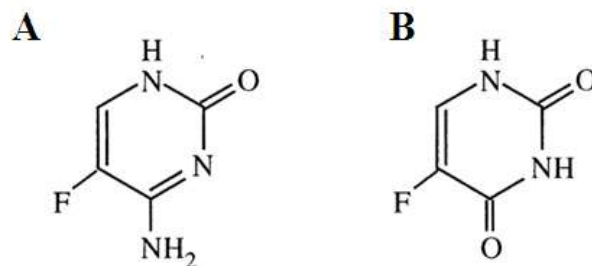


Figure 17 : Structures chimiques de la 5-fluorocytosine (A) et de son métabolite actif le 5-fluorouracile (B)



Son action antifongique s'exerce d'une part via l'inhibition de la synthèse protéique après conversion en 5-FU triphosphate et incorporation à l'ARN et, d'autre part, via l'inhibition de la thymidilate synthétase, enzyme essentielle de la biosynthèse de l'ADN après conversion en 5-FU monophosphate par l'UPRT (Vermes *et al.*, 2000). Fongistatique *in vitro*, elle est active sur les levures du genre *Candida* et *Cryptococcus* et possède également une activité sur *Aspergillus* (Vermes *et al.*, 2000 ; Larsen, 2011).

Cependant, la résistance à la 5-FC est fréquente et limite donc son usage en monothérapie (Vermes *et al.*, 2000). Celle-ci repose sur l'acquisition de mutations sur les gènes impliqués dans sa métabolisation notamment le gène *FURI* (codant l'UPRT) et/ou sur la surexpression du gène *CDC21* codant la thymidilate synthétase, conduisant à augmenter la synthèse des pyrimidines entrant alors en compétition avec l'antifongique (Vermes *et al.*, 2000 ; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2010 ; Vandeputte *et al.*, 2011).

#### II.4.5. Les allylamines

Cette classe d'antifongiques, comprend la naftifine et la terbinafine (LAMISIL®). Le mode d'action des allylamines repose sur l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol par un mécanisme distinct de celui des azolés qui implique l'inhibition de la squalène époxydase (Pappas, 2011). L'effet antifongique qui en résulte est fongistatique. La terbinafine est quasi exclusivement utilisée pour la prise en charge des infections candidosiques superficielles mais peut aussi trouver sa place dans la prise en charge des infections invasives notamment réfractaires aux traitements habituels en association avec d'autres antifongiques (Pappas, 2011). La naftifine, réservée à la prise en charge des dermatophyties, n'est pas disponible en France.

#### II.4.6. Les morpholines

Le seul composé de cette famille utilisé en clinique est l'amorolfine (LOCERYL®). Elle possède une activité fongistatique qui repose sur l'inhibition de la C14 stérol réductase (Erg24) et de la C8 stérol isomérase (Erg2), deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol (Polak, 1992). L'utilisation de l'amorolfine est limitée à la prise en charge des infections superficielles (onyxis).

### III. Etat des connaissances sur la résistance aux azolés chez *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*

La résistance aux antifongiques est un phénomène complexe et d'importance médicale car pouvant conduire à l'échec thérapeutique. Elle peut être schématiquement la conséquence d'une résistance microbiologique, d'une résistance dite « clinique » ou de la composante des deux (Pfaller, 2012).

La résistance microbiologique des champignons vis-à-vis des antifongiques n'est donc pas la seule cause d'échec thérapeutique. Les causes de résistance clinique sont multiples, parmi lesquelles le site de l'infection plus ou moins accessible à l'antifongique, des causes pharmacocinétiques (malabsorption, interactions médicamenteuses, etc.) ou bien encore la présence d'un dispositif intravasculaire qui peut être le support d'un biofilm (White *et al.*, 1998). En effet, à la manière des bactéries, les *Candida* et les *Aspergillus* sont capables de former un biofilm *in vivo* (Ramage *et al.*, 2006 ; Ramage *et al.*, 2009, Ramage *et al.*, 2011). Au sein du biofilm, structure complexe et dynamique, la résistance aux antifongiques est considérablement accrue, jusqu'à un facteur 1000 et tout particulièrement vis-à-vis des antifongiques azolés comme illustré avec *C. albicans* (Mukherjee *et al.*, 2003 ; Ramage *et al.*, 2005 ; LaFleur *et al.*, 2006 ; Tobudic *et al.*, 2011). A l'exception des mécanismes impliquant les phénomènes d'efflux, la résistance des levures aux azolés, sous forme de biofilm, diffère des levures sous forme planctonique et ne feront pas ici l'objet d'un traitement spécifique (Ramage *et al.*, 2002 ; Mukherjee *et al.*, 2003 ; Al-Fattani *et al.*, 2006 ; Perumal *et al.*, 2007 ; Nett *et al.*, 2010).

La résistance microbiologique comprend la résistance dite naturelle ou « intrinsèque » comme celle observée avec *C. krusei*, espèce naturellement résistante au fluconazole ou bien encore *A. lentulus* vis-à-vis du voriconazole, et la résistance dite « acquise », résultat d'une exposition souvent prolongée à un traitement antifongique relevant d'un processus de sélection (Van der Linden *et al.*, 2011c ; Pfaller, 2012).

Comme nous allons le voir, la résistance acquise aux azolés chez *C. albicans* et *A. fumigatus* fait intervenir plusieurs mécanismes distincts. Elle représente un réel enjeu en thérapeutique car non prévisible et susceptible de compromettre le succès thérapeutique.

### III.1. Méthodes d'étude et définition de la résistance

L'évaluation de la sensibilité *in vitro* des souches aux azolés revêt une importance particulière en cas d'infection profonde afin de prédire le succès thérapeutique. Elle peut être réalisée par de nombreuses méthodes dont certaines commerciales, comme la technique Etest<sup>®</sup> de diffusion en milieu gélosé. Des méthodes de référence, standardisées, ont été développées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (CLSI, 2004 ; CLSI, 2008a ; CLSI 2008b ; CLSI 2008c ; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2008b ; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2008c). L'intérêt de ces méthodes, les plus utilisées reposant sur le principe de microdilution en milieu liquide, réside dans leur excellente reproductibilité, permettant la confrontation des résultats issus de plusieurs laboratoires. Ces méthodes ont ainsi permis de mieux comprendre la distribution des CMI des souches considérées comme « sauvages » pour une espèce donnée. La borne supérieure de la distribution des CMI permet de définir l'ECV (Epidemiological Cutoff Value), qui regroupe généralement 95 % des isolats sauvages (Pfaller *et al.*, 2011e). L'ECV sert alors de support, en complément des données de pharmacocinétiques, de pharmacodynamie (PK/PD) et des données de corrélation *in vitro/in vivo*, pour établir les valeurs seuils d'interprétation clinique ou CBP (Clinical BreakPoint) permettant de prédire l'échec thérapeutique. Initialement proposées en 2005 par le CLSI, ces valeurs critiques ont fait récemment l'objet d'une révision et sont désormais adaptées à l'espèce en cause (Pfaller *et al.*, 2010a ; Pfaller *et al.*, 2011c). Par ailleurs, les résultats des CMI pour les *Candida* et les *Aspergillus* vis-à-vis des azolés sont fortement corrélés entre le CLSI et l'EUCAST, résultat de l'harmonisation des pratiques (Pfaller *et al.*, 2011a ; Pfaller *et al.*, 2011e). *Candida albicans* est une espèce habituellement sensible aux azolés comme en attestent les valeurs basses de CMI observées pour ces antifongiques, les CMI<sub>90</sub> étant respectivement de 0.25, 0.12 et 0.007 µg/mL pour le fluconazole, l'itraconazole et le voriconazole (Pfaller *et al.*, 2010a ; Pfaller *et al.*, 2011c ; Pfaller *et al.*, 2012). Ces seuils critiques, bien que nécessaires pour l'interprétation pertinente des CMI, ne sont pas encore disponibles pour tous les antifongiques.

Les valeurs seuils d'interprétation clinique pour *C. albicans* vis-à-vis des antifongiques azolés sont présentées dans le Tableau III. Ainsi, un isolat de *C. albicans* présentant une CMI de 4 µg/mL au fluconazole doit être considéré comme de sensibilité intermédiaire, la résistance étant définie pour une valeur de CMI  $\geq 8$  µg/mL.

**Tableau III : Distribution des CMI et valeurs seuils d'interprétation pour la détermination de la sensibilité aux azolés de *C. albicans* définies par le CLSI**

Antifongique	CMI (µg/mL)			Seuils d'interprétation (CMI µg/mL)			Références
	Intervalle	Mode	ECV(%) <sup>1</sup>	S	SDD	R	
Fluconazole <sup>2</sup>	0.12 - ≥64	0.12	0.5 (98.1%)	≤2	4	≥8	Pfaller <i>et al.</i> , 2010
Itraconazole <sup>3</sup>	≤0.008 - ≥8	0.03	0.12 (95.0%)	ND	ND	ND	Pfaller <i>et al.</i> , 2012
Voriconazole <sup>4</sup>	0.007 - 1	0.007	0.03 (99.0%)	≤0.125	0.25 - 0.5	≥1	Pfaller <i>et al.</i> , 2010

<sup>1</sup>Pourcentage des souches dont la CMI est inférieure à l'ECV; <sup>2</sup>Données établies à partir de 8059 souches;

<sup>3</sup>Données établies à partir de 14716 souches; <sup>4</sup>Données établies à partir de 8617 souches.

S: Sensible; SDD: Sensible Dose-Dépendant; R: Résistant; ND: Non disponible

Il est important de souligner que ces nouveaux seuils d'interprétation sont plus bas que les précédents seuils établis par le CLSI pour le fluconazole (sensible, CMI ≤ 8 µg/mL ; sensible-dose-dépendant, CMI = 16–32 µg/mL; résistant, CMI ≥ 64 µg/mL) et le voriconazole (sensible, CMI ≤ 1 µg/mL ; sensible-dose-dépendant, CMI = 2 µg/mL; résistant, CMI ≥ 4 µg/mL) (Pfaller *et al.*, 2006a ; Pfaller *et al.*, 2006b). Concernant l'itraconazole, de nouveaux seuils devraient être prochainement proposés afin de remplacer ceux utilisés jusqu'à présent (sensible, CMI ≤ 0.125 µg/mL ; sensible-dose-dépendant, CMI = 0.25–0.5 µg/mL; résistant, CMI ≥ 1 µg/mL) (NCCLS, 2002).

La détermination de la sensibilité aux antifongiques des *Aspergillus* est encore peu réalisée en routine dans les laboratoires. *Aspergillus fumigatus* (au sens strict) est une espèce habituellement sensible aux azolés. La distribution des CMI ainsi que les seuils d'interprétation proposés par l'EUCAST sont présentés dans le Tableau IV. Les données établies par le CLSI sont superposables et devraient permettre le développement prochain de seuils d'interprétation équivalents à ceux de l'EUCAST (Espinel-Ingroff *et al.*, 2010).

**Tableau IV : Distribution des CMI et valeurs seuils d'interprétation définies par l'EUCAST pour la détermination de la sensibilité aux azolés d'*A. fumigatus***

Antifongique	CMI (µg/mL)			Seuils d'interprétation (CMI µg/mL)		Références
	Intervalle	Mode	ECV(%) <sup>1</sup>	S	R	
Itraconazole <sup>2</sup>	0.008 - 32	0.25	1 (97.5%)	≤1	>2	Arendrup <i>et al.</i> , 2012
Voriconazole <sup>3</sup>	0.032 - 32	0.5	1 (96.2%)	≤1	>2	EUCAST, 2012
Posaconazole <sup>4</sup>	0.008 - 64	0.06	0.25 (87.8%)	≤0.125	>0.25	Arendrup <i>et al.</i> , 2012

<sup>1</sup>Pourcentage des souches dont la CMI est en dessous de l'ECV (les souches présentant une CMI ≥ 2 µg/mL ne sont pas considérées ; <sup>2</sup>Données établies à partir de 2389 souches ; <sup>3</sup>Données établies à partir de 1945 souches ; <sup>4</sup>Données établies à partir de 2117 souches.

S: Sensible; R: Résistant

En pratique clinique, une bonne connaissance de la distribution de CMI permet de détecter les isolats cliniques ayant acquis un mécanisme de résistance aux azolés et qui pourraient être associées à une moins bonne réponse thérapeutique.

### **III.2. Prévalence de la résistance aux antifongiques azolés**

La prévalence globale de la résistance au fluconazole de *C. albicans* apparaît relativement stable, autour de 1.5 % (Pfaller *et al.*, 2010b). Toutefois, celle-ci est bien plus importante chez les patients bénéficiant de traitement par azolés sur des périodes prolongées. A coté des patients infectés par le VIH, qui ont pendant longtemps constitué la principale population à risque en particulier à la fin des années 90 du fait de l'épidémie de SIDA, il faut également considérer les patients présentant des déficits de l'immunité innée. Ainsi, les patients souffrant du syndrome APECED (AutoImmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy) bénéficient parfois de traitements par azolés au long cours du fait de candidoses chroniques (Rautemaa *et al.*, 2007 ; Siikala *et al.*, 2010 ; McManus *et al.*, 2011).

Les données de prévalence de la résistance d'*A. fumigatus* aux antifongiques azolés restent éparpillées, la détermination des CMI étant encore rarement réalisée en pratique courante dans les laboratoires. Dans une méta-analyse récente, comprenant près de 5000 isolats cliniques, elle était évaluée à 2 % (Howard et Arendrup, 2011). Néanmoins, depuis l'isolement des premières souches résistantes à l'itraconazole à la fin des années 1980, la prévalence de la résistance aux azolés semble en augmentation en Europe (Denning *et al.*, 1997 ; Snelders *et al.*, 2008 ; Howard *et al.*, 2009). Celle-ci apparaît toutefois très variable d'un centre à l'autre, des prévalences plus importantes, jusqu'à 5 % au Royaume-Uni (Manchester) et 6 % aux Pays-Bas (Nijmegen) ont été rapportées (Snelders *et al.*, 2008 ; Howard *et al.*, 2009). Au sein d'une même catégorie de patients, comme chez les patients atteints de mucoviscidose, les prévalences sont également variables, entre moins de 1 % à 4.6 % en fonction des études (Amorim *et al.*, 2010 ; Mortensen *et al.*, 2010, Burgel *et al.*, 2012). Des observations similaires ont été faites chez les patients d'hématologie (Alanio *et al.*, 2011 ; Van der Linden *et al.*, 2011b).

Cependant, ces données de prévalence de la résistance aux azolés d'*A. fumigatus* pourraient ne constituer que la partie « immergée de l'iceberg », celles-ci reposant sur l'analyse de souches

obtenues après culture des prélèvements cliniques. Ainsi, dans une étude récente, Denning *et al.* ont mis en évidence par PCR, des souches d'*A. fumigatus* présentant des mutations associées à la résistance chez six de huit patients présentant une ABPA (75 %) et 12 sur 24 présentant une aspergillose pulmonaire chronique (50 %) alors que tous ces patients présentaient des cultures négatives des prélèvements pulmonaires (Denning *et al.*, 2011). La résistance aux azolés d'*A. fumigatus* constitue donc une problématique d'actualité (Denning et Perlin, 2011). Celle-ci peut schématiquement survenir par deux voies distinctes chez un patient. La première, repose sur un mécanisme de pression de sélection, secondaire à un traitement par azolés au long cours, mais pouvant survenir plus rapidement en quelques mois (Camps *et al.*, 2012). A coté de ce mécanisme historique, un autre mécanisme a été proposé. Il repose sur l'acquisition à partir de notre environnement, de souches *de novo* résistantes aux antifongiques azolés (Verweij *et al.*, 2007 ; Snelders *et al.*, 2009 ; Verweij *et al.*, 2009b). Conséquence directe de cette actualité, des méthodes permettant l'identification rapide des mutations associées à la résistance, directement à partir des prélèvements biologiques, en s'affranchissant des cultures mycologiques ou bien à partir des isolats cliniques, se sont progressivement développées (Klassen *et al.*, 2010 ; Denning *et al.* 2011 ; Spiess *et al.*, 2012).

### **III.3. Mécanismes moléculaires de la résistance aux azolés**

La résistance acquise aux antifongiques azolés a été principalement étudiée chez *C. albicans*. Néanmoins, certains de ces mécanismes mis en jeu chez *C. albicans*, sont également présents chez *A. fumigatus*. Par ailleurs, cet axe de recherche étant en plein essor et suscitant beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique, il n'est pas exclu que d'autres mécanismes soient mis en évidence dans les années à venir. Récemment, le phénomène d'hétéro-résistance, décrit chez les procaryotes, a été mis en évidence chez *A. fumigatus* (Escribano *et al.*, 2012).

Au total, quatre grandes catégories de mécanismes participent à la résistance aux azolés : i) altération de la cible des azolés résultant d'une ou plusieurs mutations ; ii) surexpression de la cible ; iii) déviation de la voie de biosynthèse des stérols ; iv) diminution de la concentration intracellulaire en antifongique par un phénomène d'efflux actif résultant de la surexpression des transporteurs multi-drogues (Sanglard et Odds, 2002 ; Verweij *et al.*, 2009a ; Howard et

Arendrup, 2011). Chez *A. fumigatus*, un dernier mécanisme proposé il y a de nombreuses années mais qui reste encore hypothétique, repose sur une diminution de la pénétration des azolés dans la cellule fongique (Manavathu *et al.*, 1999b).

L'acquisition de la résistance est un mécanisme progressif et cumulatif. Ainsi, comme cela a été illustré pour *C. albicans*, plusieurs de ces mécanismes sont fréquemment combinés chez un même isolat clinique (Coste *et al.*, 2007 ; MacCallum *et al.*, 2010). Enfin, d'autres mécanismes, reflet notamment de la plasticité génomique, peuvent s'y associer chez *C. albicans*.

Un état des connaissances actuelles sur ces différents mécanismes de résistance chez *C. albicans* et *A. fumigatus* est présenté ci-dessous.

### **III.3.1. Altération de la cible des azolés (14 $\alpha$ -déméthylase)**

L'altération de la voie de biosynthèse des stérols affectant en particulier la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, est un mécanisme fréquent et largement documenté chez les isolats cliniques de *C. albicans* et d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés. Ce mécanisme de résistance repose sur la survenue de mutations non-synonymes (responsable d'un changement d'acide aminé) sur le gène codant la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase mais n'affectant pas la fonctionnalité de l'enzyme.

#### **III.3.1.1. *Candida albicans***

Un grand nombre de mutations ponctuelles non-synonymes sur le gène *ERG11* (codant la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, CaCyp51) ont ainsi été décrites chez des isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azolés (Loffler *et al.*, 1997 ; Sanglard *et al.*, 1998 ; Favre *et al.*, 1999 ; White *et al.*, 2002 ; Chau *et al.*, 2004 ; Goldman *et al.*, 2004 ; Siikala *et al.*, 2010 ; McManus *et al.*, 2011). Par ailleurs, de nouvelles mutations sont régulièrement rapportées et illustrent l'important polymorphisme de ce gène (Xu *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009 ; Feng *et al.*, 2010 ; Manastir *et al.*, 2011).

Ces mutations ne sont pas régulièrement distribuées mais se localisent préférentiellement au niveau de trois régions (Hotspot) comprises entre les acides aminés 105 à 165, 266 à 287 et 405 à 488 (Marichal *et al.*, 1999). Cela a pour principale conséquence que l'imputabilité d'une mutation dans la résistance d'un isolat clinique est parfois difficile à déterminer, d'autant que

plusieurs mutations peuvent être observées chez un même isolat clinique et que d'autres mécanismes peuvent y être associés pour concourir au phénotype de résistance observé (Chau *et al.*, 2004 ; Cernicka *et al.*, 2006 ; Coste *et al.*, 2007 ; McManus *et al.*, 2011). Néanmoins, plusieurs d'entre elles ont pu être clairement associées à la résistance grâce notamment à des expériences de mutagenèse dirigée puis d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* (Tableau V) (Sanglard *et al.*, 1998 ; Kakeya *et al.*, 2000 ; Perea *et al.*, 2001 ; Chau *et al.*, 2004). A coté de ces substitutions, d'autres comme D116E, E266D, K128T ou bien encore V437I, ne sont pas impliquées dans la résistance comme le suggère leur présence chez des isolats sensibles aux azolés (Sanglard *et al.*, 1998 ; White *et al.*, 2002 ; Chau *et al.*, 2004 ; Goldman *et al.*, 2004).

**Tableau V : Mutations décrites sur le gène *ERG11* de *C. albicans* et dont l'implication a été confirmée par mutagenèse dirigée**

Mutations	Références
G129A	Sanglard <i>et al.</i> , 1998
Y132H	Sanglard <i>et al.</i> , 1998; Kakeya <i>et al.</i> , 2000
S279F	Warrilow <i>et al.</i> , 2012
S405F	Sanglard <i>et al.</i> , 1998
G464S	Sanglard <i>et al.</i> , 1998
R467K	Sanglard <i>et al.</i> , 1998
I471T	Kakeya <i>et al.</i> , 2000

Sur le plan moléculaire, ces substitutions sont responsables soit d'une diminution de l'affinité de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase pour les azolés soit d'une perturbation de l'accès de l'antifongique au site actif résultat d'une modification de la structure tridimensionnelle de la protéine (Li *et al.*, 2004). A titre d'exemple, la résistance au fluconazole conférée par les mutations situées au niveau du codon 279 (S279F et S279Y), s'explique par une diminution de l'affinité de l'enzyme pour les azolés mais une affinité accrue pour le lanostérol, consécutive à une modification de la conformation de CaCyp51 (Warrilow *et al.*, 2012).

La compréhension de l'impact des mutations sur le gène dans la résistance aux azolés repose donc aussi sur l'étude de leur impact sur la structure tridimensionnelle de l'enzyme mais cette analyse se heurte à l'absence de structure cristalline de CaCyp51. En effet, la quasi-totalité des modèles tridimensionnels de CaCyp51 proposés à ce jour reposent sur l'homologie entre les séquences protéiques de CaCyp51 et celle de *Mycobacterium tuberculosis* (MtCyp51), dont la structure tridimensionnelle a été établie en 2001 (Figure 18) (Podust *et al.*, 2001a ; Macchiarulo *et al.*, 2002 ; Fukuoka *et al.*, 2003 ; Xiao *et al.*, 2004 ; Sheng *et al.*, 2006 ; Sheng *et al.*, 2010).



Il ressort de ces modèles tridimensionnels de CaCyp51, l'hypothèse de deux tunnels distincts permettant l'entrée des azolés et l'accès au site actif de l'enzyme (Podust *et al.*, 2001a ; Sheng *et al.*, 2004 ; Xiao *et al.*, 2004). Le tunnel 1 est parallèle au plan de l'hème et formé par la boucle BC et l'hélice B', tandis que le second, le tunnel 2 est perpendiculaire au plan de l'hème. L'entrée de ce tunnel 2 est formée par la boucle FG et l'hélice A' (Podust *et al.*, 2001a ; Xiao *et al.*, 2004 ; Sheng *et al.*, 2010). Ce dernier serait plus spécifique des antifongiques azolés à longue chaîne comme le posaconazole et l'itraconazole (Podust *et al.*, 2001a ; Xiao *et al.*, 2004).

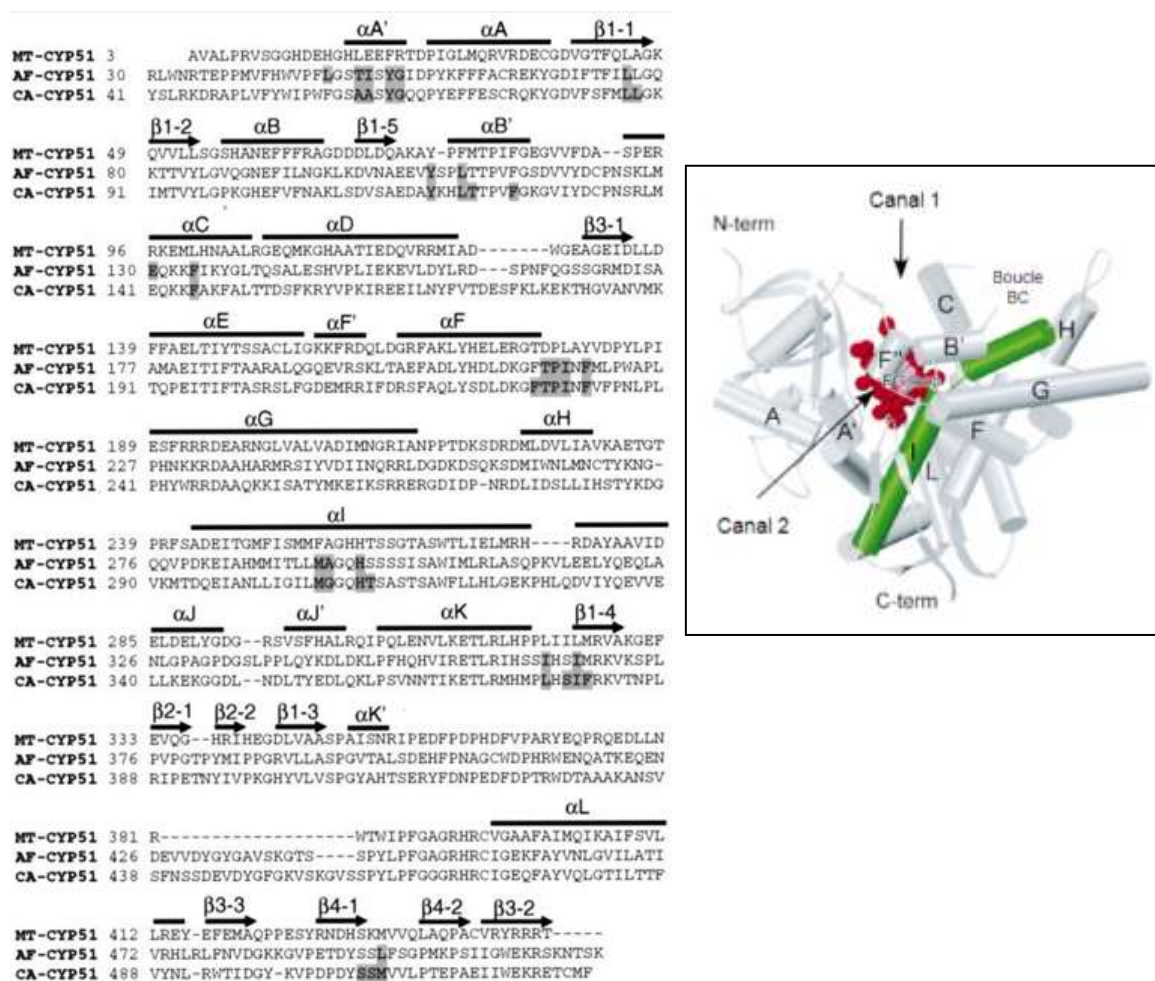


Figure 18 : Alignement des séquences protéiques de MtCyp51, CaCyp51 et AfCyp51A et structure tridimensionnelle de MtCyp51 (encadré).

**Légende :** Les structures secondaires sont précisées. Les résidus interagissant avec le posaconazole sont grisés.

**Source :** Podust *et al.*, 2001b ; Xiao *et al.*, 2004

Ces modèles ont permis de montrer que les mutations associées à la résistance ne sont pas obligatoirement proches du site actif de l'enzyme mais également au sein de régions assurant

l'accès des antifongiques à l'hème (Figure 19). Un autre intérêt de ces modèles tridimensionnels est de pouvoir prédire l'impact d'une mutation sur la sensibilité aux azolés.



**Figure 19 : Localisation des principales substitutions impliquées dans la résistance aux azolés dans la structure tridimensionnelle de CaCyp51**

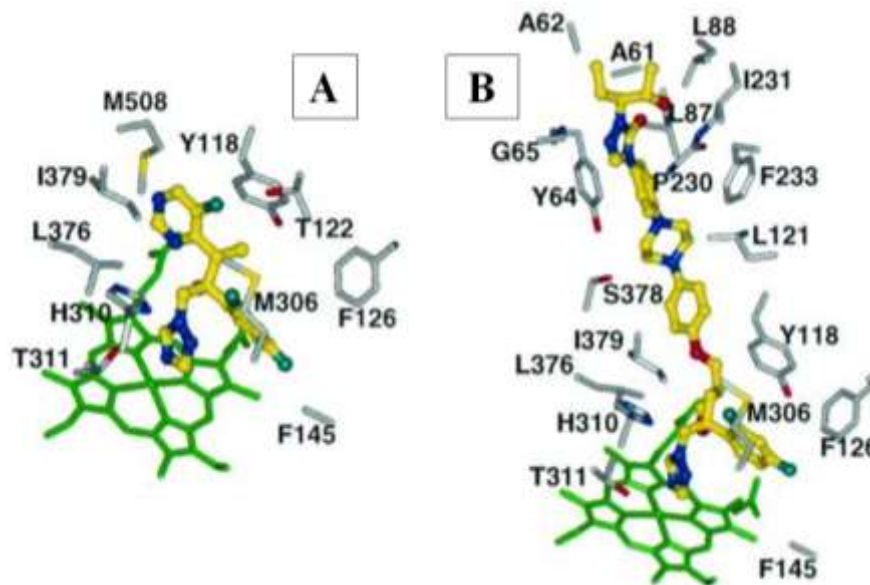
Légende : L'hème est représenté en vert. L'antifongique azolé (ici le posaconazole) est représenté en jaune.

Source : Xiao *et al.*, 2004

La mutation G307S située au niveau de l'hélice I, à proximité immédiate du site actif de l'enzyme et au contact de l'hème, pourrait perturber la fixation de l'antifongique (Xiao *et al.*, 2004). Aussi, le remplacement de la sérine en position 279, résidu situé sur la partie externe de l'enzyme dans la structure tridimensionnelle de CaCyp51, par une phénylalanine (S279F) est responsable d'un large remaniement conformationnel conduisant à une modification des résidus de la poche de l'hème. Cela conduit notamment à l'éloignement de la sérine 507, impliquée dans l'interaction avec le fluconazole (Warrilow *et al.*, 2012).

A l'opposé, la mutation K143R, située au niveau de l'hélice C, donc à l'entrée du tunnel 1 pourrait interférer avec l'accès des azolés jusqu'au site actif (Podust *et al.*, 2001 ; Xiao *et al.*, 2004). D'autres mutations comme A61V et P230L, sont situées respectivement au niveau de l'hélice A' et au sein de la boucle FG, deux domaines formant le tunnel 2. Elles pourraient interagir avec les azolés à longue chaîne expliquant la moindre sensibilité vis-à-vis du posaconazole des isolats cliniques correspondants (Xiao *et al.*, 2004).

Il apparaît donc clairement, que les profils d'activité antifongique des différents azolés sont intimement liés à la nature des interactions qu'ils lient avec l'enzyme, les résidus impliqués dans l'interaction avec le voriconazole n'étant pas rigoureusement comparables à ceux impliqués dans l'interaction avec le posaconazole (Figure 20) (Xiao *et al.*, 2004).



**Figure 20 : Résidus de CaCyp51 impliqués dans l'interaction avec le voriconazole (A) et le posaconazole (B)**  
 Légende : L'hème apparaît en vert. L'antifongique est représenté avec ses atomes de carbone en jaune, oxygène en rouge et azote en bleu.

Source : Xiao *et al.*, 2004

*In fine*, l'intérêt de la modélisation moléculaire est de permettre une meilleure compréhension de l'interaction entre l'enzyme et les azolés autorisant le développement rationnel de nouveaux composés azolés permettant de contourner la résistance. La pertinence de ces modèles est cependant discutable. L'homologie entre CaCyp51 et MtCyp51 étant relativement faible (28 % seulement), CaCyp51 étant plus proche des séquences de Cyp51 de mammifères (dont celle de l'homme), elle ne permet pas la modélisation d'une large zone d'insertion présente chez *C. albicans* (résidus 439 à 457) (Xiao *et al.*, 2004 ; Sheng *et al.*, 2010). Or, un certain nombre de mutations, comme F449S et G450E, dont l'implication dans la résistance aux azolés est évidente, se situent dans cette région non modélisée (Perea *et al.*, 2001 ; Chau *et al.*, 2004). Récemment, afin de palier aux limites des modèles actuels reposant sur le principe d'homologie avec MtCyp51 et en particulier afin de permettre une modélisation de cette boucle, un nouveau modèle tridimensionnel de CaCyp51, hybride, a été proposé par notre équipe (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011).

En conclusion, une meilleure compréhension de la résistance impliquant *ERG11* nécessiterait l'analyse d'un plus grand panel de souches cliniques de *C. albicans*, sensibles et résistantes aux azolés permettant d'avoir une vision plus complète du polymorphisme de ce gène.

### **III.3.1.2. *Aspergillus fumigatus***

La voie de biosynthèse des stérols chez *A. fumigatus*, encore mal connue, apparaît néanmoins conservée (Ferreira *et al.*, 2005). Une différence notable par rapport à *C. albicans* concerne l'existence chez *A. fumigatus*, d'une duplication de plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des stérols dont le gène codant la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase dont les deux copies sont exprimées chez *A. fumigatus* (*CYP51A* et *CYP51B*) (Mellado *et al.*, 2001 ; Ferreira *et al.*, 2005 ; Nierman *et al.*, 2005). Les gènes *CYP51A* (1619 pb) et *CYP51B* (1731 pb) codent pour des protéines (515 aa et 524 aa respectivement) relativement homologues entre elles (64 % d'homologie). Elles présentent par ailleurs une certaine homologie avec d'autres Cyp51 fongiques comme celle de *C. albicans* (44 %) (Mellado *et al.*, 2001). Bien que l'enzyme AfCyp51A semble être l'unique cible des antifongiques azolés, des mutations sur le gène *CYP51B* ont été identifiées chez des souches d'*A. fumigatus* résistantes à l'itraconazole (Ferreira *et al.*, 2005 ; Mellado *et al.*, 2005).

La survenue d'une ou plusieurs mutations sur le gène *CYP51A* responsables d'une diminution d'affinité de l'enzyme pour les azolés, sans altérer sa fonctionnalité, constitue donc le principal mécanisme observé chez les isolats cliniques d'*A. fumigatus* résistants aux azolés (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008b ; Verweij *et al.*, 2009a ; Howard et Arendrup, 2011). A ce jour, plus de 45 mutations distinctes survenant au niveau de 36 résidus ont été décrites sur le gène *CYP51A* d'*A. fumigatus*. Pour un nombre limité d'entre-elles dont G54R, L98H et M220T, l'implication dans la résistance aux azolés a été formellement démontrée par mutagenèse dirigée (Tableau VI).

La résistance croisée aux azolés est fréquente chez les souches mutées sur le gène *CYP51A* (Tableau VI). Les mutations les plus souvent responsables de ce phénotype de résistance sont les mutations survenant au niveau des codons 98 (L98H), 138 (G138C et G138R), 431 (Y431C) et 434 (G434C) (Howard et Arendrup, 2011). Dans une étude récente, 74 et 65 % des souches résistantes à l'itraconazole étaient respectivement résistantes au posaconazole et au voriconazole (Howard *et al.*, 2009).

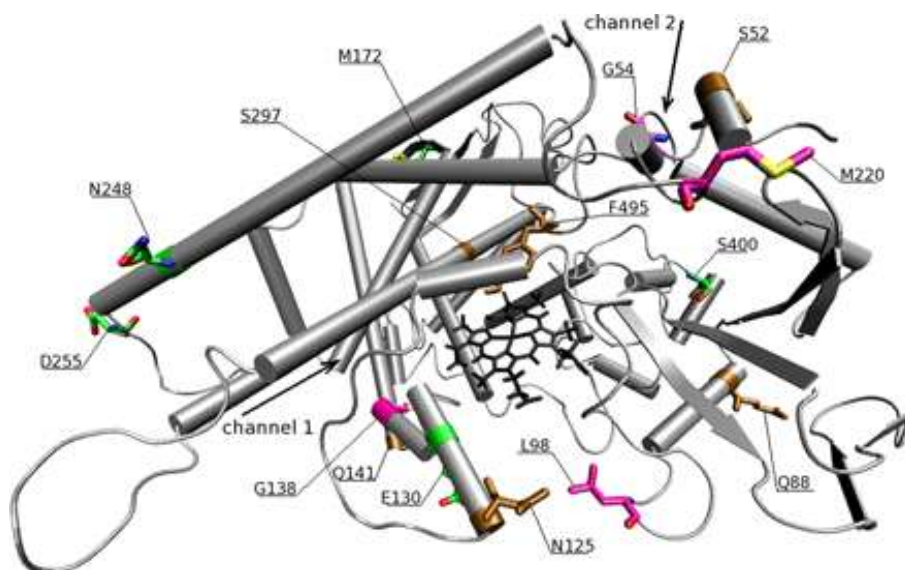
**Tableau VI : Mutations décrites sur le gène *CYP51A* et leur implication potentielle dans la résistance aux azolés chez *A. fumigatus***

**Légende** : FLC : fluconazole ; VRC : voriconazole ; POS : posaconazole ; ND : données non disponibles ; <sup>1</sup> Leur implication dans la résistance aux azolés reste à démontrer ; <sup>2</sup> Mutations probablement non impliquées dans la résistance.

Position	Substitutions	Phénotype de résistance habituellement observé chez les isolats correspondants	Références
<i>Mutations fréquentes et dont l'implication dans la résistance à été confirmée par mutagenèse dirigée</i>			
G54	E, K, R, V, W	Résistance à l'ITC et POS, sensibilité au VRC	Rodriguez-Tudela <i>et al.</i> , 2008a ; Diaz-Guerra <i>et al.</i> , 2003 ; Howard <i>et al.</i> , 2009
L98	H	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Mellado <i>et al.</i> , 2007 ; Snelders <i>et al.</i> , 2008 ; Howard <i>et al.</i> , 2009
G138	C, R	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Albarrag <i>et al.</i> , 2011
P216	L	Résistance à l'ITC et POS, sensibilité au VRC	Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Camps <i>et al.</i> , 2012
F219	I	Résistance à l'ITC, variable au POS et sensibilité au VRC	Van Der Linden <i>et al.</i> , 2011b ; Camps <i>et al.</i> , 2012
M220	I, K, R, T, V	Résistance à l'ITC et au POS, variable au VRC	Rodriguez-Tudela <i>et al.</i> , 2008a ; Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Snelders <i>et al.</i> , 2010
Y431	C	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Albarrag <i>et al.</i> , 2011
<i>Autres mutations décrites chez les isolats cliniques résistants aux azolés<sup>1</sup></i>			
V13	G	ND	Delhaes <i>et al.</i> , 2011
N22	D	Résistance à l'ITC (Données non disponibles pour POS et VRC)	Da silva ferreira <i>et al.</i> , 2004
S52	T	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Snelders <i>et al.</i> , 2009 ; Snelders <i>et al.</i> , 2010
Q88	H	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Snelders <i>et al.</i> , 2010
V101	F	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Mortensen <i>et al.</i> , 2011
N125	I	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Snelders <i>et al.</i> , 2010
Q141	H	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Snelders <i>et al.</i> , 2009 ; Snelders <i>et al.</i> , 2010
H147	Y	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Howard <i>et al.</i> , 2009
F165	L	Sensibilité à l'ITC et VRC, résistance au POS	Escribano <i>et al.</i> , 2011
M236	K, T, V	Résistance à l'ITC (données non disponibles pour POS et VRC)	Ferreira <i>et al.</i> , 2005
D262	Y	Sensibilité à l'ITC et VRC, intermédiaire au POS	Escribano <i>et al.</i> , 2011
S297	T	Résistance à l'ITC et POS, sensibilité au voriconazole	Mellado <i>et al.</i> , 2007 ; Snelders <i>et al.</i> , 2008
S299	L	ND	Delhaes <i>et al.</i> , 2011
P394	L	Résistance à l'ITC (données non disponibles pour POS et VRC)	Da silva ferreira <i>et al.</i> , 2004
S400	I	Sensibilité à l'ITC, résistance au POS et VRC	Snelders <i>et al.</i> , 2010
G432	S	Résistance à l'ITC, sensibilité au POS et VRC	Alanio <i>et al.</i> , 2011
G434	C	Résistance à l'ITC, POS et VRC	Howard <i>et al.</i> , 2009
T440	A	Résistance à l'ITC (données non disponibles pour POS et VRC)	Da silva ferreira <i>et al.</i> , 2004
G448	S	Résistance au VRC, ITC et POS variable	Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Pelaez <i>et al.</i> , 2012b
N479	D	Sensibilité à l'ITC et VRC, résistance au POS	Escribano <i>et al.</i> , 2011
Y491	H	Résistance à l'ITC (données non disponibles pour POS et VRC)	Da silva ferreira <i>et al.</i> , 2004
F495	I	Résistance à l'ITC et POS, sensibilité au VRC	Mellado <i>et al.</i> , 2007 ; Snelders <i>et al.</i> , 2008
<i>Mutations décrites chez des isolats sensibles aux azolés<sup>2</sup></i>			
A9	T	-	Camps <i>et al.</i> , 2012
F46	Y	-	Rodriguez-Tudela <i>et al.</i> , 2008a ; Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Snelders <i>et al.</i> , 2010
E130	D	-	Snelders <i>et al.</i> , 2010
M172	V	-	Rodriguez-Tudela <i>et al.</i> , 2008a ; Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Snelders <i>et al.</i> , 2010
N248	T	-	Rodriguez-Tudela <i>et al.</i> , 2008a ; Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Snelders <i>et al.</i> , 2010
D255	E	-	Rodriguez-Tudela <i>et al.</i> , 2008a ; Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Snelders <i>et al.</i> , 2010
E427	K, G	-	Rodriguez-Tudela <i>et al.</i> , 2008a ; Howard <i>et al.</i> , 2009 ; Snelders <i>et al.</i> , 2010

A l'opposé, les souches présentant une mutation au niveau du codon 54 sont résistantes à l'itraconazole et parfois aussi au posaconazole mais sont habituellement sensibles au voriconazole (Dia-Guerra *et al.*, 2003 ; Howard et Arendrup, 2011). Enfin, les mutations affectant le codon 220 (M220I, M220K, M220T et M220V) confèrent la résistance à l'itraconazole et au posaconazole mais le profil de sensibilité au voriconazole apparaît variable (Mellado *et al.*, 2004).

L'existence de ces différents phénotypes de résistance aux azolés s'explique par la position de ces substitutions sur la protéine AfCyp51A (Howard et Arendrup, 2011). L'étude de la structure tridimensionnelle de l'enzyme constitue donc une étape importante, permettant d'expliquer voire de prédire l'impact d'une mutation sur la sensibilité aux antifongiques azolés. Cependant, du fait de l'absence de structure cristalline de la protéine AfCyp51A, tous les modèles utilisés à ce jour reposent, comme pour *C. albicans*, sur l'homologie entre AfCyp51A et MtCyp51. Tous suggèrent également l'existence de deux tunnels permettant l'accès des antifongiques azolés au site actif (Figure 21) (Gollapuddy *et al.*, 2004 ; Xiao *et al.*, 2004 ; Snelders *et al.*, 2010).

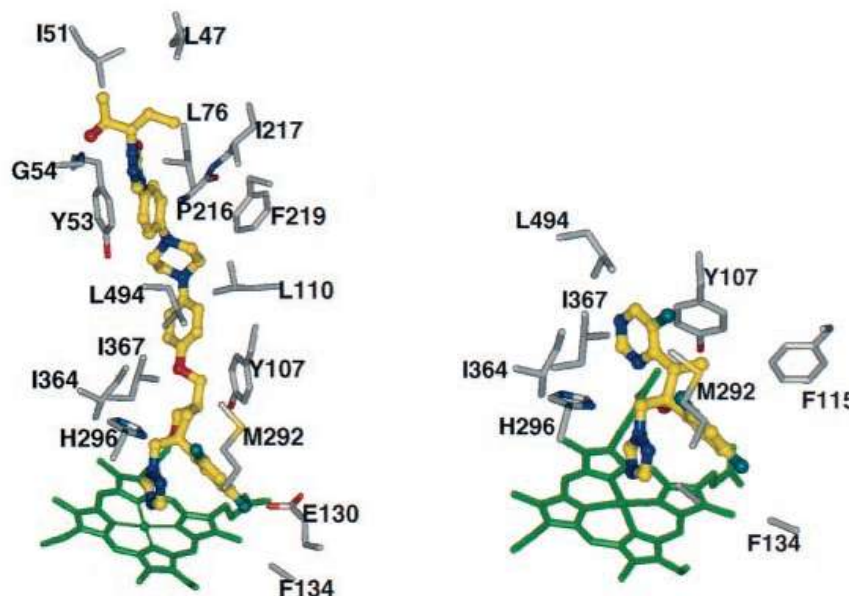


**Figure 21 : Localisation des principales substitutions décrites au sein de la structure tridimensionnelle de l'enzyme Cyp51A d'*A. fumigatus* (AfCyp51A)**

Source : Snelders *et al.*, 2010

La position de la glycine 138, située à proximité de l'hème, pourrait expliquer le profil de résistance aux azolés des isolats mutés sur ce codon (G138C, G138R). En effet, sa substitution par une arginine (G138R) entraînerait une modification de l'environnement autour de l'hème,

la chaîne latérale polaire de l'arginine étant en conflit avec les groupements vinyles des chaînes latérales de l'hème et celles des résidus environnants (Xiao *et al.*, 2004 ; Snelders *et al.*, 2010). Le résidu G54 se situe à l'entrée du tunnel 2 (Snelders *et al.*, 2010). Le remplacement de la glycine par le tryptophane (G54W), acide aminé présentant un encombrement stérique important et hydrophobe pourrait perturber l'ancrage de la longue chaîne latérale des molécules volumineuses comme l'itraconazole et le posaconazole (Figure 22). Cette hypothèse rend ainsi compte du phénotype de résistance à l'itraconazole et au posaconazole mais de la sensibilité au voriconazole dont la structure est moins volumineuse (Xiao *et al.*, 2004 ; Snelders *et al.*, 2010). Le remplacement de la glycine 54 par un tryptophane (G54W) est responsable d'une augmentation des CMI pour le posaconazole d'un rapport de 250 et de 30 dans le cas de l'arginine (G54R) (Mann *et al.*, 2003). L'observation de CMI plus basses vis-à-vis du posaconazole mises en évidence chez les isolats présentant la substitution G54E reste plus difficile à expliquer (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011). Par conséquent, non seulement l'emplacement précis des substitutions mais également leur nature, sont susceptibles d'influencer le phénotype de résistance aux azolés (Snelders *et al.*, 2010).



**Figure 22 : Résidus potentiellement impliqués dans l'interaction avec le posaconazole (A) et le voriconazole (B) dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme Cyp51A d'*A. fumigatus* (AfCyp51A)**

Source : Xiao *et al.*, 2004

L'impact du remplacement de la leucine 98, résidu fortement conservé dans le règne fongique par une histidine (L98H), est plus complexe à apprécier (Podust *et al.*, 2001b ; Snelders *et al.*,

2008, Mortensen *et al.*, 2011 ; Van der Linden *et al.*, 2011b). Ce résidu est situé à distance de l'hème et des tunnels permettant l'accès au site actif mais est localisé dans une boucle très flexible (Figure 21) (Snelders *et al.*, 2011). Le remplacement de la leucine, seul résidu hydrophobe au sein de cette boucle hydrophile, par une histidine (hydrophile) pourrait déstabiliser de manière importante cette région. En effet, l'interaction entre la leucine 98 et la proline 124 de la boucle BC n'étant plus possible du fait de son remplacement par une histidine, augmenterait la flexibilité de la boucle BC lui permettant de recouvrir l'entrée du tunnel 1 (Snelders *et al.*, 2011). Ces données expérimentales confirment les travaux antérieurs sur le rôle de la boucle BC dans l'ouverture ou la fermeture du tunnel 1 (Podust *et al.*, 2001a, Lepesheva *et al.*, 2003 ; Gollapudy *et al.*, 2004). L'autre conséquence de cette mutation serait la rupture de l'interaction entre l'hème et les résidus tyrosine en positions 107 et 121. Cette perte d'interaction pourrait conduire à un rapprochement de l'histidine 98 du groupement carboxylique de l'hème et à la relocalisation des chaînes latérales des résidus 107 et 121 vers la poche hydrophobe formée par les résidus 102, 106, 110, 111, 368, 494 et 495, aboutissant *in fine* à fermer le second tunnel (Snelders *et al.*, 2011). Ainsi, la substitution L98H empêche l'accès des azolés au site actif de l'enzyme, sans affecter sa fonctionnalité ni perturber son environnement hydrophobe, indispensable pour la fixation de l'éburicol (Snelders *et al.*, 2011). A noter que cette mutation est rarement observée seule mais le plus souvent en association avec une duplication en tandem d'une région de 34 pb dans la région promotrice de *ERG11*. Ces deux mutations ont un effet synergique et confèrent un phénotype de multi-résistance aux azolés (Denning *et al.*, 2011 ; Mortensen *et al.*, 2011 ; Snelders *et al.*, 2011 ; Van der Linden *et al.*, 2011b).

Bien que ces modèles tridimensionnels permettent de mieux comprendre l'impact des substitutions de la protéine dans la résistance aux azolés, leur pertinence est discutée du fait de la faible homologie entre AfCyp51A et MtCyp51 (29 %). Ces limites ont conduit certains auteurs à proposer un nouveau modèle reposant sur l'homologie avec la séquence humaine de protéine de Cyp51, présentant une homologie bien supérieure, de 41 % (Fraczek *et al.*, 2011).

En conclusion, bien que la survenue de mutation sur le gène *CYP51A* est de loin le mécanisme de résistance le plus fréquent, l'existence d'un certain nombre d'isolats cliniques résistants aux azolés en l'absence de ces mutations confirme l'existence d'autres mécanismes (Snelders *et al.*, 2008 ; Howard *et al.*, 2009 ; Snelders *et al.*, 2009 ; Bowyer *et al.*, 2011 ; Lockhart *et al.*, 2011).



### III.3.2. Surexpression de la cible des azolés (14 $\alpha$ -déméthylase)

La surexpression de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase est un autre mécanisme pouvant contribuer à la résistance aux antifongiques azolés. Mécanisme connu de longue date chez plusieurs espèces de *Candida* dont *C. albicans*, la compréhension de la régulation de ce gène s'est considérablement améliorée au cours de ces dernières années (White *et al.*, 1997 ; Vandeputte *et al.*, 2005 ; Sanglard *et al.*, 2009).

De découverte plus récente, la surexpression du gène *CYP51A* chez *A. fumigatus* repose sur un mécanisme distinct de *C. albicans* et suscite un intérêt croissant du fait du lien potentiel qui lie l'émergence de ce nouveau mécanisme à l'utilisation des fongicides azolés dans notre environnement (Mellado *et al.*, 2007 ; Verweij *et al.*, 2009b).

