UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 2021 **N° 2021-119**

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
et
MÉMOIRE DU DIPLÔME
D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MEDICALE

par

Sophie HARTUIS

Présentée et soutenue publiquement le 13 octobre 2021

Impact du polymorphisme génétique sur la résistance aux antifongiques de *Candida parapsilosis* : développement d'un modèle d'étude utilisant CRISPR-Cas9

Président du jury : Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Florent MORIO

Membres du jury : Monsieur le Professeur Stéphane CORVEC
Monsieur le Professeur Nicolas PAPON
Madame le Docteur Rose-Anne LAVERGNE

Remerciements

A Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE pour me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci également pour le partage de vos connaissances pendant les deux semestres de mon internat réalisés au sein de votre service. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage de Master 2 dans votre équipe de recherche.

A Monsieur le Docteur Florent MORIO pour m'avoir proposé ce beau projet de recherche et de m'avoir encadrée durant le stage de Master 2. Merci pour ta disponibilité, tes conseils ainsi que pour ton aide si précieuse pendant cette année de Master 2 et pour la rédaction de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Stéphane CORVEC pour avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse ainsi que pour la qualité de la formation que j'ai reçue pendant le semestre d'internat réalisé au sein de votre service.

A Monsieur le Professeur Nicolas PAPON pour avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse et de juger ce travail.

A Madame le Docteur Rose-Anne LAVERGNE pour avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse. Merci pour tes cours toujours passionnants de Parasitologie-Mycologie et ta bienveillance au cours de ces deux semestres.

Je tiens particulièrement à remercier toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicale du CHU de NANTES. Merci pour votre gentillesse, votre bienveillance et votre bonne humeur au quotidien.

Je remercie également toute l'équipe IICiMed de m'avoir si bien accueillie dans votre équipe de recherche. En particulier à Estelle pour tes conseils et ton aide tout au long de ce travail, à Isabelle pour le dosage des stérols membranaires qui ont pu enrichir la discussion de ce travail.

Aux différentes équipes de Nantes et de Tours que j'ai pu côtoyer durant mon Internat. Merci pour l'accueil et les enseignements que vous m'avez transmis.

A l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicale du CHU de Martinique pour votre accueil, votre gentillesse et la découverte des spécialités antillaises. Au Dr. DESBOIS-NOGARD d'avoir accepté mon stage Inter-CHU et pour la transmission de vos connaissances.

A l'équipe du laboratoire du CH de Saint-Nazaire pour votre accueil, votre formation et pour m'avoir permis de me libérer du temps pour la rédaction de cette thèse.

A mes co-internes rencontrés durant ces années d'Internat et plus particulièrement à Pierre pour ton imagination débordante et à Anaïs pour ce premier semestre en Biochimie, pour cette aventure tourangelle et pour tous les autres moments.

A Malo et Claire pour votre bonne humeur durant ces cours de Master 2, sans vous ces quelques mois de cours n'auraient pas été aussi sympathiques.

A Marion pour ton soutien, ton aide et ta compréhension tout au long de ces années.

A Claire et Laure pour votre amitié de longues dates, rien ne change même les années passant.

A Cinthia, Coline, Gwladys et Pauline pour votre amitié, votre soutien et ces bons moments passés ensemble.

A Lisa et Lilia, pour votre amitié, même éloignées nous restons toujours en contact.

Aux amies et amis Pharma, à nos journées BU mais aussi à nos soirées, sans vous je n'aurais pas aussi bien vécu mes années de fac. A toutes nos retrouvailles qui sont toujours si réussies.

A notre trio de choc. Mo et Wayne, sans votre aide, votre soutien, votre bonne humeur, cette année de préparation au concours à l'Internat aurait été encore plus difficile.

Au groupe de St Sylvain pour ces bons moments passés ensemble et plus particulièrement à Aurélien pour ton aide et nos discussions sur CRISPR.

A Adeline, Alix et Camille, je suis ravie d'avoir pu vous rencontrer durant ces années d'Internat. Merci pour votre soutien. Je n'oublie pas également Samuel, Ronan et Pierre, pour ces moments partagés tous ensemble ainsi que tous ceux à venir.

A ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, ainsi qu'à la famille GOUSSAULT-LANGLAIS, pour votre soutien. C'est toujours un plaisir de vous retrouver.

A la famille ROBIN pour votre soutien et votre gentillesse.

A mes parents pour votre patience, votre soutien et votre aide si précieuse depuis toujours. Vous êtes toujours là pour moi. Je ne vous en remercierai jamais assez.