#### III.3.2.1. *Candida albicans*

##### i. Importance en clinique

La surexpression du gène *ERG11* chez les souches cliniques résistantes aux azolés est généralement modérée, ne dépassant pas un facteur de trois à cinq, ce qui a conduit à suggérer que ce mécanisme ne pourrait être responsable à lui seul de la résistance aux azolés (Sanglard *et al.*, 1995 ; White *et al.*, 1997 ; Perea *et al.*, 2001 ; Sanglard et Odds, 2002). L'induction de l'expression de *ERG11* en réponse au fluconazole peut être reproduite expérimentalement *in vitro* et pourrait rendre compte du phénomène de « traîne » observé avec les azolés et participer ainsi au phénomène de tolérance (Henry *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2004 ; Ribeiro *et al.*, 2007).

##### ii. Régulation génétique du gène *ERG11*

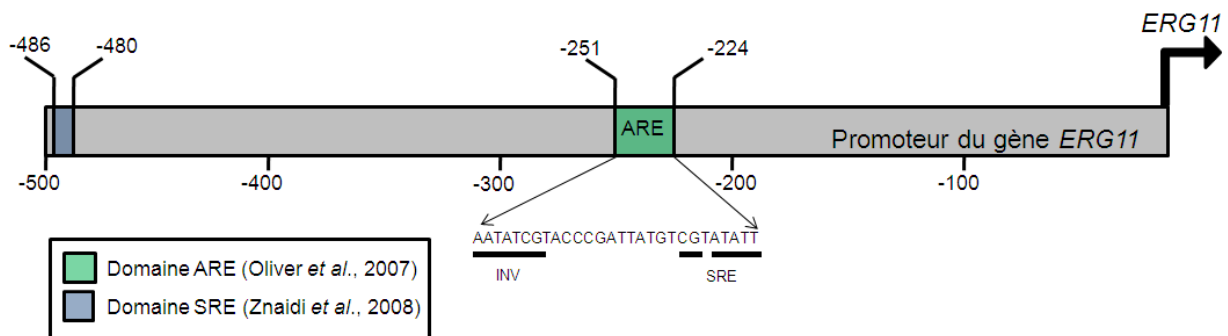
Sur le plan moléculaire, la surexpression du gène *ERG11* peut être soit le résultat d'une dérégulation de son expression soit, comme nous ne le verrons ensuite, d'une augmentation du nombre de copie du gène suite à la formation d'un isochromosome (Selmecki *et al.*, 2008 ; Sanglard *et al.*, 2009). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol est régulée par Upc2 et Ecm22, deux activateurs transcriptionnels appartenant à la famille Zn<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub> (Vik et Rine, 2001). Ces deux facteurs de transcription

contrôlent le niveau d'expression de ces gènes par interaction avec un domaine cis-régulateur, nommé SRE (Sterol Regulatory Element), situé dans la région promotrice de ces gènes dont *ERG2*, *ERG3* et *ERG11* (Vik et Rine, 2001).

A ce jour, *UPC2* est le seul gène homologue de ces facteurs de transcription identifié chez *C. albicans* (Silver *et al.*, 2004 ; MacPherson *et al.*, 2005). Comme chez *S. cerevisiae*, Upc2 régule l'expression de nombreux gènes dont ceux impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol voire également de *MDR1* et *CDR1* chez *C. albicans* (Znaidi *et al.*, 2008). La délétion du gène *UPC2* chez *C. albicans* abolie la surexpression du gène *ERG11* normalement induite par les antifongiques azolés (Silver *et al.*, 2004 ; MacPherson *et al.*, 2005).

Des délétions au sein de la région promotrice du gène *ERG11* ont permis d'identifier le domaine régulateur ARE (Azole-Responsive Enhancer), lequel joue un rôle important dans la régulation de ce gène (Figure 23) (Oliver *et al.*, 2007). Ce domaine est situé entre les positions -251 à -224 en amont de la séquence codante du gène *ERG11*. Il contient deux régions espacées de 13 pb formant un motif imparfaitement répété et inversé : SRE (-231 à -224) fortement homologue au domaine SRE décrit chez *S. cerevisiae* et INV (-251 à -245). Tous les deux pourraient constituer le site de fixation d'Upc2 sous une forme dimérique (Oliver *et al.*, 2007). La déplétion en ergostérol membranaire induite par les inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol conduirait donc à la surexpression de *ERG11* via l'interaction entre le facteur de transcription Upc2 et le domaine ARE (Oliver *et al.*, 2007).

Deux autres domaines SRE, sites de fixation potentiels pour Upc2 sur le gène *ERG11* ont été proposés, l'un entre les positions -232 à -226, chevauchant celui décrit par Oliver *et al.* et un second entre les positions -486 à -480 (Znaidi *et al.*, 2008).



**Figure 23 : Position des éléments cis-régulateurs dans la région promotrice du gène *ERG11* de *C. albicans***  
 Remarque : le second domaine SRE décrit par Znaidi *et al.* (Znaidi *et al.*, 2008) situé entre les positions -232 à -225, au sein du domaine ARE, n'est pas représenté.

En parallèle de ces travaux, des mutations dites « gain de fonction » (GOF) sur le gène *UPC2*, associées à une hyperactivité du facteur de transcription puis *in fine* à la surexpression constitutive du gène *ERG11* ont été décrites ces dernières années chez des isolats cliniques de *C. albicans* résistants au fluconazole (Dunkel *et al.*, 2008b ; Flowers *et al.*, 2010 ; Heilmann *et al.*, 2010 ; Hoot *et al.*, 2011 ; Flowers *et al.*, 2012). A ce jour, sept mutations gain de fonction distinctes sur le gène *UPC2*, responsables de la surexpression du gène *ERG11*, ont été décrites (Tableau VII). D'autres mutations ont été rapportées sur ce gène mais leur implication dans la résistance reste à démontrer. Toutefois, l'existence chez certains isolats d'une surexpression du gène *ERG11* en l'absence de mutations sur le gène *UPC2*, souligne l'existence de mécanismes régulant l'expression de ce gène de manière Upc2-indépendante (Flowers *et al.*, 2010 ; Flowers *et al.*, 2012).

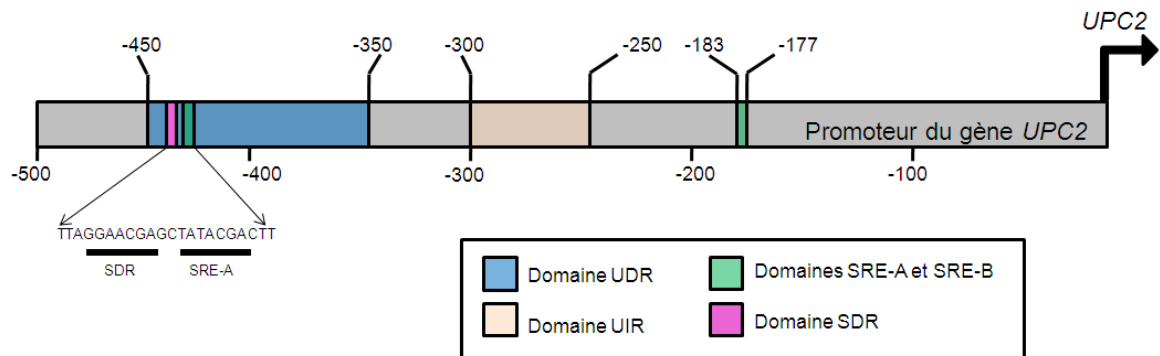
**Tableau VII : Mutations décrites sur le gène *UPC2* de *C. albicans* et leur implication dans la surexpression du gène *ERG11***

Source : Dunkel *et al.* 2008b ; Flowers *et al.*, 2010 ; Heilmann *et al.*, 2010 ; Hoot *et al.*, 2011 ; Flowers *et al.*, 2012

Mutations décrites sur le gène <i>UPC2</i> et associées à un gain de fonction (GOF)	Mutations décrites sur le gène <i>UPC2</i> et dont le rôle reste à déterminer
G304R	R68K
M597I	I142S
Y642F	S190N
A643T	S228N
A643V	W478C
G648D	Y642F
G648S	

A coté de ce mécanisme constitutif, aboutissant à son hyperactivité, l'activation d'Upc2 peut être fortement induite (jusqu'à un facteur 100) par les inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol dont les antifongiques azolés, du fait de la déplétion membranaire en ergostérol (Hoot *et al.*, 2008). Enfin, Upc2 est capable de s'autoréguler par fixation à sa région promotrice, comme proposé chez *S. cerevisiae* (Davies *et al.*, 2005 ; MacPherson *et al.*, 2005 ; Hoot *et al.*, 2008 ; Hoot *et al.*, 2010). Cependant, le maintien de l'activité du promoteur du gène *UPC2* en l'absence d'Upc2 confirme l'existence d'un autre facteur de transcription susceptible d'interagir avec ce promoteur et donc de contrôler l'expression d'Upc2 (Hoot *et al.*, 2008). Plusieurs domaines régulateurs au sein de la région promotrice du gène *UPC2* ont pu être caractérisés (Figure 24) (Hoot *et al.*, 2010) :

- **Domaine UDR (Upc2-Dependent Region).** Ce domaine, localisé entre les positions -450 à -350 en amont de la séquence codante du gène *UPC2*, contient un motif SRE-A (-437 à -431) parfaitement homologue au site de fixation d'Upc2 chez *S. cerevisiae* et indispensable pour l'expression basale et induite du gène *UPC2* (Hoot *et al.*, 2010). Ce motif est un des sites de fixation d'Upc2 sur sa région promotrice mais la présence d'un autre domaine, nommé SDR (Short Direct Repeat Sequence), est nécessaire suggérant qu'Upc2 pourrait se fixer sous une forme dimérique au niveau de ces régions régulatrices (Hoot *et al.*, 2010). Enfin, un dernier domaine nommé SRE-B a été mis en évidence entre les positions -183 à -177 et constitue le second site de fixation d'Upc2 (Hoot *et al.*, 2010).
- **Domaine UIR (Upc2-Independent Region).** Ce domaine (-300 à -250) est nécessaire à l'expression du gène *UPC2* chez les mutants  $\Delta upc2/\Delta upc2$  et serait le site de fixation d'un autre facteur de transcription, non encore identifié, permettant de réguler l'expression du gène *UPC2* selon un mécanisme Upc2-indépendant (Hoot *et al.*, 2010).



**Figure 24 : Position des éléments cis-régulateurs dans la région promotrice du gène *UPC2* de *C. albicans***  
 Source : d'après Hoot *et al.*, 2010

La régulation du gène *UPC2* est donc extrêmement complexe. Elle fait intervenir plusieurs mécanismes, autorégulation via Upc2 lui-même et/ou régulation via l'intervention d'autres facteurs transcriptions comme Ndt80 qui possède un site potentiel de fixation dans la région promotrice du gène *UPC2* (Hoot *et al.*, 2010). Toutefois, comme illustré précédemment, la mise en évidence d'isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azolés et présentant une surexpression du gène *ERG11*, en l'absence de mutations sur le gène *UPC2*, suggère l'existence d'autres mécanismes, Upc2-indépendants, permettant d'expliquer le phénotype de résistance de ces isolats cliniques (Flowers *et al.*, 2010 ; Heilmann *et al.*, 2010 ; Flowers *et al.*, 2012).

### III.3.2.2. *Aspergillus fumigatus*

A coté du mécanisme de résistance reposant sur la survenue de mutations sur le gène *CYP51A*, quasi historique, un nouveau mécanisme a été décrit en 2007 chez des isolats cliniques d'*A. fumigatus* présentant un profil de résistance à tous les azolés (Verweij *et al.*, 2007 ; Mellado *et al.*, 2007). Il repose sur la duplication en tandem d'un motif de 34 pb ou TR<sub>34</sub> (Tandem Repeat) situé au niveau de la région promotrice du gène *CYP51A* entre les positions -322 à -288 (Mellado *et al.*, 2007). La présence de cette duplication est responsable d'une surexpression modérée du gène *CYP51A* (x4 à x8) (Mellado *et al.*, 2007). La présence de cette duplication en tandem n'est pas suffisante pour conférer une résistance de haut niveau aux azolés (Mellado *et al.*, 2007). D'ailleurs, la mise en évidence de la mutation TR<sub>34</sub> est rarement observée seule (Snelders *et al.*, 2008 ; Denning *et al.* 2011). En revanche, son association à la substitution L98H, correspondant au génotype nommé « TR<sub>34</sub>/L98H » (ou TR/L98H), est fréquente et synergique, conférant le phénotype de multi-résistance observé chez les isolats correspondants (Mellado *et al.*, 2007 ; Snelders *et al.*, 2011). A noter que d'autres types de duplication dans la région promotrice de *CYP51A*, moins fréquentes, ont néanmoins été observées chez des isolats résistants aux azolés : TR<sub>46</sub> et TR<sub>53</sub> (Snelders *et al.*, 2008 ; Snelders *et al.*, 2012).

L'hypothèse actuelle est que l'apparition de ce nouveau mécanisme de résistance, qui aurait émergé aux Pays-Bas au milieu des années 1990, est liée à l'utilisation croissante et intensive des fongicides azolés dans notre environnement (Snelders *et al.*, 2008 ; Verweij *et al.*, 2009b ; Snelders *et al.*, 2012). L'existence de duplication en tandem au sein de la région promotrice des gènes *CYP51*, conférant une diminution de la sensibilité aux fongicides azolés par une surexpression de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, a en effet été documentée chez plusieurs champignons phytopathogènes comme *Penicillium digitatum* et l'agent de la septoriose du blé, *Mycosphaerella graminicola* (Verweij *et al.*, 2009b ; Cools *et al.*, 2012). Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse dont : i) la mise en évidence de souches résistantes TR/L98H dans l'environnement (Snelders *et al.*, 2009, Mortensen *et al.*, 2010) ; ii) la mise en évidence de ces mêmes souches chez des patients n'ayant jamais reçu d'azolés (Verweij *et al.*, 2007 ; Chowdhary *et al.*, 2011 ; Van der Linden *et al.*, 2011b ; Burgel *et al.*, 2012) ; iii) l'importante proximité génétique observée entre les souches d'*A. fumigatus* TR/L98H isolées de patients et celles de l'environnement (Snelders *et al.*, 2008 ; Chowdhary *et al.*, 2011) ; iiiii) l'existence de

phénotype de résistance croisés entre certains fongicides azolés utilisés dans l'agriculture et les azolés utilisés en médecine (Snelders *et al.*, 2009 ; Snelders *et al.*, 2012).

Au moins cinq composés inhibiteurs de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase de la famille des triazolés, autorisés aux Pays-Bas entre 1990 et 1996, pourraient être à l'origine de l'émergence de ce mécanisme de résistance : bromuconazole, propiconazole, tebuconazole, epoxiconazole et difenoconazole (Snelders *et al.*, 2012). La forte similarité des interactions moléculaires établies entre ces azolés et l'enzyme dans le modèle tridimensionnel d'AfCyp51A expliquerait le profil de résistance de haut niveau vis-à-vis de ces fongicides et des médicaments utilisés en médecine (Snelders *et al.*, 2012).

Depuis la mise en évidence des premiers isolats présentant ce mécanisme de résistance aux Pays-Bas, des souches portant la mutation TR/L98H, ont été rapportées dans plusieurs pays d'Europe, en Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, France, Grande-Bretagne et Italie plus récemment en dehors de l'europe, en Chine et en Inde (Mellado *et al.*, 2007 ; Snelders *et al.*, 2008 ; Howard *et al.*, 2009 ; Chowdhary *et al.*, 2011 ; Lockhart *et al.*, 2011 ; Mortensen *et al.*, 2011 ; Van der Linden 2011a ; Burgel *et al.*, 2012). Les données disponibles à ce jour montrent que la prévalence de ce mécanisme de résistance est variable en fonction des pays et des établissements de santé. A titre d'exemple, il constitue le principal mécanisme aux Pays-Bas, identifié chez plus de 90 % des d'isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés mais est au contraire, peu représenté en Grande-Bretagne où la résistance est largement dominée par les mutations sur la séquence codante du gène *CYP51A* (Bueid *et al.*, 2010 ; Van der Linden *et al.*, 2011a). Ces différences pourraient s'expliquer par la population étudiée, comprenant principalement des patients souffrant d'aspergillose chronique et recevant des azolés au long cours dans les études conduites en Grande-Bretagne et par l'usage intensif d'azolés dans l'agriculture aux Pays-Bas (Howard et Arendrup, 2011).

Enfin, la possibilité d'autres mécanismes pouvant participer à la surexpression du gène *ERG11* ne doit pas être exclue. Ainsi, l'investigation récente de trois souches d'*A. fumigatus* multi-résistantes aux azolés présentant une surexpression importante de ce gène (x8 à x16) et isolées d'un même patient présentant un aspergillose pulmonaire chronique en situation d'échappement mérite d'être abordée (Howard *et al.*, 2006 ; Albarrag *et al.*, 2011). Aucune d'entre elles ne présentait la duplication TR<sub>34</sub> dans la région promotrice du gène *AfCYP51A*. Cependant, de façon inattendue, une des souches présentait une large insertion de 1822 pb en amont de la séquence codante du gène *CYP51A* (position -370), portant les caractéristiques

d'un transposon de type II (motifs répétés et inversés de 45 pb aux deux extrémités et séquence codant une transposase de 556 acides aminés). Cependant, la position de ce transposon, en amont de deux sites de début de transcription (-49 et -36) rend peu probable l'effet de ce transposon sur l'initiation de la transcription de *CYP51A*. Le rôle de ce transposon nommé *Aft1*, dans la régulation de l'expression du gène *CYP51A*, reste donc à démontrer (Hey *et al.*, 2008 ; Albarrag *et al.*, 2011).

### III.3.3. Déviation de la voie de biosynthèse des stérols

La déviation de la voie de biosynthèse des stérols est un mécanisme pouvant participer à la résistance aux azolés. Ce mécanisme complexe qui sur la présence de mutations altérant la fonctionnalité de certaines protéines de cette voie de biosynthèse, a été rapporté chez les levures du genre *Candida*. Dans la plupart des cas, il s'agit de mutations sur le gène *ERG3* codant la C5 désaturase. L'impact d'autres perturbations de la voie de biosynthèse de l'ergostérol est exceptionnel et peu étudié. A ce jour, l'implication de ce mécanisme chez *A. fumigatus* n'est pas connue.

#### III.3.3.1. C5 désaturase (*Erg3*)

##### i. *Candida albicans*

La stérol C5 désaturase, enzyme codée par le gène *ERG3* chez *C. albicans*, est impliquée dans la voie de biosynthèse de stérols en aval de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase (Figure 25). Elle assure la conversion de l'épisterol en ergosta 5, 7, 24 (28) triénol, lui même substrat de la C22 désaturase (*ERG5*) puis de la C24 désaturase (*ERG4*), ultime étape avant d'aboutir à l'ergostérol (Sanglard *et al.*, 2003).

En présence d'un antifongique azolé, du fait de l'inhibition de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, elle est responsable de la conversion du 14 $\alpha$ -méthyl fécostérol en 14 $\alpha$ -méthylergosta-8,24(28) dien3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, toxique pour la cellule fongique (Figure 25).

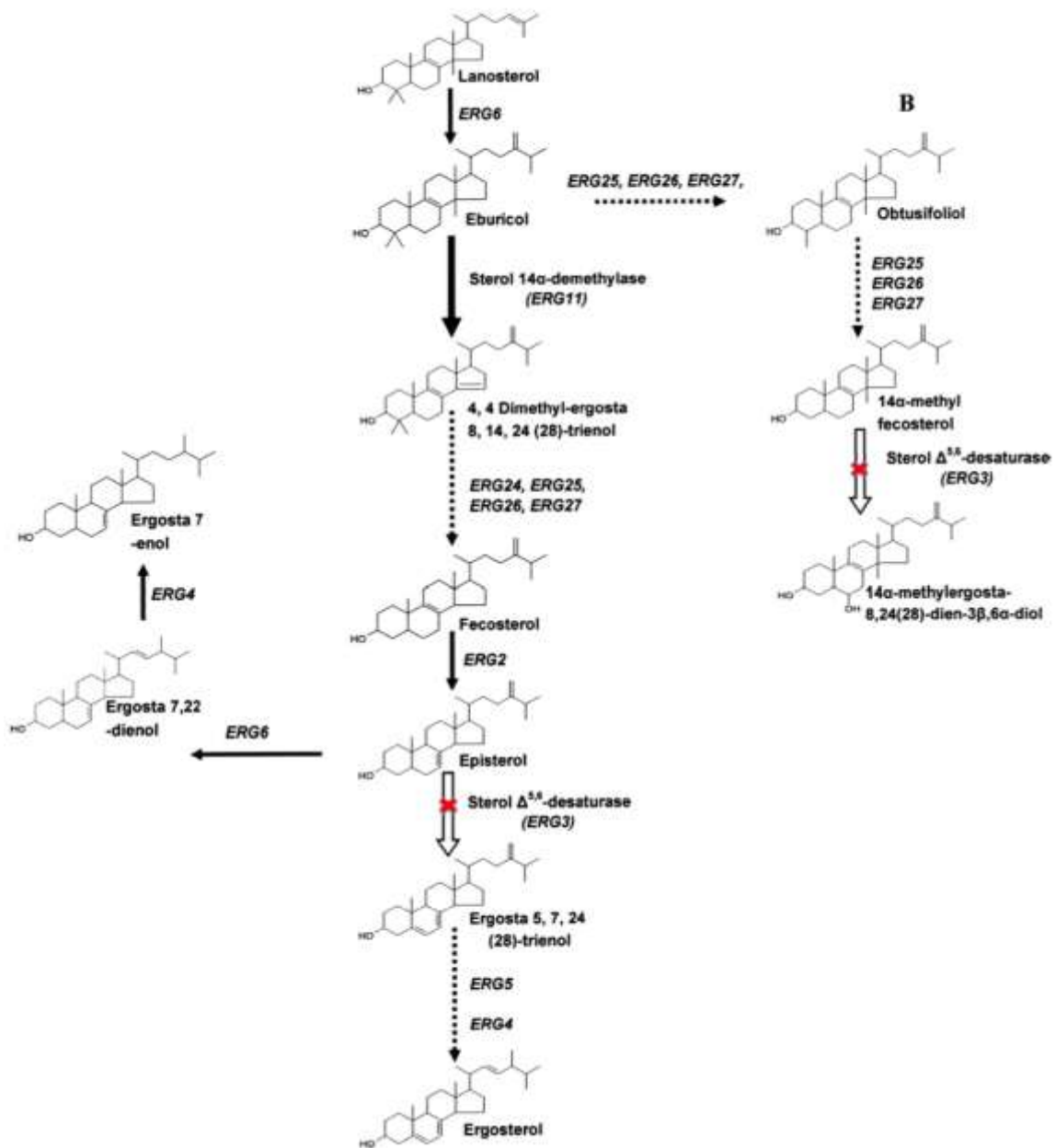


Figure 25 : Déviation de la voie de biosynthèse en présence d'une perte de fonctionnalité de la C5 désaturase (Erg3) chez *C. albicans*

Légende : Flèches en gras : une seule étape enzymatique ; flèches pointillées : plusieurs étapes enzymatiques.

Remarque : La perte de l'activité de l'enzyme conduit à une déviation de la voie de biosynthèse vers la formation d'ergosta7,22-diénoles. En présence d'azolés, la voie de synthèse est déviée vers la synthèse de 14 $\alpha$ -méthylfecosterols.

Source : d'après Martel *et al.*, 2010b

Décrite initialement chez *S. cerevisiae* (Watson *et al.*, 1989 ; Arthington *et al.*, 1991), l'implication potentielle de la stérol C5 désaturase dans la résistance aux azolés a été rapportée ultérieurement chez plusieurs isolats cliniques de *C. albicans*, de *C. lusitaniae* et chez *C. dubliniensis* lors d'expériences de sélection de souches résistantes à l'itraconazole (Kelly *et*



*al.*, 1997 ; Nolte *et al.*, 1997 ; Pinjon *et al.*, 2003 ; Sanglard *et al.*, 2003 ; Young *et al.*, 2003 ; Martel *et al.*, 2010b). Alors que dans les conditions physiologiques, l'ergostérol est le stérol majoritaire de la membrane de *C. albicans* les isolats présentant une forme mutée, non fonctionnelle de l'enzyme Erg3, présentent une distribution profondément modifiée de leur profil des stérols membranaires : proportion faible voire non détectable d'ergostérol et une accumulation importante d'épistérol, d'ergosta-7,22-diénole et de fécostérol (Figure 25) (Martel *et al.*, 2010b). En présence d'azolés, on observe chez ces isolats, une accumulation de 14 $\alpha$ -méthyl fécostérol, stérol intermédiaire non toxique pour la cellule fongique et expliquant le phénotype de résistance aux azolés (Figure 25). Par ailleurs, le phénotype de résistance impliquant *ERG3* est souvent associé à une augmentation des CMI vis-à-vis de l'amphotéricine B du fait de l'incapacité de ces souches à produire de l'ergostérol, cible des polyènes (Kelly *et al.*, 1997 ; Nolte *et al.*, 1997 ; Sanglard *et al.*, 2003 ; Young *et al.*, 2003 ; Martel *et al.*, 2010b). Toutefois ce phénotype de résistance croisée est inconstamment observée (Martel *et al.*, 2010b).

Ce mécanisme étant encore relativement peu exploré, et à ce jour, seules une dizaine de mutations non-synonymes ont pu être identifiées sur ce gène à partir de l'analyse d'isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azolés (D19E, K97E, D147G, A168V, L193P, V237A, H243N, T329S, T330A, W332R et A353T) (Miyazaki *et al.*, 1999, Yan *et al.*, 2008, Martel *et al.*, 2010b). A l'exception de quelques unes comme A168V, T329S et W332R, présentes seules et/ou pour lesquelles l'implication dans la perte de fonctionnalité de Erg3 et la résistance a été confirmée par mutagenèse dirigée, la plupart ont été mises en évidence en association chez un même isolat clinique, rendant difficile leur implication dans la résistance aux azolés. Récemment, un nouvel isolat présentant une délétion de 2 pb sur le gène *ERG3* ( $\Delta$ 121-122), conduisant à un décalage du cadre de lecture et *in fine* à une protéine tronquée a été caractérisé (Vale-Silva *et al.*, 2012). Résultat d'un probable mécanisme de compensation, ces isolats présentent habituellement une surexpression du gène *ERG11* (Geber *et al.*, 1995 ; Pinjon *et al.*, 2003 ; Pierson *et al.*, 2004 ; Miyazaki *et al.*, 2006).

La faible représentation en pratique clinique de ce mécanisme de résistance, certes peu exploré, a conduit certains auteurs à suggérer que ces isolats pourraient présenter un désavantage sélectif comme une capacité de croissance atténuée ou une moindre virulence *in vivo* (Geber *et al.*, 1995 ; Sanglard *et al.*, 2003). Cette dernière hypothèse a été étayée dans plusieurs modèles

expérimentaux de candidoses invasives chez la souris et a conduit à mettre en évidence un défaut de filamentation chez ces souches (Chau *et al.*, 2005 ; Miyazaki *et al.*, 2006).

Ces données n'ont cependant pas été confirmées dans deux études récentes montrant d'une part que certains isolats conservent leur capacité de filamentation et d'autre part, que la perte de fonctionnalité de l'enzyme Erg3 n'est pas systématiquement associée à une diminution de la virulence (Martel *et al.*, 2010b ; Vale-Silva *et al.*, 2012). Le lien entre le phénotype de résistance via *ERG3* et la moindre virulence de ces souches reste donc à éclaircir.

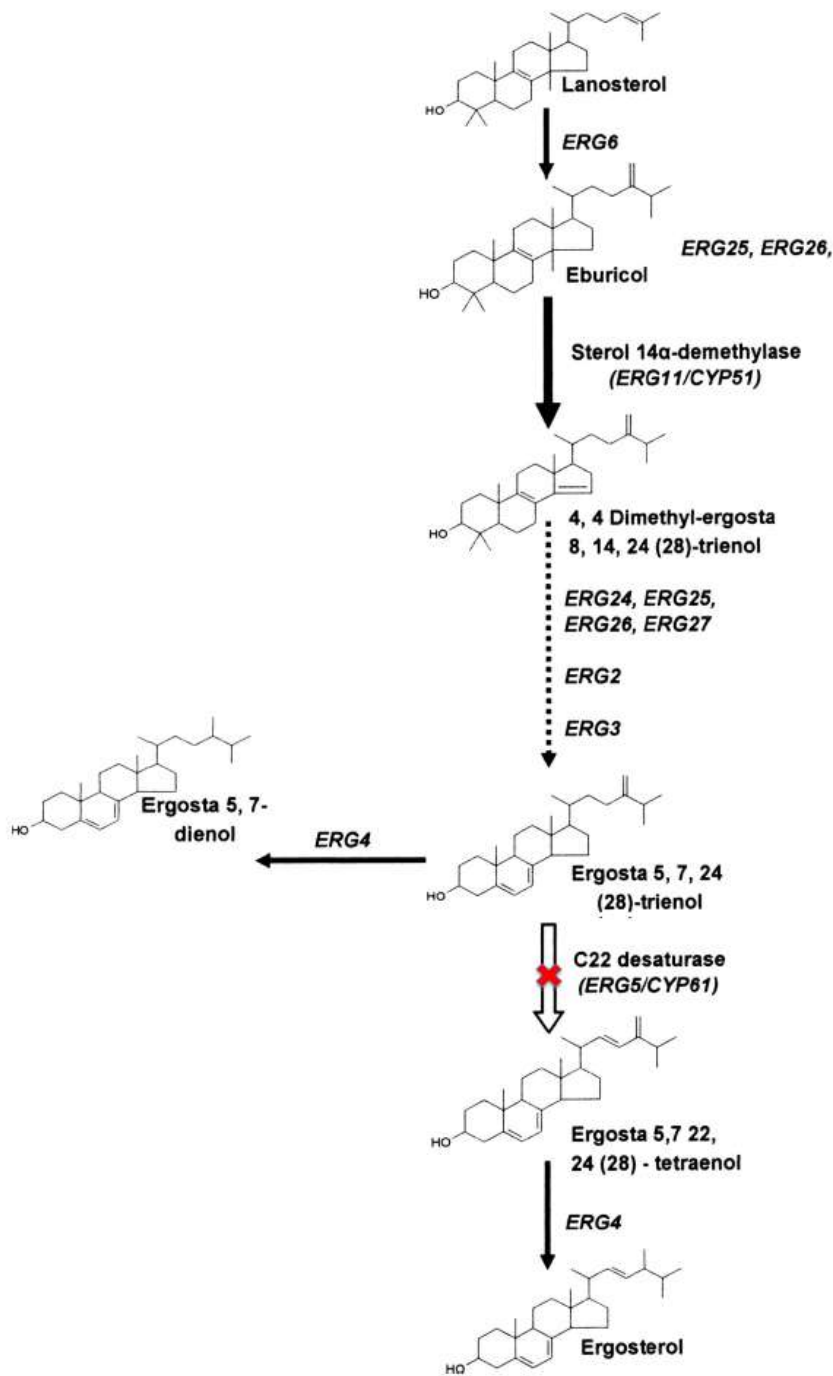
## ii. *Aspergillus fumigatus*

Trois gènes homologues du gène *ERG3* de *C. albicans*, ont été mis en évidence chez *A. fumigatus* : *ERG3A*, *ERG3B* et *ERG3C* (Mellado *et al.*, 2001 ; Ferreira *et al.*, 2005 ; Nierman *et al.*, 2005 ; Alcazar-fuoli *et al.*, 2006). La délétion de ces gènes, réalisée de manière expérimentale, semble cependant montrer leur absence d'implication dans la résistance aux azolés chez *A. fumigatus* (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2006).

### III.3.3.2. C22 désaturase (Erg5)

Cette enzyme assure normalement la conversion de l'ergosta 5, 7, 24 (28) triénol en ergosta 5, 7, 22 (28) -tétraénol, dernier intermédiaire dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Sanglard *et al.*, 2003). En présence d'une perte de fonctionnalité de l'enzyme, on observe une déviation de la voie de biosynthèse vers la formation d'ergosta 5,7-diénole suite à l'intervention de la C24 désaturase (*ERG4*) (Figure 26).

Récemment, une souche clinique de *C. albicans* présentant un profil des stérols inhabituel, caractérisé par l'absence d'ergostérol et l'accumulation importante d'ergosta 5,7-diénole, typique d'une perte de fonctionnalité de la C22 désaturase (Erg5), a été rapportée (Martel *et al.*, 2010a). Sur le plan moléculaire, une duplication en tandem des acides aminés 106 à 115 était observée à l'état homozygote. A l'instar des mutants *erg3*, cet isolat présentait une résistance croisée entre les azolés et l'amphotéricine B et maintenait une capacité de filamentation (Martel *et al.*, 2010b). Toutefois, la contribution de cette mutation sur le gène *ERG5* au phénotype de résistance aux azolés reste inexplicée celui-ci pouvant s'expliquer par la présence concomitante de la mutation A114S sur le gène *ERG11* (Martel *et al.*, 2010a).



**Figure 26 : Déviation de la voie de biosynthèse des stérols en présence d'une perte de fonctionnalité de la C22 désaturase (Erg5) chez *C. albicans***  
 Source : d'après Martel *et al.*, 2010a

A l'exception des mutations sur le gène *ERG6* décrites à ce jour uniquement chez *C. glabrata* et associées spécifiquement à une résistance *in vitro* aux polyènes, aucune autre altération de la voie de biosynthèse des stérols n'a été impliquée à ce jour dans la résistance aux antifongiques chez les levures du genre *Candida* (Vandeputte *et al.*, 2007 ; Vandeputte *et al.*, 2008).

### III.3.4. Surexpression des transporteurs d'efflux

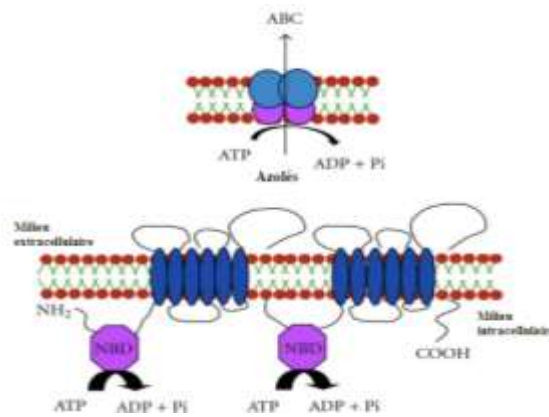
La surexpression de certains transporteurs d'efflux, naturellement présents à l'état physiologique, peut conduire à réduire la concentration intracellulaire des antifongiques azolés. Ce mécanisme est de loin le plus fréquemment impliqué dans la résistance aux antifongiques chez les champignons dont *C. albicans* (Coleman et Mylonakis, 2009). Deux classes distinctes de transporteurs d'efflux sont impliquées dans la résistance aux azolés, les transporteurs de la superfamille ABC (ATP-binding Cassette Superfamily) et ceux de la superfamille MFS (Major Facilitator Superfamily).

Les mécanismes aboutissant à la surexpression constitutive de ces transporteurs d'efflux chez les souches de *C. albicans* résistantes aux azolés sont désormais mieux connus. Ils font notamment intervenir une dérégulation de l'expression des gènes codant ces transporteurs, résultant de mutations gain de fonction sur leurs facteurs de transcription (Sanglard *et al.*, 2009). Bien que plus nombreux que chez *C. albicans*, ces transporteurs d'efflux sont en revanche encore mal caractérisés chez *A. fumigatus*, en particulier concernant leur capacité à assurer l'export des antifongiques azolés (Ferreira *et al.*, 2005). Leur implication dans le phénotype de résistance des isolats cliniques est néanmoins reconnue (Howard et Arendrup, 2011).

#### III.3.4.1 Efflux de type ATP-dépendant (ABC)

##### i. Généralités

Les transporteurs de type ABC sont largement distribués dans le règne vivant et sont capables de prendre en charge une très grande variété de substrats. D'un point de vue structural, ces transporteurs sont des protéines composées de deux sous-unités (Figure 27). Chaque sous-unité est constituée d'un domaine transmembranaire ou TMD (Transmembrane Domain) composé de six hélices  $\alpha$  selon la topologie (NBD-TMD)<sup>2</sup> et d'un domaine hydrophile cytoplasmique de liaison des nucléotides ou NBD (Nucleotide Binding Domain) (Gaur *et al.*, 2005a ; Prasad *et al.*, 2006). L'énergie nécessaire au fonctionnement de ces transporteurs est obtenue par l'hydrolyse de l'ATP, réalisée au niveau des domaines cytoplasmiques (NBD1 et NBD2).



**Figure 27 : Représentation schématique de la structure des transporteurs d'efflux de type CDR**  
**Légende :** Les domaines de fixation des nucléotides et les domaines transmembranaires sont figurés en violet et bleu respectivement.

**Source :** d'après Prasad *et al.*, 2011

## ii. *Candida albicans*

L'inventaire complet des protéines de type ABC chez *C. albicans*, grandement facilité par le séquençage de son génome, a permis d'identifier 28 transporteurs distincts (Gaur *et al.*, 2005a). A ce jour, seuls deux d'entre eux ont été clairement impliqués dans la résistance aux azolés, Cdr1 et Cdr2 (*Candida Drug Resistance 1* et 2 respectivement).

Protéines d'environ 1500 acides aminés, Cdr1 et Cdr2 sont codées par les gènes *CDR1* et *CDR2*, tous deux situés sur le chromosome 3. Ces transporteurs sont capables d'assurer l'efflux d'une grande variété de substrats dont le cycloheximide, des lipides et stéroïdes et des antifongiques comme la terbinafine et les antifongiques azolés dont le fluconazole, le kétoconazole, le miconazole, le voriconazole ou bien encore l'itraconazole (Shukla *et al.*, 2003 ; Chau *et al.*, 2004 ; Akins, 2005 ; Shukla *et al.*, 2006 ; Cannon *et al.*, 2009). Le posaconazole serait un moins bon substrat de ces transporteurs. La surexpression de ces transporteurs d'efflux peut être induite par divers composés dont la fluphénazine ou les hormones stéroïdes mais également certains antifongiques comme la terbinafine et l'amorolfine (Vandeputte *et al.*, 2012).

Des gènes homologues de *CDR1* et de *CDR2*, impliqués dans l'efflux des azolés ont été décrits chez plusieurs autres espèces de *Candida* dont *C. dubliniensis* (*CdCDR1* et *CdCDR2*), *C. krusei* (*ABC1* et *ABC2*), *C. glabrata* (*CgCDR1*) et *C. tropicalis* (*CDR1*) (Moran *et al.*, 1998 ; Sanglard *et al.*, 1999 ; Barchiesi *et al.*, 2000 ; Katiyar et Edlind, 2001 ; Pinjon *et al.*, 2003 ; Lamping *et al.*, 2009).

- Importance en clinique

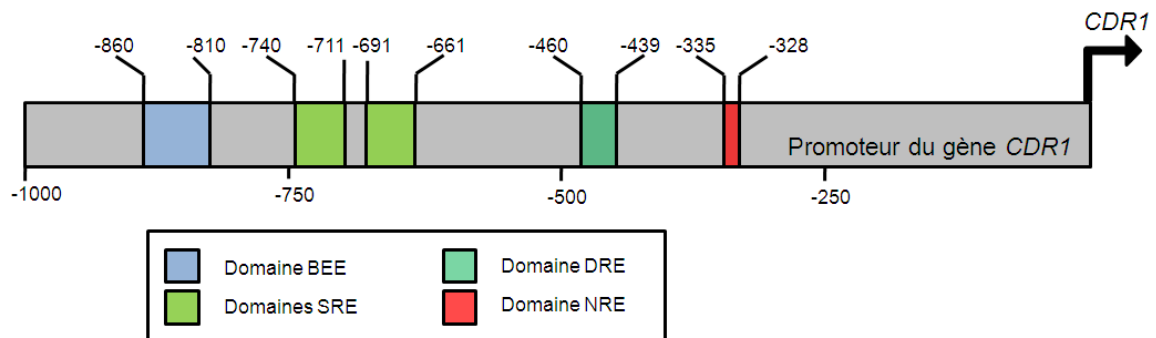
L'importance de la surexpression de transporteurs d'efflux Cdr1 et Cdr2 dans la résistance de *C. albicans* aux antifongiques azolés a été illustrée dans de nombreuses études et en particulier chez les patients infectés par le VIH ou plus récemment chez des patients possédant des désordres génétiques affectant l'immunité innée, deux catégories de patients susceptibles de bénéficier de traitements par azolés au long cours (Sanglard *et al.*, 1995 ; Franz *et al.*, 1998 ; Lopez-ribot *et al.*, 1998 ; Perea *et al.*, 2001 ; Martinez *et al.*, 2002 ; White *et al.*, 2002 ; Chau *et al.*, 2004 ; Siikala *et al.*, 2010 ; McManus *et al.*, 2011). Bien que Cdr1 et Cdr2 soient capables d'assurer l'efflux des antifongiques azolés, Cdr1 est probablement le plus impliqué dans le phénomène de résistance (Holmes *et al.*, 2008 ; Tsao *et al.*, 2009).

- Régulation génétique de *CDR1* et *CDR2*

Ces dernières années, les travaux de recherche visant à élucider les mécanismes de la surexpression de *CDR1* et *CDR2* se sont multipliés et ont permis de mieux appréhender la régulation génétique de ces transporteurs d'efflux. La réalisation de délétions au sein de la région promotrice du gène *CDR1* de *C. albicans* a ainsi permis de caractériser plusieurs domaines cis-régulateurs impliqués dans sa régulation transcriptionnelle (Figure 28) :

- **Domaine BEE (Basal Expression Element)**. Ce domaine est situé dans la partie distale du promoteur entre les positions -860 à -810, en amont de la séquence codante de *CDR1*. Ce domaine assure le maintien de l'expression à bas niveau de *CDR1* (De Micheli *et al.*, 2002). Toute délétion dans cette région affecte l'expression de *CDR1*.
- **Domaine DRE (Drug Responsive Element)**. Le domaine DRE est situé entre les positions -460 et -439. Il joue un rôle important d'une part, dans la surexpression constitutive de *CDR1* chez les souches cliniques de *C. albicans* résistantes aux azolés et d'autre part, dans son induction en réponse aux activateurs comme l'oestradiol ou la fluphénazine (De Micheli *et al.*, 2002). Une séquence consensus de 20 pb (CGGAWATCGGATATTTTTT) contenant deux motifs CGG joue un rôle primordial dans son activation (De Micheli *et al.*, 2002). Ce domaine DRE est le seul domaine régulateur identifié à ce jour pour *CDR2* (De Micheli *et al.*, 2002).

- **Domaine SRE (Steroid Responsive Element)**. Il se compose de deux éléments, SRE1 et SRE2, situés dans la partie distale du promoteur (-740 à -711 et -691 à -661 respectivement) et impliqués spécifiquement dans la surexpression de *CDR1* en réponse aux hormones stéroïdes. SRE1 et SRE2 sont impliqués dans la surexpression de *CDR1* en réponse à la progestérone mais seul SRE2 est nécessaire pour la réponse à l'oestradiol (Karnani *et al.*, 2004).
- **Domaine NRE (Negative Regulatory Element)**. Ce domaine est situé dans la partie proximale du promoteur (-335 à -328). Il assure, comme BEE, le maintien de l'expression à bas niveau de *CDR1* (Gaur *et al.*, 2004 ; Gaur *et al.*, 2005b). La délétion de ce domaine conduit à une surexpression de *CDR1* (Gaur *et al.*, 2004 ; Gaur *et al.*, 2005b).



**Figure 28 : Position des éléments cis-régulateurs décrits dans la région promotrice du gène *CDR1* de *C. albicans***

Source : d'après Sanglard *et al.*, 2009

Le domaine DRE, impliqué dans la résistance aux azolés est celui qui a suscité le plus d'intérêt. En effet, ses deux motifs répétés de type CGG sont reconnus par les facteurs de transcription de la famille  $Zn_2Cys_6$  et en particulier par le facteur de transcription Tac1 (Transcriptional Activator of *CDR* genes) qui joue un rôle majeur dans la régulation de *CDR1* et de *CDR2* (Coste *et al.*, 2004). La fixation de Tac1 sur le domaine DRE, démontrée *in vivo* et *in vitro*, conduit à l'activation des gènes *CDR* dont *CDR1* et *CDR2* (Coste *et al.*, 2004 ; Coste *et al.*, 2009). Par ailleurs, la délétion du gène *TAC1* permet d'abolir la surexpression constitutive de *CDR1* et de *CDR2* chez des isolats cliniques résistants aux azolés (Coste *et al.*, 2004).

A l'image du gène *ERG11* et de son facteur de transcription Upc2, les travaux pionniers de Coste *et al.*, ont révélés que la surexpression constitutive de Cdr1 et Cdr2 observée chez les isolats cliniques résistants aux azolés, reposait sur la présence de mutations gain de fonction sur le gène *TAC1*. Ces mutations confèrent une hyperactivité à l'allèle correspondant et permettent

d'accroître de manière importante et constitutive l'activité transcriptionnelle de Tac1 (Coste *et al.*, 2006). A ce jour, une vingtaine de mutations non-synonymes sur le gène *TAC1* ont été formellement impliquées comme gain de fonction (Tableau VIII).

**Tableau VIII : Mutations décrites sur le gène *TAC1* de *C. albicans***

**Légende :** <sup>1</sup>L'implication en tant que GOF est fortement suggérée; <sup>2</sup>Décrite chez un allèle sauvage de *TAC1*; <sup>3</sup>Décrite en association avec d'autres mutations; <sup>4</sup>Décrite chez un allèle *TAC1* hyperactif ne portant pas de GOF connue; <sup>5</sup>Décrite chez un allèle *TAC1* hyperactif portant une ou plusieurs GOF; <sup>6</sup>Décrite chez un isolat présentant une surexpression de *CDR1/CDR2* sans GOF connue; <sup>7</sup>Décrite chez un isolat présentant une surexpression de *CDR1/CDR2* avec GOF connue; <sup>8</sup>Décrite chez un allèle *TAC1* non fonctionnel en association à d'autres mutations; <sup>9</sup>Décrite dans l'article original comme E154R.

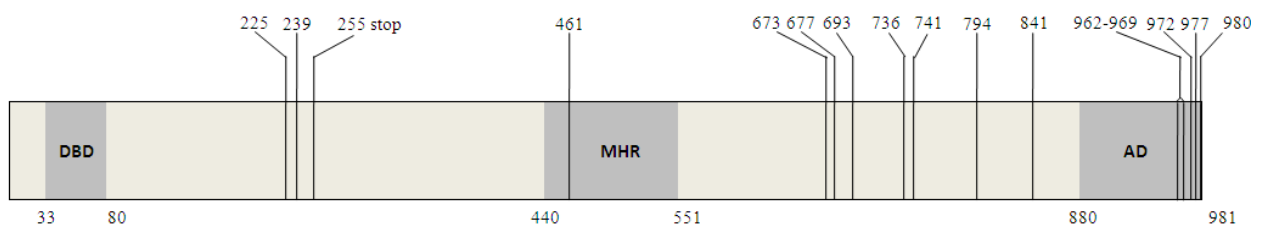
**Source :** Coste *et al.*, 2006; Coste *et al.*, 2007; Yann *et al.*, 2008; Coste *et al.*, 2009; Siikala *et al.*, 2010; McManus *et al.*, 2011.

Mutations associées à un gain de fonction sur le gène <i>TAC1</i> (GOF)	Mutations associées à une perte de fonction de <i>TAC1</i> (LOF)	Mutations décrites sur le gène <i>TAC1</i> et sans effet sur l'expression de <i>TAC1</i> <sup>2</sup>	Mutations décrites sur le gène <i>TAC1</i> et dont le rôle reste à déterminer <sup>3</sup>
T225A	K215stop	L17S	F14Y <sup>4</sup>
I255stop	F368S	L47K	N93Y <sup>5</sup>
W239L	L392F	F104V	S108N
E461K	N871D	L131I, L131S	E132G <sup>8</sup>
R673Q		M170V	Q154R <sup>5,9</sup>
ΔM677		F189S	T158A <sup>8</sup>
R693K		S199N	K215E <sup>4</sup>
A736T, A736V		R206H	N218S <sup>8</sup>
N740D <sup>1</sup> , N740S <sup>1</sup>		V207A	S236L <sup>6</sup>
H741Y		F232S	L237F <sup>5</sup>
I794V		V317A	L244S <sup>8</sup>
E841G		A377V	S264L <sup>5</sup>
ΔL962-N969		N396S	P276L <sup>7</sup>
N972D, N972S, N972I		I558V	S290C <sup>6</sup>
N977D, N977K <sup>1</sup>		L572F	D304V <sup>8</sup>
G980E, G980W		S683P	S382G <sup>8</sup>
		S764G	Y395N <sup>8</sup>
		N772K	N398S <sup>6</sup>
		D776N	N441D <sup>8</sup>
		E829Q	W442R <sup>5</sup>
		R869Q	G500D <sup>5</sup>
		I895T	V510A <sup>5</sup>
		E904G	S518L <sup>5</sup>
		S935L	L563S <sup>4</sup>
		S937L	I571V <sup>4</sup>
		S941P	N591D <sup>8</sup>
		N944Y	K640R <sup>5</sup>
			F641Y <sup>8</sup>
			S651P <sup>5</sup>
			Y674H <sup>5</sup>
			E681V <sup>5</sup>
			L706S <sup>5</sup>
			Y720H <sup>4</sup>
			L732F <sup>8</sup>
			L734F <sup>6</sup>
			K763stop <sup>8</sup>
			N874G <sup>6</sup>
			N894S <sup>6</sup>
			L949S <sup>8</sup>
			F973S <sup>6</sup>



Il s'agit pour la plupart de substitutions, mais des mutations non-sens ou des délétions ont été rapportées. D'autres mutations ont au contraire été associées à une perte de fonction (Tableau VIII) (Coste *et al.*, 2009). A coté de ces mutations gain de fonction et perte de fonction, un grand nombre d'autres mutations ont été décrites, mais leur l'impact sur la fonctionnalité de Tac1 reste à évaluer. Les allèles de *TAC1* (sauvage ou hyperactif) étant codominants, la présence d'un allèle hyperactif à l'état homozygote est requise pour une résistance de haut niveau aux azolés (Coste *et al.*, 2004 ; Coste *et al.*, 2006 ; Coste *et al.*, 2007 ; Coste *et al.*, 2009). Une vision complète du polymorphisme allélique mis en évidence sur ce gène est présentée dans le Tableau VIII.

Comme illustré dans la Figure 29, ces mutations gain de fonction ne sont pas également distribuées sur le gène *TAC1*. La majorité d'entre elles se situent dans la partie C-terminale de la protéine, en particulier dans une région considérée comme étant le domaine d'activation de Tac1 où une délétion ( $\Delta$ L962-N969) et six substitutions ont été décrites (N972D, N972S, N972I, N977D, G980E et G980W) (Coste *et al.*, 2007). D'autres mutations gain de fonction ont été identifiées au niveau du domaine MHR (Middle Homology Region) et dans la partie N-terminale de la protéine, deux régions dont les fonctions ne sont pas encore connues. Enfin, l'implication de N740S et N740D, deux mutations récemment décrites et situées à proximité immédiate de H741Y, déjà connue comme gain de fonction, reste à confirmer (Siikala *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, la présence de mutations sur le gène *TAC1* est le seul mécanisme permettant d'expliquer la surexpression de Cdr1 et Cdr2 chez les isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux antifongiques azolés (Sanglard *et al.*, 2009).



**Figure 29 : Position des mutations gain de fonction sur le facteur de transcription Tac1 de *C. albicans***  
 Légende : DBD : DNA Binding Domain ; MHR : Middle Homology Region ; AD : Activation Domain.

S'il est bien établi que le facteur de transcription Tac1 joue un rôle central dans la régulation du gène *CDR1*, d'autres facteurs de transcription pourraient également y contribuer comme le laisse supposer la présence de multiples domaines de régulation dans sa région promotrice.

Il a été notamment montré que la délétion du gène *NDT80*, codant un facteur de transcription homologue du facteur de transcription de la méiose chez *S. cerevisiae*, empêche l'induction de l'expression de *CDR1* et augmente la sensibilité de *C. albicans* aux azolés (Chen *et al.*, 2004). Cependant, l'impact réel de Ndt80 dans le développement de la résistance aux azolés des isolats cliniques n'a pas été confirmé dans une étude récente (Sasse *et al.*, 2011).

Par ailleurs, des données récentes montrent qu'un autre facteur de transcription, Ncb2, sous-unité  $\beta$  de NC2 (Negative Factor II), complexe hétérodimérique répresseur de l'ARN polymérase II chez *S. cerevisiae*, pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation de *CDR1* chez *C. albicans* (Shukla *et al.*, 2011). Les auteurs ont pu montrer le rôle complexe de Ncb2 pouvant être répresseur ou activateur de *CDR1* (Shukla *et al.*, 2011). En effet, alors que la délétion du gène *NCB2* est associée à une surexpression de *CDR1* et à une diminution de la sensibilité aux azolés, à l'opposé, son recrutement accru dans la région promotrice de *CDR1*, chez des isolats surexprimant constitutivement *CDR1/CDR2* du fait de mutations gain de fonction sur le gène *TAC1*, suggère un rôle supplémentaire de Ncb2 dans l'activation de *CDR1/CDR2* en association à Tac1. Il est probable que la dualité d'action de Ncb2 pourrait reposer sur la présence de sites de fixation distincts dans la région promotrice de *CDR1* pour son activation (région proximale) et sa répression (région distale, proche de NRE) (Shukla *et al.*, 2011).

Enfin, Upc2, déjà impliqué dans l'expression des gènes de la biosynthèse de l'ergostérol, pourrait également participer à l'activation transcriptionnelle du gène *CDR1* et un autre facteur, CaTup1 réprimerait l'expression de *CDR1* (Murad *et al.*, 2001 ; Znaidi *et al.*, 2008).

En conclusion, la régulation transcriptionnelle de *CDR1* fait donc intervenir un réseau complexe de facteurs de transcription dont il reste encore beaucoup à découvrir. Par ailleurs, à côté de cette régulation transcriptionnelle, la présence de modifications post-transcriptionnelles conférant une meilleure stabilité des ARNm de *CDR1* et *CDR2*, est un autre mécanisme qui a été décrit chez *C. albicans* (Manoharlal *et al.*, 2008).

Enfin, Ferrari *et al.* ont récemment montré l'impact des mutations gain de fonction sur le gène *CgPDR1* (homologue de *TAC1* de *C. albicans*) dans la surexpression du gène *CgCDR1* et donc la résistance de *C. glabrata* mais également dans sa virulence (Ferrari *et al.*, 2009 ; Ferrari *et al.*, 2011). A l'heure actuelle, l'impact de la surexpression de Cdr1 sur la virulence de *C. albicans* n'a pas été exploré.

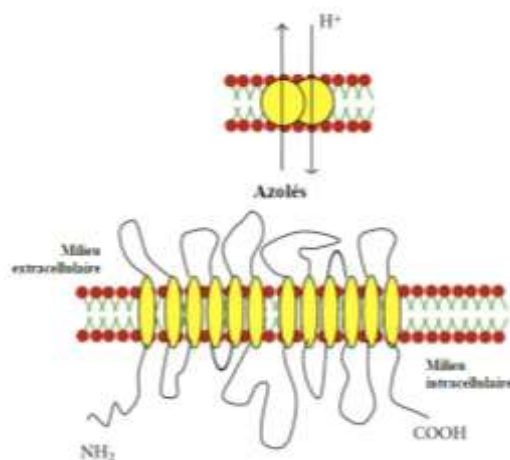
### iii. *Aspergillus fumigatus*

Quarante neuf transporteurs d'efflux de la superfamille des ABC ont été identifiés chez *A. fumigatus*, nombre bien supérieur à celui observé chez *C. albicans* (Ferreira *et al.*, 2005 ; Nierman *et al.*, 2005). Les deux premiers transporteurs étudiés sont AfuMdr1 et AfuMdr2 (Tobin *et al.*, 1997). L'implication de AfuMdr1 dans l'efflux de la cilofungine, composé antifongique (mais pas de l'itraconazole), a été démontrée par expression hétérologue chez *S. cerevisiae* (Tobin *et al.*, 1997). En 2002, Slaven *et al.*, ont décrit un autre transporteur, AtrF, dont l'expression est induite en présence d'itraconazole (Slaven *et al.*, 2002).

#### III.3.4.2 Efflux de type proton-dépendant (MFS)

##### i. Généralités

Les transporteurs de la superfamille MFS sont largement représentés dans le monde vivant et sont de différents types, symport, antiport ou uniport (Pao *et al.*, 1998). Le transport des substrats repose sur le gradient de proton (ou ion  $\text{Na}^+$ ) existant entre le milieu intracellulaire et le coté extracellulaire créant une force dite « protomotrice ». D'un point de vue structural, ces transporteurs sont composés de 12 ou 14 domaines transmembranaires et d'une boucle cytoplasmique (Figure 30).



**Figure 30 : Représentation schématique de la structure des transporteurs d'efflux de type MFS à 12 domaines transmembranaires**

Source : d'après Prasad *et al.*, 2011

Ils se répartissent en 17 familles dont deux, DHA1 (type H+/antiport à 12 domaines transmembranaires, DHA 12) et DHA2 (type H+/antiport à 14 domaines transmembranaires, DHA 14), assurent l'efflux des composés toxiques (Pao *et al.*, 1998 ; Gaur *et al.*, 2008 ; Coleman et Mylonakis, 2009 ; Sa-Correia *et al.*, 2009).

ii. ***Candida albicans***

A ce jour, au moins 95 transporteurs distincts de la superfamille MFS ont été identifiés chez *C. albicans* mais seulement un petit nombre d'entre eux ont été réellement caractérisés (Gaur *et al.*, 2008). Le seul transporteur formellement impliqué dans la résistance au fluconazole est Mdr1, appartenant à la famille DHA1 et codé par le gène *MDR1* anciennement appelé *BEN<sup>r</sup>* car initialement décrit comme impliqué dans la résistance au bénomyl (Fling *et al.*, 1991 ; Hiller *et al.*, 2006a). En plus du fluconazole et du bénomyl, ce transporteur est impliqué dans l'efflux d'une large gamme de substrats toxiques pour la cellule fongique comme le cycloheximide, les benzotriazolés ou le méthotrexate (Ben-Yaacov *et al.*, 1994 ; Cannon *et al.*, 2009). Souvent considéré comme possédant un spectre réduit vis-à-vis des azolés, limité au fluconazole, plusieurs études suggèrent que le kétoconazole mais également le voriconazole seraient aussi des substrats de Mdr1 contrairement au miconazole, à l'itraconazole et au posaconazole (Sanglard *et al.*, 1995 ; Nimi *et al.*, 2006 ; Lamping *et al.*, 2007 ; Wakiec *et al.* 2007 ; Cannon *et al.*, 2009).

Flu1, autre transporteur de type MFS, a également été proposé comme participant à l'efflux des antifongiques azolés, sa délétion étant associée à une augmentation de la sensibilité au fluconazole (Calabrese *et al.*, 2000). Toutefois, son implication dans la résistance aux azolés des isolats cliniques n'a pas été confirmée (Calabrese *et al.*, 2000 ; White *et al.*, 2002).

- Importance en clinique

La surexpression constitutive de *MDR1* est un mécanisme fréquemment observé chez les isolats cliniques de *C. albicans* résistants au fluconazole et a pu être largement documenté chez les patients VIH recevant du fluconazole au long cours du fait d'une candidose oropharyngée (Sanglard *et al.*, 1995 ; White *et al.*, 1997 ; Franz *et al.*, 1998 ; Lopez-Ribot *et al.*, 1998 ; Perea *et al.*, 2001 ; Martinez *et al.*, 2002 ; White *et al.*, 2002 ; Chau *et al.*, 2004). Bien que cette surexpression soit généralement associée à d'autres mécanismes de résistance, sont imputabilité

dans la résistance au fluconazole à été démontrée (Hiller *et al.*, 2006a). La surexpression de *MDR1* observée chez ces isolats cliniques est constitutive et résulte d'une dérégulation de son expression. Le niveau d'expression de *MDR1* chez ces souches résistantes au fluconazole peut ainsi être multiplié jusqu'à 200 fois par rapport au niveau d'expression observé chez les souches sensibles (Chau *et al.*, 2004 ; Frade *et al.*, 2004).

- Régulation génétique du gène *MDR1*

Comme pour *CDR1* et *CDR2*, les connaissances sur les mécanismes participant à la régulation génétique du gène *MDR1* se sont approfondies ces dernières années. Dans les conditions physiologiques, *MDR1* est exprimé à bas niveau chez *C. albicans* (Lyons et White, 2000 ; Chau *et al.*, 2004 ; Frade *et al.*, 2004). Son expression est en revanche induite en réponse à différents composés toxiques pour la levure dont le bénomyl et le peroxyde d'hydrogène (Gupta *et al.*, 1998 ; Karababa *et al.*, 2004 ; Harry *et al.*, 2005). Plusieurs domaines situés dans la région promotrice du gène *MDR1* participent à sa régulation chez *C. albicans* (Figure 31) :

- **Domaine BRE (Benomyl Response Element) ou MDRE (MDR1 Drug Response Element)**. Ce domaine est situé entre les positions nucléotidiques -296 à -260 en amont de la séquence codante de *MDR1*. Il apparaît nécessaire pour l'expression constitutive à haut niveau de *MDR1* chez les isolats cliniques résistants aux azolés ainsi qu'à son induction en réponse au bénomyl (Riggle et Kumamoto, 2006 ; Rognon *et al.*, 2006). Il contient un site de fixation pour le facteur de transcription Mcm1 (-288 à -277) (Riggle et Kumamoto, 2006 ; Rognon *et al.*, 2006). La fixation de Mcm1 au niveau de la région promotrice de *MDR1* a été confirmée *in vivo* et des mutations sur ce site abolissent l'expression de *MDR1* (Riggle et Kumamoto, 2006 ; Lavoie *et al.*, 2008 ; Tuch *et al.*, 2008).
- **Domaine HRE (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Response Element)**. Ce domaine est situé plus en aval de la région promotrice (-561 à -520). Il apparaît nécessaire pour la surexpression de *MDR1* en réponse à un traitement par le peroxyde d'hydrogène (Rognon *et al.*, 2006). Il n'est en revanche pas impliqué dans la réponse au bénomyl ni dans la surexpression constitutive de *MDR1* (Rognon *et al.*, 2006). Il contient deux motifs YRE (YAP1-response element), sites de fixation potentiels pour le facteur de transcription Cap1 (*C. albicans* AP-1) (Rognon *et al.*, 2006). Le premier est situé entre les positions -532 à

-526 (TTAGTAA) et le second -549 à -543 (TAACTAT). Il est probable que Cap1, facteur de transcription de la famille bZip impliqué dans le stress oxydatif, puisse participer à la régulation de *MDR1* via son interaction au domaine HRE (Alarco et Raymond, 1999 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Hiller *et al.*, 2006b ; Znaidi *et al.*, 2009).

- **Domaines AR1, AR2 et AR3.** Ces trois régions activatrices au sein du promoteur de *MDR1* ont été identifiées par Hiller *et al.* : AR1 (-397 à -301), AR2 (-588 à -500) et AR3 (-287 à -209) (Hiller *et al.*, 2006b).
- **Domaines T-HBP (tert-butyl hydrogen peroxide response element) et BRE.** Ces deux domaines ont été décrits par Harry *et al.* et chevauchent ceux déjà décrits par Hiller *et al.* (Harry *et al.*, 2005).

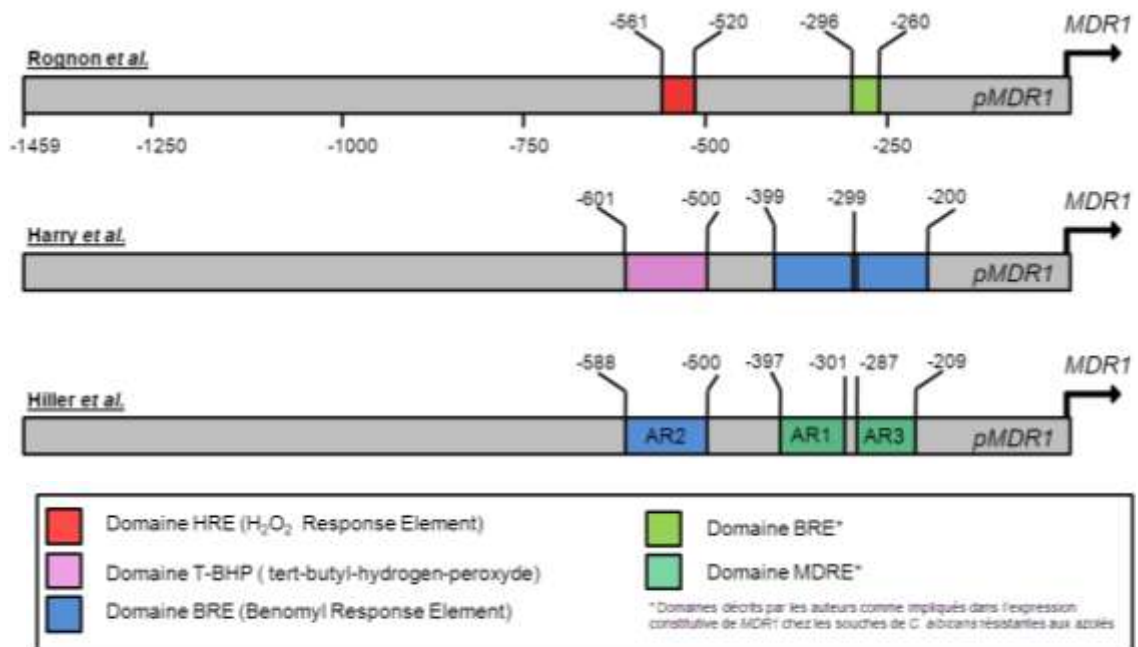


Figure 31 : Position des éléments cis-régulateurs dans la région promotrice du gène *MDR1* de *C. albicans*  
 Source : d'après Sanglard *et al.*, 2009

Le relatif chevauchement entre les domaines AR1/AR3 (Figure 31) et le domaine BRE d'une part et, d'autre part entre AR2 et le domaine HRE, renforce l'hypothèse sur l'importance de ces régions dans la surexpression constitutive à haut niveau du gène *MDR1* chez les souches résistantes et celle induite par le peroxyde d'hydrogène respectivement.

En 2007, Morschhäuser *et al.* ont démontré le rôle majeur de Mrr1 (Multi Drug Resistance Regulator 1), facteur de transcription de la famille des protéines à doigt de zinc, dans la surexpression de *MDR1* (Morschhäuser *et al.*, 2007). En effet, l'inactivation du gène *MRR1*

aboli la surexpression constitutive de *MDR1* chez des souches résistantes et empêche son induction par le bénomyl et le peroxyde d'hydrogène illustrant le caractère central de Mrr1 (Morschhäuser *et al.*, 2007). Comme pour Tac1, la surexpression constitutive de *MDR1* observée chez certains isolats cliniques de *C. albicans* résistants au fluconazole résulte de mutations gain de fonction sur le gène *MRR1* (Morschhäuser *et al.*, 2007 ; Schubert *et al.*, 2008a). Tous les isolats de *C. albicans* résistant au fluconazole et présentant une surexpression de *MDR1* analysés jusqu'à présent, possèdent des mutations gain de fonction sur ce gène (Morschhäuser *et al.*, 2007; Dunkel *et al.*, 2008a ; Schubert *et al.*, 2008a). A ce jour, 14 mutations gain de fonction ont été mises en évidence (Tableau IX).

**Tableau IX : Mutations décrites sur le gène *MRR1* de *C. albicans* et leur implication dans la résistance aux azolés**

Source : Dunkel *et al.*, 2008a ; Schubert *et al.*, 2011a

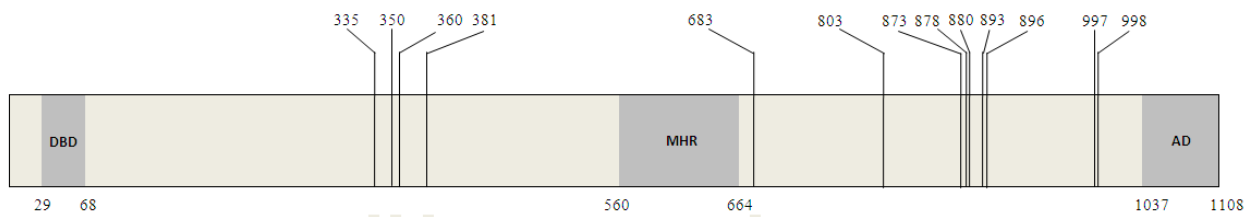
Remarque : Plusieurs autres mutations ont été mise en évidence très récemment chez *C. dubliniensis* (S602Y, C874Y, ΔT993, ΔT996-1006) (Schubert *et al.*, 2011b).

Mutations décrites sur le gène <i>MRR1</i> et associées à un <u>gain de fonction</u> (GOF)	Mutations décrites sur le gène <i>MRR1</i> et dont le rôle reste à déterminer
K335N	S16I
Q350L	V27I
T360I	T73K
T381I	nxNPQS (acides aminés 165-168)
P683H, P683S	S171P
N803D	L248V
R873T	V341E
G878E	E1020Q
A880E	
W893R	
T896I	
G997V	
L998F	

Cependant, étant donné le faible nombre d'isolats résistants au fluconazole étudiés à ce jour, il est probable que d'autres mutations restent à mettre en évidence. Comme pour les mutations décrites sur le gène *TAC1* la présence ces mutations gain de fonction à l'état homozygote est requise pour une résistance de haut niveau, du fait du caractère codominant de ces allèles (Coste *et al.*, 2006 ; Dunkel *et al.*, 2008a, Sanglard *et al.*, 2009). Aucune mutation associée à une perte de fonction de Mrr1 n'a été mise en évidence à ce jour.

A l'instar du gène *TAC1*, les mutations gain de fonction ne sont pas régulièrement réparties sur le gène sur *MRR1* (Figure 32). Elles se situent préférentiellement au niveau de deux régions situées entre les acides aminés 335 à 381 et 873 à 896 (Dunkel *et al.*, 2008a).

Le site de fixation de Mrr1 au niveau de la région promotrice du gène *MDR1* n'est pas connu mais pourrait correspondre au motif DCSGHD, répété à plusieurs endroits dans la région promotrice de *MDR1* (Schubert *et al.*, 2011a).



**Figure 32 : Position des mutations gain de fonction décrites sur le facteur de transcription Mrr1 de *C. albicans***

Légende : DBD : DNA Binding Domain ; MHR : Middle Homology Region ; AD : Activation Domain.

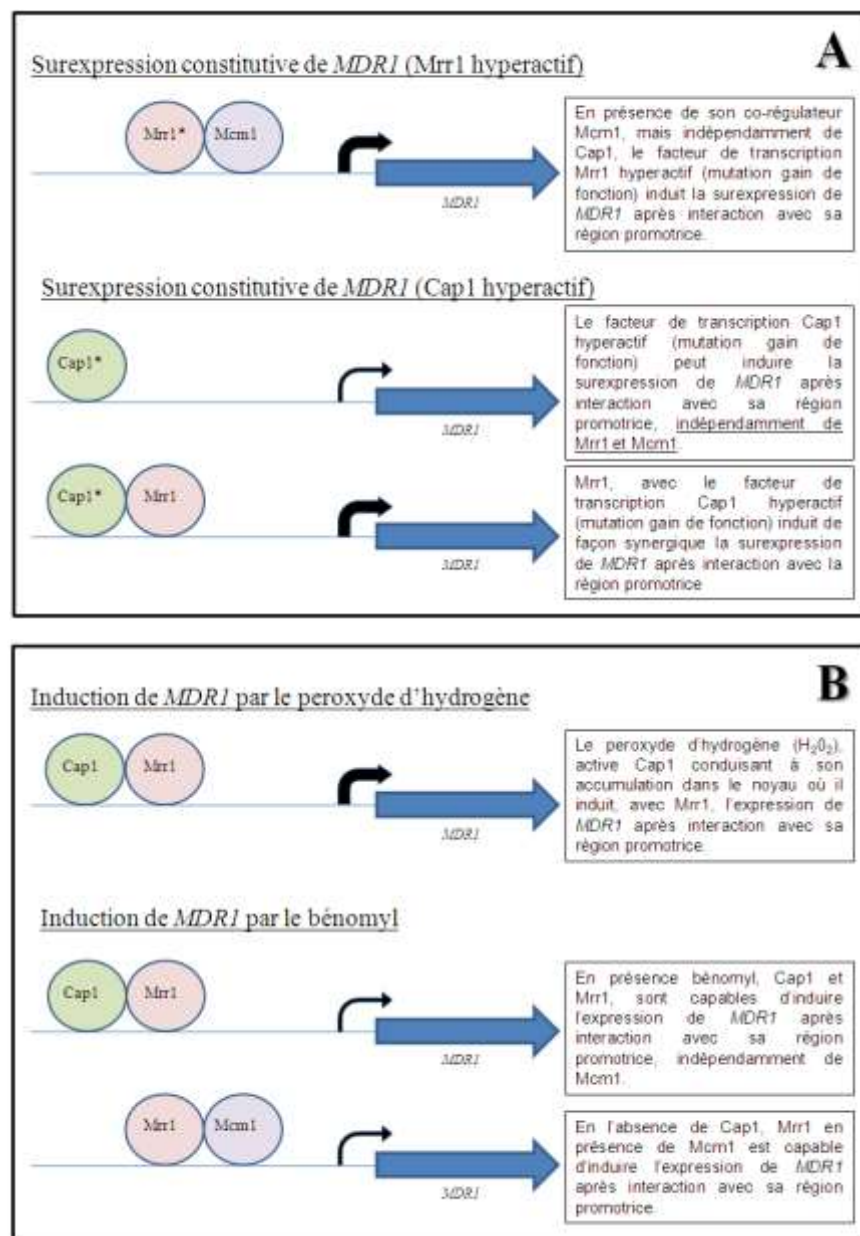
Source : d'après Schubert *et al.*, 2011a.

Au total, bien que le facteur de transcription Mrr1 joue un rôle central dans la régulation du gène *MDR1*, il existe de nombreuses interconnexions avec d'autres facteurs de transcription comme Cap1, Mcm1 et Upc2 ayant des sites de fixation bien identifiés dans la région promotrice de *MDR1*. A titre d'exemple, Upc2, déjà impliqué dans la régulation des gènes de la voie de synthèse de l'ergostérol, participerait à l'activation ou la répression de *MDR1* : activation transcriptionnelle en phase d'hypoxie et répression en présence de lovastatine (Znaidi *et al.*, 2008).

Des auteurs ont aussi rapporté la surexpression modérée de *MDR1* en l'absence de mutation gain de fonction sur *MRR1* chez une souche présentant une mutation gain de fonction sur le gène *UPC2* et une surexpression constitutive de *ERG11* (Dunkel *et al.*, 2008b). Par ailleurs, il a été observé le maintien de la résistance au fluconazole, malgré la délétion du gène *MDR1*, chez des isolats présentant des mutations gain de fonction sur le gène *MRR1* (Schubert *et al.*, 2011a). Cette observation suggère que le facteur de transcription Mrr1 participerait à la résistance aux azolés via des mécanismes indépendants de *MDR1* (Schubert *et al.*, 2011a). Enfin, un autre facteur de transcription, Rep1, pourrait réguler de manière négative, l'expression du gène *MDR1* (Chen *et al.*, 2009).



Des travaux récents ont permis de mieux appréhender les relations et interconnexions entre ces différents facteurs de transcriptions pour la régulation génétique de *MDR1* (Mogavero *et al.*, 2011). En conclusion, l'ensemble de ces données confirme que plusieurs facteurs de transcription participent de manière conjointe à la surexpression de *MDR1*, selon des schémas distincts selon que la surexpression de *MDR1* soit constitutive ou en réponse aux inducteurs (Figure 33) (Hiller *et al.*, 2006b ; Mogavero *et al.*, 2011).



**Figure 33 : Représentation schématique des voies d'activation du gène *MDR1* chez *C. albicans***  
 Légende : A. Surexpression constitutive de *MDR1*. B. induction de *MDR1* en réponse au peroxyde d'hydrogène et au bénomyl.

Source : d'après Mogavero *et al.*, 2011

- La présence d'un allèle hyperactif de *MRR1* résultant d'une ou plusieurs mutations gain de fonction confère la résistance au fluconazole via la surexpression constitutive de *MDR1*, indépendamment des facteurs de transcription Upc2 et Cap1 mais requiert la présence de Mcm1.
- La présence d'un allèle hyperactif de Cap1 pourrait également conduire à la surexpression constitutive de *MDR1*, indépendamment de Mrr1 et Mcm1. Toutefois, cette situation n'a jamais été observée chez des isolats cliniques résistants aux azolés.
- La présence d'un allèle hyperactif de Cap1 en association avec le facteur de transcription Mrr1 est synergique et conduit à une résistance de haut niveau aux azolés.

Concernant l'activation de *MDR1* en réponse aux inducteurs, les modalités de sa régulation génétique apparaissent intimement liées à la nature de l'inducteur (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou bénomyl) :

- Mrr1 semble lui jouer un rôle plus central et est impliqué l'expression de *MDR1* en réponse au bénomyl et à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Le facteur de transcription Cap1, est indispensable pour l'activation de *MDR1* en réponse à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et contribue à l'induction par le bénomyl.
- Le facteur de transcription Mcm1 est uniquement impliqué dans l'induction de *MDR1* en réponse au bénomyl.

### iii. *Aspergillus fumigatus*

Le nombre de transporteurs d'efflux identifiés chez *A. fumigatus* est important et évalué à 278, soit bien supérieur à celui identifié chez *C. albicans* (Ferreira *et al.*, 2005 ; Nierman *et al.*, 2005). Le premier transporteur présentant une homologie avec les transporteurs de la superfamille des MFS est AfuMdr3, décrit par Nascimento en 2003 (Nascimento *et al.*, 2003). Les auteurs ont montré chez des isolats d'*A. fumigatus* résistants à l'itraconazole, obtenus de manière expérimentale, une surexpression constitutive des gènes *AfuMDR3* (et *afuMDR4*) ainsi que leur surexpression en réponse à un traitement par itraconazole (Nascimento *et al.*, 2003).

Si l'implication du transporteur afuMdr4 dans la résistance d'*A. fumigatus* aux azolés est probable, ce transporteur étant également surexprimé au sein du biofilm, celle d'afuMdr3 est plus discutée, car également surexprimé chez des isolats sensibles aux azolés (Chen *et al.*, 2005 ; Albarrag *et al.*, 2011 ; Rajendran *et al.*, 2011).

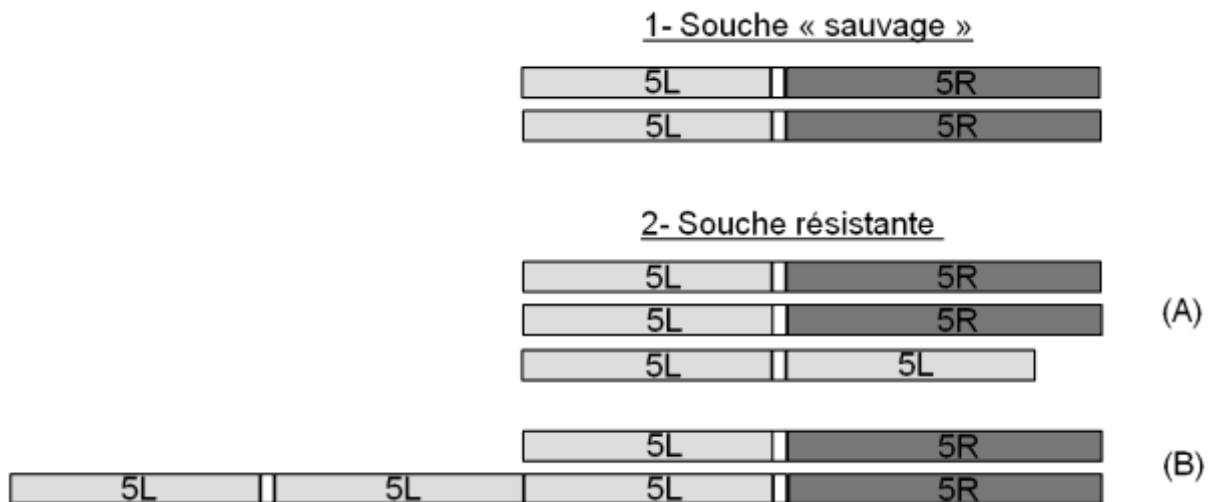
### II.3.5. Plasticité génomique

Comme illustré plus haut, l'acquisition de la résistance aux antifongiques azolés est le résultat d'un mécanisme progressif et séquentiel résultant de l'effet de la pression de sélection exercée par les antifongiques. Ainsi, chez *C. albicans*, levure diploïde, la survenue d'une mutation gain de fonction sur le facteur de transcription Tac1, n'est qu'une première étape, une résistance de haut niveau vis-à-vis des azolés nécessitant la présence de deux allèles hyperactifs soit le passage de la mutation de l'état hétérozygote à l'état homozygote (Coste *et al.*, 2004 ; Coste *et al.*, 2006). Cet événement génétique résulte généralement d'une perte d'hétérozygotie (LOH) liée soit à la perte d'un chromosome suivi de la reduplication de son homologue (portant la mutation gain de fonction), soit à des événements de recombinaison mitotiques ou conversions géniques (Selmecki *et al.*, 2010).

En plus de ces réarrangements génomiques, l'aneuploïdie joue aussi un rôle majeur dans l'acquisition de la résistance aux azolés chez *C. albicans*, procurant probablement à la levure un avantage sélectif (Selmecki *et al.*, 2009). L'aneuploïdie, inhabituelle chez les souches sauvages dans les conditions physiologiques normales, est au contraire fréquemment observée chez les souches de *C. albicans* résistantes aux azolés (Selmecki *et al.*, 2005 ; Selmecki *et al.*, 2006 ; Selmecki *et al.*, 2009). Ainsi, environ 50 % des souches de *C. albicans* résistantes au fluconazole possèderaient un génome aneuploïde. Cette aneuploïdie peut correspondre à tout (chromosome entier et particulier des trisomies) ou partie d'un chromosome (aneuploïdie segmentaire). L'aneuploïdie segmentaire la plus fréquente, retrouvée chez environ 20 % des souches résistantes au fluconazole, intéresse le bras gauche du chromosome 5, portant les gènes *ERG11* et *TAC1* (Selmecki *et al.*, 2006). Sur le plan génétique, celle-ci correspond à la duplication du bras gauche du chromosome 5 (5L), en miroir, face au centromère (Figure 34). Elle peut être soit extra-chromosomique, sous la forme d'un isochromosome, appelé i(5L), soit positionnée à l'extrémité gauche de la région télomérique du bras court du chromosome 5 ou d'autres chromosomes (Selmecki *et al.*, 2006 ; Selmecki *et al.*, 2008 ; Selmecki *et al.*, 2009). Cette aneuploïdie, va *in fine* contribuer à amplifier significativement l'expression des gènes situés sur cette portion chromosomique (dont *ERG11* et *TAC1*).

L'apparition de l'isochromosome i(5L) ainsi que la survenue de nombreux autres grands réarrangements chromosomiques sont intimement liés à la pression antifongique, ces

événements pouvant apparaître rapidement après un contact avec le fluconazole conférant à ces isolats un avantage sélectif (Selmecki *et al.*, 2009).



**Figure 34 : Représentation schématique de l'organisation de l'isochromosome i(5L) de *C. albicans***

Légende : 1- Chez une souche sauvage, sensible au fluconazole, les deux homologues sont rarement sujets à l'aneuploïdie. 2- Chez des isolats résistants aux azolés, l'isochromosome i(5L) formé à partir du bras gauche du chromosome 5 peut être soit extra-chromosomique (A) ou attaché à l'extrémité télomérique du bras gauche du même ou d'un autre chromosome (B).

Source : d'après Selmecki *et al.*, 2006

Processus dynamique, la perte de l'isochromosome i(5L) avec pour conséquence une diminution de la résistance, est rapidement observée à l'arrêt de la pression de sélection antifongique (Selmecki *et al.*, 2006). Parmi les grands réarrangements chromosomiques pouvant venir se surajouter à l'i(5L), il faut citer la présence de copies multiples des chromosomes 3 (portant les gènes *MRR1* et *CDR1*), 4, 6 (portant le gène *MDR1*) et 7.

En conclusion, il est intéressant de souligner le parallélisme remarquable existant entre la réponse au stress engendré par le fluconazole chez *C. albicans* et celle d'organismes procaryotes comme *E. coli* (Gonzalez *et al.*, 2008 ; Selmecki *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données montre l'importance de la plasticité du génome de *C. albicans* permettant une meilleure adaptation au stress engendré par les antifongiques azolés (Selmecki *et al.*, 2010).

A ce jour, ce type de mécanisme n'a pas été mis en évidence chez *A. fumigatus*.

Chapitre II  
Etudes expérimentales

**Résistance aux antifongiques azolés chez  
*Candida albicans***

---

**Etude n°1**

Etude du polymorphisme du gène *ERG11* dans une collection d'isolats cliniques de *Candida albicans*, sensibles et résistants aux antifongiques azolés : nouvelles mutations et revue de la littérature

*Candida albicans*, levure opportuniste, la plus fréquemment impliquée en pathologie médicale est habituellement sensible aux antifongiques de la famille des azolés. Ces antifongiques constituent d'ailleurs une famille de choix pour la prise en charge des infections à *Candida*, qu'elles soient superficielles ou invasives. Cependant, la mise en place de traitements antifongiques par azolés au long cours comme par exemple chez le patient infecté par le VIH présentant une candidose oropharyngée est une situation propice au développement de la résistance. Parmi les nombreux mécanismes participant à la résistance aux antifongiques azolés chez la levure *C. albicans*, la survenue de mutations sur le gène *ERG11*, codant la stérol 14 $\alpha$ -demethylase, enzyme cible des azolés et aboutissant, par substitution d'un acide aminé, à diminuer l'affinité des azolés, constitue un des mécanismes les plus importants, autant en terme de prévalence qu'en terme d'impact sur la sensibilité à ces antifongiques.

A ce jour, plus de 100 mutations sur le gène *ERG11* ont été rapportées dans la littérature et de nouvelles mutations sont régulièrement décrites illustrant le caractère hautement polymorphe de ce gène. Toutefois, seul un petit nombre de ces substitutions a pu être formellement associé à la résistance au fluconazole, la preuve de leur implication nécessitant la mise en œuvre d'approche par mutagenèse dirigée visant à exprimer l'allèle mutée chez la levure modèle *S. cerevisiae*. Ainsi le réel impact sur la sensibilité aux azolés de la plupart des substitutions décrites sur le gène *ERG11* mérite encore d'être précisé. L'apport de la modélisation moléculaire de l'enzyme CaCyp51 par homologie avec MtCyp51 constitue une solution pertinente et complémentaire permettant d'émettre des hypothèses sur l'impact d'une mutation en fonction de sa position au sein de la structure tridimensionnelle de la protéine. Cependant une autre difficulté qui doit être prise en compte est l'existence d'une large zone d'insertion dans la protéine CaCyp51, non présente chez *M. tuberculosis* et donc non modélisable dans les modèles tridimensionnels actuels. Or plusieurs substitutions ont été décrites au sein de cette boucle, dont certaines fortement suspectes d'être impliquées dans la résistance.

Dans l'étude présentée ci-après, notre objectif était d'explorer le polymorphisme génétique du gène *ERG11* sur une large collection d'isolats cliniques de *C. albicans* présentant différents profils de sensibilité aux antifongiques azolés (souches sensibles et résistantes). Aussi, l'intégralité du gène *ERG11* a été analysée de manière systématique chez 73 isolats cliniques de *C. albicans* afin de contribuer à la caractérisation du polymorphisme survenant



naturellement sur ce gène puis d'identifier les substitutions uniquement présentes chez les souches résistantes aux azolés, les seules potentiellement impliquées dans la résistance. Les nouvelles substitutions mise en évidence dans ce travail ont été discutées en regard des modèles tridimensionnels actuels de CaCyp51.

Cette approche exhaustive du polymorphisme génétique du gène *ERG11*, nous a également conduit à compléter ce travail par une revue de la littérature permettant de faire un état des lieux de l'ensemble des substitutions décrites sur ce gène et leur implication potentielle dans la résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans*.

**Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2010; 66(4): 373-384.**

**Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature**

Florent Morio<sup>a,b</sup>, Cedric Loge<sup>a</sup>, Bernard Besse<sup>c</sup>, Christophe Hennequin<sup>d</sup>  
and Patrice Le Pape<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, EA 1155—IICiMed, Faculté de Pharmacie, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France ; <sup>b</sup>CHU Nantes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie, 5 allée de l'île Gloriette, 44000 Nantes, France ; <sup>c</sup>CHU Nantes, Laboratoire de Virologie, Institut de Biologie, 5 allée de l'île Gloriette, 44000 Nantes, France ; <sup>d</sup>Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, 184 rue du Faubourg St Antoine, 75012 Paris, France.

For several years, azole antifungal drugs have been a treatment option for potentially life-threatening *Candida* infections. However, azole resistance can occur through various mechanisms such as alterations in *ERG11*, encoding lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51). In this study, we investigated the antifungal susceptibility to fluconazole, itraconazole, and voriconazole of 73 clinical isolates of *Candida albicans*. Screening for amino acid substitutions in Erg11 was performed on each of the 73 isolates. Twenty isolates displayed a marked decrease in azole susceptibility. Amino acid substitutions were detected in more than two-thirds of the strains. In all, 23 distinct substitutions were identified. Four have not been described previously, among which N136Y and Y447H are suspected to be involved in azole resistance. We suggest that the high genetic polymorphism of *ERG11* must be considered in the rationale design of new azole compounds targeting lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase. A review of all Erg11p amino acid polymorphisms described to date is given.

## 1. Introduction

*Candida albicans* is responsible for a wide spectrum of clinical infections in humans, ranging from mucosal infections such as vaginitis or oropharyngeal candidiasis to potentially life-threatening systemic infections such as candidemia. Because of their safety profile and high therapeutic index, azole antifungal drugs have been used to treat *Candida* infections for many years, as first-line therapy, antifungal prophylaxis, or empirical or preemptive treatment. However, as a consequence of long-term exposure to azole drugs, resistance can arise. To date, at least 4 distinct mechanisms have been shown to confer azole resistance in *C. albicans*: i) reduced intracellular accumulation of azoles due to the overexpression of genes encoding efflux transporters belonging to the Adenosine-5'-triphosphate (ATP)-binding cassette superfamily (*CaCDR1* and *CaCDR2*) or major facilitator superfamily (*CaMDR1*); ii) genetic alterations in the *ERG11* gene encoding lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CA-CYP51), the primary target of azoles; iii) overexpression of the *ERG11* gene; and iv) alterations in the ergosterol biosynthetic pathway (Sanglard and Odds, 2002). Importantly, these mechanisms are often combined in clinical isolates (Cernicka and Subik, 2006; Chau et al., 2004; Coste et al., 2007; Franz et al., 1998; Goldman et al., 2004). Recently, Selmecki et al. (2006) demonstrated that azole resistance could also result from the formation of an isochromosome harboring *ERG11* and *TAC1* genes (encoding a transcription factor involved in *CDR1* and *CDR2* up-regulation) through segmental aneuploidy.

To our knowledge, more than 140 different amino acid substitutions have been reported to date in Erg11 of clinical isolates of *C. albicans* (reviewed in Table 1). This high genetic polymorphism suggests that lanosterol demethylase is highly permissive to structural changes. Interestingly, most of these substitutions, instead of being randomly dispersed, are clustered into 3 hot spot regions ranging from amino acids 105 to 165, 266 to 287, and 405 to 488 (Marichal et al., 1999). Several lines of evidence indicate that these amino acid changes do not contribute equally to azole resistance. Whereas some substitutions such as K143R, S405F, G464S, R467K, or I471T have been recovered exclusively from azole-resistant strains and their involvement in azole resistance has been confirmed using in vitro experiments (heterologous gene expression, affinity between azoles and CA-CYP51), others such as E266D or V488I probably do not contribute to azole resistance because they are found in both azole-resistant and azole-susceptible strains (Chau et al., 2004; Kakeya et al., 2000; Lamb et al., 2000; Loffler et al., 1997; Sanglard et al., 1998). Finally, T315A, Y118A, Y118F, and

Y118T have been clearly associated with resistance but have not yet been detected in clinical isolates (Chen et al., 2007; Lamb et al., 1997). Such findings clearly show that further study of azole-susceptible and azole-resistant strains is required for a better understanding of azole resistance mechanisms. In addition, there is now increasing evidence that mapping of all Erg11 amino acid changes involved in azole resistance onto the active site and channels of the 3-dimensional modeled structure of CA-CYP51 could help in the design of new azole antifungals with potent activity against resistant strains (Chen et al., 2007; Fukuoka et al., 2003; Rupp et al., 2005; Sheng et al., 2004; Sheng et al., 2009; Xiao et al., 2004).

During the course of an ongoing project in our laboratory, aimed at the design and synthesis of new azole antifungal drugs through a modeling approach, Erg11 amino acid substitutions were screened in a large number of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates of *C. albicans* (Giraud et al., 2008; Lebouvier et al., 2007; Pagniez et al., 2002). All of the amino acid changes occurring in Erg11 are reviewed with reference to the literature.

**Table 1.** Review of all Erg11p amino acid substitutions described to date in clinical isolates of *C. albicans*

Amino acid substitutions in Erg11	Hot spot	References	Notes
Y33C		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
F14L		Sanglard and Bille, 2002	
V19A		Sanglard and Bille, 2002	
L35S		Sanglard and Bille, 2002	
Y39C		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
R44G		Sanglard and Bille, 2002	
P49R/T		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
W54Stop		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
W57K		Sanglard and Bille, 2002	
A61V <sup>sh</sup>		Chau et al., 2004	Associated with resistance. Responsible for a 4-fold increase in FLZ MIC. Residue suspected to interact with POS and ITZ binding
F72L		Favre et al., 1999; Marichal et al., 1999	Described in azole-susceptible isolates
Y79C		Goldman et al., 2004	Described in combination with T199I in an FLZ-resistant isolate
D81G		Long et al., 2002	
F83Y		Jiang et al., 2006	
K90E		Sanglard and Bille, 2002	
K99T		Goldman et al., 2004	Described in combination with amino acid changes involved in azole resistance in an isolate with a moderately high FLZ MIC (8 µg/mL)
G100E		Sanglard and Bille, 2002	
F105L	1	Löffler et al., 1997	Described in azole-resistant strains as a single mutation or in combination with amino acid changes involved in azole resistance
A107T	1	Chau et al., 2004	Described as a single mutation in sequential isolates displaying a reduced susceptibility to FLZ
K108E	1	Wang et al., 2009	Described in combination with Y132H and S405F in an FLZ- and VOR-resistant isolate
S110P	1	Sanglard and Bille, 2002	
A114S	1	Jiang et al., 2006; Xu et al., 2008	Described as a single mutation in FLZ resistant isolates
A114V	1	Sanglard and Bille, 2002	
D116E <sup>b</sup>	1	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Marichal et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998; White et al., 2002; Xu et al., 2008	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
K119L	1	Cernicka and Subik, 2006	Described in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
K119N	1	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
F126L <sup>b</sup>	1	Favre et al., 1999; Perea et al., 2001	Described in azole-resistant isolates. Responsible for an increase in FLZ MIC when combined with K143R, E266D, S405F, or V437I
K128T <sup>b</sup>	1	Chau et al., 2004; Löffler et al., 1997; Marichal et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998; White et al., 2002; Xu et al., 2008	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates

Amino acid substitutions in Erg11	Hot spot	References	Notes
G129A <sup>a,b</sup>	I	Sanglard et al., 1998	Described in an FLZ- and ITZ-resistant isolate. G129A alone is not sufficient to increase FLZ MIC. Cumulative effect with G464S
V130I	I	Goldman et al., 2004	Described in an FLZ-resistant isolate
Y132F <sup>b</sup>	I	Chau et al., 2004; Goldman et al., 2004; Perea et al., 2001	Associated with resistance. Significantly increase FLZ MIC
Y132H <sup>a,b,c</sup>	I	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Kakeya et al., 2000; Marichal et al., 1999; Sanglard et al., 1998; Xu et al., 2008	Associated with resistance. Responsible for a 4-fold increase in FLZ MIC. Cumulative effect with S405F and R467K
N136Y	I	This article	Described in combination with Y132H in a single isolate with reduced azole susceptibility
R138K	I	Sanglard and Bille, 2002	
M140T	I	Sanglard and Bille, 2002	
M140R	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
K143E <sup>b</sup>	I	Favre et al., 1999; Goldman et al., 2004	Described in combination T229 and P503L in isolates with reduced azole susceptibility. K143E significantly increase FLZ MIC when combined with T229A
K143R <sup>b</sup>	I	Chau et al., 2004; Goldman et al., 2004; Lee et al., 2004; Manavathu et al., 1999; Perea et al., 2001; White et al., 2002	Associated with resistance. Responsible for a 64-fold increase in FLZ MIC
F145L	I	Chau et al., 2004; Goldman et al., 2004	Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
K147R	I	Löffler et al., 1997	Described in an azole-susceptible isolate
A149V	I	Marichal et al., 1999	Described in FLZ- and ITZ-resistant isolates
D153E	I	Marichal et al., 1999	Described in an azole-susceptible isolate
R157K	I	Sanglard and Bille, 2002	
V159I	I	This article; Sanglard and Bille, 2002	Described in combination with D116E and K128T in azole-susceptible isolates
K161N	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
R163T	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
E165Y	I	Marichal et al., 1999	Described in an azole-susceptible isolate
E165K	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
S175G		Sanglard and Bille, 2002	
T199I		Goldman et al., 2004	Described in combination with Y79C in an azole-resistant isolate
S203F		Sanglard and Bille, 2002	
F205L		Sanglard and Bille, 2002	
Y221H		This article	Described in a single-azole susceptible isolate
D225Y		Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
D225H		Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
T229A <sup>b</sup>		Favre et al., 1999; Perea et al., 2001	Described in azole-resistant isolates. Responsible for a significant increase in FLZ MIC when combined with F449S or K143E
P230L		Li et al., 2004; Xiao et al., 2004	In combination with other amino acid changes, P230L confers increase resistance to POS and ITZ. P230 is predicted to be in close contact with POS side chain
N237Y		Sanglard and Bille, 2002	
I253V		Goldman et al., 2004	Described as a single mutation in an azole-resistant isolate
Y257H <sup>b</sup>		Chau et al., 2004; Xiao et al., 2004; Xu et al., 2008	Only described in azole-resistant isolates. Combination with G464S significantly increases FLZ MIC
R265G		Goldman et al., 2004	Described in an azole-susceptible isolate
E266D	II	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Goldman et al., 2004; Löffler et al., 1997; Marichal et al., 1999; White et al., 2002; Xu et al., 2008	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
E266Q <sup>b</sup>	II	Sanglard et al., 1998	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible isolates
R267H	II	Manavathu et al., 1999	Described in combination with K128T, K143R, E266D, and D278E in 2 FLZ resistant isolates
K274H	II	Sanglard and Bille, 2002	
L276S	II	This article	Described in a single azole-susceptible isolate
D278N <sup>b</sup>	II	Li et al., 2004	Described in combination with D116E, K128T, Y132H, and G464S in sequential azole-resistant isolates

Amino acid substitutions in Erg11	Hot spot	References	Notes
D278E	II	Manavathu et al., 1999	Described in combination with D116E, K128T, K143R, E266D, and R267H in 2 FLZ-resistant isolates
S279F	II	Marichal et al., 1999	Described in combination with Y132H and G465S in an FLZ- and ITZ-resistant isolate
H283D	II	Goldman et al., 2004	Described as a single mutation in an isolate with reduced azole susceptibility to FLZ
H283R	II	Chau et al., 2004	Described in combination with Y132H and G464S in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
K287R	II	Loffler et al., 1997; Manavathu et al., 1999	Described only in azole-resistant isolates
D294G		Long et al., 2002	
A298T		Sanglard and Bille, 2002	
A298V		Sanglard and Bille, 2002	
G303D		Goldman et al., 2004	Described in an azole-susceptible isolate
I304N		Sanglard and Bille, 2002	
I304T		Sanglard and Bille, 2002	
L305P		Goldman et al., 2004	Described in an azole-susceptible isolate
G307S <sup>b</sup>		Chau et al., 2004; Goldman et al., 2004; Perea et al., 2001	Probably involved in azole resistance. Mutation only described in azole-resistant isolates. Combination with D116E and G450E or Y257H and G464S confers azole resistance
H310R		Sanglard and Bille, 2002	
H334C		Sanglard and Bille, 2002	
K342R		Goldman et al., 2004	Described in an azole-susceptible isolate
K344R		Sanglard and Bille, 2002	
P360S		Sanglard and Bille, 2002	
I366T		Sanglard and Bille, 2002	
H373L		Sanglard and Bille, 2002	
M374V		Long et al., 2002	
P375Q		Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
L376V		Sanglard and Bille, 2002	
F380L		Sanglard and Bille, 2002	
F380S		Goldman et al., 2004	Described as a single mutation in an FLZ-resistant isolate
R381I		Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
P386L		Long et al., 2002	
E391G		Wang et al., 1999	
K398N		Sanglard and Bille, 2002	
H400R		Long et al., 2002	
V404L		Maebashi et al., 2003	Described in an FLZ-resistant isolate
V404I		Lee et al., 2004	Described in an isolate with reduced azole susceptibility to FLZ
S405F <sup>a,b,c</sup>	III	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998	Associated with resistance. Responsible for a 4-fold increase in FLZ MIC. Cumulative effect with Y132H
S405P	III	Sanglard and Bille, 2002	
G421D	III	Sanglard and Bille, 2002	
R426K	III	Sanglard and Bille, 2002	
A432C	III	Sanglard and Bille, 2002	
V437I <sup>b</sup>	III	Favre et al., 1999; Goldman et al., 2004; Lee et al., 2004; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998; White et al., 2002	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
V439L	III	Sanglard and Bille, 2002	
N440K	III	Wang et al., 2005	
S442F	III	Sanglard and Bille, 2002	
G443E	III	Sanglard and Bille, 2002	
D446G	III	Sanglard and Bille, 2002	
D446N <sup>b</sup>	III	Perea et al., 2001	Described in an FLZ-resistant isolate. Combination with V437I has been associated with a significant increase in FLZ MIC
Y447G	III	Sanglard and Bille, 2002	
Y447H	III	This article	Described in combination with G307S in a single isolate with a reduced azole susceptibility to FLZ and ITZ
G448E	III	Loffler et al., 1997	Described in an FLZ- and ITZ-resistant isolate
G448R	III	White et al., 2002	Described in an FLZ- and ITZ-resistant isolate

Amino acid substitutions in Erg11	Hot spot	References	Notes
G448V <sup>b</sup>	III	Chau et al., 2004	Described in combination with Y132H in 2 FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolates. Responsible for a 64-fold increase in FLZ MIC when combined with Y132H
F449L	III	Favre et al., 1999	Described in combination with D116E and Y132H in an FLZ- and ITZ-resistant isolate
F449S <sup>b</sup>	III	Chau et al., 2004; Perea et al., 2001	Associated with resistance. Responsible for a significant increase in FLZ MIC
F449V	III	Lee et al., 2004	Described as a single mutation in an isolate with reduced azole susceptibility to FLZ
F449Y	III	Xu et al., 2008	Described as a single mutation in an FLZ-resistant isolate
G450E <sup>b</sup>	III	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Goldman et al., 2004; Loffler et al., 1997; Perea et al., 2001	Described only in azole-resistant isolates. Combination with D116E or Y132H increase FLZ MIC
G450R	III	Sanglard and Bille, 2002	
G450V	III	Wang et al., 2009	Described in combination with G307S in an FLZ-resistant isolate
V452A	III	Chau et al., 2004; Marichal et al., 1999	Described only in azole-resistant isolates
V456I	III	This article; Sanglard and Bille, 2002	Described in combination with E266D, G464S, and V488I in a single FLZ-resistant isolate
Y460H	III	Sanglard and Bille, 2002	
G464S <sup>a,b,c</sup>	III	Chau et al., 2004; Franz et al., 1998; Li et al., 2004; Loffler et al., 1997; Marichal et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998	Associated with resistance. Responsible for a 64-fold increase in FLZ MIC. Cumulative effect with G129A and R467K
G465S	III	Marichal et al., 1999	
R467I <sup>b</sup>	III	Chau et al., 2004	Described in combination with Y132H and S279F in an isolate with reduced azole susceptibility to FLZ and ITZ
R467K <sup>a,b,c</sup>	III	Lamb et al., 2000; Lee et al., 2004; Sanglard et al., 1998; White, 1997	Described in combination with G464S in an FLZ- and VOR-resistant isolate. Responsible for an 8-fold increase in FLZ MIC when combined with K128T and G464S
H468Y	III	Sanglard and Bille, 2002	Associated with resistance. Responsible for a 4-fold increase in FLZ MIC. Cumulative effect with G464S. Reduce CYP51
I471I <sup>b</sup>	III	Takeya et al., 2000; Xu et al., 2008	Associated with resistance. Cumulative effect with Y132H
I471V	III	Sanglard and Bille, 2002	Mutation only described in azole-resistant isolates
Q474K	III	Long et al., 2002; Xu et al., 2008	Described as a single mutation in an FLZ-resistant isolate
L480S	III	Sanglard and Bille, 2002	
T486P	III	Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
F487L	III	Wang et al., 1999	
V488I	III	Chau et al., 2004; Franz et al., 1998; Goldman et al., 2004; Loffler et al., 1997; Xu et al., 2008	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
V488G	III	Wang et al., 1999	
L491V		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
R492G		Sanglard and Bille, 2002	
T494A		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
T494I		Sanglard and Bille, 2002	
T494P		Wang et al., 1999	
P503L		Goldman et al., 2004	Described in combination with K143E in an FLZ-resistant isolate
D504G		Wang et al., 1999	
V509M		Chau et al., 2004; Lee et al., 2004	Described only in azole-resistant isolates
T513P		Sanglard and Bille, 2002	
W520G		Sanglard and Bille, 2002	
W520R		Sanglard and Bille, 2002	
E521D		Sanglard and Bille, 2002	

For each amino acid change, notes regarding the putative involvement in azole resistance and references are given. The new mutations identified in this study are underlined. Amino acid changes depicted in boldface have been clearly associated with azole resistance using the following *in vitro* experiments: a) increased MIC after heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* by site-directed mutagenesis, b) or functional expression of *C. albicans* PCR-amplified *ERG11*, c) or decreased affinity of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase for azole. The location of the 3 hot spot regions (I, II, and III) is indicated. FLZ = fluconazole; ITZ = itraconazole; VOR = voriconazole; POS = posaconazole.



## 2. Materials and methods

### 2.1. *C. albicans* strains

A collection of 73 clinical isolates of *C. albicans* from the Mycobank of the Laboratory of Parasitology and Medical Mycology, Nantes University Hospital, France, was investigated. Most of the strains (n = 62) were isolated during routine laboratory procedures from different hospitals. The remaining isolates were provided by the French National Reference Center for Mycoses and Antifungals (n = 11; Institut Pasteur, Paris, France). All strains were identified using either the VITEK2 system<sup>®</sup> or chromogenic medium Candida ID2<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). These strains, selected for their antifungal susceptibility profile (azole-susceptible as well as azole-resistant strains), represented a large variety of clinical samples. Eighteen isolates were recovered from blood cultures (Table 2).

### 2.2. Antifungal drug susceptibility testing

Antifungal susceptibility to fluconazole, itraconazole, and voriconazole was determined for each isolate using the broth microdilution reference method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A2 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 were used as controls. Fluconazole was purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), itraconazole from Janssen-Cilag (Neuss, Germany), and voriconazole from Mycobiotics (Université de Nantes, France). MIC that is the lowest drug concentration that resulted in 50 % growth inhibition relative to the growth in the control well was determined visually after 48 h of incubation at 35 °C. MIC values for fluconazole, itraconazole, and voriconazole were compared with the CLSI interpretative guidelines on antifungal susceptibility testing. Briefly, MICs  $\leq 8$   $\mu\text{g/mL}$  were considered as susceptible (S), 16 to 32  $\mu\text{g/mL}$  as susceptible dose dependent (SDD), and  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  as resistant (R) for fluconazole; MICs  $\leq 0.125$   $\mu\text{g/mL}$  as susceptible, 0.25 to 0.5  $\mu\text{g/mL}$  as SDD, and  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  as resistant for itraconazole; and MICs  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$  as susceptible, 2  $\mu\text{g/mL}$  as SDD, and  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  as resistant for voriconazole.

### 2.3 *ERG11* gene amplification and sequencing

Amplification was performed directly from colonies grown on Sabouraud's agar plates without prior DNA extraction. Briefly, a single colony was gently removed with a

micropipette tip and transferred directly to a polymerase chain reaction (PCR) tube. The complete *ERG11* open reading frame (1451 bp) was amplified with a PTC-100 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA) using the primers described previously: ERG11ORF-F—GAAAGGGAATTCAATCG and ERG11ORF-R—TGTTAATCCAACCTAAGTAAC (Lee et al., 2004). Reaction mixtures contained 1 µmol/L of each primer, 10 µL of 5× buffer, 2 mmol/L of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L of each deoxyribonucleoside triphosphate, 0.1 U of GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega, Madison, WI), and sterile water up to a final volume of 50 µL. Amplification parameters were as follows: initial denaturation at 96 °C for 3 min followed by 35 cycles of annealing at 56 °C for 1 min, elongation at 72 °C for 2 min, and denaturation at 95 °C for 1 min. PCR products were purified and sequencing was performed using a BigDye terminator sequencing kit on a ABI PrismR 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using additional primers (Lee et al., 2004). Nucleotide sequences were assembled using Seqscape Navigator software (Applied Biosystems). For each strain, the entire *ERG11* open reading frame sequence was compared with a previously described *ERG11* sequence (accession number X13296) obtained from a fluconazole-susceptible strain (Lai and Kirsch, 1989). Silent mutations were not considered. Each substitution leading to an amino acid change was inspected visually for allelic dosage (homozygosity or heterozygosity). Each of the new amino acid change was checked by a second round of amplification and sequencing.

#### **2.4. Nucleotide sequence accession number**

The *ERG11* sequences of the strains displaying new amino acid substitutions have been submitted to GenBank database under accession numbers EU885932 to EU885938.

### **3. Results**

#### **3.1. Antifungal susceptibility testing**

The results of in vitro susceptibility testing for the 73 clinical isolates of *C. albicans* are shown in Table 2. According to the CLSI breakpoints, most of the isolates were susceptible to fluconazole, itraconazole, and voriconazole (n = 53, 73 %). Twenty isolates (27 %) exhibited a marked decrease in azole susceptibility, including 9 that were resistant to at least 1 of the 3 antifungal drugs. More precisely, 15 isolates had reduced susceptibility to fluconazole (7 SDD and 8 R), 18 to itraconazole (12 SDD and 6 R), and 6 to voriconazole (1 SDD and 5 R).

Cross-reduced azole susceptibility was observed for 6 isolates. Most of these isolates were recovered from the mouth or respiratory tract. All but 1 of the 18 bloodstream isolates were azole susceptible.

**Table 2.** Results of *in vitro* antifungal susceptibility testing and amino acid substitutions in Erg11 for the 73 clinical isolates of *C. albicans*

Strain	Site of isolation	MIC (µg/mL)			Amino acid change(s) in Erg11
		FLZ	ITZ	VOR	
CAAL-1	Mouth	16	0.031	0.125	K143R, V437I
CAAL-2	Respiratory tract	>64	>16	>8	D116E <sup>h</sup> , D153E <sup>h</sup>
CAAL-3	Blood	<0.125	<0.031	0.031	None
CAAL-4	Respiratory tract	0.125	<0.031	0.031	D116E, K128T
CAAL-5	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-6	Respiratory tract	0.125	<0.031	<0.016	D116E, G129A <sup>h</sup> , E266D <sup>h</sup>
CAAL-7	BAL	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-8	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-9	Blood	<0.125	<0.031	0.031	E266D, V488I
CAAL-10	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	E266D, V488I
CAAL-11	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-12	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-13	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	E266D, V488I
CAAL-14	ND	0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-15	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	D116E <sup>h</sup> , K128T <sup>h</sup> , V159I <sup>h</sup>
CAAL-17	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-18	Gastric fluid	<0.125	<0.031	<0.016	V437I
CAAL-19	Preservation fluid	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-20	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-21	Gastric fluid	<0.125	<0.031	<0.016	E266D, V488I <sup>h</sup>
CAAL-22	Gastric fluid	0.5	0.031	0.031	G464S
CAAL-23	Urine	<0.125	<0.031	<0.016	D116E
CAAL-24	Mouth	0.5	<0.031	0.016	G464S
CAAL-28	ND	64	0.125	0.5	S405F
CAAL-29	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	D116E <sup>h</sup> , K128T <sup>h</sup>
CAAL-30	ND	<0.125	<0.031	<0.016	D116E
CAAL-31	Gastric fluid	0.25	<0.031	0.031	G464S
CAAL-32	Respiratory tract	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-33	Urine	0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-34	Gastric fluid	<0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-35	Urine	<0.125	<0.031	<0.016	E266D, V488I <sup>h</sup>
CAAL-37	Respiratory tract	>64	0.25	0.25	E266D, G464S, V456I <sup>h</sup> , V488I
CAAL-38	Gastric fluid	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-39	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-40	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-41	Respiratory tract	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, E266D
CAAL-42	Blood	<0.125	0.031	<0.016	E266D, V488I <sup>h</sup>
CAAL-43	Respiratory tract	<0.125	<0.031	<0.016	E266D, V488I <sup>h</sup>
CAAL-44	Gastric fluid	<0.125	<0.031	<0.016	E266D, V488I <sup>h</sup>
CAAL-45	Gastric fluid	<0.125	<0.031	<0.016	E266D, V488I
CAAL-58	Blood	0.125	0.031	0.031	D116E, E266D
CAAL-60	Urine	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, K128T
CAAL-61	Mouth	>64	>16	0.125	G307S, Y447H
CAAL-62	Intra-abdominal	0.125	<0.031	<0.016	D116E <sup>h</sup> , K128T <sup>h</sup> , Y221H <sup>h</sup>
CAAL-63	Mouth	<0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-64	Intra-abdominal	0.5	0.125	0.063	E266D, V488I <sup>h</sup>
CAAL-65	Mouth	32	0.5	0.5	F145L
CAAL-66	Mouth	8	0.5	0.125	D116E, K128T, G448E
CAAL-67	ND	32	0.25	0.25	G450E
CAAL-68	ND	8	0.5	1	E266D, V437I, G450E
CAAL-69	Urine	<0.125	<0.031	<0.016	None
CAAL-70	Mouth	16	0.5	2	Y132H, N136Y
CAAL-71	Mouth	32	1	4	Y132H, G450E
CAAL-72	Mouth	<0.125	0.031	<0.016	D116E, E266D
CAAL-73	Mouth	<0.125	<0.031	<0.016	D116E, E266D
CAAL-74	Mouth	>64	0.25	0.125	Y132F, E266D, G448V, V488I
CAAL-75	Intra-abdominal	>64	1	4	D116E, Y132H, K143R
CAAL-76	Blood	>64	>16	>8	D116E <sup>h</sup> , K128T <sup>h</sup>
CAAL-79	Blood	<0.125	<0.031	<0.016	D116E <sup>h</sup> , K128T <sup>h</sup>
CAAL-82	ND	4	0.25	0.5	Y132H <sup>h</sup> , E266D, G450E, V488I
CAAL-90	ND	>64	>16	>8	E266D, V488I <sup>h</sup>

Strain	Site of isolation	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			Amino acid change(s) in Erg11
		FLZ	ITZ	VOR	
CAAL-91	ND	16	0.5	0.25	K143R
CAAL-92	ND	32	0.5	1	G464S
CAAL-93	ND	0.125	<0.031	<0.016	E266D, V488I
CAAL-94	ND	0.125	<0.031	0.016	D116E <sup>h</sup> , K128T <sup>h</sup> , E266D <sup>h</sup> , V488I <sup>h</sup>
CAAL-95	ND	0.125	<0.031	0.016	None
CAAL-96	ND	0.25	<0.031	<0.016	D153E
CAAL-97	ND	0.12	0.25	0.015	D116E, K128T
CAAL-98	ND	1	<0.03	0.125	None
CAAL-99	ND	4	0.125	0.25	None
CAAL-100	ND	1	0.06	0.125	E266D, L276S <sup>h</sup> , V488I <sup>h</sup>
CAAL-101	ND	0.5	0.03	0.06	D116E <sup>h</sup> , K128T <sup>h</sup> , V159I <sup>h</sup>
CAAL-102	ND	0.25	0.25	0.015	D116E

ND = not defined; FLZ = fluconazole; ITZ = itraconazole; VOR = voriconazole; BAL = bronchoalveolar lavage; h = heterozygous (i.e., mutation in a single allele). The new substitutions are shown in bold.

### 3.2. Analysis of Erg11p amino acid substitutions

Amplification of the complete *ERG11* gene and screening for amino acid substitutions was performed for each of the 73 clinical isolates (Table 2). As expected from previous studies, a large number of silent polymorphisms were identified (data not shown). Only 13 isolates had no amino acid substitution. All were azole susceptible and 6 were bloodstream isolates. Interestingly, among the remaining 60 isolates carrying amino acid substitutions in Erg11 (40 azole-susceptible and 20 isolates with reduced azole susceptibility), the number of amino acid substitutions varied between the isolates and ranged from 1 (n = 13) to 4 substitutions per strain (n = 4). Most of the isolates had 2 amino acid changes (n = 35). In all, 23 distinct amino acid substitutions were identified including some which have previously been associated with resistance. Interestingly, the following 4 are new: N136Y, Y221H, L276S, and Y447H. Most of the substitutions (88/123, 72 %) occurred in both *ERG11* alleles (i.e., homozygous). The 23 distinct amino acid changes identified in our study could be divided into 2 subsets. The first subset consisted of substitutions that appeared to be restricted to isolates displaying a reduced azole susceptibility phenotype. The following 12 substitutions fall into this category: Y132F, Y132H, K143R, F145L, G307S, S405F, G448E, G448V, G450E, V456I, and the new amino acid changes N136Y and Y447H. Of note, these 2 new substitutions were recovered from 2 isolates displaying reduced susceptibility to more than 1 antifungal (CAAL-61 and CAAL-70). Strikingly, CAAL-61, which contained Y447H, was resistant to fluconazole (MIC >64  $\mu\text{g/mL}$ ) and itraconazole (MIC >16  $\mu\text{g/mL}$ ) but remained highly susceptible to voriconazole (MIC = 0.125  $\mu\text{g/mL}$ ). The second subset concerned substitutions recovered from either azole-susceptible or reduced susceptibility isolates and included 11 amino acid changes: D116E, K128T, G129A, D153E, V159I, E266D, V437I, G464S, V488I, and the new

substitutions Y221H and L276S. Y221H and L276S occurred in a single allele in 2 susceptible strains (CAAL-62 and CAAL-100, respectively). D116E, K128T, E266D, and V488I appeared in a large number of isolates (n = 29, 19, 18, and 17 isolates, respectively). D116E was frequently recovered in combination with K128T (n = 19 isolates), whereas E266D was recovered with V488I (n = 16). G129A occurred in a single allele in combination with D116E and E266D in a single azole-susceptible strain. Obviously, other mechanisms are required to explain azole resistance in some of our strains such as CAAL-90 harboring only this kind of amino acid substitutions.

Alignment of 15 different CYP51 amino acid sequences from various organisms, focusing on residues surrounding the 4 new amino acid changes (residues 136, 221, 276, and 447) as shown in Table 3, revealed that the 2 new amino acid changes with a potential involvement in azole resistance (N136Y and Y447H) affect highly conserved residues.

**Table 3.** Alignment of 15 CYP51 amino acid sequences from various organisms

Organism	133	139	218	224	273	279	444	450
<i>C. albicans</i>	D C P N S R L	A Q L Y S D L	N R D L I D S	E V D Y G F G				
<i>C. dubliniensis</i>	D C P N S R L	A Q L Y S D L	S R D L I D S	E V D Y G F G				
<i>C. tropicalis</i>	D C P N S R L	A Q L Y A D L	K R D L I D S	T V D Y G F G				
<i>C. glabrata</i>	D C P N H R L	A Y L Y S D L	N R D L I D E	E V D Y G F G				
<i>C. krusei</i>	D C P N W K L	A E M Y S D L	N E D L V D A	T V D Y G F G				
<i>A. fumigatus</i>	D C P N S K L	A D L Y H D L	- S D M I W N	V V D Y G Y G				
<i>P. italicum</i>	D C P N S K L	A D L F H D L	G T D M I S N	T V D Y G Y G				
<i>S. cerevisiae</i>	D C P N S R L	A Y L Y S D L	D R D L I D S	E V D Y G F G				
<i>S. pombe</i>	D I P N H V F	A D L Y H D L	G T D M I W T	Q I D Y G Y G				
<i>U. maydis</i>	D V P N A V F	A Q L Y H D L	E N D M I A A	K Q D F G F G				
<i>A. thaliana</i>	D V D Y S V R	S A L F H D L	E N D M L Q C	- - S P G R E				
<i>D. discoideum</i>	D S E T E I M	A D L Y H E L	V D D V L Y T	- - D V - - -				
<i>M. tuberculosis</i>	D A S P E R R	A K L Y H E L	D R D M L D V	- - E Q P R Q				
<i>R. rattus</i>	D V P N A V F	A Q L Y A D L	A E D I L Q T	- - L Q - - D				
<i>H. sapiens</i>	D V P N P V F	A Q L Y A D L	I D D I L Q T	- - L Q - - D				

Only residues surrounding the 4 new amino acid substitutions N136Y, Y221H, L276S, and Y447H are shown. The alignment was generated using the ClustalW program. Amino acid numbering is taken from the *C. albicans* gene sequence. Arrow heads indicate new amino acid changes. "-" is indicative of a gap in the protein sequence. Amino acids conserved across fungi are underlined in gray and amino acids conserved across all 15 CYP51 sequences are underlined in black. The following accession numbers have been used: *C. albicans*, X13296; *Candida dubliniensis*, AY034876; *Candida tropicalis*, M23673; *Candida glabrata*, S75389; *Candida krusei*, S75391; *S. cerevisiae*, M18109; *Aspergillus fumigatus*, AF338659; *Schizosaccharomyces pombe*, Q09736; *Ustilago maydis*, Z48164; *Penicillium italicum*, Z49750; *Homo sapiens*, D55653; *Rattus norvegicus*, D55681, *M. tuberculosis*, P0A512; *Arabidopsis thaliana*, AB014459; *Dictyostelium discoideum*, XP\_001134568.

#### 4. Discussion

Mutations in the *ERG11* gene sequence leading to amino acid substitutions represent one of the main mechanisms contributing to azole resistance in clinical isolates of *C. albicans*. To date, more than 140 distinct amino acid substitutions have been reported in the literature, but only a few of these have been clearly associated with azole resistance. In this study, our aim was to screen for Erg11 amino acid substitutions in a large collection of *C. albicans* clinical isolates displaying various levels of azole susceptibility. To provide as complete a picture as possible of the genetic alterations occurring in this gene, we chose to study the complete *ERG11* coding sequence instead of focusing on the 3 hot spot regions described previously (Marichal et al., 1999). For each isolate, the complete *ERG11* gene was amplified using a colony-PCR approach, a quick and easy method based on amplification of a target gene directly from a single colony without any prior DNA extraction step (Luo and Mitchell, 2002).

Our data clearly show that point mutations leading to amino acid changes are a frequent event in *ERG11* observed not only in azole-resistant strains but also in azole-susceptible ones. Indeed, only 13 (18 %) of the 73 isolates displayed the wild-type sequence (i.e., no amino acid change), including 6 bloodstream isolates. In all, of the 23 distinct amino acid substitutions identified, 19 have been reported previously. Thus, 4 substitutions described in this study are new (N136Y, Y221H, L276S, and Y447H). Except for Y221H, all substitutions were in the 3 hot spot regions described previously (Marichal et al., 1999). In agreement with a previous study, we report a high frequency of D116E, K128T, and E266D (White et al., 2002). Moreover, a large number of clinical strains exhibited the same pattern of amino acid substitutions (D116E and K128T; 19/73, 26 %).

Although all isolates displaying a phenotype of reduced azole susceptibility (20/20, 100 %) had genetic alterations in Erg11, amino acid polymorphisms were also identified in susceptible isolates (40/53, 75 %). This means that the presence or absence of amino acid polymorphism is usually not sufficient to predict azole susceptibility. Finally, allelic dosage (homozygosity *versus* heterozygosity) must also be taken into consideration in this diploid species (Jones et al., 2004). In this way, the finding that 11 of the 23 amino acid changes (D116E, K128T, G129A, D153E, V159I, E266D, V437I, G464S, V488I, and the 2 new Y221H and L276S) recorded here were found in both azole-susceptible and azole-resistant strains strongly suggests that these substitutions are probably not associated with resistance.

However, this is largely supported by previous studies for D116E, K128T, D153E, E266D, V437I, and V488I; the case of G129A and G464S needs to be discussed in light of our results (Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Franz et al., 1998; Li et al., 2004; Marichal et al., 1999; Park and Perlin, 2005; Perea et al., 2001; White et al., 2002; Xu et al., 2008). According to a previous report, G129A alone is not sufficient to confer azole resistance but has been shown to be responsible for a 16-fold increase in fluconazole MIC when combined with G464S (Sanglard et al., 1998). Here, the recovery of G129A in an azole-susceptible strain supports the hypothesis that G129A must be associated with specific substitutions to contribute to azole resistance in *C. albicans*. Regarding G464S, previously associated with resistance by various methods (Chau et al., 2004; Sanglard et al., 1998), no robust hypothesis can be proposed to explain why this amino acid change occurred here in 3 highly azole-susceptible isolates. Similar discrepancies have been also reported in the literature for Y132H (Bellamine et al., 2004; Sanglard et al., 1998). Because the new substitutions Y221H and L276S were recovered from azole-susceptible isolates, they are unlikely to be associated with resistance. V159I, a substitution that was rarely described in the literature, occurred here in azole-susceptible isolates (CAAL-15 and CAAL-101).

As suggested previously, amino acid substitutions that appear to be restricted to reduced susceptibility isolates could be useful as predictive markers of azole resistance as well as for the rationale design of new azole antifungal drugs using homology models of CA-CYP51 constructed based on the X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51 (MT-CYP51) (Fukuoka et al., 2003; Macchiarulo et al., 2002; Park and Perlin, 2005; Podust et al., 2001; Xiao et al., 2004). Twelve substitutions recovered in our study fit this criterion because they are restricted to reduced susceptibility isolates: Y132F, Y132H, K143R, F145L, G307S, S405F, G448E, G448V, G450E, V456I, and the 2 new substitutions N136Y and Y447H. Except for F145L, previously reported in susceptible as well as resistant strains, and V456I reported by Sanglard and Bille (2002) without information relative to the susceptibility of the corresponding strains, these findings are in agreement with previous reports. The contribution of some of the amino acid changes (Y132F, K143R, G307F, and S405F) to azole resistance has been confirmed using in vitro experiments (Chau et al., 2004; Kakeya et al., 2000; Lee et al., 2004; Loffler et al., 1997; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998; White et al., 2002). Hence, our data support the involvement of Y132F, Y132H, K143R, G307S, S405F, G448E,

G448V, and G450E in azole resistance and their potential use as predictive markers of azole resistance.

The two new amino acid substitutions N136Y and Y447H were only recovered from isolates with a reduced azole susceptibility phenotype and are therefore likely to be involved in azole resistance. N136Y occurred in both alleles in a single isolate with reduced susceptibility to fluconazole, itraconazole, and voriconazole. Complementary investigations revealed that this isolate also had a moderately high MIC to posaconazole (E-test, MIC = 0.5 µg/mL). According to the secondary structure of CA-CYP51, residue 136 is close to the C helix, a region that is in close proximity to the heme and ligand binding site (Xiao et al., 2004). In the MT-CYP51/fluconazole crystal structure, the open BC loop and C helix exhibited high thermal motion, suggesting significant changes in protein conformation. Being localized in the region of the mouth of channel 1, this residue could interfere with azole entry or its binding to the active site if the BC loop adopts a closed conformation (Podust et al., 2001). Moreover, the finding that this residue is conserved between fungal CYP51s suggests that it may play an important role in CYP51s tridimensional conformation. Because N136Y occurred simultaneously with Y132H, more studies are now warranted to determine whether the resistant phenotype is the result of Y132H alone or is due to an additive effect with Y132H. Y447H was recovered from a single isolate displaying resistance to both fluconazole and itraconazole but that remained susceptible to voriconazole simultaneously with G307S, a substitution that could be associated with azole resistance according to Perea et al. (2001). Y447H is close to the C terminus part of CA-CYP51 near the L helix and cysteine residue 470 and would therefore be too far away to interact directly with azole binding (Xiao et al., 2004). However, this residue that appears to be conserved among *Candida* species is part of a large insertion located from residues 439 to 457 that was not modeled in detail in this report (Xiao et al., 2004).

Obviously, the reduced susceptibility phenotype observed in some of our strains could not be explained by only studying the genetic alterations in *ERG11*. This again shows that several azole resistance mechanisms are frequently combined in clinical strains of *C. albicans* (Cernicka and Subik, 2006; Chau et al., 2004; Coste et al., 2007; Franz et al., 1998; Goldman et al., 2004).

To conclude, our study highlights the high diversity and frequency of amino acid substitutions in *Erg11*, the primary target of azole antifungal drugs. This genetic polymorphism should be



taken into consideration in the rationale design of new antifungal compounds targeting lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase with potent activity against resistant strains. Further experiments will provide answers regarding the contribution of the new amino acid substitutions to azole resistance.

**Acknowledgments**

*The authors are grateful to Jean-Yves Leberre, Philippe Rispaïl, Yvon Sterkers, Marie-Denise Linas, Claire Lacroix, and the French National Reference Center for Mycoses and Antifungals (Institut Pasteur, Paris, France) for providing some of the strains used in this study. The authors thank Olivier Barre for technical assistance.*

### References

- Bellamine A, Lepesheva G, Waterman MR (2004) Fluconazole binding and sterol demethylation in three CYP51 isoforms indicate differences in active site topology. *J Lipid Res* 45:2000–2007.
- Cernicka J, Subik J (2006) Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents* 27:403–408.
- Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM (2004) Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2124–2131.
- Chen SH, Sheng CQ, Xu XH, Jiang YY, Zhang WN, He C (2007) Identification of Y118 amino acid residue in *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase associated with the enzyme activity and selective antifungal activity of azole analogues. *Biol Pharm Bull* 30:1246–1253.
- Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D (2007) Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 6:1889–1904.
- Favre B, Didmon M, Ryder NS (1999) Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* 145(Pt 10):2715–2725.
- Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J (1998) Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42:3065–3072.
- Fukuoka T, Johnston DA, Winslow CA, de Groot MJ, Burt C, Hitchcock CA, Filler SG (2003) Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1213–1219.
- Giraud F, Loge C, Pagniez F, Crepin D, Le Pape P, Le Borgne M (2008) Design, synthesis, and evaluation of 1-(N-benzylamino)-2-phenyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ols as antifungal agents. *Bioorg Med Chem Lett* 18:1820–1824.

- Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, Godoy Martinez PC, Goldman MH, Colombo AL (2004) Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50:25–32.
- Jiang W, Tan S, Jiang G (2006) Synergistic effect of terbinafine combined with fluconazole or itraconazole on stable fluconazole-resistant *Candida albicans* induced by fluconazole in vitro. *Chin J Microbiol Immunol* 26: 360–364.
- Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7329–7334.
- Takeya H, Miyazaki Y, Miyazaki H, Nyswaner K, Grimberg B, Bennett JE (2000) Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2985–2990.
- Lai MH, Kirsch DR (1989) Nucleotide sequence of cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase) from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 17:804.
- Lamb DC, Kelly DE, Schunck WH, Shyadehi AZ, Akhtar M, Lowe DJ, Baldwin BC, Kelly SL (1997) The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem* 272:5682–5688.
- Lamb DC, Kelly DE, White TC, Kelly SL (2000) The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob Agents Chemother* 44:63–67.
- Lebouvier N, Pagniez F, Duflos M, Le Pape P, Na YM, Le Baut G, Le Borgne M (2007) Synthesis and antifungal activities of new fluconazole analogues with azaheterocycle moiety. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 3686–3689.
- Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA (2004) Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother* 53:217–224.
- Li X, Brown N, Chau AS, Lopez-Ribot JL, Ruesga MT, Quindos G, Mendrick CA, Hare RS, Loebenberg D, DiDomenico B, McNicholas PM (2004) Changes in susceptibility to

- posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 53:74–80.
- Loffler J, Kelly SL, Hebart H, Schumacher U, Lass-Florl C, Einsele H (1997) Molecular analysis of cyp51 from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett* 151:263–268.
- Long F, Zhang Y, Lan H (2002) The point mutation of cytochrome P-450 lanosterol 14-demethylase ERG11 gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Chin J Infect Dis* 20:211–214. Luo G, Mitchell TG (2002) Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40: 2860–2865.
- Macchiarulo A, Costantino G, Fringuelli D, Vecchiarelli A, Schiaffella F, Fringuelli R (2002) 1,4-Benzothiazine and 1,4-benzoxazine imidazolé derivatives with antifungal activity: a docking study. *Bioorg Med Chem* 10:3415–3423.
- Maebashi K, Kudoh M, Nishiyama Y, Makimura K, Kamai Y, Uchida K, Yamaguchi H (2003) Proliferation of intracellular structure corresponding to reduced affinity of fluconazole for cytochrome P-450 in two low-susceptibility strains of *Candida albicans* isolated from a Japanese AIDS patient. *Microbiol Immunol* 47:117–124.
- Manavathu EK, Kallakuri S, Arganoza MT, Vazquez JA (1999) Amino acid variations of cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from fluconazole resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 16:198–203.
- Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FC, Odds FC, Bossche HV (1999) Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* 145(Pt 10):2701–2713.
- National Committee for Clinical Laboratory & Standards (NCCLS) (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast—second edition: approved standard M27-A2. Wayne, PA: NCCLS.
- Pagniez F, Le Borgne M, Marchand P, Na YM, Le Baut G, Robert-Piessard S, Le Pape P (2002) In vitro activity of a new antifungal azoly substituted indole against *Aspergillus fumigatus*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 17:425–429.

- Park S, Perlin DS (2005) Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb Drug Resist* 11:232–238.
- Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF (2001) Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2676–2684.
- Podust LM, Poulos TL, Waterman MR (2001) Crystal structure of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3068–3073.
- Rupp B, Raub S, Marian C, Holtje HD (2005) Molecular design of two sterol 14 $\alpha$ -demethylase homology models and their interactions with the azole antifungals ketoconazole and bifonazole. *J Comput Aided Mol Des* 19:149–163.
- Sanglard D, Bille J (2002) Action of and resistance to antifungal agents. In: *Candida and candidiasis*. Calderone RA, Ed. Washington DC: American Society For Microbiology, pp. 370.
- Sanglard D, Odds FC (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2:73–85.
- Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J (1998) Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 241–253.
- Selmecki A, Forche A, Berman J (2006) Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* 313:367–370.
- Sheng C, Zhang W, Zhang M, Song Y, Ji H, Zhu J, Yao J, Yu J, Yang S, Zhou Y, Zhu J, Lu J (2004) Homology modeling of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* and insights into the enzyme-substrate interactions. *J Biomol Struct Dyn* 22:91–99.

- Sheng C, Chen S, Ji H, Dong G, Che X, Wang W, Miao Z, Yao J, Lu J, Guo W, Zhang W (2009) Evolutionary trace analysis of CYP51 family: implication for site-directed mutagenesis and novel antifungal drug design. *J Mol Model* 16:279–284.
- Wang H, Kong F, Sorrell T, Wang B, McNicholas P, Pantarat N, Ellis D, Xiao M, Widmer F, Chen SC (2009) Rapid detection of ERG11 gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing. *BMC Microbiol* 14:167 (Epub ahead of print).
- Wang WL, Wang DL, Li RY (1999) A study of the resistant mechanisms of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Chin J Derm Venereol* 13: 360–364.
- Wang YB, Wang H, Guo HY, Zhao YZ, Luo SQ (2005) Analysis of ERG11 gene mutation in *Candida albicans*. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 25: 1390–1393.
- White TC (1997) The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14-demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1488–1494.
- White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA (2002) Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1704–1713.
- Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM (2004) Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Chemother* 48:568–574.
- Xu Y, Chen L, Li C (2008) Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J Antimicrob Chemother* 61:798–804.

**Etude n°2**

Mutation sur le gène *ERG3*, codant la C5 désaturase,  
et résistance de *Candida albicans* aux antifongiques azolés :  
description de deux nouveaux mutants présentant une virulence  
atténuée

Comme expliqué précédemment, bien que plus de 40 espèces de *Candida* aient été décrites comme pathogènes pour l'homme, *C. albicans* reste l'espèce la plus fréquemment impliquée, et est habituellement sensible aux antifongiques azolés. Toutefois, leur utilisation prolongée, peut conduire à l'émergence de souches résistantes. L'acquisition de résistance repose sur plusieurs mécanismes un des plus importants étant la survenue de mutations ponctuelles sur le gène *ERG11*, codant la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, mécanisme exploré sur une large collection d'isolats cliniques de *C. albicans*, dans la première partie de notre travail de recherche. Cependant, ce mécanisme, bien que fréquemment observé, ne permet parfois pas à lui seul d'expliquer le phénotype de résistance de certains isolats cliniques comme nous avons pu l'observé dans l'étude précédente. En effet, deux des souches analysées dans ce travail présentaient un phénotype de résistance au fluconazole, à l'itraconazole et au posaconazole en l'absence de mutation associée à la résistance sur le gène *ERG11*. Cette observation nous a amené à approfondir l'exploration des mécanismes participant à la résistance aux azolés de ces deux isolats cliniques.

Dans ce travail, nous montrons que ces deux isolats sont en fait deux nouveaux mutants *erg3*. Outre, la moindre sensibilité à l'amphotéricine B résultant de la quasi-absence d'ergostérol chez ces deux isolats, du fait de la perte de la fonctionnalité de la C5 désaturase (Erg3), nos résultats expérimentaux soulignent l'impact d'une nouvelle substitution et d'une délétion de 13 pb, sur la virulence de *C. albicans* dans un modèle murin de candidose invasive.



**Journal of Antimicrobial Chemotherapy (Sous presse).**

**Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence.**

Florent Morio<sup>1,2</sup>, Fabrice Pagniez<sup>1</sup>, Claire Lacroix<sup>3</sup>, Michel Miegville<sup>1,2</sup>  
and Patrice Le Pape<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA1155–IICiMed, Faculté de Pharmacie, Nantes, France ; <sup>2</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France

**Objectives:** To determine the mechanisms responsible for fluconazole resistance in two *Candida albicans* isolates (CAAL2 and CAAL76) recovered from two hospitalized patients after fluconazole prophylaxis.

**Methods:** MICs to fluconazole and voriconazole were determined by the broth microdilution method (CLSI M27-A3), and by Etest<sup>®</sup> for amphotericin B. RNA expression levels of *CDRI*, *MDR1* and *ERG11* were determined by RT-PCR. Mutations in *ERG11* and *ERG3* were investigated by amplification and sequencing. Sterol membrane profiles were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *In vivo* virulence was determined in a murine model of invasive candidiasis.

**Results:** Both isolates displayed azole cross-resistance and reduced susceptibility to amphotericin B, and are novel  $\Delta^{5,6}$ -desaturase (Erg3p) mutants. CAAL2 harbor a new amino acid substitution (L193R), whereas a 13 bp deletion leading to a truncated Erg3p ( $\Delta$ 366-378) was found in CAAL76. Both genetic alterations impaired Erg3p function as shown by GC-MS in these isolates (ergosterol content below 10%, and accumulation of ergosta-7,22-dienol above 40%). *In vivo*, in a murine model of invasive candidiasis, both CAAL2 and CAAL76 exhibited a significant trend toward reduced virulence, which seems to be linked to a reduced capacity for hyphal growth.

Conclusions: These findings demonstrate the critical role of residue 193 in Erg3p function and azole resistance. We suggest that this attenuated *in vivo* virulence phenotype could be linked to lower potential for hyphal growth. Taken together, our findings highlight the fact that *erg3* mutants must be considered in future studies aiming at investigating azole antifungal drug resistance.

## Introduction

*Candida* species are major human pathogens responsible for a wide spectrum of diseases ranging from superficial to life-threatening invasive infections. Whereas more than 40 species have been described as human pathogens, *Candida albicans* still remains the main species responsible for candidaemia worldwide.<sup>1,2</sup> Azole antifungal agents represent, with the echinocandins, the most widely used treatments of candidiasis. However, acquisition of resistance can occur, leading to the risk of breakthrough infections.<sup>3,4</sup> In recent years, intense research has been conducted, leading to a better understanding of the molecular mechanisms of azole resistance, among which the most prevalent in *C. albicans* are: i) reducing intracellular concentration of the azole drugs by overexpression of efflux pumps belonging to either the ATP-binding cassette superfamily (*CDR1*, *CDR2*) or the major facilitator superfamily (*MDR1*); ii) up-regulation of the *ERG11* gene encoding 14- $\alpha$ -lanosterol demethylase, the primary target of azole drugs; iii) point mutations in *ERG11* causing amino acid changes that lead to decreased affinity for azole drugs.<sup>5</sup> Importantly, these mechanisms are frequently combined in a single isolate.<sup>6,7,8</sup> An important step toward a better understanding of genetic regulation of azole resistance in *C. albicans* has been recently achieved with the discovery of hyperactive alleles (resulting from gain-of-function mutations) in the zinc-finger transcriptional factor genes *TAC1*, *MRR1* and *UPC2*, which are responsible for the constitutive overexpression of *CDR1/CDR2*, *MDR1* and *ERG11*, respectively.<sup>9-11</sup> However, whereas active efflux and amino acid substitutions in Erg11p are the most common mechanisms of azole resistance in *C. albicans*, other poorly studied mechanisms involving other enzymes of the ergosterol biosynthesis pathway, such as Erg3p and Erg5p, can occur.<sup>12-16</sup>

In a previous study we investigated *ERG11* polymorphism in a collection of *C. albicans* clinical isolates, allowing us to describe novel mutations that were recently implicated in azole resistance, by site-directed mutagenesis.<sup>17,18</sup> Interestingly, two azole-resistant clinical isolates from this collection (CAAL2 and CAAL76) exhibited Erg11p substitutions that were previously described in azole-susceptible isolates (D116E, K128T and D153E), suggesting that these mutations could not explain their azole resistance. Here, we show that both *C. albicans* isolates are in fact novel *erg3* mutants that display defective sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase activity and a reduced susceptibility to amphotericin B. Moreover, our data underline that in

addition to their implication in azole resistance, the new *ERG3* mutations impact on *in vivo* virulence. Finally, our data underline that genetic alterations in *ERG3* could arise following fluconazole therapy.

## **Materials and Methods**

### **Strains**

CAAL2 and CAAL76 clinical isolates were recovered from two hospitalized patients.<sup>18</sup> Both patients had received fluconazole as antifungal prophylaxis before isolation of the strains. CAAL2 was isolated from the respiratory tract of a 63-year-old heart transplant recipient, while CAAL76 was isolated from a blood culture of a 27-year-old hematopoietic stem cell transplant recipient. Both strains were stored at -80°C for long-term storage.

A set of 10 fluconazole-susceptible clinical isolates from a previous study was used to determine the background expression levels of *PMA1*, *ACT1*, *MDR1*, *CDR1* and *ERG11*.<sup>18</sup> Three of them (CAAL94, CAAL96 and CAAL97) were also used as controls for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), phenotypic tests and *in vivo* experiments.

### **Antifungal susceptibility testing**

MICs of fluconazole and voriconazole were determined for each isolate using the broth microdilution reference method as recommended by the CLSI document M27-A3.<sup>19</sup> Fluconazole was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and voriconazole was obtained from Pfizer. MICs were determined visually after 48 h of incubation at 35°C. MIC was considered as the lowest drug concentration that resulted in 50% growth inhibition relative to the growth in the control well. MIC values were compared with the recently proposed revised species-specific clinical breakpoints for fluconazole and voriconazole.<sup>20,21</sup> Briefly, for fluconazole, MICs  $\leq 2$  mg/L were considered susceptible (S), 4 mg/L was susceptible dose dependent (SDD) and  $\geq 8$  mg/L was resistant (R); for voriconazole, MICs  $\leq 0.125$  mg/L were considered S, 0.25-0.5 mg/L was SDD, and  $\geq 1$  mg/L was R. *In vitro* susceptibility to amphotericin B was determined by Etest<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), this method having shown better performance over microdilution methods for the detection of amphotericin B resistance.<sup>22</sup> The MIC of amphotericin B was defined as the lowest concentration at which fungal growth was completely inhibited, as recommended by the manufacturer.

### **DNA extraction and *ERG3* sequencing analysis**

DNA extraction was conducted using a NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany), after cell lysis using lyticase (Sigma-Aldrich). DNA extracts were stored at -20°C until analysis. All primers used in this study are listed in Table S1 (available as Supplementary data at *JAC* Online). PCR amplification of the entire coding sequence of *ERG3* (1161 bp) was obtained using the primers CaERG3F and CaERG3R.<sup>15</sup> All PCR products were purified, and sequencing was performed using a BigDye terminator sequencing kit on an ABI PrismR<sup>®</sup> 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were analysed using SeqScape software (Applied Biosystems) and compared with a wild-type *ERG3* reference sequence (Genbank accession numbers AF069752).

### **Membrane sterol analysis**

Analysis of membrane sterol composition was conducted by GC-MS as previously described.<sup>23</sup> Briefly, cells were incubated in 50 mL Sabouraud dextrose broth (Sigma-Aldrich) at 35°C with stirring for 18 h. Cells were collected by centrifugation at 1500 g. The pellet was suspended in 3 mL of saponification medium (25 g of KOH, 36 mL of distilled H<sub>2</sub>O and made up to 100 mL with 100% EtOH). Then, the suspension was vortexed for 1 min and incubated at 80°C for 60 min. Sterols were then extracted by addition of a mixture of 1 mL of distilled H<sub>2</sub>O and 4 mL of *n*-hexane (Merck, Darmstadt, Germany). Hexane extract was then evaporated. Samples were derivatized with 100 µL of silylating mixture (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France) at room temperature (RT) for 30 min, evaporated, and diluted in 500 µL of *n*-hexane. A 2 µL aliquot was injected into a gas chromatograph (model 6890N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a quadrupole mass spectrometer (model 5973i, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Sterols of interest were identified by their mass spectra. To compare the sterol profiles of the isolates, the AUC of each sterol peak was used to calculate the ratio sterol AUC/sum of sterols AUCs. Three fluconazole-susceptible *C. albicans* isolates (CAAL94, CAAL96 and CAAL97) were included in the experiment as controls.

### **RNA extraction and RT-PCR transcript levels**

RNA was extracted from mid-log exponential phase growth cultures in YPD medium (2% bactopectone, 1% yeast extract, 1% glucose) at 30°C and 200 rpm using a NucleoSpin RNA

II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) after cell lysis using lyticase (Sigma-Aldrich). RNA extracts were aliquotted and stored at -80°C before analysis. Absence of DNA contamination was checked, and RNA integrity was verified using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with an RNA Nano 6000 kit (Agilent). RNA expression levels of *ERG11*, *MDR1* and *CDR1* as well as of two housekeeping genes (*PMA1* and *ACT1*) were determined by quantitative RT-PCR on a Rotor-Gene 3000 instrument (Corbett Life Science, Sydney, Australia) using a One Step PrimeScript RT-PCR kit (Takara Bio Inc, Saint-Germain-en-Laye, France) with primers and probes described in Table S1. Relative expression was measured quantitatively after normalization to an 18S rRNA control (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by simultaneous amplification with each target gene as described previously.<sup>7</sup> Each RNA samples was tested in triplicate. RNA transcript levels of CAAL2 and CAAL76 were compared with the normal expression range of a collection of 10 fluconazole-susceptible *C. albicans* isolates (Table S2, available as Supplementary data at JAC Online). Overexpression was considered significant when  $\Delta Ct$  value ( $Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{18S \text{ rRNA}}$ ) exceeded 3 SD.

### **Murine model of invasive candidiasis**

Four-week-old female Swiss mice (Centre d'élevages Janvier, Le Genest St Isle, France) were immunocompromised by subcutaneous administration of 30 mg/kg prednisolone (Sigma-Aldrich) one day before infection. Disseminated candidiasis was induced by inoculation with  $5 \times 10^6$  *C. albicans* cells in 0.1 mL yeast suspension into the lateral tail vein. Inoculum size was determined in preliminary studies for the fluconazole-susceptible strains with the aim to obtain lethality by between 4 and 7 days. The same conditions were used for inoculation with *erg3* mutants. Survival was monitored every day for 10 days after infection. Three fluconazole-susceptible isolates were used as control (CAAL94, CAAL96 and CAAL97). The survival rate of animals infected with each *erg3* mutant isolate was compared with those animals infected with each fluconazole-susceptible isolate using the log rank test. In addition, groups of animals infected with wild-type isolates and those with *erg3* mutant isolates were compared with the same statistics test. A p-value <0.05 was considered significant.

### Germ tube formation and hyphal growth *in vitro*

The capacity of the isolates to produce germ tubes was investigated after incubation of the isolates at 35°C in human serum for 2 h without shaking. Production of pseudohyphae was analysed by subculturing the isolates on Potato Carrot Bile Agar medium (PCB) at 30°C for 24–48 h. The kinetics of hyphal growth was investigated as follows. For each isolate, 100 µL of a suspension (with a turbidity equivalent of a 3 McFarland standard) in distilled water was incubated for 16 h at 35°C with 1 mL of RPMI 1640 liquid medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich). Three fluconazole-susceptible isolates (CAAL94, CAAL96 and CAAL97) were included in each experiment as controls.

### Nucleotide sequence accession numbers

*ERG3* nucleotide sequences of the two isolates have been deposited in the GenBank database under accession numbers JN565145 and JN565146.

## Results

As shown in Table 1, both *C. albicans* isolates displayed a high level of resistance to fluconazole (>64 mg/L) and voriconazole (>8 mg/L), with MICs largely above the recently revised clinical susceptibility breakpoints. Both strains harbor mutations leading to amino acid substitutions in Erg11p (D116E, K128T and D153E) that have been previously described in azole-susceptible isolates, suggesting that these mutations cannot account for azole resistance in our isolates.

**Table 1: Results of antifungal susceptibility testing and mutations leading to amino acid substitutions in Erg11p and Erg3p for the two *C. albicans* clinical isolates**

	Site of isolation	MIC (mg/L)			Mutations in Erg11p	Mutations in Erg3p
		FLC	VRC	AMB		
CAAL2	respiratory tract	>64	>8	0.75	D116E <sup>a</sup> , D153E <sup>a</sup>	L193R, V351A
CAAL76	blood	>64	>8	1	D116E <sup>a</sup> , K128T <sup>a</sup>	ΔL122-1125 <sup>b</sup>

FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; AMB, amphotericin B;

<sup>a</sup>Heterozygous; other mutations are homozygous.

<sup>b</sup>Deletion from nucleotides 366 to 378 in *ERG3* resulted in a frameshift and truncated Erg3p due to a premature stop codon.

Strikingly, CAAL2 and CAAL76 displayed an azole-resistant phenotype that seemed to depend neither on *CDR1*- nor on *MDR1*-mediated efflux, as revealed by measurements of mRNA transcripts by RT-PCR (Table 2). However, both isolates displayed a significant *ERG11* overexpression (2.9 and 4.2 fold, respectively relative to the set of fluconazole-susceptible isolates).

**Table 2: RNA transcript levels of *ACT1*, *PMA1*, *MDR1*, *CDR1* and *ERG11* of the two *Candida albicans* clinical isolates by RT-PCR**

	$\Delta Ct$				
	<i>PMA1</i>	<i>ACT1</i>	<i>ERG11</i>	<i>MDR1</i>	<i>CDR1</i>
CAAL2	9.91	11.02	<b>11.11 (<math>\times 2.9</math>)</b>	12.99	14.19
CAAL76	10.15	11.20	<b>10.57 (<math>\times 4.2</math>)</b>	12.86	13.28

Values that fall outside the 3 SD range are shown in bold.

Besides fluconazole and voriconazole resistance, CAAL2 and CAAL76 also displayed unusually high MICs of amphotericin B (0.75 and 1 mg/L, respectively), a phenotype that has been previously linked to a defect in Erg3p.<sup>16</sup> Therefore, to gain further insight into the molecular mechanisms responsible for azole resistance in these isolates we amplified the *ERG3* coding sequence. Each isolates displayed a novel genetic alteration in *ERG3*. In addition to the V351A amino acid change that has been previously reported from azole-susceptible isolates, CAAL2 displayed a novel homozygous T578G nucleotide substitution, leading to a leucine-to-arginine exchange (L193R) in Erg3p (Table 1). Interestingly, L193R occurred at a residue that is highly conserved in yeasts.<sup>24</sup> CAAL76 displayed a large, homozygous, 13 bp deletion, from nucleotides 366 to 378, responsible for a frameshift and truncated protein due a premature stop codon.

To investigate whether the observed Erg3p amino acid substitutions could impact on ergosterol biosynthesis, we determined the membrane sterol profiles of these isolates by GC-MS. As shown in Table 3, each of the three fluconazole-susceptible *C. albicans* isolates (CAAL94, CAAL96 and CAAL97) displayed a normal sterol profile, with ergosterol content representing more than 90% of the total sterol fraction, and a low amount of sterol intermediates. In stark contrast, the two azole-resistant strains displayed very low ergosterol content: <10 % for CAAL2 and not detectable for CAAL76. Interestingly, both strains



displayed accumulation of ergosta-7,22-dienol (64.2% and 41% for CAAL2 and CAAL76, respectively) and other sterol intermediates such as episterol (10% and 34%, respectively) and ergosta 7-enol (8% and 4.3%, respectively), highlighting a defective sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase activity in these isolates.

**Table 3: Membrane lipid sterol composition of *erg3* mutant isolates by GC-MS**

	Percentage of each sterol fraction in the <i>C. albicans</i> isolates				
	CAAL2	CAAL76	CAAL94	CAAL96	CAAL97
Lanosterol/obtusifoliol <sup>a</sup>	1.2	1.5	—	—	—
Eburicol	2.2	—	—	—	—
Zymosterol	—	1.2	1.3	2.0	1.2
Fecosterol	6.2	18.2	—	—	—
Episterol	10.4	33.5	—	—	1.0
Ergosta-7,22-dienol	<b>64.2</b>	<b>41.0</b>	—	—	—
Ergosta-7-enol	8.0	4.3	—	—	—
Ergosta-5,8-dienol	—	—	5.0	—	—
Ergosterol	6.0	—	<b>90.8</b>	<b>94.7</b>	<b>95.9</b>
Unidentified	1	—	—	—	1.8

A sterol amount below 1% (or not detected) is represented by —.

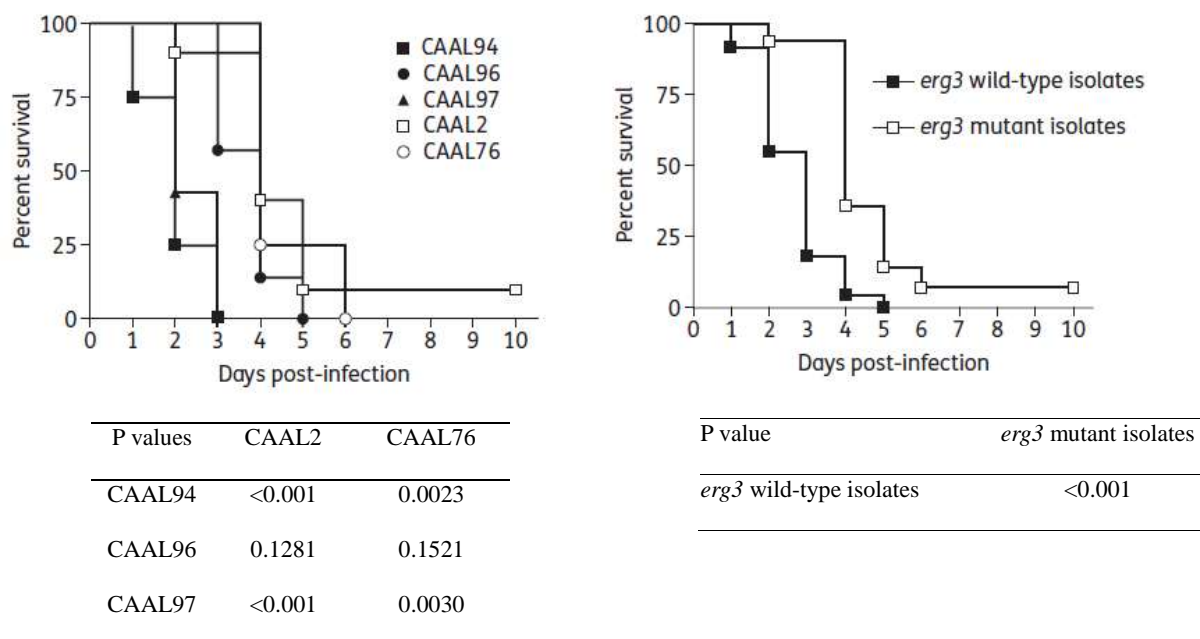
All three fluconazole-susceptible isolates (controls) have the *ERG3* wild-type sequence.

The most abundant sterol for each isolate is shown in bold.

Data are the average of three independent experiments.

<sup>a</sup>Lanosterol and obtusifoliol cannot be differentiated (similar molecular weights).

We therefore investigated the virulence of these isolates in a murine model of invasive candidiasis to study whether the genetic alterations found in *ERG3* could have an impact on *in vivo* virulence. As depicted in Figure 1, despite slight differences in survival between wild-type isolates, a significant trend toward a reduced virulence of both *erg3* mutants was noted by comparison with wild-type isolates ( $p < 0.005$ ).



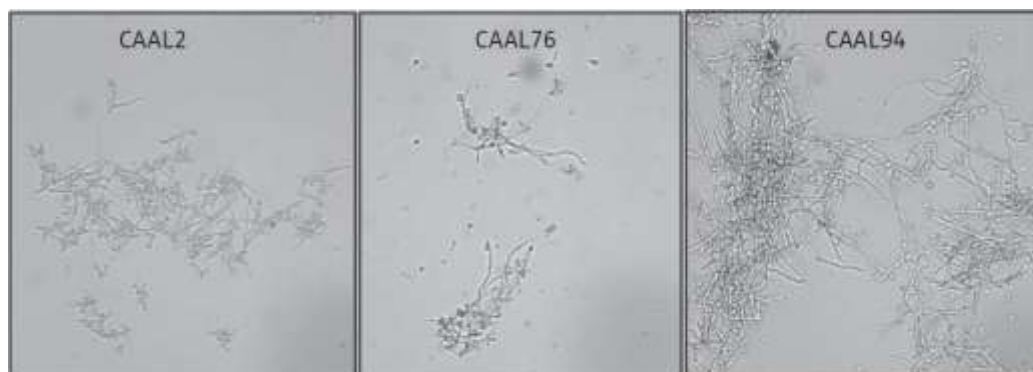
**Figure 1: Survival of mice infected with CAAL2, CAAL76 or wild-type fluconazole-susceptible isolates**

For each strain,  $5 \times 10^6$  blastoconidia (except for CAAL2,  $3 \times 10^6$ ) were injected into the tail vein. The following number of mice were used: CAAL2,  $n=10$ ; CAAL76,  $n=4$ ; CAAL94,  $n=8$ ; CAAL96 and CAAL97,  $n=7$ .

Left panel: Survival rate of each *erg3* mutant isolate was compared with each FLC-susceptible isolate.

Right panel: Survival rate of *erg3* mutant isolates (grouped together) was compared with wild-type isolates (grouped together). P values <0.05 was considered significant (log rank test).

Further investigations revealed that both *erg3* mutants exhibited the typical yeast form on Sabouraud dextrose agar, and retained the ability to form germ tubes, pseudohyphae and hyphae. However, kinetics studies revealed, under our conditions, a clearly reduced capacity for hyphal growth of these mutants in comparison with the wild-type isolates (Figure 2).



**Figure 2: Kinetics of hyphal formation for CAAL2 and CAAL76 in RPMI 1640/10% FBS.** Note that under these conditions, both CAAL2 and CAAL76 exhibit a clearly reduced hyphal growth by comparison to the wild-type azole-susceptible isolate (CAAL94) taken as control.

## Discussion

Acquisition of azole resistance, described in several species, is of serious concern in *Candida*, leading to treatment failures, and even requiring the latest generation of drugs, such as voriconazole and posaconazole.<sup>3,4</sup> Up to now, a large number of studies have been focused on the mechanisms leading to azole resistance in *C. albicans*, especially up-regulation of the genes encoding efflux pumps and amino acid substitutions in Erg11p.<sup>25</sup> So far, the impact of genes, apart from *ERG11*, involved in the ergosterol biosynthesis pathway in azole resistance (such as *ERG3* and *ERG5*) has been poorly investigated.<sup>14,15</sup> In the present study, we report two novel *C. albicans* isolates with an *erg3* mutant phenotype, isolated from two patients receiving fluconazole prophylaxis.

Sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase, encoded by *ERG3*, is a key enzyme in the ergosterol biosynthesis pathway, being responsible for introducing a double bond in the ring structure of episterol to produce ergosta 5,7,24 (28)-trienol. The latter, an intermediate in ergosterol biosynthesis, is the substrate of sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase and sterol  $\Delta^{24}$ -reductase (encoded by *ERG5* and *ERG4* respectively).<sup>26</sup> Initially studied in *Saccharomyces cerevisiae*, *erg3* null mutant are intrinsically resistant to azole drugs<sup>27</sup>. In *Candida* species, mutations in *ERG3* protect yeast cells from membrane damage due to the accumulation of 14 $\alpha$ -methylfecosterol instead of the toxic products 14 $\alpha$ -methylergosta-8,24-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol that results from *ERG11* inhibition by azole drugs. In most of the studies published to date, *erg3* mutant isolates displayed cross-resistance between azoles and polyenes, such as amphotericin B, both of which are drugs types that target ergosterol.<sup>13,15,16,26,28</sup> However, according to a recent study, the reduced susceptibility to amphotericin B could be infrequent: mutants called “leaky” are low-ergosterol producing isolates due to a slight *ERG3* defect.<sup>15</sup> Here, CAAL2 and CAAL76 could be considered as typical *erg3* mutants, exhibiting extremely low ergosterol content (not detectable for CAAL76) and resistance to azoles and amphotericin B.

Apart from those of *C. albicans* and its related species *Candida dubliniensis*, *erg3* mutants have been described in a limited number of *Candida* species.<sup>29-31</sup> Moreover, only a few of these *erg3* mutants have been investigated for mutations leading to amino acid changes in *ERG3*.<sup>7,15,28,30,32,33</sup> Up to now, 16 genetic alterations (mostly amino acid substitutions) have been reported in *C. albicans* isolates (Table 4).

**Table 4: Erg3p amino acid substitutions previously described in *C. albicans* and *C. dubliniensis***

Erg3p amino acid substitution <sup>a</sup>	Notes	References
<i>Candida albicans</i>		
D19E <sup>b,c</sup>	occurred as a single mutation	33
- <sup>c,d</sup>	2 bp deletion (nucleotides 120 to 121) leading to a frameshift and truncated protein (stop codon at position 52)	28
K97E	associated to other substitutions (L193P, V237A and A353T)	15
D147G	associated to T330A (leaky <i>erg3</i> mutant); residue highly conserved in yeasts	15
- <sup>c</sup>	13 bp deletion (nucleotides 366 to 378) leading to a frameshift and truncated protein (stop codon at position 153)	This study
A168V <sup>d</sup>	associated to T329S (Darlington strain); residue highly conserved in yeasts	32
L193P	associated to other substitutions (K97E, V237A and A353T); residue highly conserved in yeasts	15
L193R <sup>c</sup>	associated to V351A; residue highly conserved in yeasts	This study
W228Stop <sup>c</sup>	occurred as a single mutation; residue highly conserved in yeasts	7
V237A	associated to other substitutions (K97E, L193P and A353T)	15
H243N	associated to T330A (leaky <i>erg3</i> mutant); residue highly conserved in yeasts	15
L266Stop <sup>c</sup>	occurred as a single mutation; residue highly conserved in yeasts	7
W292Stop	associated to other substitutions (Darlington strain)	32
T329S <sup>d</sup>	associated to A168V (Darlington strain); residue highly conserved in yeasts	32
T330A	associated to D147G or H243N (leaky <i>erg3</i> mutant); residue highly conserved in yeasts	15
W332R <sup>c</sup>	occurred as a single mutation; residue highly conserved in yeasts	15
V351A	recovered in both azole-susceptible and azole-resistant isolates	This study, 32
A353T	associated to other substitutions (K97E, L193P and V237A)	15
<i>Candida dubliniensis</i>		
Q47H <sup>b</sup>	recovered in an azole-susceptible isolate	30
V119I <sup>b</sup>	recovered in an azole-susceptible isolate	30
- <sup>b,c</sup>	2 bp deletion leading to a frameshift and truncated protein (stop codon at position 147)	30
Q160K <sup>b,c</sup>	residue highly conserved in mammalian and fungal $\Delta^{5,6}$ desaturases	30
- <sup>b,c</sup>	2 bp deletion leading to a frameshift and truncated protein (stop codon at position 194)	30
H269N <sup>b</sup>	recovered in an azole-resistant isolate with an <i>erg3</i> wild-type phenotype	30
P272L <sup>b,c</sup>	associated to H318N; residue highly conserved in mammalian and fungal $\Delta^{5,6}$ desaturases	30
H318N <sup>b,c</sup>	associated to P272L; located in a histidine-rich domain	30
Q327K <sup>b,c</sup>	residue conserved in mammalian and fungal $\Delta^{5,6}$ desaturases	30

The four histidine-rich conserved domains thought to constitute the active site of the enzyme are located at amino acids 226-230 (HX3H), 239-243 (HX2HH), 254-257 (HX2H), and 314- 318 (HX2HH), in *C. albicans* and *C. dubliniensis*.

<sup>a</sup>Relative to the start methionine.

<sup>b</sup>Substitution recovered from a laboratory mutant (not a clinical isolate).

<sup>c</sup>Mutation likely to be responsible for an impaired Erg3p activity [being either recovered as a single substitution or in combination with substitution(s) not associated with azole resistance in an azole-resistant isolate].

<sup>d</sup>Involvement of this substitution (alone or in combination with others) in azole resistance have been confirmed by heterologous gene expression in *S. cerevisiae*.

Apart from D19E, created *in vitro* by serial cultures of a wild-type strain in the presence of fluconazole, all other mutations have been reported from clinical isolates.<sup>33</sup> Importantly, with a few exceptions (e.g. W332R), most of these substitutions have been described in combined mutations, in azole-resistant isolates. Thus, their exact involvement as a single substitution in Erg3p impairment and azole resistance remains to be established. Other amino acid changes (Q160K, H269N, P272L, H318N and Q327K) have been reported only in *C. dubliniensis* (Table 4).<sup>30</sup> Here, in addition to V351A, which occur at a residue that is probably not crucial for Erg3p function,<sup>15</sup> we described two novel genetic alterations associated with impaired  $\Delta^{5,6}$ -desaturase activity, as witnessed by the very low ergosterol content and significant accumulation of ergosta-7,22-dienol in the corresponding isolates. Interestingly, a substitution at residue 193 (L193P) has been identified recently by Martel and co-workers in a single *C. albicans* isolate exhibiting an *erg3* mutant phenotype.<sup>15</sup> However, in this work, the exact role of L193P in azole resistance could not be determined because of the multiple amino acid changes in this isolate (K97E, V237A, V351A and A353T). Here, we described a different substitution at the same residue (L193R). L193R was homozygous in CAAL2. Taken together, these findings highlight the critical role of residue 193 in Erg3p function and suggest that substitution at this residue can confer azole resistance and reduced susceptibility to amphotericin B through Erg3p impairment. Notably, the sterol membrane pattern of CAAL76, as evidenced by GC-MS, showed a loss of sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase activity; this was in complete agreement with *ERG3* gene sequencing, which showed a major deletion leading to a truncated Erg3p. Indeed, loss of Erg3p activity in CAAL76 can be explained, by the frameshift deletion, leading to the loss of a large part of the 5' end of the protein including the four histidine-rich motifs. These domains, which are conserved among all known sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturases, are suspected to comprise the active site of the enzyme.<sup>30,32</sup> Whereas, *ERG3* mutations have been previously reported in *C. albicans* in patients following fluconazole therapy, to the best of our knowledge, deletion leading to a frame shift and truncated  $\Delta^{5,6}$ -desaturase has been mainly observed in *C. dubliniensis* after *in vitro* experiments that aimed at selecting itraconazole-resistant mutants, but only in a single *C. albicans* isolate.<sup>12,28,30,32</sup> Notably, in these strains, deletions were smaller in size (2 bp) than the deletion observed in CAAL76 (13 bp). Both *erg3* mutant isolates also displayed significant *ERG11* overexpression, confirming that *ERG11* is usually induced, possibly as a compensatory mechanism in *erg3* mutant isolates.<sup>26,29,30,34,35</sup>

As shown in previous studies, yeast lacking functional Erg3p remains viable, as this gene is non-essential for growth in aerobic conditions, but can exhibit reduced growth rate.<sup>26,29,36</sup> Furthermore, studies investigating morphological changes associated with Erg3p loss of function, showed that some *erg3* mutants had lost the capability to produce hyphae.<sup>12,34</sup> Thus, some authors have suggested that this phenotypic characteristic is being responsible for the reduced *in vivo* virulence of these mutants.<sup>12,34</sup> While Martel and coworkers showed that some *erg3* mutant isolates can still produce hyphae, their *in vivo* virulence was unfortunately not investigated.<sup>15</sup> In line with this, some controversy regarding the clinical significance of these mutants has arisen.<sup>12,26,34</sup> Recently, Vale-Silva and coworkers have shown, in an immunocompetent BALB/c mouse model, that loss of Erg3p activity does not necessarily decrease virulence.<sup>28</sup> As suggested by the authors, the reduced *in vivo* fitness of these isolates could be compensated for by as yet unknown mechanisms.<sup>28</sup> In the present study, our results clearly confirm that *C. albicans* isolates can retain the ability for hyphal growth despite sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase impairment.<sup>15,28</sup> Finally, our experiments, in an immunosuppressed Swiss mice model, also revealed (even in the absence of a complete loss of ability to form hyphae) a significantly lower *in vivo* virulence of the two *erg3* mutants, supporting the theory of the contribution of hyphal growth to virulence. Interestingly, as shown by other authors, the reduced virulence trait of *erg3* mutant isolates is not necessarily linked to reduced kidney fungal burden (not performed in our study).<sup>7,28</sup> However, we cannot exclude the possibility that a specific genetic background in these strains, not link to the Erg3p impairment, could be responsible for the attenuated virulence. Firm evidence would require functional complementation of the *ERG3* allele.

In conclusion, this study gives further convincing evidence that *C. albicans erg3* mutants can develop following fluconazole therapy. We demonstrated for the first time the critical role of substitutions at residue 193, as well as of a novel large deletion, both having a dramatic impact on Erg3p function and azole resistance. Such *erg3* mutants could have an important impact on antifungal management strategies, due to cross-resistance between azoles and polyene antifungal drugs. However, their lower *in vivo* virulence, which probably explains their rather low frequency, could question their real impact in the clinical setting. Finally, these results also demonstrate that not only *ERG11* but also other genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway must be investigated when azole resistance is suspected.

**Funding sources**

This study was supported by internal funding

**Transparency declaration**

None to declare

**Acknowledgements**

*Part of this work has been presented at the Fifth Congress on Trends in Medical Mycology, Valencia, Spain, 2011 (Abstract no. 298).*

*The authors thank Olivier Barre and Bernard Besse for their excellent technical assistance and Jean-Benoît Hardouin and Véronique Sébille for discussion about statistical analysis.*

**Supplémentary Data**

Tables S1 and S2 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

**Supplementary data****Table S1: Nucleotide sequences of the primers and probes used in this study**

Primer/Probes	Nucleotide sequences (5'-3')
<i>ERG3 amplification and sequencing</i>	
CaERG3F	ATGGATATCGTACTAGAA
CaERG3R	TCATTGTTCAACATATTC
<i>RT-PCR expression analysis</i>	
ACT1-F	TTGGTGATGAAGCCCAATCC
ACT1-R	CATATCGTCCCAGTTGGAAACA
ACT1-S	FAM-TTGACCTTGAGATACCCAATTGAACACGGTA-Tamra
PMA-F	TTGAAGATGACCACCCAATCC
PMA-R	GAAACCTCTGGAAGCAAATTCG
PMA1-S	FAM-AGATGTCCACGAAAACACAAAACACCGTT-Tamra
ERG11-F	AACTACTTTTGTTTATAATTTAAGATGGACTATTGA
ERG11-R	AATGATTTCTGCTGGTTCAGTAGGT
ERG11-S	FAM-TGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGG-Tamra
MDR1-F	TTACCTGAAACTTTTGGCAAACA
MDR1-R	ACTTGTGATTCTGTCGTTACCG
MDR1-S	FAM-TCGCAAGGCTAAAAGATTGAGAGCCATCA-Tamra
CDR1-F	TTTAGCCAGAACTTTCACTCATGATT
CDR1-R	TATTATTCTTCATGTTTCATATGGATTGA
CDR1-S	FAM-TAACCCATATGTCAGAAGTGCCCGGG-Tamra



**Table S2: RNA transcript levels of *ACT1*, *PMA1*, *MDR1*, *CDR1* and *ERG11* of a set of 10 FLC-susceptible clinical isolates of *Candida albicans* by RT-PCR**

Isolate	$\Delta Ct$				
	<i>PMA1</i>	<i>ACT1</i>	<i>ERG11</i>	<i>MDR1</i>	<i>CDR1</i>
CAAL3	11.44	11.78	13.05	17.08	14.36
CAAL5	11.54	11.71	11.99	13.94	16.07
CAAL12	12.28	11.87	12.84	13.01	14.95
CAAL17	10.39	11.43	12.14	17.63	14.83
CAAL20	10.22	10.32	13.11	17.96	14.70
CAAL39	11.63	11.14	12.30	13.63	16.28
CAAL93	10.05	11.58	13.15	11.72	16.76
CAAL94	11.53	11.26	13.08	16.88	15.67
CAAL96	10.64	11.18	12.04	18.50	14.30
CAAL97	10.9	10.91	12.71	18.26	14.24
Mean $\Delta Ct$	11.06	11.32	12.64	15.86	15.22
SD	0.73	0.47	0.48	2.51	0.91
+/- Fold range expression level	1.66	1.38	1.39	5.70	1.88
2-SD range	[9.60-12.52]	[10.38-12.25]	[11.69-13.59]	[10.84-20.88]	[13.39-17.04]
3-SD range	[8.87-13.25]	[9.91-12.72]	[11.21-14.07]	[8.33-23.39]	[12.48-17.95]

### References

1. Johnson EM. Rare and emerging *Candida* Species. *Curr Fungal Infect Rep* 2009; **3**: 152-9.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 133-63.
3. Myoken Y, Kyo T, Sugata T *et al.* Breakthrough fungemia caused by fluconazole-resistant *Candida albicans* with decreased susceptibility to voriconazole in patients with hematologic malignancies. *Haematologica* 2006; **91**: 287-8.
4. Weiler S, Lass-Flörl C, Auberger J *et al.* Triazole-resistant candidaemia following posaconazole exposure. *Int J Antimicrob Agents* 2009 ; **33**: 494-5.
5. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002 ; **2**: 73-85.
6. Cernicka J, Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27**: 403-8.
7. Chau AS, Gurnani M, Hawkinson R *et al.* Inactivation of sterol Delta5,6-desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3646-51.
8. Coste A, Selmecki A, Forche A *et al.* Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 2007; **6**: 1889-904.
9. Coste A, Turner V, Ischer F *et al.* A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 2006; **172**: 2139-56.
10. Dunkel N, Blass J, Rogers PD *et al.* Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* 2008; **69**: 827-40.
11. Dunkel N, Liu TT, Barker KS *et al.* A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell* 2008; **7**: 1180-90.

12. Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ *et al.* Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2124-31.
13. Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE *et al.* Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturation. *FEBS Lett* 1997; **400**: 80-2.
14. Martel CM, Parker JE, Bader O *et al.* A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in *ERG11* (encoding sterol 14 $\alpha$ -demethylase) and *ERG5* (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3578-83.
15. Martel CM, Parker JE, Bader O *et al.* Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4527-33.
16. Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ *et al.* Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:196-9.
17. Alvarez-Rueda N, Fleury A, Morio F *et al.* Amino acid substitutions at the major insertion loop of *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -Demethylase are involved in fluconazole resistance. *PLoS One* 2011; **6**: e21239.
18. Morio F, Loge C, Besse B *et al.* Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; **66**: 373-84.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third edition. Approved standard M27-A3.* CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
20. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC *et al.* Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**: 330-43.
21. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ *et al.* Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole

- and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010; **13**: 180-95.
22. Wanger A, Mills K, Nelson PW *et al.* Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2520-2.
  23. Guillon R, Pagniez F, Giraud F *et al.* Design, synthesis, and *in vitro* antifungal activity of 1-[(4-substituted-benzyl)methylamino]-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ols. *ChemMedChem* 2011; **6**: 816-25.
  24. Griffiths KM, Howlett BJ. Transcription of sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase and sterol 14 $\alpha$ -demethylase is induced in the plant pathogenic ascomycete, *Leptosphaeria maculans*, during treatment with a triazole fungicide. *FEMS Microbiol Lett* 2002; **217**: 81-7.
  25. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 2009; **9**: 1029-50.
  26. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T *et al.* *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2404-12.
  27. Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ *et al.* Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14  $\alpha$ -methylergosta-8,24(28)-dien-3  $\beta$ ,6  $\alpha$ -diol. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **207**: 910-15.
  28. Vale-Silva LA, Coste AT, Ischer F *et al.* Azole resistance by loss of function of the sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase gene (*ERG3*) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; **56**:1960-8.
  29. Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE *et al.* Deletion of the *Candida glabrata* *ERG3* and *ERG11* genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2708-17.
  30. Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ *et al.* Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2424-37.
  31. Young LY, Hull CM, Heitman J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2717-24.

32. Miyazaki Y, Geber A, Miyazaki H *et al.* Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of *ERG3* (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* 1999; **236**: 43-51.
33. Yan L, Zhang J, Li M *et al.* DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008; **40**: 1048-60.
34. Miyazaki T, Miyazaki Y, Izumikawa K *et al.* Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* *erg3/erg3* mutant *in vivo* despite *in vitro* resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 580-6.
35. Pierson CA, Eckstein J, Barbuch R *et al.* Ergosterol gene expression in wild-type and ergosterol-deficient mutants of *Candida albicans*. *Med Mycol* 2004; **42**: 385-9.
36. Arthington BA, Bennett LG, Skatrud PL *et al.* Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene* 1991; **102**: 39-44.

**Etude n°3**

Mutations sur les gènes codant les facteurs de transcription Tac1,  
Mrr1 et Upc2 dans une collection d'isolats cliniques  
de *Candida albicans* résistants au fluconazole

Dans les études précédentes, nous avons exploré le polymorphisme nucléotidique du gène *ERG11* dans une large collection d'isolats cliniques de *C. albicans*. Ce travail nous a permis de décrire plusieurs nouvelles mutations sur ce gène dont quelques-unes pourraient expliquer le phénotype de résistance de certains de nos isolats cliniques. En outre, dans la continuité de ce travail, nous avons identifié deux isolats résistants aux azolés présentant deux nouvelles mutations sur le gène *ERG3*.

Cependant, le phénomène de résistance aux antifongiques azolés résultant de plusieurs mécanismes souvent combinés, la possibilité d'autres mécanismes comme par exemple la surexpression constitutive des transporteurs d'efflux ou du gène *ERG11*, résultat d'une hyperactivation transcriptionnelle, devait être abordée.

Dans la suite logique des précédents travaux, nous avons donc initié l'investigation exhaustive des mécanismes moléculaires, à travers notamment l'investigation des facteurs de transcriptions *Tac1*, *Mrr1* et *Upc2*, à l'origine de l'acquisition de la résistance aux azolés des souches de notre collection. Dans cette étude, nous présentons les premiers résultats de l'investigation de ces mécanismes moléculaires chez six souches cliniques de *C. albicans* résistantes au fluconazole.

Nos résultats expérimentaux révèlent que la résistance aux azolés, chez ces isolats, s'appuie sur de multiples mécanismes fréquemment combinés chez un même isolat clinique. En plus de ces mutations gain de fonction déjà décrites sur les gènes *TAC1* (T225A, E841G et G980W) et *UPC2* (G648S) impliquées respectivement dans la régulation de l'expression des gènes *CDR1* et *ERG11*, nous rapportons plusieurs nouvelles mutations sur ces facteurs de transcription, dont certaines potentiellement impliquées dans la résistance au fluconazole.

**Article en préparation**

**Mutations in the transcription factor-encoding genes *TAC1*, *MRR1*  
and *UPC2* in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of  
*Candida albicans***

Florent Morio<sup>1,2</sup>, Fabrice Pagniez<sup>1</sup>, Myriam Besse<sup>2</sup>, Françoise Gay-andrieu<sup>1,2</sup>,  
Michel Miegerville<sup>1,2</sup>, Patrice Le Pape<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités,  
EA1155 – IICiMed, Faculté de Pharmacie, Nantes, France;

<sup>2</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nantes, Nantes, France;

Part of this work has been presented at the 5<sup>th</sup> Trends in Medical Mycology, Valencia, Spain  
(2 to 5 October 2011)

Several mechanisms can lead to azole resistance and therapeutic failure in *Candida albicans*. In this study, our aim was to determine the mechanisms accounting for azole resistance in a set of six *C. albicans* clinical isolates recovered during clinical practice and exhibiting a high-level of resistance to fluconazole. For this purpose, we investigated the expression levels of *CDR1*, *MDR1* and *ERG11* by RT-PCR together with the amplification and sequencing of their transcription factors *TAC1*, *MRR1* and *UPC2*. Our data underline that azole resistance in this set of clinical isolates results from distinct and often combined mechanisms, being mostly driven by *CDR1* and/or *MDR1* active efflux. Of note, these isolates harbor multiple amino acid substitutions in Tac1, Mrr1 and Upc2. Importantly, along with previously reported gain-of-function mutations we described novel mutations in *TAC1*, *MRR1* and *UPC2*, with a putative involvement in fluconazole resistance.



## 1. Introduction

*Candida* species are major human pathogens being responsible for a wide spectrum of diseases ranging from superficial to invasive life-threatening infections in immunocompromised patients. Till now, more than 40 *Candida* species have been described as human pathogens but *C. albicans* remains the most prevalent, being the main species isolated from blood cultures worldwide [1, 2]. Whereas azole drugs represent together with the echinocandins the most widely used treatments of candidiasis, resistance can occur, leading to the risk of treatment failure and breakthrough infections [3-5]. In recent years, intense researches have been focused on azole resistance, leading to a better understanding of its mechanisms among which the most prevalent in *C. albicans* are: i) reduced intracellular concentration of the azole drugs due to overexpression of efflux pumps belonging to either the ATP binding cassette (ABC) superfamily (Cdr1, Cdr2) or major facilitator superfamily (Mdr1); ii) point mutations in *ERG11* responsible for amino acid substitutions leading to a decreased affinity for azole drugs; iii) overexpression of the *ERG11* gene encoding lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, the primary target of azole drugs [6]. Importantly, most of these mechanisms are frequently combined in a single isolate [7-9]. Recently, an important step toward a better understanding of genetic regulation of azole resistance in *C. albicans* has been achieved with the discovery of gain-of-function (GOF) mutations leading to hyperactive alleles, in the zinc-finger transcriptional factors *TAC1*, *MRR1* and *UPC2*, responsible for the constitutive overexpression of *CDR1/CDR2*, *MDR1* and *ERG11* respectively [10-12]. Till now, whereas only a few GOF mutations have been described in *UPC2*, more than 10 have been reported in both *TAC1* and *MRR1* [13]. However, it is likely that additional mutations in these transcription factors or other yet unknown mechanisms probably exist [4, 14-16].

In a previous study we investigated the *ERG11* polymorphism in a large collection of clinical isolates of *C. albicans*. This work allowed us to describe several novel amino acid substitutions among which, some have been recently confirmed to be involved in fluconazole resistance [17, 18]. In addition to these fluconazole-resistant *erg11* mutants, two other resistant isolates from this collection were recently evidenced to be two novel *erg3* mutants [19]. Whereas most of these azole-resistant isolates had mutations on genes involved in the sterol biosynthesis pathway, the possibility of other azole resistance mechanisms remained to be investigated. In the present study, we aimed to decipher the molecular mechanisms behind azole resistance in some of these clinical isolates investigating overexpression of *CDR1*,

*MDR1* and *ERG11* as well as mutations in their respective transcription factors *TAC1*, *MRR1* and *UPC2*. We demonstrate that, in most of these strains, azole resistance relies on multiple mechanisms including altered drug transport mediated by *CDR1* and/or *MDR1*. In addition to previously reported mutations in *TAC1*, *MRR1* and *UPC2*, we described several new mutations including some with a putative involvement in fluconazole resistance.

## **2. Materials and methods**

**2.1. Strains.** The strains used in this study (Table 1) were recovered from six unrelated patients at various anatomical sites during routine laboratory practice [17]. All had *ERG11* substitutions involved in fluconazole resistance. Strains were identified using conventional routine mycological methods and stored at -80°C for long-term storage. A set of 10 fluconazole-susceptible clinical isolates was used to determine the background expression levels of *PMA1*, *ACT1*, *MDR1*, *CDR1* and *ERG11* (Table S1).

### **2.2. Antifungal susceptibility testing**

Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) to fluconazole (FLC) and voriconazole (VRC) were determined for each isolate using the broth microdilution reference method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A3 [20]. FLC was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and VRC from Pfizer. MICs were determined visually after 48 h of incubation at 35°C. MIC was considered as the lowest drug concentration that resulted in 50 % growth inhibition relative to the growth in the control well. MIC values were compared with the recently proposed revised species-specific clinical breakpoints for FLC and VRC [21, 22]. Briefly, MICs  $\leq 2$  mg/L were considered as susceptible (S), 4 mg/L as susceptible-dose-dependent (SDD), and  $\geq 8$  mg/L as resistant (R) for FLC; MICs  $\leq 0.125$  mg/L as S, 0.25 to 0.5 mg/L as SDD, and  $\geq 1$  mg/L as R for VRC.

### **2.3. *In vivo* susceptibility testing**

Four-week-old female Swiss mice (Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France), were immunosuppressed by subcutaneous administration of 30 mg/kg prednisolone (Sigma-Aldrich) one day before infection. Disseminated candidiasis was induced by intravenous infection (0.1 mL) in the lateral tail vein with an inoculum size previously determined to induce enough mortality in the control group ( $5 \cdot 10^5$  cells for CAAL28, CAAL67 and

CAAL74;  $10^5$  cells for CAAL37, CAAL61 and CAAL75). Two groups of eight mice were used and treatments were administered *per os*. One received FLC (5 mg/kg in distilled water) whereas the control group was given distilled water. Survival was monitored every day for 13 days after infection. Survival rate of the FLC group was compared with control group by using the Log rank test. A p value of less than 0.05 was considered significant.

#### **2.4. Flow cytometry using Rhodamine 6G**

ATP binding cassette active efflux was determined by flow cytometry as described previously with slight modifications [23]. Briefly, yeast cells were grown overnight in 20 mL of YPD medium at 30°C under 200 rpm.  $10^7$  cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 min and the pellet was suspended in 1 mL PBS medium. Yeast cells were incubated at 200 rpm for 90 min for de-energization before addition of rhodamine 6G (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 100  $\mu$ M and incubation for 30 additional minutes at 30°C, 200 rpm. Rhodamine uptake was stopped by cooling the tube on ice. Rhodamine incorporation was determined by measuring the fluorescence at 535 nm on a FACS Canto II cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) after 1:20 dilution in PBS (10 000 events collected per isolate). Yeast cells were then washed three times with cold PBS to remove rhodamine excess. Active efflux was evaluated by measuring the fluorescence (as described above) at 30 and 60 min, after incubating the cells with or without glucose (16  $\mu$ M final concentration) at 30°C, 200 rpm. Data were analyzed using FACSDiva II software (BD Biosciences).

#### **2.5. RNA extraction and RT-PCR transcript levels**

RNA was extracted from mid-log exponential phase growth culture in YPD medium (2 % bactopectone, 1 % yeast extract, 1 % glucose) at 30°C under 200 rpm using NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) after cell lysis using lyticase (Sigma-Aldrich). Each RNA extract was aliquoted and stored at -80°C before analysis. Absence of DNA contamination was checked and RNA integrity was verified using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using RNA 6000 Nano Assay kit. RNA expression levels of *ERG11*, *MDR1* and *CDR1* as well as of two housekeeping genes (*PMA1* and *ACT1*) were determined by quantitative RT-PCR on a RotorGene 3000 instrument (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) using the One step PrimeScript RT-PCR kit (Takara Bio Inc, Saint-Germain-en-Laye, France) and previously described primers and probes (Table S1) [9]. Quantitative relative expression was measured after normalization by a

18S rRNA endogenous control (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), amplified simultaneously in duplex with each target gene. Each RNA samples was tested in triplicate. Measurement of RNA transcript level of the isolates was compared with the normal expression range of a collection of 10 FLC-susceptible *C. albicans* isolates (Table S2). For each target gene, normality was checked by Shapiro-Wilk test. Overexpression was considered significant and highly significant when  $\Delta Ct$  value [Ct(gene of interest)-Ct(18S rRNA)] fall outside 2 (2-SD) and 3 standard deviation (3-SD) respectively.

## 2.6. Sequencing analysis of *Tac1*, *Mrr1* and *Upc2* encoding genes

DNA extraction was performed using NucleoSpin tissue kit (Macherey-Nagel, Germany) after cell lysis using lyticase (Sigma-Aldrich). DNA extracts were stored at -20°C until analysis. All primers used in this study are listed in Table S1. Amplification and sequencing of *TAC1*, *MRR1* and *UPC2* was performed using the primers listed in Table S1. Briefly, for *TAC1*, five overlapping regions were amplified using the primers pairs Zinc2-604/Zinc2-1247c, Zinc2-1169/Zinc2-1798c, Zinc2-1708/Zinc2-2465c, Zinc2-2242/Zinc2-3087c and Zinc2-3004/Zinc2-ORFR2 respectively. For *MRR1*, three overlapping regions covering most of the *MRR1* coding sequence were amplified using the primer pairs ZCF36-9/ZCF36seq6, ZCF36seq2/ZCF36seq5 and ZCF36-2531F/ZCF36-3124R. Finally, for *UPC2*, two overlapping regions were amplified and sequenced using the primers pairs UPC2-5A/UPC-5B and UPC2-3B/UPC2-4A. All PCR products were purified and sequencing was performed using the BigDye terminator sequencing kit on an ABI PrismR 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences were analyzed using the Seqscape software (Applied Biosystems) and compared with the following DNA reference sequences: Genbank accession numbers DQ393587 (*TAC1*), XM\_711520 (*MRR1*) and EU583451 (*UPC2*). Each new mutation leading to an amino acid change was confirmed in a second round of amplification and sequencing.

## 2.7. Determination of the mating type

Determination of the mating type status was performed by amplification of both *MTLa* and *MTL $\alpha$*  genes using the primers set MTLalpha1-F/MTLalpha1-R and MTLa-F/MTLa-R (Table S1) [7]. Strains were considered either as homozygous (a/a or  $\alpha/\alpha$ ) or heterozygous (a/ $\alpha$ ) for the mating type locus.

### 3. Results

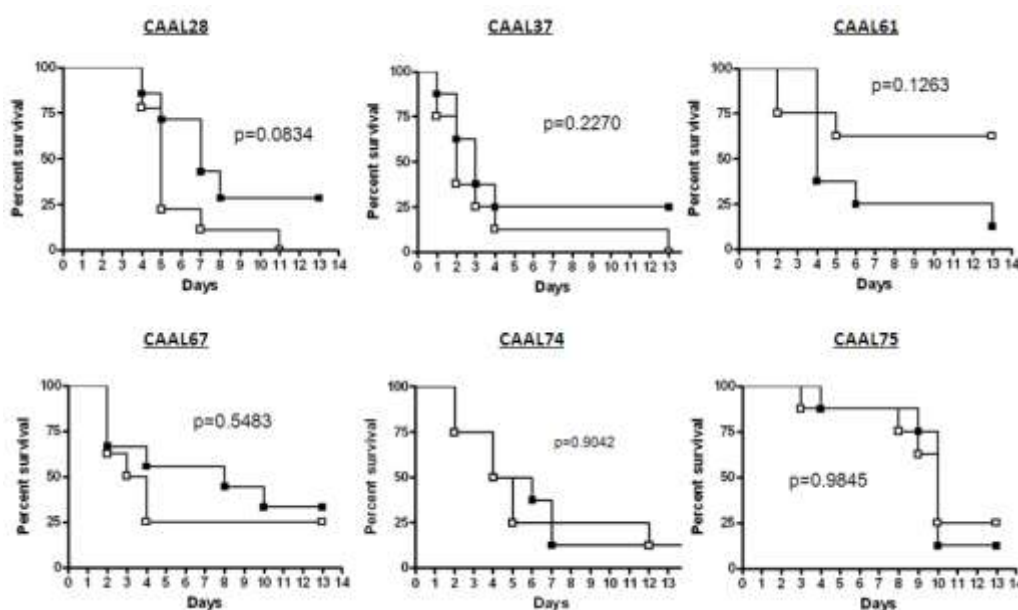
Using the CLSI microdilution method, each of the six clinical isolates displayed *in vitro* resistance to FLC with MICs above the revised clinical susceptibility breakpoint for this species (from 32 to >64 mg/L). Four of these isolates also displayed reduced susceptibility to VRC (CAAL28, CAAL37, CAAL67 and CAAL75) (Table 1). Two isolates were homozygous for the mating-type locus (CAAL28 and CAAL37) (Table 1).

**Table 1:** Patients characteristics and *in vitro* antifungal susceptibility of the isolates

Isolate	Patient sex/age (years)	Underlying disease	Site of isolation	Mating Type	Minimal Inhibitory Concentrations (mg/L)	
					FLC	VRC
CAAL28	F/44	HIV	Mouth/COP	a/a	64	0.5
CAAL37	M/46	Rheumatoid arthritis	Respiratory tract	$\alpha/\alpha$	>64	0.25
CAAL61	M/53	HIV	Mouth/COP	a/a	>64	0.125
CAAL67	F/54	HIV	Mouth/COP	a/a	32	0.25
CAAL74	F/29	Severe combined immunodeficiency	Mouth /COP	a/a	>64	0.125
CAAL75	M/40	HIV	Intra-abdominal	a/a	>64	4

M: male; F: female; FLC: fluconazole; VRC: voriconazole. COP: oropharyngeal candidiasis

Resistance to FLC was confirmed for all these strains in a murine model of invasive candidiasis (Figure 1).



**Figure 1:** *In vivo* susceptibility testing in a murine model of invasive candidiasis. Mortality was assessed every day in both groups, with (open square) and without fluconazole (full square)

In an attempt to evaluate the importance of Cdr1/Cdr2 mediated efflux in our set of isolates, we first evaluated the activity of efflux pumps by flow cytometry using the rhodamine 6G, which uses the same membrane ABC transporters as fluconazole in *Candida*. Four out of the six isolates displayed active efflux after addition of glucose (CAAL28, CAAL37 and CAAL67 and CAAL75) (data not shown). To gain further insights into the mechanism of azole resistance in the six isolates, we investigated *CDR1*, *MDR1* and *ERG11* transcript levels as well as of two housekeeping genes (*PMA1* and *ACT1*) by RT-PCR (Table 2). RNA expression levels were compared to the background expression level of a set of 10 FLC-susceptible isolates (supplementary Table S2). As expected, expression levels of *PMA1* and *ACT1* did not differ between the two sets of isolates (FLC-susceptible vs FLC-resistant).

In the set of FLC-susceptible isolates, quantification of *CDR1* transcript levels revealed a low inter-strain variation, below a 2-fold expression. However, when compared with these FLC-susceptible strains, *CDR1* expression was increased in 5 of the 6 FLC-resistant isolates (CAAL28, CAAL37, CAAL67, CAAL74 and CAAL75), being highly significant for CAAL75 that displayed resistance to both FLC and VRC (>64 mg/L and 4 mg/L respectively) (Table 2). Except for CAAL74, these findings are in complete agreement with data obtained by flow cytometry.

In spite of a high inter-strain variation in the FLC-susceptible isolates (5.7-fold expression), *MDR1* expression was significantly increased in three isolates that displayed up to a 100-fold increase in its expression (CAAL61, CAAL67 and CAAL74, Table 2). Finally, two strains displayed a highly significant *ERG11* overexpression (CAAL61 and CAAL75).

**Table 2:** Transcript level measurement of *PMA1*, *ACT1*, *CDR1*, *MDR1* and *ERG11* by RT-PCR for the six FLC-resistant clinical isolates of *Candida albicans*.

Isolate	RNA expression by RT-PCR ( $\Delta$ Ct)				
	<i>PMA1</i>	<i>ACT1</i>	<i>CDR1</i>	<i>MDR1</i>	<i>ERG11</i>
CAAL28	10.84	11.00	<i>13.16</i> (x4.2)	15.86	<i>11.79</i> (x1.8)
CAAL37	12.30	11.85	14.02 (x2.3)	16.28	14.16
CAAL61	11.26	11.24	15.41	<i>9.18</i> (x102.5)	<b>10.72 (x3.8)</b>
CAAL67	12.31	11.60	<i>13.56</i> (x3.2)	<i>9.23</i> (x99)	12.46
CAAL74	10.94	11.17	<i>13.52</i> (x3.2)	<i>9.53</i> (x80)	<i>11.91</i> (x1.7)
CAAL75	10.03	10.77	<b>12.43 (x6.9)</b>	17.43	<b>11.16 (x2.8)</b>

*Values that fall outside 3-SD range are shown in boldface.*  
*Values that fall outside 1.5-SD range are shown in italic.*

Since *CDR1*, *MDR1* and *ERG11* overexpression have been linked to the occurrence of GOF mutations in the zinc transcription factors encoding genes *TAC1*, *MRR1* and *UPC2* respectively, their coding sequences were investigated for each isolate. In all, 24 distinct mutations leading to an amino acid change were identified in *TAC1* and each isolate had multiple *TAC1* substitutions (Table 3).

**Table 3:** Amino acid polymorphism(s) in Tac1, Mrr1 and Upc2

Isolate	Amino acid substitutions in Tac1 <sup>2</sup>	Amino acid substitutions in Mrr1 <sup>3</sup>	Amino acid substitutions in Upc2 <sup>4</sup>
CAAL28	L47K, F104V, S199N, R206H, V207A, <u>S264P</u> , N396S, D776N, E829Q, <u>N896S</u> , S941P	L248V <sup>h</sup> , V341E <sup>h</sup> , E1020Q	I142S <sup>h</sup> , <u>A451V<sup>h</sup></u>
CAAL37	L47K, S199N, R206H, V207A, D776N, E829Q, <b>E841G</b> , <u>N896S</u> , S941P	<u>N937K</u> , E1020Q, <u>F1032L</u>	R68K <sup>h</sup> , I142S <sup>h</sup> , S190N <sup>h</sup> , S228N <sup>h</sup>
CAAL61	L47K, <u>K87N<sup>h</sup></u> , <u>M170I<sup>h</sup></u> , <u>N174D<sup>h</sup></u> , F189S <sup>h</sup> , S199N <sup>h</sup> , R206H <sup>h</sup> , V207A <sup>h</sup> , A377V <sup>h</sup> , N396S <sup>h</sup> , N772K <sup>h</sup> , D776N <sup>h</sup> , E829Q <sup>h</sup> , S941P <sup>h</sup>	<u>K884E</u>	I142S, <b>G648S</b>
CAAL67	L47K, <u>K87N<sup>h</sup></u> , F104V <sup>h</sup> , <u>M170I<sup>h</sup></u> , <u>N174D<sup>h</sup></u> , F189S <sup>h</sup> , S199N, R206H, V207A, <b>T225A<sup>h</sup></b> , N396S, <u>W442stop<sup>h</sup></u> , I558V <sup>h</sup> , N772K <sup>h</sup> , D776N, E829Q, <u>N896S<sup>h</sup></u> , S941P	<u>N937K</u> , E1020Q, <u>F1032L</u> , <u>S1037L</u>	I142S <sup>h</sup>
CAAL74	L47K, F104V <sup>h</sup> , S199N <sup>h</sup> , R206H <sup>h</sup> , V207A <sup>h</sup> , N396S <sup>h</sup> , D776N <sup>h</sup> , E829Q <sup>h</sup> , <u>N896S<sup>h</sup></u> , S941P <sup>h</sup>	S171P, <u>R557K</u> , E1020Q	R68K <sup>h</sup> , I142S, S228N <sup>h</sup> , <u>T273A<sup>h</sup></u> , <b>G648S<sup>h</sup></b> , <u>K684E<sup>h</sup></u>
CAAL75	L47K, F104V, S199N, R206H, V207A, N396S, <u>W486C</u> , D776N, E829Q, <u>N896S</u> , S941P, <b>G980W<sup>h</sup></b>	S171P, E1020Q	R68K <sup>h</sup> , I142S <sup>h</sup> , S228N <sup>h</sup> , <u>T273A<sup>h</sup></u>

The nucleotides coding sequences spanning the following positions were analyzed: <sup>1</sup>nucleotides 1 to 1587 for *ERG11* (entire open reading frame), <sup>2</sup>nucleotides 125 to 2946 (5' end) for *TAC1*, <sup>3</sup>nucleotides 513 to 3104 for *MRR1*, and <sup>4</sup>nucleotides 64 to 2056 for *UPC2*.<sup>h</sup>: heterozygous (mutation in a single allele). Each amino acid substitution previously involved in azole resistance or described as a gain-of-function mutation (GOF) is shown in boldface. New mutations are underlined.

As expected, T225A, E841G and G980W, previously reported as GOF mutations, correlate with *CDR1* upregulation and active efflux by cytometry in the corresponding isolates (CAAL37, CAAL67 and CAAL75). It is noteworthy that both T225A and E841G were only responsible for a moderate increased in *CDR1* expression in CAAL67 and CAAL37 (3.2- and 2.3- fold respectively). Importantly, whereas most of the substitutions have been previously reported, seven are new (K87N, M170I, N174D, S264P, W442stop, W486C and N896S). S264P resulting from a T790C exchange was identified in CAAL28 that displayed a 4.2-fold

*CDR1* upregulation and active efflux by flow cytometry. CAAL74 that exhibited a significant *CDR1* upregulation had the new N896S substitution. None of the other mutations identified in this isolate have been previously described as gain-of-function.

As for *TAC1* but to a lower extent, each of these FLC-resistant isolates also had mutations in *MRR1*. Nine distinct amino acid substitutions were identified. Five of them have not been reported previously (R557K, K884E, N937K, F1032L and S1037L). Notably, R557K, K884E and S1037L are of particular interest being only identified from the three isolates displaying *MDR1* overexpression (CAAL61, CAAL67 and CAAL74).

*UPC2* sequencing analysis also highlighted several amino acid substitutions in these clinical isolates. G648S, a substitution recently reported as a GOF mutation, was identified in two isolates (CAAL61 and CAAL74). Of note, the increased *ERG11* expression seen in CAAL61 compared with CAAL74 could correlate with the occurrence of G648S in both alleles (i.e homozygous) in this strain. Three substitutions have not been reported previously in *UPC2* (T273A, A451V and K684E). Strikingly, both T273A and K684E were recovered from two isolates (CAAL74 and CAAL75) that displayed *ERG11* overexpression, being highly significant for one of them (1.7 and 2.8-fold expression respectively).

#### **4. Discussion**

Acquisition of azole resistance is of serious concern in *Candida*, being described in several species, leading to treatment failures with fluconazole but even to the last generation of azole drugs such as voriconazole and posaconazole [3, 4, 5, 8, 28]. Up to now, a large number of studies have been focused on *C. albicans* azole resistance mechanisms allowing a better understanding of the mechanisms leading to its development as well as the genetic basis of its regulation [6, 13].

In the present study, our aim was to investigate the molecular mechanisms responsible for FLC-resistance in a collection of six *C. albicans* clinical isolates previously reported to exhibit *ERG11* substitutions involved in fluconazole resistance. These strains were recovered during clinical practice from unrelated patients.

As reported previously, homozygosity at the mating-type locus (MTL) has been associated with azole resistance [26]. Indeed, as proposed by Coste and coworkers, acquisition of azole resistance through loss of heterozygosity (LOH) at the *TAC1* locus, indirectly contributes to *MTL* homozygosity, both genes being close (approximately 14 kb) [10]. Here, two isolates



from our collection were homozygous for the *MTL* locus. Because, both strains were also homozygous for the *TAC1* locus, we can suppose that azole resistance in both strains could have arisen from a LOH event as shown in other clinical azole-resistant isolates [10].

Our data clearly illustrate that azole resistance commonly relies on multiple mechanisms in single clinical isolate [7-9]. Indeed, in addition to amino acid substitutions in *ERG11*, including Y447H and V456I located within the insertion loop, that were recently involved in azole resistance by our team [18], four out of the six isolates also exhibited *CDR1* upregulation. Investigation of its transcription factor *TAC1* encoding gene, allowed us to identify T225A, E841G and G980E, three mutations previously reported to be responsible for *CDR1* constitutive overexpression and azole resistance [7, 27]. Several new amino acid substitutions were identified in *TAC1* among which S264P and N896S. Mapping of S264P revealed that this mutation is located between the DNA binding domain and the Middle Homology Region (MHR). So far, only three GOF mutations (T225A, W239L and I255stop) have been reported in this region among *C. albicans* azole-resistant isolates [27]. Another substitution at this residue (S264L) has been previously described as part of a hyperactive *TAC1* allele [7, 27]. However this mutation occurred in combination with A736V, a mutation known to be involved in *CDR1* upregulation making difficult to determine the involvement of S264L in azole resistance [7, 27]. N896S occurred in the activation domain of Tac1, but quite far from previously reported gain-of-function mutations and a mutation at a surrounding residue has not been shown to impact on Tac1 activity (I895T) [7]. Taken together this suggests that N896S is probably not a gain of function mutation. As illustrated here, the huge level of allelic polymorphism occurring in *TAC1* highlights that this gene is highly permissive to nucleotide changes and suggest that other GOF mutation could exist.

The important strain-to-strain variability in *MDR1* expression levels observed among FLC-susceptible isolates has been also reported by others [9, 28]. Analysis of a large region within the *MRR1* gene encompassing all previously reported GOF mutations, allowed us to identify five new amino acid substitutions in this gene. At least R557K, K884E and S1037L are of special interest because of being recovered from the only three isolates with increased *MDR1* expression. To the best of our knowledge, no GOF mutation has yet been described in the region surrounding R557K. S1037L is located between residues 951 to 1050, a region called the ID1 domain where two GOF mutations (G997V and L998F) have been identified [29]. Finally, it is noteworthy that K884E, is located in a region that is considered as the fourth

mutational hot spot (amino acids 873 to 896) suggesting its putative involvement in azole resistance [11].

In addition to the overexpression based mechanisms reported above, two of our clinical isolates also displayed a highly significant *ERG11* upregulation. One of them displayed the G648S amino acid substitution supporting recent data from Flowers and coworkers that this mutation is responsible for Upc2 hyperactivity and *ERG11* upregulation [30]. However, as noted previously for A643T, our data illustrate that G648S must occur in both alleles to confer constitutive *ERG11* expression [15].

From a medical perspective, this study again provides convincing evidence that *C. albicans* can develop several azole resistance mechanisms following azole therapy, being mostly combined in a single clinical isolate. This study also pointed out that other mechanisms remain to be determined to explain *ERG11* overexpression in some isolates and that several mutations in *TAC1* and *MRR1* remains to be investigated as putative GOF mutations.

### **Acknowledgments**

*The authors are grateful to Christophe Hennequin, Jean-Yves Leberre, Yvon Sterkers and Philippe Rispail, for providing some of the strains used in this study.*

*The authors thank Olivier Barre and Bernard Besse for their excellent technical assistance.*

**Supplementary data****Table S1:** Nucleotide sequences of primers and probes used in this study

Primer/Probes	Nucleotide sequences (5'-3')	References
<b><u>RT-PCR expression analysis</u></b>		
ACT1-F	TTGGTGATGAAGCCCAATCC	[9]
ACT1-R	CATATCGTCCCAGTTGGAAACA	[9]
ACT1-S	FAM-TTGACCTTGAGATACCCAATTGAACACGGTA-TAMRA	[9]
PMA-F	TTGAAGATGACCACCCAATCC	[9]
PMA-R	GAAACCTCTGGAAGCAAATTCG	[9]
PMA1-S	FAM-AGATGTCCACGAAAACTACAAAACACCGTT-TAMRA	[9]
ERG11-F	AACTACTTTTGTATAAATTAAGATGGACTATTGA	[9]
ERG11-R	AATGATTTCTGCTGGTTCAGTAGGT	[9]
ERG11-S	FAM-TGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGG-TAMRA	[9]
MDR1-F	TTACCTGAAACTTTTGGCAAAAACA	[9]
MDR1-R	ACTTGTGATTCTGTCGTTACCG	[9]
MDR1-S	FAM-TCGCAAGGCTAAAAGATTGAGAGCCATCA-TAMRA	[9]
CDR1-F	TTTAGCCAGAATTTCACTCATGATT	[9]
CDR1-R	TATTTATTCTTCATGTTTCATATGGATTGA	[9]
CDR1-S	FAM-TAACCCATATGTCAGAAGTGCCCGGG-TAMRA	[9]
<b><u>TAC1 amplification and sequencing</u></b>		
Zinc2-604	ATAAGAGTGGCATGTGATA	[10]
Zinc2-1247c	TCTTACCCTATGAACCTA	[10]
Zinc2-1169	TGTTGGTACTCATTCAATT	[10]
Zinc2-1798c	ACATCAACAATGCTTCTAC	[10]
Zinc2-1708	CAGAATTCGTTGGAGAATA	[10]
Zinc2-2465c	TCTCTCGCCTAATTGACGT	[10]
Zinc2-2242	GCCTTGTACAAATCAAGAA	[10]
Zinc2-3087c	GGTGTTCCTGTACCACAA	[10]
Zinc2-3004	TCCAAAACCATGCGGAAT	This study
Zinc2-ORFR2	CATCGCTTTCACCAATTACAA	This study
<b><u>MRR1 amplification and sequencing</u></b>		
ZCF36-9	GACACTCGAGTCTCGCAAATTTCTGACC	[11]
ZCF36seq6	CATCCTTGATATCCGTTTCACC	[11]
ZCF36seq2	CAGTTTACTTTATCCATTTATGCC	[11]
ZCF36seq5	CCCTTGGTAATCTTCCACGC	[11]
ZCF36-300F*	CGAAGCTCCTCGAAAGAAAC	This study
ZCF36-1167R*	GGGAACAACATCATTGAAACC	This study
ZCF36-1572F*	CCCTGAAGCACAAAGACATGA	This study
ZCF36-2053R*	ACCCAGGAAACACCAAGTTTG	This study
ZCF36-2531F	TGCAACACCATGCTGAAAAT	This study
ZCF36-3124R	GCGATTGAGATTGTGACTGC	This study
<b><u>UPC2 amplification and sequencing</u></b>		
UPC2-3B*	GCTTCATTAGCACAGTTGCCATC	[15]
UPC2-4A*	TTATGGGCCACAGTAACGAATCACATTGTG	[15]
UPC2-4B	GCATTCAACTACTGCCTTTAGTGC	[15]
UPC2-5A	GCCATTTATGATGATGACAGTGA	This study
UPC2-5B	TACTGCGACCAAATGGATCA	This study
<b><u>Determination of the mating type</u></b>		
MTLalpha 1-F	TACATTCTGGTCGCGATGCTC	[7]
MTLalpha 1-R	GTAATCCAAAGCCTCGCATAA	[7]
MTLa-F	TAAGAATGAAGACAACGAGG	[7]
MTLa-R	CGTGTTTTCTGCTATCAATTC	[7]

\*Additional primers used for sequencing

**Table S2:** Transcript level measurement of *ACT1*, *PMA1*, *MDR1*, *CDR1* and *ERG11* by RT-PCR in a set of 10 FLC-susceptible clinical isolates of *Candida albicans*

Isolate	RNA expression level by RT-PCR ( $\Delta$ Ct)				
	<i>PMA1</i>	<i>ACT1</i>	<i>CDR1</i>	<i>MDR1</i>	<i>ERG11</i>
CAAL3	11.44	11.78	14.36	17.08	13.05
CAAL5	11.54	11.71	16.07	13.94	11.99
CAAL12	12.28	11.87	14.95	13.01	12.84
CAAL17	10.39	11.43	14.83	17.63	12.14
CAAL20	10.22	10.32	14.70	17.96	13.11
CAAL39	11.63	11.14	16.28	13.63	12.30
CAAL93	10.05	11.58	16.76	11.72	13.15
CAAL94	11.53	11.26	15.67	16.88	13.08
CAAL96	10.64	11.18	14.30	18.50	12.04
CAAL97	10.90	10.91	14.24	18.26	12.71
Mean $\Delta$ Ct	11.06	11.32	15.22	15.86	12.64
SD	0.73	0.47	0.91	2.51	0.48
+/- Fold range expression level	1.66	1.38	1.88	5.70	1.39
1.5-SD range	[9.96-12.15]	[10.61-12.38]	[13.85-16.58]	[12.09-19.62]	[11.92-13.36]
3-SD range	[8.87-13.25]	[9.91-12.72]	[12.48-17.95]	[8.33-23.39]	[11.21-14.07]

### References

- 1 Johnson EM. Rare and Emerging *Candida* Species. Current Fungal Infection Reports 2009;3: 1259-1159.
- 2 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007;20:133-163.
- 3 Rautemaa R, Richardson M, Pfaller M, Koukila-Kähkölä P, Perheentupa J, Saxén H. Decreased susceptibility of *Candida albicans* to azole antifungals: a complication of long-term treatment in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) patients. J Antimicrob Chemother 2007;60:889-892.
- 4 Siikala E, Rautemaa R, Richardson M, Saxen H, Bowyer P, Sanglard D. Persistent *Candida albicans* colonization and molecular mechanisms of azole resistance in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) patients. J Antimicrob Chemother 2010;65:2505-2513.
- 5 Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2378-2386.
- 6 Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002;2:73-85.
- 7 Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bounoux ME, d'Enfert C et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. Eukaryot Cell 2007;6:1889-1904.
- 8 Cernicka J, Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. Int J Antimicrob Agents 2006;27:403-408.
- 9 Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2124-2131.
- 10 Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A et al. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. Genetics 2006;172:2139-2156.

- 11 Dunkel N, Blass J, Rogers PD, Morschhäuser J. Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* 2008;69:827-840.
- 12 Dunkel N, Liu TT, Barker KS, Homayouni R, Morschhäuser J, Rogers PD. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell* 2008;7:1180-1190.
- 13 Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 2009;9:1029-1050.
- 14 Bruzual I, Kumamoto CA. An MDR1 promoter allele with higher promoter activity is common in clinically isolated strains of *Candida albicans*. *Mol Genet Genomics*. 2011;286:347-357.
- 15 Heilmann CJ, Schneider S, Barker KS, Rogers PD, Morschhäuser J. An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:353-359.
- 16 McManus BA, McGovern E, Moran GP, Healy CM, Nunn J, Fleming P et al. Microbiological screening of Irish patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy reveals persistence of *Candida albicans* strains, gradual reduction in susceptibility to azoles, and incidences of clinical signs of oral candidiasis without culture evidence. *J Clin Microbiol* 2011;49:1879-1889.
- 17 Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66:373-384.
- 18 Alvarez-Rueda N, Fleury A, Morio F, Pagniez F, Gastinel L, Le Pape P. Amino Acid Substitutions at the Major Insertion Loop of *Candida albicans* Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase Are Involved in Fluconazole Resistance. *PLoS One* 2011;6:e21239.
- 19 Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization

of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother.* May 2012 [Epub ahead of print].

20 CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third edition. Approved standard M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

21 Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:330-343.

22 Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010;13:180-195.

23 Brun S, Bergès T, Poupard P, Vauzelle-Moreau C, Renier G, Chabasse D et al. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1788-1796.

24 Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AG et al. Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4527-4533.

25 Weiler S, Lass-Flörl C, Auberger J, Bellmann-Weiler R, Stein M, Joannidis M et al. Triazole-resistant candidaemia following posaconazole exposure. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:494-495.

26 Rustad TR, Stevens DA, Pfaller MA, White TC. Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology* 2002;148:1061-1072.

27 Coste AT, Crittin J, Bauser C, Rohde B, Sanglard D. Functional analysis of cis- and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryot Cell* 2009;8:1250-1267.

28 Lyons CN, White TC. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2296-2303.

29 Schubert S, Popp C, Rogers PD, Morschhäuser J. Functional dissection of a *Candida albicans* zinc cluster transcription factor, the multidrug resistance regulator Mrr1. *Eukaryot Cell* 2011;10:1110-1121.

30 Flowers SA, Barker KS, Toner G, Chadwick SG, Gyax SE, Morschhäuser J et al. Novel UPC2 gain-of-function mutations in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. 11<sup>th</sup> ASM Conference on *Candida* and Candidiasis March 29-April 2, 2012, San Francisco, California, USA.



**Résistance aux antifongiques azolés chez  
*Aspergillus fumigatus***

---

**Etude n°1**

Prévalence élevée de la résistance d'*Aspergillus fumigatus* aux triazolés, principalement due à la mutation TR/L98H, dans une cohorte française de patients atteints de mucoviscidose

En comparaison des données disponibles pour les levures du genre *Candida*, la résistance acquise des *Aspergillus* aux antifongiques azolés est longtemps restée inexplorée. Une des raisons pour cela est que la détermination de la sensibilité *in vitro* des champignons filamenteux aux antifongiques est rarement réalisée en routine dans les laboratoires de mycologie. Bien qu'encore rare, évaluée autour de 2 % dans une méta-analyse récente, comprenant près de 5000 isolats cliniques (Howard et Arendrup, 2011), ces dernières années, un nombre croissant de publications rapportant la description de souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés ont été publiées. Si la résistance aux antifongiques azolés repose principalement sur les mutations sur le gène *CYP51A*, un nouveau mécanisme, reposant sur la duplication d'une région de 34 pb au sein de la région promotrice du gène *CYP51A*, associée à la substitution L98H sur la séquence codante de *CYP51A*, connu sous l'acronyme TR<sub>34</sub>/L98H a été décrit en 2007 (Mellado *et al.*, 2007). A la différence des mutations sur le gène *CYP51A*, la présence du TR/L98H est associée le plus souvent à un phénotype de multirésistance aux azolés (itraconazole, voriconazole et posaconazole), posant un réel problème en thérapeutique (Mellado *et al.*, 2007 ; Verweij *et al.*, 2007 ; Verweij *et al.*, 2009a). L'hypothèse actuelle est que l'émergence de ce mécanisme pourrait être liée à l'utilisation intensive de fongicides azolés dans l'agriculture. Initialement rapporté au Pays-Bas, ce mécanisme a été également décrit dans plusieurs autres pays d'Europe, en Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, France, Italie, et Royaume-Uni mais également très récemment en Chine et en Inde (Howard *et al.*, 2009 ; Verweij *et al.*, 2009b ; Mortensen *et al.*, 2010 ; Lockhart *et al.*, 2011 ; Mortensen *et al.*, 2011 ; Chowdhary *et al.*, 2012). La prévalence de ce mécanisme apparaît très variable en fonction des pays ; TR/L98H étant porté par plus de 90 % des isolats au Pays-Bas mais peu fréquent au Royaume-Uni (Snelders *et al.*, 2008 ; Verweij *et al.*, 2009b ; Bueid *et al.*, 2010 ; Van der Linden *et al.*, 2011b). Les raisons de cette différence sont encore mal connues mais pourraient reposer sur le type de population étudiée. Au cours de la mucoviscidose, la colonisation fongique des voies aériennes en particulier à *A. fumigatus* est un événement fréquent pouvant conduire à l'instauration d'un traitement par azolés notamment en cas d'ABPA. Ainsi, dans une étude conduite dans notre centre hospitalier, 70 % des patients avaient au moins une culture positive à *A. fumigatus* (L'hirondel *et al.*, 2008). Dans cette population de patients, les données de prévalence de la résistance aux azolés sont extrêmement variables allant de moins de 1 % au Portugal à 4.5 % au Danemark (Amorim *et*

*al.*, 2010 ; Mortensen *et al.*, 2011). Aucune donnée n'était disponible en France au moment de notre étude.

Plusieurs questions restaient donc en suspens. Nous n'avions ainsi aucune notion de la prévalence, dans notre centre hospitalier, de la résistance à l'itraconazole d'*A. fumigatus* au cours de la mucoviscidose. Or, il s'agit d'une information capitale, notre établissement, par ailleurs Centre National de Référence pour la Mucoviscidose, assurant le suivi d'une cohorte de plus de 300 patients adultes dont certains transplantés pulmonaires, à risque d'infections invasives. Au-delà des chiffres de prévalence, la présence ou non de la mutation TR/L98H, pour laquelle peu de données étaient disponibles en France, constituait également une préoccupation importante.

Afin d'essayer d'y répondre, une étude rétrospective de 16 mois dans une cohorte de patients pris en charge au CHU de Nantes a été conduite. Les résultats sont présentés ci-après.

**Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012 May 17. [Epub ahead of print]**

**High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*,  
especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with  
cystic fibrosis**

Florent Morio<sup>1,2+</sup>, Guillaume G. Aubin<sup>2+</sup>, Isabelle Danner-Boucher<sup>3,4</sup>, Alain Haloun<sup>3,4</sup>, Emilie Sacchetto<sup>2</sup>, Dea Garcia-Hermoso<sup>5,6</sup>, Stéphane Bretagne<sup>5,6</sup>, Michel Miegerville<sup>1,2</sup>, Patrice Le Pape<sup>1,2</sup>.

+Both authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA1155–IICiMed, Faculté de Pharmacie, Nantes, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>Service de Pneumologie et Unité de Transplantation Thoracique, CHU de Nantes, Nantes, France; <sup>4</sup>Centre de Référence Maladies Rares pour la Mucoviscidose, CHU de Nantes, Nantes, France; <sup>5</sup>Institut Pasteur, Unité de Mycologie Moléculaire, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et des Antifongiques, Paris, France; <sup>6</sup>CNRS URA3012, Paris, France

**Objectives:** Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* due to a single azole resistance mechanism (TR/L98H) is increasingly reported in European countries. Data from patients with cystic fibrosis (CF) are limited. Our study aimed to investigate the prevalence and molecular mechanisms of azole resistance in *A. fumigatus* in a cohort of patients with CF.

**Methods:** Eighty-five *A. fumigatus* isolates from 50 CF patients, collected between January 2010 and April 2011, were retrospectively analysed for azole resistance using agar plates containing 4 mg/L itraconazole. MICs of itraconazole, voriconazole and posaconazole were determined according to EUCAST methodology for each isolate able to grow on this medium. Species identification was performed by sequencing of the *b-tubulin* gene. Sequencing analysis of the *cyp51A* gene and its promoter region was conducted.

**Results:** Nine isolates (four patients, 8% prevalence) were able to grow on itraconazole-containing agar plates. Itraconazole resistance was confirmed by EUCAST methodology (MICs >2 mg/L). All isolates had mutations in the *cyp51A* gene at residues previously

involved in azole resistance: L98H ( $n=5$ ), M220T ( $n=4$ ) and G54R ( $n=1$ ). One patient had three genetically distinct azole-resistant isolates identified during the study. The isolates with L98H that were recovered from three patients (6% prevalence) also had the 34 bp tandem repeat in the promoter region of *cyp51A* (TR/L98H) and displayed multiazole resistance.

Discussion: We report an 8% prevalence of itraconazole resistance in CF patients in our centre, mostly driven by TR/L98H (6%). Our data confirm that TR/L98H occurs in France and can be highly prevalent in CF patients.

## **Introduction**

*Aspergillus fumigatus* is widespread in the environment and is the main *Aspergillus* species responsible for human diseases in both immunocompromised and immunocompetent hosts. Inherently resistant to fluconazole, *A. fumigatus* is usually susceptible to the other triazole antifungal drugs, such as itraconazole, voriconazole or posaconazole, and voriconazole is the first-line therapy for invasive aspergillosis. Since the first two published cases in 1997,<sup>1</sup> an ever-growing number of studies focusing on acquired azole resistance in both clinical and environmental *A. fumigatus* isolates suggest that azole resistance is increasing.<sup>2,3</sup> Azole resistance mainly results from substitutions in the lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (encoded by the *cyp51A* gene).<sup>4</sup> In the Netherlands, the main mechanism involves a 34 bp tandem repeat in the promoter region of the *cyp51A* gene along with a leucine to histidine substitution at residue 98 (also referred to as TR/L98H), which confers multiazole resistance.<sup>3</sup> The main hypothesis explaining why TR/L98H is found in >90% of *A. fumigatus* azole-resistant isolates from the Netherlands relies on the widespread use of azole compounds in agriculture.<sup>5,6</sup> Outside the Netherlands, isolates with TR/L98H have been reported in most European countries, including Belgium, Denmark, the UK and Spain, and recently outside Europe, e.g. in India, suggesting a global spread of this resistance mechanism.<sup>2,5,7-9</sup> Whereas TR/L98H has also been recently reported in France, there are limited data regarding its prevalence in this country.<sup>10,11</sup> Here, we present the results of a 16-month retrospective study to determine the frequency and molecular mechanisms of azole-resistance in a cohort of patients with cystic fibrosis (CF).

## **Patients and Methods**

One hundred and forty-two sputum and bronchial aspiration samples (mean number of samples per patient=2.8; 1-18 samples per patient) from 50 CF patients (mean age=21 years; 5-46 years of age) admitted to the Pneumology Department of Nantes University Hospital (France) during January 2010 to April 2011 were analysed retrospectively. Ninety-seven of the 142 (68.3%) samples were positive for *A. fumigatus*. Twenty-six patients (52%) had several positive samples (two to six samples). Eighty-five of the 97 isolates (12 unavailable for analysis) were included in this study.

Azole resistance was screened by subculturing each isolate on agar plates containing 4 mg/L itraconazole. Plates were prepared in-house and contained RPMI 1640 medium (Sigma-

Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 2% D-glucose (Sigma-Aldrich) buffered with 3-(N-morpholino)propanesulphonic acid (MOPS; 0.165 M final concentration, Sigma- Aldrich) at pH 7.0 and 1.5% Bacto agar (Difco, Pont de Claix, France). Briefly, fresh conidia from a 7-day-old culture on Sabouraud dextrose agar slants with chloramphenicol (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were suspended in sterile water at a turbidity equivalent to that of a 0.5 McFarland standard. Plates were inoculated by dipping a sterile swab into the inoculum suspension and swabbing the entire agar surface. Plates were then incubated at 35°C for 72 h. Two *Aspergillus ustus* isolates were included as positive controls in each set of experiments. Itraconazole resistance was evaluated by Etest<sup>®</sup> (AB Biodisk, bioMérieux, France) for each isolate that was able to grow on azole-containing agar plates. Minimal inhibitory concentrations (MICs) for itraconazole, voriconazole and posaconazole were therefore determined by the reference microdilution according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) methodology (CNRMA, Institut Pasteur, Paris, France).<sup>12</sup> Isolates with MIC >2 mg/L were considered resistant to itraconazole<sup>13</sup> and voriconazole,<sup>4</sup> and isolates with MIC >0.25 mg/L resistant to posaconazole.<sup>14</sup>

Species identification of itraconazole-resistant isolates was performed by amplification and sequencing of the  $\beta$ -tubulin gene.<sup>15</sup> Each of these isolates was further subjected to the amplification and sequencing of the *cyp51A* gene, as described previously,<sup>10</sup> and of a 234 bp region of its promoter using the primers AFTR-F (5'-TAATCGCAGCACCACTTCAG-3') and AFTR-R (5'-GCCTAGGACAAGGACGAATG-3'). Nucleotide sequences were compared with the reference sequence of the *A. fumigatus* azole-susceptible strain CM237 (GenBank accession number AF338659). Genotyping of the itraconazole-resistant isolates was performed using four microsatellite markers with a global discriminatory power of 0.994, as described previously.<sup>16</sup> Briefly, amplification was carried out in a 20  $\mu$ L reaction mixture containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.1 mM each dNTP, 0.1  $\mu$ M each primer (Sigma, Paris, France), and 1 U of Amplitaq Gold *Taq* DNA polymerase (Applied Biosystems, Meylan, France). After an initial denaturation step at 94°C for 5 min, samples were amplified by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 59°C for 30 s, elongation at 72°C for 30 s, and then a final extension at 72°C for 30 min. Next, 2 $\mu$ L the PCR product was mixed with 13  $\mu$ L of HiDi Formamide (Applied Biosystems) containing 0.5  $\mu$ L of 6-carboxy-X-rhodamine-labeled Geneflo 625 size standard (Eurx, Gdansk, Poland). Capillary electrophoresis was performed using the ABI Prism 3730XL sequencer and allele



sizes were calculated with GeneMapper soft-ware (version 4; Applied Biosystems). Since the four microsatellite markers consist of di-nucleotide repeats, the alleles were considered to be different when a 2 bp difference was observed.

### **Results and Discussion**

Nine of the 85 isolates (four patients, 8% global prevalence) were able to grow on itraconazole-containing agar (Table 1). Sequencing of the  $\beta$ -tubulin gene confirmed that these isolates were *A. fumigatus sensu stricto*. Each isolate also had high MICs by Etest®. Itraconazole-resistance was confirmed using EUCAST methodology, with all isolates having MIC >2 mg/L. Distinct patterns of antifungal susceptibility were observed for voriconazole and posaconazole (Table 1). Importantly, five out of the nine isolates, coming from three patients (Patients 1, 2 and 3, Table 1), displayed multiazole resistance (resistance to itraconazole, voriconazole and posaconazole). Previous exposure to mould-active azoles exposure (mostly itraconazole) was recorded for each of these patients.

To provide further insight into the mechanisms responsible for azole resistance in these isolates, we amplified the *cyp51A* coding sequence and its promoter. The nine itraconazole-resistant isolates displayed mutations in the *cyp51A* gene at residues previously linked to azole resistance: L98H ( $n=5$ ), M220T ( $n=4$ ) and G54R ( $n=1$ ) (Table 1). All isolates with L98H also displayed the 34 bp tandem repeat (TR/L98H) and were recovered from three patients (6% global prevalence in CF). As expected, isolates with TR/L98H displayed multiazole resistance.<sup>4</sup> Patient 3 had three *A. fumigatus* isolates with distinct azole resistance mechanisms on three separate samplings. Compared with TR/L98H, M220T was associated with itraconazole resistance but lower MICs of voriconazole. Combination of M220T with G54R was associated with resistance to posaconazole, but voriconazole retained significant *in vitro* activity (MIC=0.25 mg/L).

Overall, whereas the acquisition of TR/L98H in patients 1, 2 and 3 can hardly be excluded from having arisen from long-term azole therapy (as none of these patients was “azole-naïve”), the main hypothesis is that these patients were contaminated by *A. fumigatus* itraconazole-resistant isolates from their environment.<sup>5</sup> This hypothesis is supported by microsatellite typing data, as Patients 1, 2 and 3 displayed almost identical TR/L98H genotypes (Table 1). In stark contrast, other isolates (including itraconazole-susceptible isolates from these patients) had completely different genotypes (Table 1).

**Table 1.** MICs and Cyp51A amino acid alterations for azole-resistant *A. fumigatus* isolates

Patient	Sex/age (years)	Isolate identification number	Date of isolation (day/month/year)	Growth on ITC-containing agar plates	MICs by EUCAST methodology (mg/L)			Cyp51A alteration	Length of microsatellite markers (bp) <sup>15</sup>			
					ITC	VRC	POS		AspA	AspB	AspC	AspD
1 <sup>a</sup>	M/30	70041901	28/01/2010	+	≥8	2	1	TR/L98H	106	118	175	92
		70067922	30/11/2010	+	≥8	4	0.5	TR/L98H	106	118	175	92
		70070375	28/12/2010	+	≥8	4	1	TR/L98H	106	118	175	92
2 <sup>b</sup>	M/41	70054925	01/07/2010	+	≥8	4	1	TR/L98H	106	118	175	98
3 <sup>c</sup>	M/25	70048399	15/04/2010	+	≥8	4	0.5	TR/L98H	106	118	175	92
		70056323	15/07/2010	+	≥8	0.25	2	G54R, M220T	118	106	165	94
		70061397	06/10/2010	+ <sup>d</sup>	≥8	0.5	0.5	M220T	104	105	175	112
		70075298	22/02/2011	-	0.25	0.5	0.125	WT	139	129	169	ND
4 <sup>e</sup>	F/18	70053499	15/06/2010	-	0.125	0.125	0.06	WT	124	142	165	96
		70071183	07/01/2011	+	≥8	0.5	0.25	M220T	124	104	173	111
		70073662	03/02/2011	+	≥8	0.5	0.25	M220T	124	104	173	111

M, male; F, female; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; POS, posaconazole; +, positive growth on ITC-containing agar plates; -, no growth on ITC-containing agar plates; WT, wild-type sequence; ND, not detected.

<sup>a</sup>The patient was given ITC from 2007 for chronic *Aspergillus* colonization while awaiting lung transplantation.

<sup>b</sup>The patient had received ITC for 6 months in 2000 for allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) and several courses of VRC before 2010.

<sup>c</sup>The patient was given ITC for chronic *Aspergillus* colonization from 2009 to April 2011.

<sup>d</sup>Growth on ITC-containing agar plate after prolonged incubation.

<sup>e</sup>The patient had received several courses of ITC since June 2010 for ABPA.

One interesting finding is the description of Patient 1, who was colonized for 11 months by a unique itraconazole-resistant *A. fumigatus* isolate with TR/L98H upon genotyping. Such chronic colonization by a multiazole-resistant isolate in the course of CF, also reported in another study,<sup>8</sup> must be considered in antifungal management strategies after lung transplantation. However, our study also illustrates that colonization of the respiratory tract by *A. fumigatus* in the course of CF is a complex and dynamic process, as illustrated here with: i) the recovery of multiple azole-resistant isolates from a single patient (Patient 3), ii) the recovery of itraconazole-susceptible isolates before (Patient 4) or after the recovery of itraconazole-resistant isolates (Patient 3).

In previous studies, the prevalence of itraconazole-resistance ranged was <1%, 4.5% and 4.6% in Portugal,<sup>17</sup> Denmark<sup>8</sup> and France, respectively.<sup>11</sup> Here, we report a high prevalence of itraconazole resistance in *A. fumigatus* isolated from CF patients at our centre (4/50 patients, 8%). Importantly, TR/L98H was the main mechanism responsible for azole resistance in our study (3/50 patients, 6%), confirming that TR/L98H is prevalent in France.<sup>5,11</sup> Of note, TR/L98H was not reported in the single study focusing on patients with haematological malignancies in France,<sup>10</sup> providing evidence that the prevalence of TR/L98H and more generally azole resistance varies from centre to centre and probably also according to the underlying diseases.<sup>18</sup> Indeed, azole resistance has been especially described in CF and in patients with chronic pulmonary aspergillosis or allergic bronchopulmonary aspergillosis, with a prevalence rate as high as 75%.<sup>19</sup> On the other hand, azole resistance has been shown to be lower but highly variable in patients with haematological malignancies, with prevalence rates varying from 0.01% to 9.4%.<sup>10,18</sup>

As already shown, itraconazole-containing plates are easy-to-use in a routine mycology laboratory, offering the possibility of screening large collections of clinical strains at low cost.<sup>8</sup> However, the use of a concentration of 4 mg/L of itraconazole, which has also been reported by others,<sup>8,9,18</sup> but is above the susceptibility breakpoint for *A. fumigatus* ( $\leq 1$  mg/L),<sup>13</sup> might be a limitation of our study as some non-susceptible isolates could have been missed.

In summary, the present study highlights a high prevalence of itraconazole resistance in *A. fumigatus*, mostly driven by TR/L98H, in CF patients at our centre. From a more global perspective, nationwide and multi-centre surveys involving medical centres responsible for the management of patients being at high risk of invasive aspergillosis, such as those with CF, are urgently needed to evaluate the burden of azoleristance in *A. fumigatus*.

**Funding sources:** This study was supported by internal funding.

**Transparency declaration:** None to declare.

**Acknowledgements**

*Part of this work has been presented at the Fifth Congress on Trends in Medical Mycology, Valencia, Spain, 2011 (Abstract no. 308).*

## References

1. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL *et al.* Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:1364-8.
2. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ *et al.* Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; **15**: 1068-76.
3. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J *et al.* Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 2008; **5**: e219.
4. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ *et al.* Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Update* 2009; **12**: 141-7.
5. Verweij PE, Snelders E, Kema GH *et al.* Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009; **9**: 789-95.
6. Snelders E, Camps SM, Karawajczyk A *et al.* Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*. 2012; **7**: e31801.
7. Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa HS *et al.* Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the cyp51A gene in India. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 362-6.
8. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK *et al.* *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 2243-51.
9. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C *et al.* Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4545-9.
10. Alanio A, Sitterle E, Liance M *et al.* Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 371-4.
11. Burgel PR, Baixench MT, Amsellem M *et al.* High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 869-74.
12. EUCAST. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 982-4.

13. EUCAST. *Itraconazole and Aspergillus spp. Rationale for the EUCAST Clinical Breakpoints*, version 1.0. 2012. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Rationale\\_documents/Itracozazole\\_Aspergillus\\_v1\\_0f.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Itracozazole_Aspergillus_v1_0f.pdf) (date last accessed: 25 April 2012)
14. EUCAST. *Posaconazole and Aspergillus spp. Rationale for the EUCAST Clinical Breakpoints*, Version 1.0. 2012. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Voriconazole\\_consultation\\_120315.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Voriconazole_consultation_120315.pdf) (date last accessed: 25 April 2012)
15. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E *et al.* *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2005; **4**: 625-32.
16. Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E *et al.* Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2413–8.
17. Amorim A, Guedes-Vaz L, Araujo R. Susceptibility to five antifungals of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from chronically colonised cystic fibrosis patients receiving azole therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 396-9.
18. Van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA *et al.* Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 1846-54.
19. Denning DW, Park S, Lass-Florl C *et al.* High-frequency triazole resistance found In nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 1123-9.

Chapitre III  
Conclusion générales et perspectives

*Candida albicans* et *A. fumigatus* sont deux champignons cosmopolites d'importance médicale majeure car à l'origine d'un large éventail de manifestations cliniques dont l'impact médico-économique est considérable. Les atteintes superficielles dues aux *Candida* et en particulier à *C. albicans*, habituellement bénignes, sont extrêmement fréquentes. A l'échelle mondiale, 75 millions de femmes souffrent de candidoses vulvo-vaginales récidivantes et 9.5 millions de sujets développent un muguet buccal chaque année (Sobel, 2007 ; Fungal Trust Research, 2011). En plus de ces atteintes superficielles, les *Candida* et dans près de la moitié des cas *C. albicans*, sont responsables d'infections invasives affectant chaque année près de 300 000 individus pour une mortalité élevée, comprise entre 30 et 55 % (Fungal Trust Research, 2011). Les manifestations cliniques des infections à *Aspergillus* sont principalement respiratoires, *A. fumigatus* étant impliqué dans 80 à 90 % des cas. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique affecte 4 millions de sujets asthmatiques à travers le monde et près de 15 % des patients atteints de mucoviscidose, le nombre d'individus concernés par l'aspergillose chronique étant lui évalué à 4 millions. Enfin, l'aspergillose invasive forme clinique la plus grave concerne chaque année 200 000 individus et est associée à une mortalité là encore élevée de l'ordre de 50 % (Fungal Trust Research, 2011).

Chez la plupart de ces patients et notamment dans le cas des infections invasives, le recours à un traitement antifongique est indispensable, la famille des azolés constituant alors des molécules de choix (Walsh *et al.*, 2008 ; Pappas *et al.*, 2009). Cependant, une acquisition de résistance peut survenir, résultat le plus souvent de traitements sur des périodes prolongées et compromettant le succès thérapeutique. Celle-ci peut affecter une ou plusieurs molécules d'une même classe conférant ainsi un profil de multi-résistance (Moudgal *et al.*, 2005 ; Myoken *et al.*, 2006 ; Verweij *et al.*, 2007 ; de Carvalho *et al.*, 2011). Si le phénomène de résistance aux antifongiques chez les champignons du genre *Candida* et *Aspergillus* ne possède pas encore la même ampleur que celui de la résistance aux antibiotiques, il constitue néanmoins un problème médical du fait de son caractère imprévisible, mais surtout du fait du nombre limité de molécules antifongiques disponibles pour la prise en charge de ces infections.

L'exploration de la résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans* et *A. fumigatus*, axe de recherche de notre travail, constitue donc une problématique d'actualité, au cœur des préoccupations de santé. Dans ce travail de recherche nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes participant à la résistance aux azolés d'isolats cliniques de



*C. albicans* et d'*A. fumigatus*. Nos principaux résultats sont discutés ci-dessous au regard de la littérature.

❖ **Résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans* : bilan et perspectives**

La survenue de mutations sur le gène *ERG11*, codant la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, constitue l'un des principaux mécanismes conduisant à la résistance aux antifongiques azolés chez les isolats cliniques de *C. albicans* (Sanglard et Odds, 2002). A ce jour, au moins 140 mutations différentes sur ce gène ont été rapportées et illustrées dans la revue de la littérature réalisée à l'occasion de notre première étude. Cependant, l'implication dans la résistance a été confirmée de manière expérimentale, notamment par mutagenèse dirigée puis expression hétérologue chez *S. cerevisiae*, pour seulement une dizaine d'entre elles (Akins, 2005). Il s'agit notamment des mutations Y132H, S405F, G464S ou R467K dont l'impact au niveau de la structure tridimensionnelle de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase (CaCyp51) a pu être évalué (Sanglard *et al.*, AAC 1998 ; Kelly *et al.*, 1999 ; Lamb *et al.*, 2000 ; Perea *et al.*, 2001 ; Chau *et al.*, 2004). L'implication de nombreuses mutations rapportées chez des isolats cliniques résistants au fluconazole reste donc encore à évaluer.

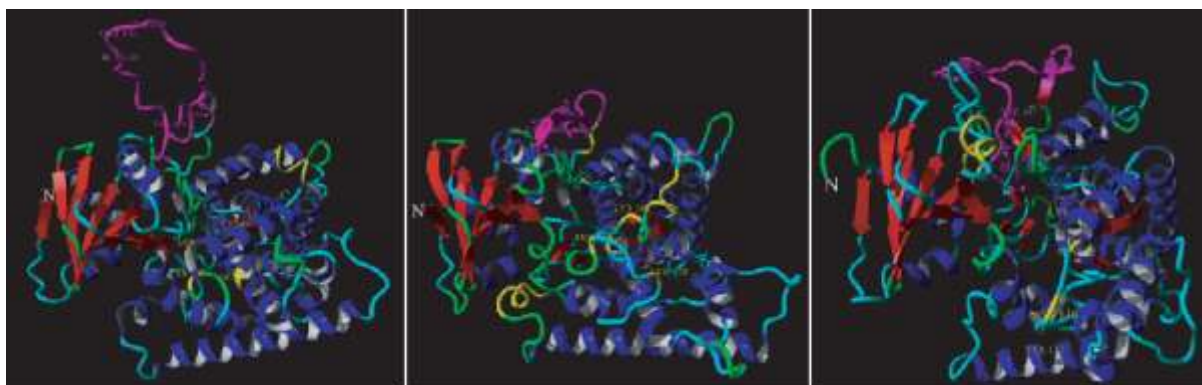
Une connaissance approfondie du polymorphisme du gène *ERG11* étant incontestablement nécessaire pour mieux comprendre et interpréter l'impact des mutations observées, le premier objectif de notre travail de recherche a été d'évaluer ce polymorphisme sur une large collection d'isolats cliniques de *C. albicans* résistants mais également d'isolats sensibles aux antifongiques azolés. En considérant les nouveaux seuils d'interprétation clinique établis par le CLSI, 19 isolats de cette collection présentaient une sensibilité diminuée au fluconazole (CMI > 2  $\mu\text{g/mL}$ ), 17 d'entre eux pouvant être considérés comme résistants (CMI  $\geq$  8  $\mu\text{g/mL}$ ) (Pfaller *et al.*, 2010a). Afin de fournir une image la plus complète possible et ne pas limiter l'analyse aux trois hotspots de mutations décrits par Marichal *et al.*, l'intégralité de la séquence codante du gène *ERG11* (1451 pb) a été étudiée pour chaque isolat (Marichal *et al.*, 1999). En accord avec les données de la littérature, il apparaît que la survenue de mutations ponctuelles sur le gène *ERG11* est un évènement fréquent, observé non seulement chez les isolats résistants aux azolés mais également chez les souches sensibles (Marichal *et al.*, 1999 ; Chau *et al.*, 2004). Au total, seules 13 des 73 souches incluses dans notre étude, en majorité des hémocultures (n=6), ne présentaient aucune mutation sur ce gène. Toutes les souches résistantes au fluconazole (n=19, CMI  $\geq$  8  $\mu\text{g/mL}$ ) présentaient des mutations, en nombre

variable, sur le gène *ERG11*. Deux isolats résistants au fluconazole présentaient des mutations non décrites à ce jour.

*In fine*, cette étude a permis de caractériser 23 mutations distinctes dont quatre n'avaient jamais été rapportées auparavant : N136Y, Y221H, L276S et Y447H. La cartographie de ces 23 mutations est en accord avec les données de Marichal, la très grande majorité d'entre-elles se localisant au niveau des trois hotspots compris entre les positions 105 à 165, 266 à 287 et 405 à 488 (Marichal *et al.*, 1999). La mise en évidence des mutations D116E, K128T, G129A, D153E, V159I, E266D, V437I et V488I, déjà rapportées dans d'autres études, mais également Y221H et L276S chez des souches présentant des CMI's basses vis-à-vis des azolés, confirme que ces mutations ne confèrent pas la résistance (Franz *et al.*, 1998 ; Favre *et al.*, 1999 ; Marichal *et al.*, 1999 ; Perea *et al.*, 2001 ; White *et al.*, 2002 ; Chau *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2004 ; Park et Perlin, 2005 ; Xu *et al.*, 2008). A l'opposé, 12 mutations ont été uniquement identifiées chez des isolats présentant une sensibilité diminuée au fluconazole : Y132F, Y132H, N136Y, K143R, F145L, G307S, S405F, Y447H, G448E, G448V, G450E et V456I. En dehors des substitutions en position 132 et 405 dont l'implication dans la résistance a été confirmée par mutagenèse dirigée, ces résultats indiquaient l'implication potentielle des autres mutations et notamment des deux nouvelles mutations, N136Y et Y447H dans la résistance aux azolés. L'étude de la position de la mutation N136Y dans la structure tridimensionnelle de CaCyp51 montrait sa localisation à l'entrée du tunnel 1 et donc une possible interférence avec l'entrée de l'antifongique. Par ailleurs, sa position au sein de l'hélice C, proche de la boucle BC, région présentant une énergie thermique élevée suggèrait la possibilité de modification conformationnelle de la protéine et permettait de proposer également son implication dans la perturbation de la liaison de l'antifongique au niveau du site actif en cas de conformation fermée de la boucle BC (Xiao *et al.*, 2004). Toutefois, la présence concomitante de la mutation Y132H, déjà impliquée dans la résistance, soulevait des questions quant à l'implication réelle de N136Y dans le phénotype de résistance observé. L'impact potentiel de la mutation Y447H était quant à lui difficile à déterminer du fait de sa localisation au sein d'une boucle comprise entre les résidus 428 à 459 (entre l'hélice K' et L), absente dans la séquence de MtCyp51 et donc non modélisable (Podust *et al.*, 2001a). Pour la même raison, l'implication dans la résistance aux azolés de plusieurs autres mutations déjà décrites au sein de cette boucle (G448E, G448V, G450E et V456I), restaient également difficile à expliquer. L'observation supplémentaire de la forte conservation dans le règne fongique de l'asparagine 136 et de la tyrosine 447, nous a cependant conduits à proposer la

participation de ces deux nouvelles mutations à la résistance de *C. albicans* aux antifongiques azolés.

Récemment, l'implication de N136Y, Y447H mais également de V456I, dans la résistance de *C. albicans* au fluconazole a pu être confirmée par mutagenèse dirigée puis expression hétérologue chez *Pichia pastoris*, dans notre laboratoire (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011 ; Alvarez-Rueda *et al.*, 2012). En effet, la présence des mutations N136Y et Y447H est associée respectivement à une augmentation d'un facteur 4 et 8 de la CMI au fluconazole chez les mutants de *P. pastoris*. Comme attendu, la capacité de production d'ergostérol, même en présence de fluconazole, est maintenue chez les mutants N136Y et Y447H. Forts de ces résultats, confirmant l'impact des mutations Y447H et V456I dans la résistance aux azolés, toutes les deux situées au sein de cette boucle d'insertion de 31 acides aminés, un nouveau modèle hybride tridimensionnel de CaCyp51 a alors été proposé (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011). Ce nouveau modèle hybride s'appuyant sur la séquence consensus de plusieurs séquences protéiques de Cyp51 de divers organismes pour lesquelles la structure cristalline est connue. Cette approche a permis de montrer l'importante flexibilité, probablement du fait d'une forte teneur en glycine, de cette zone d'insertion (Figure ci-dessous).



Position variable de la séquence d'insertion présente chez *C. albicans* dans trois modèles tridimensionnels de CaCyp51 reposant sur l'homologie avec (de gauche à droite) : Cyp51 humaine en association au kétoconazole (ModWeb, 3ld6), Cyp51 de *M. tuberculosis* en association au 4-phénylimidazole (SwissModel, 1e9x), prostacycline synthase Cyp450 8a1 de zebrafish (ModWeb3b98).

Source : Alvarez-Rueda *et al.*, 2011

A l'image de l'organisation spatiale de cette région dans la séquence de Zebrafish (Sd98), le résidu tyrosine 447 pourrait se superposer au motif catalytique GGGRHRC de l'enzyme et sa substitution pourrait être responsable d'une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le fluconazole. Il est intéressant de noter que ce modèle hybride pourrait aussi rendre compte de

l'impact de la mutation Y431C chez *A. fumigatus* (homologue de Y447H chez *C. albicans*), associée à un phénotype de résistance aux azolés (Howard *et al.*, 2009).

La meilleure connaissance des mécanismes de résistance de *C. albicans* aux azolés, en particulier vis-à-vis du gène *ERG11*, est également une étape essentielle dans la conception rationnelle de nouveaux azolés inhibiteurs de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase (Xiao *et al.*, 2004 ; Sheng *et al.*, 2010). Un exemple concret de l'apport de nos travaux à la conception de nouveaux candidat-médicaments est illustré par le développement récent, dans notre laboratoire, d'une nouvelle série chimique issue de la pharmacomodulation du fluconazole suite au remplacement d'un des noyaux triazole de la chaîne latérale par un groupement benzylamine para-sulfonamide ou para-rétrosulfonamide (Guillon *et al.*, 2011). Plusieurs dérivés de cette série chimique, inhibiteurs démontrés de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, se sont avérés très actifs sur *C. albicans* vis-à-vis des souches sensibles au fluconazole (CMI de l'ordre de <0.001 à 0.07  $\mu$ g/mL) mais également de deux souches résistantes, pour lesquelles les CMI observées étaient en moyenne de 10 à 50 fois plus faibles que celles obtenues avec le fluconazole (Guillon *et al.*, 2011). La mise en perspective de ces résultats par rapport aux mécanismes de résistance de ces isolats montre que cette nouvelle série chimique serait capable de contourner le phénomène de résistance, en particulier les mécanismes d'efflux médiés par les transporteurs ABC-dépendants Cdr1 et Cdr2 ainsi que la substitution Y132H, tous deux fréquemment observés chez les isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azolés (Sanglard *et al.*, 1998 ; Kelly *et al.*, 1999 ; Marichal *et al.*, 1999).

En conclusion, cette première étude permet de souligner l'importance et la fréquence des mutations sur le gène *ERG11* dans la résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans*. Les travaux réalisés au sein de notre équipe dans la continuité de nos travaux ont permis de confirmer l'implication de la mutation N136Y ainsi que des mutations situées dans la boucle d'insertion, dont la mutation Y447H, dans la résistance. Néanmoins, comme illustré dans notre revue de la littérature, le phénotype de résistance de certains isolats cliniques ne peut être expliqué uniquement par l'analyse du polymorphisme du gène *ERG11* et relève, à l'évidence, d'autres mécanismes. Une exploration plus approfondie des mécanismes de résistance a donc été conduite chez plusieurs de ces isolats cliniques.

Décrite initialement chez *S. cerevisiae*, puis chez *C. albicans* ainsi que chez *C. dubliniensis*, *C. glabrata* et *C. lusitaniae*, l'implication de la C5 désaturase (Erg3) dans la

résistance aux azolés est encore peu explorée. La survenue de mutations sur le gène *ERG3* est considérée comme un mécanisme rarement observé chez les isolats cliniques, comme en atteste le faible nombre de publications relatives à ce sujet en comparaison des données existantes sur le gène *ERG11* ou sur l'implication des transporteurs d'efflux. Sa faible prévalence a été attribuée à la moindre virulence des mutants *erg3* suggérée par les résultats obtenus dans les modèles expérimentaux de candidoses invasives (Nolte *et al.*, 1997 ; Chau *et al.*, 2005 ; Miyazaki *et al.*, 2006). Celle-ci a été associée à la vitesse de croissance plus faible *in vitro* de ces souches ainsi qu'à leur défaut de filamentation, observé *in vitro* et *in vivo*, leur procurant un désavantage sélectif, la transition de la forme levures à la forme filamenteuse participant à la virulence (Sanglard *et al.*, 2003 ; Chau *et al.*, 2005 ; Miyazaki *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'observation de l'efficacité *in vivo* du fluconazole sur un mutant *erg3* malgré un phénotype de résistance *in vitro* a contribué à remettre en cause l'impact réel de ce mécanisme en clinique (Miyazaki *et al.*, 2006). Toutefois, les données actuellement disponibles s'accumulant, l'impact de ce mécanisme apparaît bien réel comme en atteste la description de mutants *erg3* chez des patients présentant une infection invasive ou en situation d'échec thérapeutique (Nolte *et al.*, 1997 ; Chau *et al.*, 2005). Dans cette seconde étude, nous rapportons la caractérisation de deux nouveaux mutants *erg3* de *C. albicans* isolés de deux patients ayant reçu une prophylaxie antifongique par fluconazole. Ces deux souches présentaient une CMI inhabituellement élevée à l'amphotéricine B (respectivement 0.75 et 1 µg/mL) par méthode Etest<sup>®</sup> en comparaison des données habituellement observées pour cette espèce (Park *et al.*, 2006 ; Lacroix *et al.*, 2011). Sur le plan moléculaire, nous avons pu identifier deux nouvelles mutations présentes à l'état homozygote sur le gène *ERG3*, L193R pour la première souche, en association avec la mutation V351A (déjà décrite chez des souches sensibles aux azolés) et une délétion de 13 pb ( $\Delta$ 366-378) dans la séquence codante du gène *ERG3* pour la seconde souche, responsable d'un décalage de cadre de lecture conduisant à l'insertion prématurée d'un codon stop. A l'exception d'une surexpression du gène *ERG11*, aucun autre mécanisme de résistance n'a pu être identifié chez ces deux isolats. La responsabilité de ces mutations dans la perte de fonctionnalité de la C5 désaturase a été confirmée par le dosage des stérols membranaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les deux souches présentaient en effet chacune un profil des stérols membranaires similaire et caractéristique d'un blocage de la voie de biosynthèse au niveau de la C5 désaturase : taux très faible d'ergostérol et accumulation de stérols intermédiaires dont l'epistérol et l'ergosta 7,22-diénoles, ce dernier devenant le stérol

majoritaire (Sanglard *et al.*, 2003 ; Chau *et al.*, 2005 ; Martel *et al.*, 2010 ; Vale-silva *et al.*, 2012). Néanmoins, la preuve expérimentale formelle entre le phénotype de résistance observé et la présence de ces mutations sur le gène *ERG3* nécessiterait l'étude de l'effet de l'introduction de l'allèle muté chez une souche sauvage (Vale-Silva *et al.*, 2012).

*In vivo*, toutes les deux présentaient une virulence significativement atténuée dans notre modèle de candidose invasive chez la souris Swiss immunodéprimée (Test de Log rank,  $p < 0.05$ ). L'observation d'une moindre filamentation *in vitro* pourrait rendre compte de la plus faible virulence de ces deux isolats. Cette observation vient donc confirmer deux études récentes montrant que la perte de fonctionnalité de l'enzyme Erg3 n'est pas forcément associée à une perte totale de la capacité de filamentation (Martel *et al.*, 2010b, Vale-Silva *et al.*, 2012). A noter que dans cette dernière étude et contrairement à tous les travaux antérieurs (y compris les nôtres), l'altération de la fonctionnalité de la C5 désaturase n'était pas associée à une diminution de la virulence (Vale-Silva *et al.*, 2012). Aussi, dans une étude similaire, Chau *et al.*, montraient que ces mutants, malgré leur moindre virulence, conservaient leur capacité à envahir le rein (Chau *et al.*, 2005). Au total, il apparaît donc un certain nombre de contradictions entre ces résultats expérimentaux qui pourraient reposer, au moins en partie, sur les méthodologies différentes utilisées dans ces études et notamment la diversité des modèles expérimentaux de candidose invasive utilisés (utilisation de souris consanguines ou non par exemple) et le « fond génétique » des isolats étudiés. Il a été proposé que ces différences entre les observations *in vitro* et *in vivo* pourraient reposer sur la capacité, plus ou moins grande de *C. albicans*, à incorporer des stérols exogènes de l'hôte, comme le cholestérol en lieu et place de l'ergostérol (Vale-Silva *et al.* 2012). Cette particularité a été rapportée chez des protozoaires comme *Trypanosoma brucei* mais également dans le règne fongique, chez *A. fumigatus* ainsi que chez *S. cerevisiae* et *C. glabrata* (Andreasen et Stier, 1953 ; Coppens et Courtoy, 1995 ; Xiong *et al.*, 2005). Chez *A. fumigatus*, l'incorporation de cholestérol à la membrane permet de compenser la déplétion en ergostérol membranaire induite par les antifongiques azolés et explique la diminution de l'activité antifongique *in vitro* de l'itraconazole observée en présence de sérum (Xiong *et al.*, 2005). De la même manière, ce phénomène a été observé chez *C. glabrata* en cas de déplétion (ou de non fonctionnalité) de la squalène époxydase (Erg9) et de la lanostérol synthase (Erg7), deux enzymes impliquées dans les premières étapes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Nakayama *et al.*, 2000 ; Tsai *et al.*, 2004 ; Bard *et al.*, 2005). Cependant, les résultats expérimentaux ne semblent pas conforter l'existence de ce phénomène chez *C. albicans* (Bard

*et al.*, 2005 ; Vale-Silva *et al.*, 2012). L'absence des deux cibles potentielles de l'amphotéricine B, l'ergostérol et le cholestérol, pourrait expliquer la résistance croisée de ces mutants *erg3* avec l'amphotéricine B (Kelly *et al.*, 1997b ; Nolte *et al.*, 1997 ; Martel *et al.*, 2010).

L'étude de l'expression du gène *ERG11* chez nos deux mutants *erg3*, a révélé une surexpression de l'ordre de 3 à 4 fois par rapport à un panel de souches sensibles au fluconazole. A l'exception de deux isolats cliniques du Schering-Plough Research Institute cette surexpression de *ERG11* a été constatée chez l'ensemble des mutants *erg3* étudiés à ce jour (Sanglard *et al.*, 2003 ; Pierson *et al.*, 2004 ; Chau *et al.*, 2005 ; Miyazaki *et al.*, 2006). Cette surexpression pourrait s'expliquer par un phénomène de compensation (Geber *et al.*, 1995 ; Pinjon *et al.*, 2003 ; Pierson *et al.*, 2004 ; Miyazaki *et al.*, 2006). Toutefois, le mécanisme même de ce phénomène de compensation n'a pas été exploré. Le séquençage, chez nos deux mutants *erg3*, du gène codant le facteur de transcription Upc2, régulant l'expression du gène *ERG11*, montre que sa surexpression n'est pas liée à la présence de mutations gain de fonction sur son facteur de transcription, à la différence de la plupart des souches cliniques surexprimant le gène *ERG11* (données non publiées). La déplétion en ergostérol observée chez ces deux isolats, à l'image de celle induite par les azolés, pourrait constituer des conditions propices à l'activation du facteur de transcription Upc2 et donc à la surexpression de *ERG11* (Silver *et al.*, 2004 ; MacPherson *et al.*, 2005 ; Hoot *et al.*, 2008). L'existence de sites de fixation pour Upc2 dans la région promotrice des gènes *ERG2*, *ERG7* et *ERG25* pourrait aussi rendre compte de leur surexpression, concomitante à celle du gène *ERG11*, chez les mutants *erg3* (Pierson *et al.*, 2004 ; MacPherson *et al.*, 2005 ; Znaidi *et al.*, 2008). Ces observations permettent de suggérer le rôle d'Upc2 dans la surexpression du gène *ERG11* chez les mutants *erg3*, mais ne doivent pas faire oublier l'existence potentielle d'autres mécanismes Upc2-independants, encore non connus, participant à la régulation de l'expression du gène *ERG11* (Hoot *et al.*, 2008).

En conclusion, l'altération de la C5 désaturase résultant d'une ou plusieurs mutations non synonymes sur le gène *ERG3* est un mécanisme de résistance probablement sous-estimé car principalement suspecté chez les isolats présentant un profil de résistance croisé entre les antifongiques azolés et l'amphotéricine B. Or, comme illustré récemment par Martel *et al.*, ce profil de résistance croisée n'est pas toujours présent (Martel *et al.* 2010b). L'investigation systématique de ce mécanisme de résistance lors de l'exploration de souches de *C. albicans* résistantes aux antifongiques azolés mais également d'autres espèces de *Candida* devrait

permettre de mieux comprendre l'implication des mutations sur ce gène dans la fonctionnalité de la C5-désaturase et *in fine* la résistance aux azolés. Enfin, l'obtention de plusieurs souches mutantes *erg3* permettrait également d'approfondir la relation entre les altérations de cette enzyme, le défaut de filamentation et la virulence.

Dans les deux études précédentes nous nous sommes intéressés à l'implication de la voie de biosynthèse des stérols dans la résistance aux azolés à travers l'étude des mutations du gène *ERG11* codant la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase et du gène *ERG3* codant la C5 désaturase. Cependant, la possibilité d'autres mécanismes chez ces isolats cliniques, comme par exemple la surexpression constitutive des transporteurs d'efflux résultat d'une hyperactivation transcriptionnelle, n'avait pas été abordée jusqu'à présent. Or, l'acquisition de la résistance est un processus progressif, cumulatif, plusieurs mécanismes participant généralement au phénotype de résistance aux azolés des isolats cliniques (Chau *et al.*, 2004 ; Coste *et al.*, 2007 ; MacCallum *et al.*, 2010 ; Siikala *et al.*, 2010). Fort de ce constat, nous avons donc initié l'investigation la plus exhaustive possible des mécanismes moléculaires à l'origine de l'acquisition de la résistance aux azolés de nos isolats, à travers notamment l'étude de l'implication des transporteurs d'efflux et de leurs facteurs de transcription. Dans cette troisième étude, nous présentons nos premiers résultats, issu de l'analyse de six isolats cliniques résistants au fluconazole.

Nos résultats expérimentaux révèlent que la résistance aux azolés observée chez ces isolats cliniques, s'appuie sur plusieurs mécanismes distincts et combinés. En effet, en plus d'une ou plusieurs mutations associées à la résistance sur le gène *ERG11*, ces souches présentaient également un ou plusieurs autres mécanismes, comme une surexpression des transporteurs d'efflux Cdr1 et / ou Mdr1 et/ou une surexpression du gène *ERG11*. Aucune d'entre elles ne présentait de mutation sur le gène *ERG3*. Hélas, aucun autre isolat que la souche analysée n'étant disponible pour chacun des ces patients. La chronologie de l'acquisition de ces différents mécanismes n'a donc pas pu être étudiée. Le séquençage des gènes codant les facteurs de transcription Tac1 (2822 pb), Mrr1 (2592 pb) et Upc2 (1993 pb) a été réalisé pour chaque isolat afin de pouvoir corrélérer les mutations identifiées sur ces facteurs de transcription aux profils d'expression de *TAC1*, *MDR1* et *UPC2* obtenus par RT-PCR.

Les principaux résultats de nos investigations sont tout d'abord la mise en évidence de plus de 20 mutations distinctes sur le gène *TAC1*. Comme attendu, les mutations T225A, E841G et



G980W, déjà décrites, étaient associées à une surexpression de *CDRI* par RT-PCR et à un efflux actif par cytométrie en flux (mesuré après marquage à la rhodamine 6G) confortant leur rôle de mutation gain de fonction (Coste *et al.*, 2009). En revanche, sept mutations identifiées dans cette étude n'avaient à notre connaissance jamais été décrites : K87N, M170I, N174D, S264P, W442stop, W486C et N896S. Parmi elles, S264P a été mise en évidence chez une souche présentant une surexpression du gène *CDRI*, confirmé par cytométrie en flux. Cette mutation survient dans une région localisée entre le domaine de fixation à l'ADN et le domaine MHR, où trois mutations gain de fonction ont déjà été décrites (T225A, W239L et I255Stop). Ces résultats permettent de suggérer le rôle potentiel de cette substitution comme gain de fonction dans la surexpression de *CDRI* et la résistance aux azolés. Le séquençage du gène *MRR1* chez ces six isolats cliniques a révélé neuf mutations distinctes dont cinq jamais rapportées auparavant (R557K, K884E, N937K, F1032L et S1037L). Parmi les mutations déjà rapportées, aucune n'a été décrites à ce jour comme gain de fonction.

L'observation de R557K, K884E et S1037L, chez trois seuls isolats présentant une surexpression importante du gène *MDRI* (x100), soulève la question de l'implication de ces substitutions dans la surexpression de ce gène. La mutation K884E, résultant de la substitution de la lysine en position 884 par l'acide glutamique se situe au sein du hotspot 3 défini par Dunkel *et al.* (Dunkel *et al.*, 2008a). Cela en fait une candidate potentielle comme mutation gain de fonction, plusieurs autres ayant déjà été décrites de part et d'autre de ce résidu chez *C. albicans* (G878E, A880E et W893R) (Dunkel *et al.*, 2008a). Concernant les mutations R557K et S1037L, leur position au milieu de la séquence protéique de Mrr1 pour R557K et dans la région ID1 pour S1037L respectivement, à distance de mutations gain de fonction déjà décrites, rend peu probable leur implication dans la surexpression du gène *MDRI* (Schubert *et al.*, 2011b).

Enfin, nous confirmons le rôle de la mutation G648S récemment décrite par Flowers *et al.* comme mutation gain de fonction, observée chez deux isolats de notre collection (Flowers *et al.*, 2012). Nous rapportons également trois nouvelles mutations sur le gène *UPC2*: T273A, A451V et K684E. A l'exception de la mutation T273A observée chez une souche présentant une surexpression du gène *ERG11* d'un facteur 2 à 3, la présence de ces mutations à l'état hétérozygote chez des isolats présentant une faible surexpression du gène *ERG11* permet de s'interroger sur leur implication dans la surexpression de ce gène. Comme observé par d'autres auteurs, et déjà noté lors de la description de nos deux mutants *erg3*, nos résultats révèlent l'existence de souches surexprimant *ERG11*, en l'absence de mutation gain de

fonction décrites sur *UPC2* suggérant l'implication d'autres mutations comme gain de fonction comme T273A ou d'autres mécanismes Upc2-indépendants (Heilmann et al., 2010 ; Flowers *et al.*, 2012).

En conclusion, l'exploration approfondie des mécanismes de résistance de ces isolats cliniques permet de confirmer l'association fréquente de plusieurs mécanismes distincts chez une même souche clinique de *C. albicans* et la prévalence importante des mécanismes d'efflux. Néanmoins plusieurs questions restent en suspens et notamment le rôle des nouvelles mutations sur les gènes *TAC1*, *MRR1* et *UPC2*, décrites dans notre travail, dans la résistance aux azolés. Des expériences de mutagenèse dirigée et expression hétérologue devrait pouvoir permettre de répondre à cette question. Concernant *MRR1*, si l'implication de certaines de ces nouvelles mutations n'est pas évidente, d'autres mécanismes peuvent être envisagés. Il a ainsi été établi que plusieurs facteurs de transcription dont Cap1 et Mcm1 pouvaient participer à la régulation de l'expression du gène *MDR1*. L'exploration de ces gènes et de leur niveau d'expression pourrait être envisagée.

#### ❖ Résistance aux antifongiques azolés chez *A. fumigatus* : bilan et perspectives

La résistance aux azolés chez *A. fumigatus* repose principalement sur la survenue de mutation sur le gène cible des azolés, la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase, codée par le gène *CYP51A*, homologue de *ERG11* chez *C. albicans*. Récemment, un nouveau mécanisme, reposant sur la duplication d'une région de 34 pb dans la région promotrice du gène *CYP51A* a été mis en évidence et semble constituer un mécanisme majeur susceptible de conférer un profil de multi-résistance (Mellado *et al.*, 2007 ; Verweij *et al.*, 2009a). Si la prévalence de ce mécanisme est mieux connue dans les pays du nord de l'europe et notamment aux Pays-Bas où il a été initialement décrit et retrouvé chez plus de 90 % des isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés, la prévalence dans les autres pays d'Europe et notamment en France, est encore difficile à évaluer. Les données disponibles semblent néanmoins montrer des prévalences très variables, ce mécanisme étant par ailleurs peu rencontré dans les études conduites au Royaume-Uni où les mutations du gène *CYP51A* restent encore les plus fréquentes (Howard *et al.*, 2009). Dans une étude française récente conduite sur une cohorte de patients d'hématologie, la prévalence de la résistance était inférieure à 1 % et montrait l'absence de ce nouveau mécanisme (Alanio *et al.*, 2011).

L'objectif de notre étude était d'étudier la prévalence de la résistance aux azolés dans notre centre hospitalier au sein d'une cohorte de patients atteints de mucoviscidose. Au-delà de confirmer la présence en France de souches d'*A. fumigatus* portant la mutation TR/L98H, rapportée dans une seule publication au moment où nous avons initié notre étude, ce travail présente avant tout l'intérêt d'apporter des nouvelles données sur la prévalence de la résistance d'*A. fumigatus* aux médicaments azolés au cours de la mucoviscidose, données jusqu'alors inexistantes en France (Verweij *et al.*, 2009b). Depuis, une autre étude menée en France a été publiée et vient compléter les rares données disponibles dans d'autres pays d'Europe (Amorim *et al.*, 2010 ; Mortensen *et al.*, 2011 ; Burgel *et al.*, 2012). La comparaison de ces études révèle de profondes différences dans la prévalence de la résistance dans cette population de patients : de 8 % dans notre étude, à moins de 1 % au Portugal mais autour de 4.5 % au Danemark ainsi que dans la cohorte française de l'hôpital Cochin. La raison de cette disparité pourrait être liée à l'exposition aux azolés plus ou moins longue des patients inclus dans ces études et/ou à l'influence de l'utilisation des fongicides azolés dans l'environnement (Verweij *et al.*, 2009b). En effet, au-delà de ces différences de prévalence, les mécanismes impliqués dans la résistance rapportés dans ces études sont également distincts. Ainsi, dans notre étude, à la différence de celles de Burgel *et al.* et Mortensen *et al.*, la mutation TR/L98H était identifiée chez trois de nos cinq patients, suggérant, d'après l'hypothèse de Verweij *et al.*, l'acquisition de souches résistantes d'*A. fumigatus* à partir d'un réservoir environnemental (Verweij *et al.*, 2009b). Cinq des neuf souches résistantes à l'itraconazole identifiées dans notre étude présentaient le TR/L98H. En accord avec les données de la littérature, toutes présentaient un phénotype de multi-résistance, celui conférant des CMI élevées vis-à-vis de l'itraconazole ( $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ ) mais également élevées pour le voriconazole (2 à 4  $\mu\text{g/mL}$ ) et le posaconazole (0.5 à 1  $\mu\text{g/mL}$ ) (Verweij *et al.*, 2009a).

L'explication de l'impact des mutations du gène *CYP51A* repose à l'heure actuelle, comme pour *C. albicans*, sur l'homologie avec MtCyp51 du fait de l'absence de structure cristalline de AfCyp51A. L'hypothèse formulée par Snelders *et al.*, est que le résidu lysine 98 étant situé dans la boucle BC, très flexible, son remplacement par une histidine plus hydrophile (L98H), pourrait être responsable d'un repliement de cette boucle aboutissant à fermer le tunnel 1 ce qui pourrait expliquer au moins en partie le phénotype de résistance aux azolés du fait d'un blocage de l'accès des antifongiques au site actif de l'enzyme. Cependant, le scénario élaboré par d'autres auteurs semble privilégier le tunnel 2 pour l'accès au site actif (Xiao *et al.*, 2004). Cette hypothèse est étayée par le fait que plusieurs mutations situées au

niveau de ce tunnel ou à proximité immédiate comme G54R et P216L, sont associées à une diminution de l'activité des azolés à longue chaîne latérale (Xiao *et al.*, 2004 ; Camps *et al.*, 2012). Ces contradictions montrent les limites du modèle actuel reposant sur l'homologie entre AfCyp51A et MtCyp51. Par ailleurs, comme pour *C. albicans*, les modèles actuels ne permettent pas d'explorer plusieurs mutations situées au niveau de la zone d'insertion non présente chez *M. tuberculosis*, comprise entre les acides aminés 427 à 441. C'est notamment le cas des substitutions Y431C (homologue de Y447 chez *C. albicans*), G434C et T440A identifiées chez des souches résistantes aux azolés (Da Silva Ferreira *et al.*, 2004 ; Howard *et al.*, 2009 ; Albarrag *et al.*, 2011). Pourtant l'implication de Y431C dans la résistance a été récemment confirmée par mutagénèse dirigée (Albarrag *et al.*, 2011). A l'évidence, ces observations illustrent la nécessité d'étudier et de proposer d'autres modèles tridimensionnelles d'AfCyp51A comme celui proposé récemment et reposant sur l'homologie avec la Cyp51 humaine (Fraczek *et al.*, 2011). L'application à AfCyp51A du modèle hybride déjà proposé par notre équipe pour *C. albicans*, constitue également une perspective intéressante et pourrait permettre de mieux comprendre l'impact des mutations décrites à ce jour dans l'acquisition de la résistance aux antifongiques azolés chez *A. fumigatus*.

Au vu des résultats de cette étude rétrospective, illustrant une prévalence importante de la résistance aux azolés chez *A. fumigatus*, une étude prospective devait être conduite. Cette étude, menée sur une population de patients atteints de mucoviscidose adultes, a démarrée de façon prospective le 1<sup>er</sup> janvier 2012. Les résultats préliminaires semblent confirmer la prévalence relativement importante de la résistance aux azolés dans notre centre hospitalier. En parallèle, les collaborations établies avec plusieurs autres laboratoires hospitaliers en France, initiées suite à ces travaux, devraient permettre d'enrichir ces données de prévalence sur le plan national.

A l'évidence, nos futures investigations devront viser à explorer d'autres mécanismes de résistance. En effet, l'exploration des mutations sur le gène *CYP51A* et du TR/L98H ne permet pas d'expliquer le phénotype de résistance aux azolés de l'ensemble des souches identifiées à ce jour (Howard *et al.*, 2009, Bueid *et al.*, 2010 ; Burgel *et al.*, 2012). Ainsi, en marge de nos travaux de recherche, nous avons récemment pu identifier une souche résistante à l'itraconazole (CMI  $\geq$  8  $\mu$ g/mL), au voriconazole (CMI = 4  $\mu$ g/mL) et au posaconazole (CMI = 1  $\mu$ g/mL) chez un patient ayant reçu de l'itraconazole pendant plus de cinq ans dans le cadre de la prise en charge d'une ABPA. L'exploration du gène *CYP51A* et de sa région promotrice a révélé cinq mutations dans sa séquence codante : F46Y, M172V, N248T, D255E

et E427K. Toutes ayant déjà été identifiées chez des souches sensibles aux azolés, cette observation suggère l'existence d'autres mécanismes chez cet isolat (Snelders *et al.*, 2010). Enfin, le portage chez un autre patient également atteint de mucoviscidose, d'une souche d'*A. fumigatus* et d'une souche d'*A. flavus* toutes deux résistantes à l'itraconazole par méthode Etest<sup>®</sup> (CMI > 32 et 16 µg/mL respectivement), souligne l'intérêt d'élargir nos recherches aux autres espèces d'*Aspergillus* impliquées en pathologie humaine comme *A. flavus*. L'évaluation de l'exposition aux azolés chez ce patient et la caractérisation des mécanismes impliqués dans la résistance de cet isolat devrait nous permettre d'apporter des données nouvelles, la résistance étant exceptionnellement décrite et peu explorée chez cette espèce (Liu *et al.*, 2012).

Au delà de la caractérisation des mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux azolés, notre travail ouvre une réflexion plus large sur l'impact des traitements azolés en médecine et probablement de l'usage des fongicides en agriculture sur l'émergence de souches résistantes pouvant être à l'origine d'infections invasives chez l'homme, l'échappement aux traitements actuels s'élargissant aux dernières générations de triazolés comme l'isavuconazole (Verweij *et al.*, 2007 ; Chowdhary *et al.*, 2012). D'une part, la pression de sélection exercée chez les patients sous traitement par azolés est forte, du fait de traitement au long cours, en particulier au cours de la mucoviscidose. Celle-ci conduit à l'émergence de souches résistantes d'*Aspergillus* mais probablement aussi de *C. albicans*, colonisant également très fréquemment l'arbre respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. Cela est d'ailleurs bien illustré par la mise en évidence récente, de la présence concomitante chez deux de nos patients, d'isolats de *C. albicans* et d'*A. fumigatus* résistants aux triazolés (données non publiées). D'autre part, l'utilisation massive de fongicides azolés dans l'environnement est supposée responsable de l'émergence des souches multi-résistantes de type TR/L98H (Verweij *et al.*, 2009b). Ce scénario pourrait s'expliquer par l'utilisation dans l'agriculture de cinq triazolés similaires dans leur structures et dans les interactions qu'ils peuvent établir avec AfCyp51A (Snelders *et al.*, 2012). Cette homologie entre les fongicides utilisés dans l'environnement et les médicaments utilisés en médecine rendrait compte du phénotype de résistance croisée observé chez les souches TR/L98H (Snelders *et al.*, 2012). Le début de l'utilisation de ces triazolés (propiconazole, bromuconazole, tebuconazole, époxiconazole et difénoconazole) estimé au milieu des années 90 coïnciderait avec l'apparition de ce mécanisme de résistance (Snelders *et al.*, 2012). Cependant, la démonstration formelle de la capacité de ces fongicides à induire la duplication de 34 pb dans

la région promotrice ainsi que la substitution L98H est toujours attendue (Manavathu *et al.*, 2001 ; Nascimento *et al.*, 2003 ; da Silva Ferreira *et al.*, 2004 ; Snelders *et al.*, 2012). Il est en effet difficile d'exclure que ce mécanisme ne puisse pas intervenir chez les patients recevant des azolés, certains isolats présentant le TR/L98H ayant été décrits, comme dans notre étude, chez des patients sous antifongiques azolés au long cours (Mortensen *et al.*, 2011 ; Burgel *et al.*, 2012).

Si l'origine exclusivement environnementale de ce mécanisme s'avérait exacte, la prévalence significative de souches portant le TR/L98H pourrait être liée aux pratiques agricoles dans notre région, la population de patients suivis dans notre centre hospitalier couvrant une large zone géographique, en grande partie rurale. Ainsi, 60 % de la surface de notre département (Loire-Atlantique) est utilisée à des fins agricoles, la viticulture constituant la seconde activité en termes d'importance, après l'élevage. Cette activité viticole est une des productions végétales les plus consommatrices de produits phytosanitaires et en particulier de fongicides dont les triazolés (Agreste, 2009a). Parmi ces triazolés, le tébuconazole est le fongicide le plus utilisé en viticulture en France, son utilisation couvrant près de 40 % des vignobles à l'échelle nationale (Agreste, 2009b). Un projet de recherche visant la réalisation de prélèvements au domicile des patients voire dans les exploitations agricoles est en cours de discussion. Il permettra peut être de mieux apprécier l'impact de ces pratiques agricoles sur l'émergence de souches résistantes d'*A. fumigatus* résistantes aux triazolés.

## Références bibliographiques

-A-

**Abad, A., Fernandez-Molina, J. V., Bikandi, J. & other authors (2010).** What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* **27**, 155-182.

**Abe, F., Usui, K., Hiraki, T. (2009).** Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **15**,8494-8504.

**Agreste Pays de Loire (2009a).** Résultats de l'enquête sur les pratiques culturales en viticulture en 2006. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/R5209A01.pdf>

**Agreste Primeur (2009b).** Lutte sanitaire en viticulture, situation en 2006. [http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf\\_primeur230.pdf](http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_primeur230.pdf)

**Akins, R. A. (2005).** An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* **43**, 285-318.

**Al-Fattani, M. A. & Douglas, L. J. (2006).** Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* **55**, 999-1008.

**Alanio, A., Sitterle, E., Liance, M. & other authors (2011).** Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* **66**, 371-374.

**Alarco, A. M. & Raymond, M. (1999).** The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 700-708.

**Alastruey-Izquierdo, A., Castelli, M. V., Cuesta, I., Zaragoza, O., Monzon, A., Mellado, E. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2009).** *In vitro* activity of antifungals against Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 5**, 71-76.

**Albarrag, A. M., Anderson, M. J., Howard, S. J., Robson, G. D., Warn, P. A., Sanglard, D. & Denning, D. W. (2011).** Interrogation of related clinical pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains: G138C, Y431C, and G434C single nucleotide polymorphisms in cyp51A, upregulation of cyp51A, and integration and activation of transposon Atf1 in the cyp51A promoter. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5113-5121.

**Alby, K., Schaefer, D. & Bennett, R. J. (2009).** Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* **460**, 890-893.

**Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Garcia-Effron, G., Buitrago, M. J., Lopez, J. F., Grimalt, J. O., Cuenca-Estrella, J. M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2006).** *Aspergillus fumigatus* C-5 sterol desaturases Erg3A and Erg3B: role in sterol biosynthesis and antifungal drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 453-460.



**Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2008a).** *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1244-1251.

**Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Garcia-Effron, G., Lopez, J. F., Grimalt, J. O., Cuenca-Estrella, J. M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2008b).** Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* **73**, 339-347.

**Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. & Sanglard, D. (2011).** Probing the role of point mutations in the *cyp51A* gene from *Aspergillus fumigatus* in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Med Mycol* **49**, 276-284.

**Alvarez-Rueda, N., Fleury, A., Morio, F., Pagniez, F., Gastinel, L. & Le Pape, P. (2011).** Amino Acid Substitutions at the Major Insertion Loop of *Candida albicans* Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase Are Involved in Fluconazole Resistance. *PLoS One* **6**, e21239.

**Alvarez-Rueda, N., Fleury, A., Morio, F., Pagniez, F., Gastinel, L. & Le Pape, P. (2012).** Amino acid substitutions at the major insertion loop of *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase are involved in fluconazole resistance. In *11<sup>th</sup> ASM Conference on Candida and Candidiasis*. San Francisco, USA.

**Amin, R., Dupuis, A., Aaron, S. D. & Ratjen, F. (2010).** The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* **137**, 171-176.

**Amorim, A., Guedes-Vaz, L. & Araujo, R. (2010).** Susceptibility to five antifungals of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from chronically colonised cystic fibrosis patients receiving azole therapy. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 396-399.

**Andes, D. R. & Dismukes, W. E. (2011).** Azoles. In *Essentials of Clinical Mycology*, pp. 61-94. Edited by C. A. Kauffman, P. G. Pappas, J. D. Sobel & W. E. Dismukes: Springer.

**Andreasen, A.A & Stier, T.J. (1953).** Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J Cell Physiol* **41**, 23-36.

**Aoyama, Y., Yoshida, Y., Sonoda, Y. & Sato, Y. (1989).** Deformylation of 32-oxo-24,25-dihydrolanosterol by the purified cytochrome P-45014DM (lanosterol 14  $\alpha$ -demethylase) from yeast evidence confirming the intermediate step of lanosterol 14  $\alpha$ -demethylation. *J Biol Chem* **264**, 18502-18505.

**Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C. & Hope, W. W. (2012).** EUCAST Technical Note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. *Clin Microbiol Infect*. Apr 5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03890.x. [Epub ahead of print].

**Arthington, B. A., Bennett, L. G., Skatrud, P. L., Guynn, C. J., Barbuch, R. J., Ulbright, C. E. & Bard, M. (1991).** Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene* **102**, 39-44.

-B-

- Baddley, J. W. (2010).** Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Med Mycol* **49** Suppl 1, S7-S12.
- Baixench, M. T., Aoun, N., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D., Bretagne, S., Ramires, S., Piketty, C. & Dannaoui, E. (2007).** Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chemother* **59**, 1076-1083.
- Balajee, S. A., Gribskov, J. L., Hanley, E., Nickle, D. & Marr, K. A. (2005).** *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* **4**, 625-632.
- Balajee, S. A., Borman, A. M., Brandt, M. E. & other authors (2009).** Sequence-based identification of *Aspergillus*, *fusarium*, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol* **47**, 877-884.
- Barchiesi, F., Calabrese, D., Sanglard, D., Falconi Di Francesco, L., Caselli, F., Giannini, D., Giacometti, A., Gavaudan, S. & Scalise, G. (2000).** Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1578-1584.
- Bard, M., Lees, N. D., Turi, T., Craft, D., Cofrin, L., Barbuch, R., Koegel, C. & Loper, J. C. (1993).** Sterol synthesis and viability of erg11 (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids* **28**, 963-967.
- Bard, M., Sturm, A.M., Pierson, C.A., Brown, S., Rogers, K.M., Nabinger, S., Eckstein, J., Barbuch, R., Lees, N.D., Howell, S.A. & Hazen, K.C. (2005).** Sterol uptake in *Candida glabrata*: rescue of sterol auxotrophic strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* **52**, 285-293.
- Barnett, J. A. (2004).** A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast* **21**, 1141-1193.
- Bart-Delabesse, E., Humbert, J. F., Delabesse, E. & Bretagne, S. (1998).** Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* **36**, 2413-2418.
- Bassetti, M., Taramasso, L., Nicco, E., Molinari, M. P., Mussap, M. & Viscoli, C. (2011).** Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* **6**, e24198.
- Bellamine, A., Lepesheva, G. I. & Waterman, M. R. (2004).** Fluconazole binding and sterol demethylation in three CYP51 isoforms indicate differences in active site topology. *J Lipid Res* **45**, 2000-2007.
- Ben-Yaacov, R., Knoller, S., Caldwell, G. A., Becker, J. M. & Koltin, Y. (1994).** *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 648-652.
- Bowyer, P., Moore, C. B., Rautemaa, R., Denning, D. W. & Richardson, M. D. (2011).** Azole antifungal resistance today: focus on *Aspergillus*. *Curr Infect Dis Rep* **13**, 485-491.

**Brand, A. (2012).** Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *Int J Microbiol*, 517-529.

**Braun, B. R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C. & other authors (2005).** A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet* **1**, 36-57.

**Brun, S., Berges, T., Poupard, P., Vauzelle-Moreau, C., Renier, G., Chabasse, D. & Bouchara, J. P. (2004).** Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1788-1796.

**Bruzual, I. & Kumamoto, C. A. (2011).** An MDR1 promoter allele with higher promoter activity is common in clinically isolated strains of *Candida albicans*. *Mol Genet Genomics* **286**, 347-357.

**Bueid, A., Howard, S. J., Moore, C. B., Richardson, M. D., Harrison, E., Bowyer, P. & Denning, D. W. (2010).** Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother* **65**, 2116-2118.

**Burgel, P. R., Baixench, M. T., Amsellem, M. & other authors (2012).** High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 869-874.

**Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F. & other authors (2009).** Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**, 657-662.

**-C-**

**Caillot, D., Couaillier, J. F., Bernard, A. & other authors (2001).** Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol* **19**, 253-259.

**Calabrese, D., Bille, J. & Sanglard, D. (2000).** A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* **146** ( Pt 11), 2743-2754.

**Camps, S. M., van der Linden, J. W., Li, Y., Kuijper, E. J., van Dissel, J. T., Verweij, P. E. & Melchers, W. J. (2012).** Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 10-16.

**Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R. & other authors (2009).** Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **22**, 291-321.

**Cernicka, J. & Subik, J. (2006).** Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents* **27**, 403-408.

**Chaffin, W. L. (2008).** *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 495-544.

**Chai, L. Y., Netea, M. G., Sugui, J., Vonk, A. G., van de Sande, W. W., Warris, A., Kwon-Chung, K. J. & Kullberg, B. J. (2010).** *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology* **215**, 915-920.

**Chapeland-Leclerc, F., Hennequin, C., Papon, N., Noel, T., Girard, A., Socie, G., Ribaud, P. & Lacroix, C. (2010).** Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 1360-1362.

**Chapman, S. W., Cleary, J. D. & Rogers, P. D. (2011).** Amphotericin B. In *Essentials in Clinical Mycology*, pp. 41-55. Edited by C. A. Kauffman, P. G. Pappas, J. D. Sobel & W. E. Dismukes.

**Chau, A. S., Mendrick, C. A., Sabatelli, F. J., Loebenberg, D. & McNicholas, P. M. (2004).** Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2124-2131.

**Chau, A. S., Gurnani, M., Hawkinson, R., Laverdiere, M., Cacciapuoti, A. & McNicholas, P. M. (2005).** Inactivation of sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3646-3651.

**Chen, C. G., Yang, Y. L., Shih, H. I., Su, C. L. & Lo, H. J. (2004).** CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating CDR1. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4505-4512.

**Chen, C.G., Yang, Y.L., Tseng, K.Y., Shih, H.I., Liou, C.H., Lin, C.C., & Lo, H.J. (2009).** Rep1p negatively regulating MDR1 efflux pump involved in drug resistance in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **46**, 714-720.

**Chen, J., Li, H., Li, R., Bu, D. & Wan, Z. (2005).** Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. *J Antimicrob Chemother* **55**, 31-37.

**Chen, S. C., Slavin, M. A. & Sorrell, T. C. (2011).** Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* **71**, 11-41.

**Chen, S. H., Sheng, C. Q., Xu, X. H., Jiang, Y. Y., Zhang, W. N. & He, C. (2007).** Identification of Y118 amino acid residue in *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase associated with the enzyme activity and selective antifungal activity of azole analogues. *Biol Pharm Bull* **30**, 1246-1253.

**Chowdhary, A., Kathuria, S., Randhawa, H. S., Gaur, S. N., Klaassen, C. H. & Meis, J. F. (2011).** Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *J Antimicrob Chemother* **67**, 362-366.

**Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2004).** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved guideline. CLSI Document M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

**Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2008a).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

**Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2008b).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Third informational supplement. CLSI document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

**Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2008c).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third edition. Approved standard M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

**Coleman, J. J. & Mylonakis, E. (2009).** Efflux in fungi: la piece de resistance. *PLoS Pathog* **5**, e1000486.

**Collectif. (2003).** Associations d'antifongiques. In *Infections fongiques: résistances et nouvelles modalités thérapeutiques*, pp. 149-161. Edited by Optimed: JIDIF: Optimed ed.

**Cools, H. J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J. A. & Fraaije, B. A. (2012).** Overexpression of the sterol 14alpha-demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Manag Sci.* (sous presse)  
doi: 10.1002/ps.3263.

**Coppens, I. & Courtoy, P.J. (1995).** Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypanosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **73**, 179-188.

**Cornely, O. A., Maertens, J., Winston, D. J. & other authors (2007).** Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* **356**, 348-359.

**Cornely, O. A., Vehreschild, J. J. & Ruping, M. J. (2009).** Current experience in treating invasive zygomycosis with posaconazole. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 5**, 77-81.

**Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhäuser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille, J. & Sanglard, D. (2006).** A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* **172**, 2139-2156.

**Coste, A., Selmecki, A., Forche, A., Diogo, D., Bougnoux, M. E., d'Enfert, C., Berman, J. & Sanglard, D. (2007).** Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* **6**, 1889-1904.

**Coste, A. T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J. & Sanglard, D. (2004).** TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell* **3**, 1639-1652.

Coste, A. T., Crittin, J., Bauser, C., Rohde, B. & Sanglard, D. (2009). Functional analysis of cis- and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryot Cell* **8**, 1250-1267.

**-D-**

da Silva Ferreira, M. E., Capellaro, J. L., dos Reis Marques, E. & other authors (2004). *In vitro* evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4405-4413.

Dagenais, T. R. & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **22**, 447-465.

Dannaoui, E., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D., Grenouillet, F., Cassaing, S., Baixench, M. T., Bretagne, S., Dromer, F. & Lortholary, O. (2012). *Candida* spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010. *Emerg Infect Dis* **18**, 86-90.

Davies, B. S., Wang, H. S. & Rine, J. (2005). Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol Cell Biol* **25**, 7375-7385.

de Carvalho Parahym, A. M., da Silva, C. M., Leao, M. P., Macario, M. C., Filho, G. A., de Oliveira, N. T. & Neves, R. P. (2011). Invasive infection in an acute myeloblastic leukemia patient due to triazole-resistant *Candida tropicalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **71**, 291-293.

de Micheli, M., Bille, J., Schueller, C. & Sanglard, D. (2002). A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol* **43**, 1197-1214.

de Vrankrijker, A. M., van der Ent, C. K., van Berkhout, F. T., Stellato, R. K., Willems, R. J., Bonten, M. J. & Wolfs, T. F. (2011). *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect* **17**, 1381-1386.

Delhaes, L., Jourdain, A., d'Almeida-Fourquet, M. & other authors (2011). Chronic *Aspergillus fumigatus* colonisation of respiratory tract in cystic fibrosis: diagnosis, management and antifungal resistance in a French cohort of cystic fibrosis patients In *21st Congress of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. Milan, Italy.

Denning, D. W., Venkateswarlu, K., Oakley, K. L., Anderson, M. J., Manning, N. J., Stevens, D. A., Warnock, D. W. & Kelly, S. L. (1997). Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1364-1368.

Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**, 1142-1151.

**Denning, D. W., Park, S., Lass-Flörl, C. & other authors (2011).** High-frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis* **52**, 1123-1129.

**Denning, D. W. & Perlin, D. S. (2011).** Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiol* **6**, 1229-1232.

**Develoux, M. & Bretagne, S. (2005).** Candidoses et levures diverses. *EMC - Maladies Infectieuses* **2**, 119-139.

**Diaz-Guerra, T. M., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2003).** A point mutation in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1120-1124.

**Diekema, D. J., Messer, S. A., Hollis, R. J., Boyken, L., Tendolkar, S., Kroeger, J., Jones, R. N. & Pfaller, M. A. (2009).** A global evaluation of voriconazole activity tested against recent clinical isolates of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* **63**, 233-236.

**Drakulovski, P., Dunyach, C., Bertout, S., Reynes, J. & Mallie, M. (2011).** A *Candida albicans* strain with high MIC for caspofungin and no FKS1 mutations exhibits a high chitin content and mutations in two chitinase genes. *Med Mycol* **49**, 467-474.

**Dunkel, N., Blass, J., Rogers, P. D. & Morschhäuser, J. (2008a).** Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* **69**, 827-840.

**Dunkel, N., Liu, T. T., Barker, K. S., Homayouni, R., Morschhäuser, J. & Rogers, P. D. (2008b).** A gain-of-function mutation in the transcription factor *Upc2p* causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell* **7**, 1180-1190.

## -E-

**Escribano, P., Recio, S., Pelaez, T., Bouza, E. & Guinea, J. (2011).** *Aspergillus fumigatus* strains with mutations in the *cyp51A* gene do not always show phenotypic resistance to itraconazole, voriconazole, or posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2460-2462.

**Escribano, P., Recio, S., Pelaez, T., Gonzalez-Rivera, M., Bouza, E. & Guinea, J. (2012).** *In vitro* acquisition of secondary azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates after prolonged exposure to itraconazole: presence of heteroresistant populations. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 174-178.

**Espinel-Ingroff, A., Diekema, D. J., Fothergill, A., Johnson, E., Pelaez, T., Pfaller, M. A., Rinaldi, M. G., Canton, E. & Turnidge, J. (2010).** Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol* **48**, 3251-3257.

**Etienne, K. A., Gade, L., Lockhart, S. R., Diekema, D. J., Messer, S. A., Pfaller, M. A. & Balajee, S. A. (2009).** Screening of a large global *Aspergillus fumigatus* species complex collection by using a species-specific microsphere-based Luminex assay. *J Clin Microbiol* **47**, 4171-4172.

**European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST.** Voriconazole: Rationale for the clinical breakpoints, version 1.0, 2012. <http://www.eucast.org>.

## **-F-**

**Favre, B., Didmon, M. & Ryder, N. S. (1999).** Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145** ( Pt 10), 2715-2725.

**Feng, L. J., Wan, Z., Wang, X. H., Li, R. Y. & Liu, W. (2010).** Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene. *Chin Med J (Engl)* **123**, 544-548.

**Ferrari, S., Ischer, F., Calabrese, D. & other authors (2009).** Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* **5**, e1000268.

**Ferrari, S., Sanguinetti, M., Torelli, R., Posteraro, B. & Sanglard, D. (2011).** Contribution of CgPDR1-regulated genes in enhanced virulence of azole-resistant *Candida glabrata*. *PLoS One* **6**, e17589.

**Ferreira, M. E., Colombo, A. L., Paulsen, I., Ren, Q., Wortman, J., Huang, J., Goldman, M. H. & Goldman, G. H. (2005).** The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **43 Suppl 1**, S313-319.

**Ferwerda, B., Ferwerda, G., Plantinga, T. S. & other authors (2009).** Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* **361**, 1760-1767.

**Fling, M. E., Kopf, J., Tamarkin, A., Gorman, J. A., Smith, H. A. & Koltin, Y. (1991).** Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol Gen Genet* **227**, 318-329.

**Flowers, S. A., Barker, K. S. & Morschhäuser, J. (2010).** Impact of novel UPC2 gain-of-function mutations on fluconazole resistance in *Candida albicans* In *Annual meeting of the American College of Clinical Pharmacy*. Austin, Texas.

**Flowers, S. A., Barker, K. S., Toner, G., Chadwick, S. G., Gygax, S. E., Morschhäuser, J. & Rogers, P. D. (2012).** Novel UPC2 gain-of-function mutations in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. In *11<sup>th</sup> ASM Conference on Candida and Candidiasis*. San Francisco, USA.



**Fournier, B., Morio, F., Leterrier, M., Villers, D., Moreau, P., Deslandes, G. & Le Pape, P. (2012).** Résistance de *Candida albicans* à la caspofungine: a propos d'un cas au CHU de Nantes. In *Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale*. Rennes, France.

**Fraczek, M. G., Bromley, M. & Bowyer, P. (2011).** An improved model of the *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2483-2486.

**Frade, J. P., Warnock, D. W. & Arthington-Skaggs, B. A. (2004).** Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. *J Clin Microbiol* **42**, 2085-2093.

**Franz, R., Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Ruhnke, M. & Morschhäuser, J. (1998).** Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3065-3072.

**Fukuoka, T., Johnston, D. A., Winslow, C. A., de Groot, M. J., Burt, C., Hitchcock, C. A. & Filler, S. G. (2003).** Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1213-1219.

**Fungal Research Trust (2011).** How common are fungal diseases ? In *The Fungal Research Trust 20<sup>th</sup> Anniversary meeting*. London, UK.

## -G-

**Gastebois, A., Clavaud, C., Aïmanianda, V. & Latge, J. P. (2009).** *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiol* **4**, 583-595.

**Gaur, M., Choudhury, D. & Prasad, R. (2005a).** Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 3-15.

**Gaur, M., Puri, N., Manoharlal, R., Rai, V., Mukhopadhyay, G., Choudhury, D. & Prasad, R. (2008).** MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics* **9**, 579.

**Gaur, N. A., Puri, N., Karnani, N., Mukhopadhyay, G., Goswami, S. K. & Prasad, R. (2004).** Identification of a negative regulatory element which regulates basal transcription of a multidrug resistance gene CDR1 of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **4**, 389-399.

**Gaur, N. A., Manoharlal, R., Saini, P., Prasad, T., Mukhopadhyay, G., Hofer, M., Morschhäuser, J. & Prasad, R. (2005b).** Expression of the CDR1 efflux pump in clinical *Candida albicans* isolates is controlled by a negative regulatory element. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 206-214.

**Geber, A., Hitchcock, C. A., Swartz, J. E., Pullen, F. S., Marsden, K. E., Kwon-Chung, K. J. & Bennett, J. E. (1995).** Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2708-2717.

**Geiser, D. M. (2009).** Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Med Mycol* **47 Suppl 1**, S21-26.

**Giraud, F., Loge, C., Pagniez, F., Crepin, D., Le Pape, P. & Le Borgne, M. (2008).** Design, synthesis, and evaluation of 1-(N-benzylamino)-2-phenyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ols as antifungal agents. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 1820-1824.

**Goldman, G. H., da Silva Ferreira, M. E., dos Reis Marques, E., Savoldi, M., Perlin, D., Park, S., Godoy Martinez, P. C., Goldman, M. H. & Colombo, A. L. (2004).** Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**, 25-32.

**Gollapudy, R., Ajmani, S. & Kulkarni, S. A. (2004).** Modeling and interactions of *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14- $\alpha$  demethylase 'A' with azole antifungals. *Bioorg Med Chem* **12**, 2937-2950.

**Gonzalez, C., Hadany, L., Ponder, R. G., Price, M., Hastings, P. J. & Rosenberg, S. M. (2008).** Mutability and importance of a hypermutable cell subpopulation that produces stress-induced mutants in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **4**, e1000208.

**Gow, N.A., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J., Netea, M.G. (2011).** *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **12**, 112-122.

**Greenberg, R. N., Mullane, K., van Burik, J. A. & other authors (2006).** Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 126-133.

**Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., Herwaldt, L., Pfaller, M. & Diekema, D. (2003).** Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* **37**, 1172-1177.

**Guillon, R., Pagniez, F., Giraud, F. & other authors (2011).** Design, synthesis, and *in vitro* antifungal activity of 1-[(4-substituted-benzyl)methylamino]-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ols. *ChemMedChem* **6**, 816-825.

**Gupta, V., Kohli, A., Krishnamurthy, S., Puri, N., Aalamgeer, S. A., Panwar, S. & Prasad, R. (1998).** Identification of polymorphic mutant alleles of CaMDR1, a major facilitator of *Candida albicans* which confers multidrug resistance, and its *in vitro* transcriptional activation. *Curr Genet* **34**, 192-199.

## -H-

**Hakki, M., Staab, J. F. & Marr, K. A. (2006).** Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2522-2524.

**Harry, J. B., Oliver, B. G., Song, J. L., Silver, P. M., Little, J. T., Choiniere, J. & White, T. C. (2005).** Drug-induced regulation of the MDR1 promoter in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2785-2792.

- Hassan, I., Powell, G., Sidhu, M., Hart, W. M. & Denning, D. W. (2009).** Excess mortality, length of stay and cost attributable to Candidaemia. *J Infect* **59**, 360-365.
- Heilmann, C. J., Schneider, S., Barker, K. S., Rogers, P. D. & Morschhäuser, J. (2010).** An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 353-359.
- Heimark, L., Shipkova, P., Greene, J., Munayyer, H., Yarosh-Tomaine, T., DiDomenico, B., Hare, R. & Pramanik, B. N. (2002).** Mechanism of azole antifungal activity as determined by liquid chromatographic/mass spectrometric monitoring of ergosterol biosynthesis. *J Mass Spectrom* **37**, 265-269.
- Henry, K. W., Nickels, J. T. & Edlind, T. D. (2000).** Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2693-2700.
- Hey, P., Robson, G., Birch, M. & Bromley, M. (2008).** Characterisation of Aft1 a Fot1/Pogo type transposon of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **45**, 117-126.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F. & other authors (2007).** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111**, 509-547.
- Hiller, D., Sanglard, D. & Morschhäuser, J. (2006a).** Overexpression of the MDR1 gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1365-1371.
- Hiller, D., Stahl, S. & Morschhäuser, J. (2006b).** Multiple cis-acting sequences mediate upregulation of the MDR1 efflux pump in a fluconazole-resistant clinical *Candida albicans* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2300-2308.
- Hitchcock, C. A., Dickinson, K., Brown, S. B., Evans, E. G. & Adams, D. J. (1990).** Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *Biochem J* **266**, 475-480.
- Hohl, T. M. & Feldmesser, M. (2007).** *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell* **6**, 1953-1963.
- Holmes, A. R., Lin, Y. H., Niimi, K., Lamping, E., Keniya, M., Niimi, M., Tanabe, K., Monk, B. C. & Cannon, R. D. (2008).** ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p does to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3851-3862.
- Hoot, S. J., Oliver, B. G. & White, T. C. (2008).** *Candida albicans* UPC2 is transcriptionally induced in response to antifungal drugs and anaerobicity through Upc2p-dependent and -independent mechanisms. *Microbiology* **154**, 2748-2756.

**Hoot, S. J., Brown, R. P., Oliver, B. G. & White, T. C. (2010).** The UPC2 promoter in *Candida albicans* contains two cis-acting elements that bind directly to Upc2p, resulting in transcriptional autoregulation. *Eukaryot Cell* **9**, 1354-1362.

**Hoot, S. J., Smith, A. R., Brown, R. P. & White, T. C. (2011).** An A643V amino acid substitution in Upc2p contributes to azole resistance in well-characterized clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 940-942.

**Horn, D. L., Neofytos, D., Anaissie, E. J. & other authors (2009).** Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* **48**, 1695-1703.

**Howard, S. J., Webster, I., Moore, C. B., Gardiner, R. E., Park, S., Perlin, D. S. & Denning, D. W. (2006).** Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Int J Antimicrob Agents* **28**, 450-453.

**Howard, S. J., Cerar, D., Anderson, M. J. & other authors (2009).** Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* **15**, 1068-1076.

**Howard, S. J. & Arendrup, M. C. (2011).** Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol* **49 Suppl 1**, S90-95.

#### **-I-**

**Ingham, C. J. & Schneeberger, P. M. (2012).** Microcolony Imaging of *Aspergillus fumigatus* Treated with Echinocandins Reveals Both Fungistatic and Fungicidal Activities. *PLoS One* **7**, e35478.

#### **-J-**

**Jiang, W., Tan, S. & Jiang, G. (2006).** Synergistic effect of terbinafine combined with fluconazole or itraconazole on stable fluconazole-resistant *Candida albicans* induced by fluconazole *in vitro*. *Chin J Microbiol Immunol* **26**, 360-364.

**Johnson, E. M. (2009).** Rare and emerging *Candida* species. *Current Fungal Infection Reports*, 1259-1159.

**Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H. & other authors (2004).** The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7329-7334.

**Joseph-Horne, T. & Hollomon, D. W. (1997).** Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiol Lett* **149**, 141-149.

#### **-K-**

**Takeya, H., Miyazaki, Y., Miyazaki, H., Nyswaner, K., Grimberg, B. & Bennett, J. E. (2000).** Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2985-2990.

**Karababa, M., Coste, A. T., Rognon, B., Bille, J. & Sanglard, D. (2004).** Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3064-3079.

**Karnani, N., Gaur, N. A., Jha, S., Puri, N., Krishnamurthy, S., Goswami, S. K., Mukhopadhyay, G. & Prasad, R. (2004).** SRE1 and SRE2 are two specific steroid-responsive modules of *Candida* drug resistance gene 1 (CDR1) promoter. *Yeast* **21**, 219-239.

**Katiyar, S. K. & Edlind, T. D. (2001).** Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. *Med Mycol* **39**, 109-116.

**Kelly, S. L., Lamb, D. C., Corran, A. J., Baldwin, B. C. & Kelly, D. E. (1995).** Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 alpha-methylergosta-8,24(28)-dien-3 beta,6 alpha-diol. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 910-915.

**Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Loeffler, J. & Einsele, H. (1996).** Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* **348**, 1523-1524.

**Kelly, S. L., Lamb, D. C., Baldwin, B. C., Corran, A. J. & Kelly, D. E. (1997a).** Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J Biol Chem* **272**, 9986-9988.

**Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U. & Einsele, H. (1997b).** Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturation. *FEBS Lett* **400**, 80-82.

**Kelly, S. L., Lamb, D. C. & Kelly, D. E. (1999).** Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 171-175.

**Ketel, C., Wang, H. S., McClellan, M., Bouchonville, K., Selmecki, A., Lahav, T., Gerami-Nejad, M. & Berman, J. (2009).** Neocentromeres form efficiently at multiple possible loci in *Candida albicans*. *PLoS Genet* **5**, e1000400.

**Kim, A., Nicolau, D. P. & Kuti, J. L. (2011).** Hospital costs and outcomes among intravenous antifungal therapies for patients with invasive aspergillosis in the United States. *Mycoses* **54**, e301-312.

**Klaassen, C. H., de Valk, H. A., Curfs-Breuker, I. M. & Meis, J. F. (2010).** Novel mixed-format real-time PCR assay to detect mutations conferring resistance to triazoles in *Aspergillus fumigatus* and prevalence of multi-triazole resistance among clinical isolates in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* **65**, 901-905.

**Klich, M. A. (2002).** *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

**Kondori, N., Svensson, E. & Mattsby-Baltzer, I. (2011).** *In vitro* susceptibility of filamentous fungi to itraconazole, voriconazole and posaconazole by Clinical and Laboratory Standards Institute reference method and E-test. *Mycoses* **54**, e318-322.

**Kousha, M., Tadi, R. & Soubani, A. O. (2011).** Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev* **20**, 156-174.

**-L-**

**Lacroix, C., Gicquel, A., Morio, F., Lambert, J., Accoceberry, I., Bailly, E., Desoubeaux, G., Collin, E., Feghoul, L., François, N., Gabriel, F., Gay-Andrieu, F., Guitard, J., Hennequin, C., Kauffmann-Lacroix, C., Lauzin, D., Sendid, B., Lortholary, O. & Bognoux, M.E. (2011).** Differences in diversity and susceptibility of *Candida* species isolated from clinical samples in intensive care and haematology units in 8 French university hospitals. 5th Trends in Medical Mycology (TIMM-5), Valencia, Spain.

**LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A. & Lewis, K. (2006).** *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3839-3846.

**Lai, M. H. & Kirsch, D. R. (1989).** Nucleotide sequence of cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14 alpha-demethylase) from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **17**, 804.

**Lamb, D. C., Kelly, D. E., Schunck, W. H., Shyadehi, A. Z., Akhtar, M., Lowe, D. J., Baldwin, B. C. & Kelly, S. L. (1997).** The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem* **272**, 5682-5688.

**Lamb, D. C., Maspahy, S., Kelly, D. E., Manning, N. J., Geber, A., Bennett, J. E. & Kelly, S. L. (1999).** Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1725-1728.

**Lamb, D. C., Kelly, D. E., White, T. C. & Kelly, S. L. (2000).** The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 63-67.

**Lamping, E., Monk, B. C., Niimi, K., Holmes, A. R., Tsao, S., Tanabe, K., Niimi, M., Uehara, Y. & Cannon, R. D. (2007).** Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **6**, 1150-1165.

**Lamping, E., Ranchod, A., Nakamura, K., Tyndall, J. D., Niimi, K., Holmes, A. R., Niimi, M. & Cannon, R. D. (2009).** Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 354-369.

**Larsen, R. A. (2011).** Flucytosine. In *Essentials of Clinical Mycology*, pp. 57-60. Edited by C. A. Kauffman, P. G. Pappas, J. D. Sobel & W. E. Dismukes: Springer.

**Latgé, J.P. (1999).** *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**, 310-350.

**Latgré, J.P. (2001).** The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **9**, 328-329.

**Lavoie, H., Sellam, A., Askew, C., Nantel, A. & Whiteway, M. (2008).** A toolbox for epitope-tagging and genome-wide location analysis in *Candida albicans*. *BMC Genomics* **9**, 578.

**Lebouvier, N., Pagniez, F., Duflos, M., Le Pape, P., Na, Y. M., Le Baut, G. & Le Borgne, M. (2007).** Synthesis and antifungal activities of new fluconazole analogues with azaheterocycle moiety. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 3686-3689.

**Lee, M. K., Williams, L. E., Warnock, D. W. & Arthington-Skaggs, B. A. (2004).** Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother* **53**, 217-224.

**Lepesheva, G. I., Virus, C. & Waterman, M. R. (2003).** Conservation in the CYP51 family. Role of the B' helix/BC loop and helices F and G in enzymatic function. *Biochemistry* **42**, 9091-9101.

**L'hirondel, J., Espern, A., David, V., Horeau-Langlard, D., Besse, M., Morio, F. (2008).** Prévalence de la colonisation fongique au cours de la mucoviscidose : étude rétrospective sur 30 mois au CHU de Nantes. Réunion interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, France.

**Li, X., Brown, N., Chau, A. S. & other authors (2004).** Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* **53**, 74-80.

**Limper, A. H., Knox, K. S., Sarosi, G. A. & other authors (2011).** An official american thoracic society statement: treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 96-128.

**Liu, W., Sun, Y., Chen, W., Liu, W., Wan, Z., Bu, D. & Li, R. (2012).** The T788G Mutation in the cyp51C Gene Confers Voriconazole Resistance in *Aspergillus flavus* Causing Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2598-2603.

**Liu, Y. & Filler, S. G. (2011).** *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* **10**, 168-173.

**Lockhart, S. R., Frade, J. P., Etienne, K. A., Pfaller, M. A., Diekema, D. J. & Balajee, S. A. (2011).** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the cyp51A gene. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4465-4468.

**Loffler, J., Kelly, S. L., Hebart, H., Schumacher, U., Lass-Flörl, C. & Einsele, H. (1997).** Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett* **151**, 263-268.

**Long, F., Zhang, Y. & Lan, H. (2002).** The point mutation of cytochrome P-450 lanosterol 14-demethylase ERG11 gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Chin J Infect Dis* **20**, 211-214.

**Lopez-Ribot, J. L., McAtee, R. K., Lee, L. N., Kirkpatrick, W. R., White, T. C., Sanglard, D. & Patterson, T. F. (1998).** Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2932-2937.

**Lortholary, O., Gangneux, J. P., Sitbon, K., Lebeau, B., de Monbrison, F., Le Strat, Y., Coignard, B., Dromer, F. & Bretagne, S. (2011).** Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect* **17**, 1882-1889.

**Luo, G. & Mitchell, T. G. (2002).** Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **40**, 2860-2865.

**Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. & Kelly, S. (2002).** Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* **8**, 76-81.

**Lyons, C. N. & White, T. C. (2000).** Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2296-2303.

## -M-

**MacCallum, D. M., Coste, A., Ischer, F., Jacobsen, M. D., Odds, F. C. & Sanglard, D. (2010).** Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 1476-1483.

**Macchiarulo, A., Costantino, G., Fringuelli, D., Vecchiarelli, A., F., S. & Fringuelli, R. (2002).** 1,4-Benzothiazine and 1,4-benzoxazine imidazole derivatives with antifungal activity: a docking study. *Bioorg Med Chem* **10**, 3415-3423.

**MacPherson, S., Akache, B., Weber, S., De Deken, X., Raymond, M. & Turcotte, B. (2005).** *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1745-1752.

**Maertens, J. A. (2004).** History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* **10 Suppl 1**, 1-10.



- Manastir, L., Ergon, M. C. & Yucesoy, M. (2011).** Investigation of mutations in Erg11 gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses* **54**, 99-104.
- Manavathu, E. K., Kallakuri, S., Arganoza, M. T. & Vazquez, J. A. (1999a).** Amino acid variations of cytochrome P-450 lanosterol 14 alpha-demethylase (CYP51A1) from fluconazole resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* **16**, 198-203.
- Manavathu, E. K., Vazquez, J. A. & Chandrasekar, P. H. (1999b).** Reduced susceptibility in laboratory-selected mutants of *Aspergillus fumigatus* to itraconazole due to decreased intracellular accumulation of the antifungal agent. *Int J Antimicrob Agents* **12**, 213-219.
- Manavathu, E.K., Abraham, O.C. & Chandrasekar, P.H. (2001).** Isolation and *in vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole and posaconazole of voriconazole-resistant laboratory isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbiol Infect* **7**, 130-137.
- Mann, P. A., Parmegiani, R. M., Wei, S. Q. & other authors (2003).** Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14alpha-demethylase. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 577-581.
- Manoharlal, R., Gaur, N. A., Panwar, S. L., Morschhäuser, J. & Prasad, R. (2008).** Transcriptional activation and increased mRNA stability contribute to overexpression of CDR1 in azole-resistant *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1481-1492.
- Mansfield, B. E., Oltean, H. N., Oliver, B. G., Hoot, S. J., Leyde, S. E., Hedstrom, L. & White, T. C. (2010).** Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *PLoS Pathog* **6**, e1001126.
- Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S. & other authors (1999).** Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145** ( Pt 10), 2701-2713.
- Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., Warrilow, A. G., Kelly, D. E. & Kelly, S. L. (2010a).** A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14alpha-demethylase) and ERG5 (encoding  $\Delta^{22}$  desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3578-3583.
- Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., Warrilow, A. G., Rolley, N., Kelly, D. E. & Kelly, S. L. (2010b).** Identification and characterization of four azole-resistant erg3 mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4527-4533.
- Martin, D. S. & Jones, C. P. (1940).** Further Studies on the Practical Classification of the Monilias. *J Bacteriol* **39**, 609-630.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. (2003).** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* **348**, 1546-1554.

**Martinez, M., Lopez-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., Bachmann, S. P., Perea, S., Ruesga, M. T. & Patterson, T. F. (2002).** Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* **49**, 515-524.

**McManus, B. A., McGovern, E., Moran, G. P., Healy, C. M., Nunn, J., Fleming, P., Costigan, C., Sullivan, D. J. & Coleman, D. C. (2011).** Microbiological screening of Irish patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy reveals persistence of *Candida albicans* strains, gradual reduction in susceptibility to azoles, and incidences of clinical signs of oral candidiasis without culture evidence. *J Clin Microbiol* **49**, 1879-1889.

**Association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers Titulaires de Parasitologie et Mycologie Médicale (2011).** CdRom ANOFEL 4.

**Mellado, E., Diaz-Guerra, T. M., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2001).** Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* **39**, 2431-2438.

**Mellado, E., Garcia-Effron, G., Alcazar-Fuoli, L., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2004).** Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance *in vitro* to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2747-2750.

**Mellado, E., Garcia-Effron, G., Buitrago, M. J., Alcazar-Fuoli, L., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2005).** Targeted gene disruption of the 14-alpha sterol demethylase (cyp51A) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2536-2538.

**Mellado, E., Garcia-Effron, G., Alcazar-Fuoli, L., Melchers, W. J., Verweij, P. E., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, J. L. (2007).** A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring *in vitro* cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1897-1904.

**Michallet, M., Gangneux, J. P., Lafuma, A. & other authors (2011).** Cost effectiveness of posaconazole in the prophylaxis of invasive fungal infections in acute leukaemia patients for the French healthcare system. *J Med Econ* **14**, 28-35.

**Miranda, L. N., van der Heijden, I. M., Costa, S. F. & other authors (2009).** *Candida* colonisation as a source for Candidaemia. *J Hosp Infect* **72**, 9-16.

**Mishra, P. K., Baum, M. & Carbon, J. (2007).** Centromere size and position in *Candida albicans* are evolutionarily conserved independent of DNA sequence heterogeneity. *Mol Genet Genomics* **278**, 455-465.

**Mistro, S., Maciel, I. D., de Menezes, R. G., Maia, Z. P., Schooley, R. T. & Badaro, R. (2012).** Does lipid emulsion reduce Amphotericin B nephrotoxicity? A systematic review with meta-analysis. *Clin Infect Dis*. Apr 24. [Epub ahead of print].

- Miyazaki, T., Miyazaki, Y., Izumikawa, K., Kakeya, H., Miyakoshi, S., Bennett, J. E. & Kohno, S. (2006).** Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* *erg3/erg3* mutant *in vivo* despite *in vitro* resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 580-586.
- Miyazaki, Y., Geber, A., Miyazaki, H., Falconer, D., Parkinson, T., Hitchcock, C., Grimberg, B., Nyswaner, K. & Bennett, J. E. (1999).** Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of ERG3 (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* **236**, 43-51.
- Mogavero, S., Tavanti, A., Senesi, S., Rogers, P. D. & Morschhäuser, J. (2011).** Differential requirement of the transcription factor Mcm1 for activation of the *Candida albicans* multidrug efflux pump MDR1 by its regulators Mrr1 and Cap1. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2061-2066.
- Moran, G. P., Sanglard, D., Donnelly, S. M., Shanley, D. B., Sullivan, D. J. & Coleman, D. C. (1998).** Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1819-1830.
- Moran, G. P., Coleman, D. C. & Sullivan, D. J. (2012).** An introduction to the medically important *Candida* species. In *Candida and Candidiasis*, pp. 11-25. Edited by R. Calderone & C. J. Clancy. Washington DC: ASM Press.
- Morgan, J., Meltzer, M. I., Plikaytis, B. D. & other authors (2005).** Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**, 540-547.
- Morio, F., Treilhaud, M., Lepelletier, D. & other authors (2008).** *Aspergillus fumigatus* endocarditis of the mitral valve in a heart transplant recipient: a case report. *Diagn Microbiol Infect Dis* **62**, 453-456.
- Morio, F., Loge, C., Besse, B., Hennequin, C. & Le Pape, P. (2010).** Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* **66**, 373-384.
- Morschhäuser, J. (2002).** The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1587**, 240-248.
- Morschhäuser, J., Barker, K. S., Liu, T. T., Bla, B. W. J., Homayouni, R. & Rogers, P. D. (2007).** The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **3**, e164.
- Mortensen, K. L., Mellado, E., Lass-Flörl, C., Rodríguez-Tudela, J. L., Johansen, H. K. & Arendrup, M. C. (2010).** Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4545-4549.

**Mortensen, K. L., Jensen, R. H., Johansen, H. K., Skov, M., Pressler, T., Howard, S. J., Leatherbarrow, H., Mellado, E. & Arendrup, M. C. (2011).** *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol* **49**, 2243-2251.

**Moudgal, V., Little, T., Boikov, D. & Vazquez, J. A. (2005).** Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 767-769.

**Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M. & Ghannoum, M. A. (2003).** Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* **71**, 4333-4340.

**Munayyer, H. K., Mann, P. A., Chau, A. S. & other authors (2004).** Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14 $\alpha$ -demethylation in yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3690-3696.

**Murad, A. M., d'Enfert, C., Gaillardin, C. & other authors (2001).** Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* **42**, 981-993.

**Myoken, Y., Kyo, T., Sugata, T., Murayama, S. Y. & Mikami, Y. (2006).** Breakthrough fungemia caused by fluconazole-resistant *Candida albicans* with decreased susceptibility to voriconazole in patients with hematologic malignancies. *Haematologica* **91**, 287-288.

-N-

**Naglik, J. R., Challacombe, S. J. & Hube, B. (2003).** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 400-428, table of contents.

**Nakayama, H., Izuta, M., Nakayama, N., Arisawa, M. & Aoki, Y. (2000).** Depletion of the squalene synthase (ERG9) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2411-2418.

**Nascimento, A. M., Goldman, G. H., Park, S. & other authors (2003).** Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1719-1726.

**National Committee for Clinical Laboratory & Standards (2002).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast—second edition: approved standard M27-A2. Wayne, PA: NCCLS.

**Neoh, C. F., Snell, G. I., Kotsimbos, T., Levvey, B., Morrissey, C. O., Slavin, M. A., Stewart, K. & Kong, D. C. (2011).** Antifungal prophylaxis in lung transplantation--a world-wide survey. *Am J Transplant* **11**, 361-366.

**Nett, J. E., Sanchez, H., Cain, M. T. & Andes, D. R. (2010).** Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis* **202**, 171-175.

**Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J. & other authors (2005).** Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151-1156.

**Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes, A. R., Lamping, E., Niimi, M., Monk, B. C. & Cannon, R. D. (2006).** Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1148-1155.

**Nolte, F. S., Parkinson, T., Falconer, D. J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R. & Wingard, J. R. (1997).** Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 196-199.

**Novakova, A., Hubka, V., Saiz-Jimenez, C. & Kolarik, M. (2012).** *Aspergillus baeticus* sp. nov. and *Aspergillus thesauricus* sp. nov.: two new species in section Usti originating from Spanish caves. *Int J Syst Evol Microbiol*. Apr 13. [Epub ahead of print].

**Nucci, M. & Anaissie, E. (2001).** Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* **33**, 1959-1967.

#### -O-

**O'Gorman, C. M., Fuller, H. T. & Dyer, P. S. (2009).** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**, 471-474.

**Oliver, B. G., Song, J. L., Choiniere, J. H. & White, T. C. (2007).** cis-Acting elements within the *Candida albicans* ERG11 promoter mediate the azole response through transcription factor Upc2p. *Eukaryot Cell* **6**, 2231-2239.

**Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., Almela, M., Martinez, J. A., Lopez, J., Pitart, C. & Mensa, J. (2011).** *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect* **77**, 157-161.

**Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C. & Rex, J. H. (2010).** An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 719-727.

#### -P-

**Pagniez, F., Le Borgne, M., Marchand, P., Na, Y. M., Le Baut, G., Robert-Piessard, S. & Le Pape, P. (2002).** *In vitro* activity of a new antifungal azolyl-substituted indole against *Aspergillus fumigatus*. *J Enzyme Inhib Med Chem* **17**, 425-429.

**Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. (1998).** Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1-34.

**Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. & other authors (2009).** Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**, 503-535.

**Pappas, P. G. (2011).** Terbinafine. In *Essentials of Clinical Mycology* pp. 113-119. Edited by C. A. Kauffman, P. G. Pappas, J. D. Sobel & W. E. Dismukes: Springer.

**Park, B.J., Arthington-Skaggs, B.A., Hajjeh, R.A., Iqbal, N., Ciblak, M.A., Lee-Yang, W., Hairston, M.D., Phelan, M., Plikaytis, B.D., Sofair, A.N., Harrison, L.H., Fridkin, S.K. & Warnock, D.W. (2006).** Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **50**,1287-1292.

**Park, S., Kelly, R., Kahn, J. N. & other authors (2005).** Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3264-3273.

**Park, S. & Perlin, D. S. (2005).** Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb Drug Resist* **11**, 232-238.

**Parks, L. W. & Casey, W. M. (1996).** Fungal sterols. In *Lipids in pathogenic fungi*, pp. 63-82. Edited by R. Prasad & M. Ghannoum. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc.

**Pasqualotto, A. C., Thiele, K. O. & Goldani, L. Z. (2010).** Novel triazole antifungal drugs: focus on isavuconazole, ravuconazole and albaconazole. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 165-174.

**Pelaez, T., Munoz, P., Guinea, J., Valerio, M., Giannella, M., Klaassen, C. H. & Bouza, E. (2012a).** Outbreak of invasive aspergillosis after major heart surgery caused by spores in the air of the intensive care unit. *Clin Infect Dis* **54**, e24-31.

**Pelaez, T., Gijon, P., Bunsow, E., Bouza, E., Sanchez-Yebra, W, Valerio, M., Gama, B., Cuenca-Estrella, M. & Mellado, E. (2012b).** Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* May 9 [Epub ahead of print].

**Perea, S., Lopez-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., McAtee, R. K., Santillan, R. A., Martinez, M., Calabrese, D., Sanglard, D. & Patterson, T. F. (2001).** Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2676-2684.

**Perlin, D. S. (2007).** Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* **10**, 121-130.

**Perumal, P., Mekala, S. & Chaffin, W. L. (2007).** Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2454-2463.

**Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L., Hollis, R. J., Rice, C., Tendolkar, S. & Diekema, D. J. (2004).** *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **48**, 201-205.

**Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Rex, J. H. & other authors (2006a).** Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* **44**, 819-826.

**Pfaller, M. A., Diekema, D. J. & Sheehan, D. J. (2006b).** Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* **19**, 435-447.

**Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2007).** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133-163.

**Pfaller, M. A., Andes, D., Diekema, D. J., Espinel-Ingroff, A. & Sheehan, D. (2010a).** Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida* : time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* **13**, 180-195.

**Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., Tullio, V., Rodloff, A., Fu, W. & Ling, T. A. (2010b).** Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* **48**, 1366-1377.

**Pfaller, M. A., Boyken, L., Hollis, R., Kroeger, J., Messer, S., Tendolkar, S. & Diekema, D. (2011a).** Comparison of the broth microdilution methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical and Laboratory Standards Institute for testing itraconazole, posaconazole, and voriconazole against *Aspergillus* isolates. *J Clin Microbiol* **49**, 1110-1112.

**Pfaller, M., Boyken, L., Hollis, R., Kroeger, J., Messer, S., Tendolkar, S. & Diekema, D. (2011b).** Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the triazoles. *J Clin Microbiol* **49**, 586-590.

**Pfaller, M. A., Andes, D., Arendrup, M. C. & other authors (2011c).** Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* **70**, 330-343.

**Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Andes, D., Arendrup, M. C., Brown, S. D., Lockhart, S. R., Motyl, M. & Perlin, D. S. (2011d).** Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat* **14**, 164-176.

- Pfaller, M. A., Espinel-Ingroff, A., Boyken, L., Hollis, R. J., Kroeger, J., Messer, S. A., Tendolkar, S. & Diekema, D. J. (2011e).** Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *J Clin Microbiol* **49**, 845-850.
- Pfaller, M. A., Watanabe, N., Castanheira, M., Messer, S. A. & Jones, R. N. (2011f).** Pre-clinical development of antifungal susceptibility test methods for the testing of the novel antifungal agent E1210 versus *Candida* : comparison of CLSI and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing methods. *J Antimicrob Chemother* **66**, 2581-2584.
- Pfaller, M. A., Espinel-Ingroff, A., Canton, E. & other authors (2012).** Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B, Flucytosine, and Itraconazole and *Candida* spp. as Determined by CLSI Broth Microdilution. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar 29. [Epub ahead of print].
- Pfaller, M.A. (2012).** Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* **125**, S3-S13.
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., Jr. & Filler, S. G. (2007).** Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* **5**, e64.
- Pierson, C. A., Eckstein, J., Barbuch, R. & Bard, M. (2004).** Ergosterol gene expression in wild-type and ergosterol-deficient mutants of *Candida albicans*. *Med Mycol* **42**, 385-389.
- Pihet, M., Carrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F. & Bouchara, J. P. (2009).** Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol* **47**, 387-397.
- Pinjon, E., Moran, G. P., Jackson, C. J., Kelly, S. L., Sanglard, D., Coleman, D. C. & Sullivan, D. J. (2003).** Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2424-2437.
- Pitt, J. I., Samson, R. A. & Frisvad, J. C. (2000).** List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus classification*, pp. 9-49. Edited by R. A. Samson & J. I. Pitt: Harkwood Academic Publishers.
- Pittet, D. (2010).** Candidémie et candidose généralisée. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Anesthésie-Réanimation* **36-983-D-10**, 13.
- Podust, L. M., Poulos, T. L. & Waterman, M. R. (2001a).** Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3068-3073.



**Podust, L. M., Stojan, J., Poulos, T. L. & Waterman, M. R. (2001b).** Substrate recognition sites in 14 $\alpha$ -sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51. *J Inorg Biochem* **87**, 227-235.

**Polak, A. & Scholer, H. J. (1975).** Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy* **21**, 113-130.

**Polak, A. (1992).** Preclinical data and mode of action of amorolfine. *Dermatology* **184 Suppl 1**, 3-7.

**Pound, M. W., Townsend, M. L., Dimondi, V., Wilson, D. & Drew, R. H. (2011).** Overview of treatment options for invasive fungal infections. *Med Mycol* **49**, 561-580.

**Prasad, R., Gaur, N. A., Gaur, M. & Komath, S. S. (2006).** Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect Disord Drug Targets* **6**, 69-83.

**Prasad, R., Sharma, M. & Rawal, M. K. (2011).** Functionally relevant residues of Cdr1p: a multidrug ABC transporter of human pathogenic *Candida albicans*. *J Amino Acids* **2011**, 531412.

**Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J. & other authors (2011).** Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* **332**, 65-68.

-Q-

-R-

**Rajendran, R., Mowat, E., McCulloch, E. & other authors (2011).** Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2092-2097.

**Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T. F., Wickes, B. L. & Lopez-Ribot, J. L. (2002).** Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* **49**, 973-980.

**Ramage, G. & Lopez-Ribot, J. L. (2005).** Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods Mol Med* **118**, 71-79.

**Ramage, G., Martinez, J. P. & Lopez-Ribot, J. L. (2006).** *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* **6**, 979-986.

**Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C. & Lopez-Ribot, J. (2009).** Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol* **35**, 340-355.

**Ramage, G., Rajendran, R., Gutierrez-Correa, M., Jones, B. & Williams, C. (2011).** *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS Microbiol Lett* **324**, 89-97.

**Rautemaa, R., Richardson, M., Pfaller, M., Koukila-Kahkola, P., Perheentupa, J. & Saxen, H. (2007).** Decreased susceptibility of *Candida albicans* to azole antifungals: a complication of long-term treatment in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) patients. *J Antimicrob Chemother* **60**, 889-892.

**Ribeiro, M. A. & Paula, C. R. (2007).** Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated *in vitro*: is there any clinical implication? *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**, 71-75.

**Riggle, P. J. & Kumamoto, C. A. (2006).** Transcriptional regulation of MDR1, encoding a drug efflux determinant, in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains through an Mcm1p binding site. *Eukaryot Cell* **5**, 1957-1968.

**Rodriguez-Tudela, J. L., Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Monzon, A. & Cuenca-Estrella, M. (2008a).** Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2468-2472.

**Rodriguez-Tudela, J. L., Arendrup, M. C., Barchiesi, F. & other authors (2008b).** EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* **14**, 398-405.

**Rodriguez-Tudela, J. L., Donnelly, J. P., Arendrup, M. C. & other authors (2008c).** EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* **14**, 982-984.

**Rognon, B., Kozovska, Z., Coste, A. T., Pardini, G. & Sanglard, D. (2006).** Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology* **152**, 3701-3722.

**Rupp, B., Raub, S., Marian, C. & Holtje, H. D. (2005).** Molecular design of two sterol 14alpha-demethylase homology models and their interactions with the azole antifungals ketoconazole and bifonazole. *J Comput Aided Mol Des* **19**, 149-163.

**Rustad, T. R., Stevens, D. A., Pfaller, M. A. & White, T. C. (2002).** Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology* **148**, 1061-1072.

-S-

**Sa-Correia, I., dos Santos, S. C., Teixeira, M. C., Cabrito, T. R. & Mira, N. P. (2009).** Drug:H<sup>+</sup> antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends Microbiol* **17**, 22-31.

**Sabatelli, F., Patel, R., Mann, P. A., Mendrick, C. A., Norris, C. C., Hare, R., Loebenberg, D., Black, T. A. & McNicholas, P. M. (2006).** *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2009-2015.

**Samson, R. A., Hong, S., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. & Varga, J. (2007).** Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol* **59**, 147-203.

**Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M. & Bille, J. (1995).** Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2378-2386.

**Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. & Bille, J. (1996).** Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2300-2305.

**Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. & Bille, J. (1997).** Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143** ( Pt 2), 405-416.

**Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L. & Bille, J. (1998).** Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 241-253.

**Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Majcherczyk, P. A. & Bille, J. (1999).** The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2753-2765.

**Sanglard, D. (2001).** Integrated antifungal drug discovery in *Candida albicans*. *Nat Biotechnol* **19**, 212-213.

**Sanglard, D., Ischer, F. & Bille, J. (2001).** Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1174-1183.

**Sanglard, D. & Bille, J. (2002).** Action of and resistance to antifungal agents In: R.A. Calderone, Editor *Candida* and candidiasis, American Society For Microbiology, Washington DC 370.

**Sanglard, D. & Odds, F. C. (2002).** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**, 73-85.

**Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D. & Bille, J. (2003).** *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2404-2412.

**Sanglard, D., Coste, A. & Ferrari, S. (2009).** Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* **9**, 1029-1050.

- Sanyal, K., Baum, M. & Carbon, J. (2004).** Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11374-11379.
- Sasse, C., Schillig, R., Dierolf, F., Weyler, M., Schneider, S., Mogavero, S., Rogers, P. D. & Morschhäuser, J. (2011).** The transcription factor Ndt80 does not contribute to Mrr1-, Tac1-, and Upc2-mediated fluconazole resistance in *Candida albicans*. *PLoS One* **6**, e25623.
- Schubert, S., Rogers, P. D. & Morschhäuser, J. (2008).** Gain-of-function mutations in the transcription factor MRR1 are responsible for overexpression of the MDR1 efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4274-4280.
- Schubert, S., Barker, K. S., Znaidi, S. & other authors (2011a).** Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2212-2223.
- Schubert, S., Popp, C., Rogers, P. D. & Morschhäuser, J. (2011b).** Functional dissection of a *Candida albicans* zinc cluster transcription factor, the multidrug resistance regulator Mrr1. *Eukaryot Cell* **10**, 1110-1121.
- Selmecki, A., Bergmann, S. & Berman, J. (2005).** Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol* **55**, 1553-1565.
- Selmecki, A., Forche, A. & Berman, J. (2006).** Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* **313**, 367-370.
- Selmecki, A., Gerami-Nejad, M., Paulson, C., Forche, A. & Berman, J. (2008).** An isochromosome confers drug resistance *in vivo* by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol Microbiol* **68**, 624-641.
- Selmecki, A., Forche, A. & Berman, J. (2010).** Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **9**, 991-1008.
- Selmecki, A. M., Dulmage, K., Cowen, L. E., Anderson, J. B. & Berman, J. (2009).** Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. *PLoS Genet* **5**, e1000705.
- Sheng, C., Zhang, W., Zhang, M. & other authors (2004).** Homology modeling of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* and insights into the enzyme-substrate interactions. *J Biomol Struct Dyn* **22**, 91-99.
- Sheng, C., Zhang, W., Ji, H. & other authors (2006).** Structure-based optimization of azole antifungal agents by CoMFA, CoMSIA, and molecular docking. *J Med Chem* **49**, 2512-2525.
- Sheng, C., Chen, S., Ji, H. & other authors (2009).** Evolutionary trace analysis of CYP51 family: implication for site-directed mutagenesis and novel antifungal drug design. *J Mol Model* **16**, 279-284.

- Sheng, C., Wang, W., Che, X., Dong, G., Wang, S., Ji, H., Miao, Z., Yao, J. & Zhang, W. (2010).** Improved model of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase by ligand-supported homology modeling: validation by virtual screening and azole optimization. *ChemMedChem* **5**, 390-397.
- Shukla, S., Saini, P., Smriti, Jha, S., Ambudkar, S. V. & Prasad, R. (2003).** Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1p. *Eukaryot Cell* **2**, 1361-1375.
- Shukla, S., Rai, V., Banerjee, D. & Prasad, R. (2006).** Characterization of Cdr1p, a major multidrug efflux protein of *Candida albicans*: purified protein is amenable to intrinsic fluorescence analysis. *Biochemistry* **45**, 2425-2435.
- Shukla, S., Yadav, V., Mukhopadhyay, G. & Prasad, R. (2011).** Ncb2 is involved in activated transcription of CDR1 in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **10**, 1357-1366.
- Siikala, E., Rautemaa, R., Richardson, M., Saxen, H., Bowyer, P. & Sanglard, D. (2010).** Persistent *Candida albicans* colonization and molecular mechanisms of azole resistance in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) patients. *J Antimicrob Chemother* **65**, 2505-2513.
- Silver, P. M., Oliver, B. G. & White, T. C. (2004).** Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryot Cell* **3**, 1391-1397.
- Skaggs, B. A., Alexander, J. F., Pierson, C. A., Schweitzer, K. S., Chun, K. T., Koegel, C., Barbuch, R. & Bard, M. (1996).** Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene* **169**, 105-109.
- Skinner, C. E. (1947).** The Yeast-Like Fungi: *Candida* and *Brettanomyces*. *Bacteriol Rev* **11**, 227-274.
- Slaven, J. W., Anderson, M. J., Sanglard, D., Dixon, G. K., Bille, J., Roberts, I. S. & Denning, D. W. (2002).** Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, atrF, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol* **36**, 199-206.
- Snelders, E., van der Lee, H. A., Kuijpers, J. & other authors (2008).** Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* **5**, e219.
- Snelders, E., Huis In 't Veld, R. A., Rijs, A. J., Kema, G. H., Melchers, W. J. & Verweij, P. E. (2009).** Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* **75**, 4053-4057.
- Snelders, E., Karawajczyk, A., Schaftenaar, G., Verweij, P. E. & Melchers, W. J. (2010).** Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 2425-2430.

**Snelders, E., Karawajczyk, A., Verhoeven, R. J., Venselaar, H., Schaftenaar, G., Verweij, P. E. & Melchers, W. J. (2011).** The structure-function relationship of the *Aspergillus fumigatus* cyp51A L98H conversion by site-directed mutagenesis: the mechanism of L98H azole resistance. *Fungal Genet Biol* **48**, 1062-1070.

**Snelders, E., Camps, S. M., Karawajczyk, A., Schaftenaar, G., Kema, G. H., van der Lee, H. A., Klaassen, C. H., Melchers, W. J. & Verweij, P. E. (2012).** Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* **7**, e31801.

**Sobel, J. D. (2007).** Vulvovaginal candidosis. *Lancet* **369**, 1961-1971.

**Spiess, B., Seifarth, W., Merker, N., Howard, S. J., Reinwald, M., Dietz, A., Hofmann, W. K. & Buchheidt, D. (2012).** Development of novel PCR Assays to detect Azole Resistance mediating Mutations of the *Aspergillus fumigatus* cyp51A Gene in primary Clinical Samples from Neutropenic Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. Apr 23. [Epub ahead of print].

**Stevens, D. A., Kan, V. L., Judson, M. A. & other authors (2000).** Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **30**, 696-709.

**Stevens, D. A., Moss, R. B., Kurup, V. P. & other authors (2003).** Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* **37 Suppl 3**, S225-264.

**Sudbery, P. E. (2011).** Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**, 737-748.

**Sun, J. N., Solis, N. V., Phan, Q. T. & other authors (2010).** Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog* **6**, e1001181.

## -T-

**Tadec, L., Talarmin, J. P., Le Pape, P., Leterrier, M., Moreau, P., Villers, D., Miegerville, M. & Morio, F. (2012).** Epidemiological trends of nosocomial Candidaemia over a 7-year period at a Nantes university hospital, France. In *22<sup>nd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. London, United Kingdom.

**Tobin, M. B., Peery, R. B. & Skatrud, P. L. (1997).** Genes encoding multiple drug resistance-like proteins in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Gene* **200**, 11-23.

**Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A. & Presterl, E. (2011).** Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses* **55**, 199-204.

**Tortorano, A. M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L. & Grillot, R. (2006).** *Candida* emia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**, 359-366.

**Troke, P., Aguirrebengoa, K., Arteaga, C. & other authors (2008).** Treatment of scedosporiosis with voriconazole: clinical experience with 107 patients. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1743-1750.

**Tsai, H.F., Bard, M., Izumikawa, K., Krol, A.A., Sturm, A.M., Culbertson, N.T., Pierson, C.A. & Bennett, J.E. (2004).** *Candida glabrata* erg1 mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2483-2489.

**Tsao, S., Rahkhoodae, F. & Raymond, M. (2009).** Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1344-1352.

**Tuch, B. B., Galgoczy, D. J., Hernday, A. D., Li, H. & Johnson, A. D. (2008).** The evolution of combinatorial gene regulation in fungi. *PLoS Biol* **6**, e38.

**-U-**

**Ullmann, A. J., Lipton, J. H., Vesole, D. H. & other authors (2007).** Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **356**, 335-347.

**-V-**

**Van de Veerdonk, F. L., Plantinga, T. S., Hoischen, A. & other authors (2011).** STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* **365**, 54-61.

**Van der Linden, J. W., Arendrup, M. C., Verweij, P. & SCARE-Network. (2011a).** Prospective International Surveillance of Azole Resistance (AR) in *Aspergillus fumigatus* (Af) (SCARE-Network). In *51<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)* Chicago, USA.

**Van der Linden, J. W., Snelders, E., Kampinga, G. A. & other authors (2011b).** Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* **17**, 1846-1854.

**Van der Linden, J. W., Warris, A. & Verweij, P. E. (2011c).** *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol* **49 Suppl 1**, S82-89.

**Vale-Silva, L.A., Coste, A.T., Ischer, F., Parker, J.E., Kelly, S.L., Pinto, E., Sanglard, D. (2012).** Azole resistance by loss of function of the sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase gene (ERG3) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1960-1968.

**Vandeputte, P., Larcher, G., Berges, T., Renier, G., Chabasse, D. & Bouchara, J. P. (2005).** Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4608-4615.

- Vandeputte, P., Tronchin, G., Berges, T., Hennequin, C., Chabasse, D. & Bouchara, J. P. (2007).** Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 982-990.
- Vandeputte, P., Tronchin, G., Larcher, G., Ernoult, E., Berges, T., Chabasse, D. & Bouchara, J. P. (2008).** A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3701-3709.
- Vandeputte, P., Pineau, L., Larcher, G., Noel, T., Brethes, D., Chabasse, D. & Bouchara, J. P. (2011).** Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* **171**, 11-21.
- Vandeputte, P., Ferrari, S. & Coste, A. T. (2012).** Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol* **2012**, 713687. Epub 2011 Dec 1.
- Vazquez, J. A. & Sobel, J. D. (2011).** Candidiasis. In *Essentials of Clinical Mycology*, pp. 167-206. Edited by C. A. Kauffman, P. G. Pappas, J. D. Sobel & W. E. Dismukes: Springer.
- Vazquez, J. A. & Sobel, J. D. (2012).** Miconazole Mucoadhesive Tablets: A Novel Delivery System. *Clin Infect Dis*. **54**,1480-1484.
- Vermes, A., Guchelaar, H. J. & Dankert, J. (2000).** Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* **46**, 171-179.
- Verweij, P. E., Mellado, E. & Melchers, W. J. (2007).** Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* **356**, 1481-1483.
- Verweij, P. E., Howard, S. J., Melchers, W. J. & Denning, D. W. (2009a).** Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* **12**, 141-147.
- Verweij, P. E., Snelders, E., Kema, G. H., Mellado, E. & Melchers, W. J. (2009b).** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* **9**, 789-795.
- Vicente, M. F., Basilio, A., Cabello, A. & Pelaez, F. (2003).** Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect* **9**, 15-32.
- Vik, A. & Rine, J. (2001).** Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**, 6395-6405.
- Voss, A., Hollis, R. J., Pfaller, M. A., Wenzel, R. P. & Doebbeling, B. N. (1994).** Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol* **32**, 975-980.



-W-

**Wakiec, R., Prasad, R., Morschhäuser, J., Barchiesi, F., Borowski, E. & Milewski, S. (2007).** Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* **50**, 109-115.

**Walsh, T. J., Anaissie, E. J., Denning, D. W. & other authors (2008).** Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **46**, 327-360.

**Wang, H., Kong, F., Sorrell, T. C. & other authors (2009).** Rapid detection of ERG11 gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing. *BMC Microbiol* **9**, 167.

**Wang, W. L., Wang, D. L. & Li, R. Y. (1999).** A study of the resistant mechanisms of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Chin J Derm Venereol* **13**, 360–364.

**Wang, Y. B., Wang, H., Guo, H. Y., Zhao, Y. Z. & Luo, S. Q. (2005).** Analysis of ERG11 gene mutation in *Candida albicans*. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **25**, 1390–1393.

**Wanger, A., Mills, K., Nelson, P. W. & Rex, J. H. (1995).** Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2520-2522.

**Warrilow, A. G., Martel, C. M., Parker, J. E., Melo, N., Lamb, D. C., Nes, W. D., Kelly, D. E. & Kelly, S. L. (2010).** Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14-alpha demethylase (CaCYP51). *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4235-4245.

**Warrilow, A. G., Mullins, J. G., Hull, C. M., Parker, J. E., Lamb, D. C., Kelly, D. E. & Kelly, S. L. (2012).** S279 point mutations in *Candida albicans* sterol 14-alpha demethylase (CYP51) reduce *in vitro* inhibition by fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2099-2107.

**Watson, P. F., Rose, M. E., Ellis, S. W., England, H. & Kelly, S. L. (1989).** Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: a new hypothesis for the mode of action of azole antifungals. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 1170-1175.

**Weiler, S., Lass-Flörl, C., Auberger, J., Bellmann-Weiler, R., Stein, M., Joannidis, M. & Bellmann, R. (2009).** Triazole-resistant candidaemia following posaconazole exposure. *Int J Antimicrob Agents* **33**, 494-495.

**Wey, S. B., Mori, M., Pfaller, M. A., Woolson, R. F. & Wenzel, R. P. (1988).** Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* **148**, 2642-2645.

**White, T. C. (1997).** The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14alpha demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1488-1494.

**White, T. C., Marr, K. A. & Bowden, R. A. (1998).** Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**, 382-402.

**White, T. C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L. F. & Stevens, D. A. (2002).** Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1704-1713.

**Whiteway, M. & Bachewich, C. (2007).** Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **61**, 529-553.

**-X-**

**Xiao, L., Madison, V., Chau, A. S., Loebenberg, D., Palermo, R. E. & McNicholas, P. M. (2004).** Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 568-574.

**Xiong, Q., Hassan, S.A., Wilson, W.K., Han, X.Y., May, G.S., Tarrand, J.J. & Matsuda, S.P. (2005).** Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency of sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 518-524.

**Xu, Y., Chen, L. & Li, C. (2008).** Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J Antimicrob Chemother* **61**, 798-804.

**-Y-**

**Yan, L., Zhang, J., Li, M., Cao, Y., Xu, Z., Cao, Y., Gao, P., Wang, Y. & Jiang, Y. (2008).** DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**, 1048-1060.

**Yoshida, Y. & Aoyama, Y. (1987).** Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-45014DM purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. *Biochem Pharmacol* **36**, 229-235.

**Young, L. Y., Hull, C. M. & Heitman, J. (2003).** Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2717-2724.

**Zaoutis, T. E., Argon, J., Chu, J., Berlin, J. A., Walsh, T. J. & Feudtner, C. (2005).** The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis* **41**, 1232-1239.

**-Z-**

- Zhang, X., De Micheli, M., Coleman, S. T., Sanglard, D. & Moye-Rowley, W. S. (2000).** Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol Microbiol* **36**, 618-629.
- Zhao, X., Oh, S. H., Cheng, G., Green, C. B., Nuessen, J. A., Yeater, K., Leng, R. P., Brown, A. J. & Hoyer, L. L. (2004).** ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* **150**, 2415-2428.
- Zhu, C. X., Gao, P. H. & Jiang, Y. Y. (2010).** [Advances in the study of *Candida albicans* gene mutation on azole drug resistance]. *Yao Xue Xue Bao* **45**, 821-826.
- Zhu, W. & Filler, S. G. (2010).** Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol* **12**, 273-282.
- Znaidi, S., De Deken, X., Weber, S., Rigby, T., Nantel, A. & Raymond, M. (2007).** The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **66**, 440-452.
- Znaidi, S., Weber, S., Al-Abdin, O. Z. & other authors (2008).** Genomewide location analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance. *Eukaryot Cell* **7**, 836-847.
- Znaidi, S., Barker, K. S., Weber, S., Alarco, A. M., Liu, T. T., Boucher, G., Rogers, P. D. & Raymond, M. (2009).** Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryot Cell* **8**, 806-820.

## RESUME et MOTS CLES

**TITRE :** Bases moléculaires de la résistance aux antifongiques azolés chez *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*

*Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* sont deux champignons cosmopolites d'importance médicale majeure car à l'origine d'un large éventail de manifestations cliniques dont l'impact médico-économique est considérable. Les infections invasives, les plus sévères, sont associées à une mortalité élevée, comprise entre 30 et 55 % et affectent chaque année près de 500.000 individus à l'échelle mondiale. Les antifongiques azolés constituent une famille d'antifongiques de choix pour la prise en charge de ces infections. Cependant, une acquisition de résistance peut survenir, résultat le plus souvent de traitements prolongés. Cette résistance constitue alors un problème médical du fait du risque d'échec thérapeutique mais surtout du fait du nombre limité de molécules antifongiques disponibles pour la prise en charge de ces infections.

L'exploration des mécanismes moléculaires participant à la résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans* et *A. fumigatus* ont notamment permis de mettre en évidence de nouvelles mutations impliquées dans la résistance aux azolés sur les gènes *CaERG11* et *CaERG3* ainsi de potentielles mutations gain de fonction sur les gènes codant les facteurs de transcription Tac1, Mrr1 et Ucp2. Ces résultats soulignent la remarquable diversité des mécanismes mis en jeu chez ces deux champignons pathogènes

**TITRE :** Molecular mechanisms leading to azole resistance in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*

*Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* are two fungal pathogens with a worldwide distribution and of medical importance, both being responsible for a wide range of diseases with a considerable medical and economic impact. Invasive infections are associated with a high mortality rate between 30 and 55 % and affect each year, nearly 500.000 people worldwide. Azole antifungal agents are still considered as the drugs of choice for the management of these infections. However, azole resistance may occur, usually after long-term therapy and represent a major clinical issue due to the risk of treatment failure and because of the limited number of available drugs for the management of these infections.

The investigation of the molecular basis of the mechanisms leading to azole antifungal resistance in *C. albicans* and *A. fumigatus* was the aim of our research project. All our data, lead us to identify new mutations involved in azole resistance including new mutations in *CaERG11* and *CaERG3*, as well as of potential new gain-of-function mutations in the genes encoding the transcription factors Tac1, Mrr1 and Ucp2. These results also underline the remarkable diversity of the mechanisms that have been developed by these two major fungal pathogens to survive to antifungal pressure.

**Keywords :** *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, azole antifungal agents, molecular mechanisms of resistance.