A Olivier pour ton soutien sans faille, ton amour et ton aide. Merci pour m'avoir suivie dans tous mes déménagements au cours de l'Internat et pour la zenitude que tu m'apportes au quotidien. A tous nos projets à venir.

Une pensée pour mes grands-parents, pour Louis et Alain, vous seriez fiers de moi.

Table des matières

Remerciements 1
Liste des abréviations 6
Liste des figures 8
Liste des tableaux 10
I. Introduction 12
A. Généralités sur *C. parapsilosis* 12
B. Pouvoir pathogène de *C. parapsilosis* 13
C. Sensibilité et résistance de *C. parapsilosis* aux antifongiques 13
i. Molécules antifongiques disponibles et modes d'action 13
ii. Phénotype sauvage et résistance acquise 14
iii. Prévalence de la résistance chez *C. parapsilosis* 17
iv. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *C. parapilosis*.. 20
v. Rôle de *MSH2* 25
D. Outils d'édition du génome 26
i. Avant l'utilisation de CRISPR-Cas9 27
ii. CRISPR-Cas9 : des ciseaux moléculaires 31
iii. CRISPR-Cas9 chez *C. parapsilosis* 33
E. Problématique de recherche et objectifs 34
II. Matériels et Méthodes 37
A. Souches mycologiques 37
B. Gènes étudiés dans le cadre de ce projet 37
C. Edition du génome de *C. parapsilosis* par la technique CRISPR-Cas9 38
i. Principe 38
ii. Construction des ARN guides et clonage dans le plasmide pCP-tRNA 40
iii. Construction de l'ADN donneur (ou Repair Template, RT) 41
iv. Transformation chez *C. parapsilosis* 43
v. Identification des mutants CRISPR-Cas9 43
D. Profil de sensibilité aux antifongiques des mutants CRISPR-Cas9 44
III. Résultats 47
A. Mise en place de la technique CRISPR-Cas9 47
B. Application de la technique CRISPR-Cas9 pour l'inactivation du gène *MSH2* 48
i. Application sur la souche *C. parapsilosis* ATCC 22019 48

ii. Sensibilité *in vitro* aux antifongiques de la souche ATCC 22019 *msh2-/-* 50
iii. Application à d'autres fonds génétiques de *C. parapsilosis* (souches cliniques) .. 50
C. Introduction de mutations ponctuelles 51
i. Mise au point et optimisation de la technique 52
ii. Introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *ERG11* 54
a. Mutation A395T (Y132F) 54
b. Mutation A428G (K143R) 55
c. Mutation G1193T (R398I) 56
iii. Introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *TAC1* 56
a. Mutation G1949A (G650E) 56
b. Mutation T2933G (L978W) 56
iv. Introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *MRR1* 57
a. Mutation G1747A (G583R) 57
b. Mutation A2619C (K873N) 57
v. Introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *ERG3* 58
a. Mutation G331A (G111R) 58
vi. Sensibilité *in vitro* aux antifongiques des mutants CRISPR-Cas9 58
D. Apport de la technique CRISPR-Cas9 pour l'étude de phénotype de résistance complexe 65
i. Réversion de la mutation Y132F sur le gène *ERG11* 65
ii. Génération simultanée de mutants multiples (exemple de la combinaison de la mutation Y132F et R398I sur le gène *ERG11*) 67
E. Collection de mutants générés au cours de ce travail 68
IV. Discussion 72
V. Conclusion et Perspectives 83
Bibliographie 85
Annexes 97

Liste des abréviations

5-FC : Flucytosine

5-FOA : Acide 5-fluoro-orotique

ABC : ATP-Binding Cassette

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMB : Amphotéricine B

APHP : Assistance Publique Hôpitaux de Paris

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messager

Cas9 : CRISPR associated protein 9

CDR1 : Candida Drug Resistance 1 gene

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNRMA : Centre National de Référence des Mycoses invasives et Antifongiques

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

ECV : Epidemiological Cutoff Values

ERG3: C5 desaturase gene

ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EuPaGDT : Eukaryotic Pathogen gRNA Design Tool

FLC : Fluconazole

HDR : Homology Directed Repair

HDV : Hepatitis Delta Virus

IDSA : Infectious Diseases Society of America

ISA : Isavuconazole

Mb : Mégabase

MDR : Multiple Drug Resistance

MDR1 : MultiDrug Resistance 1 gene

MFS : Major Facilitator Superfamily

MIC : Micafungine

MRR1 : Multidrug Resistance Regulator 1 gene

NHEJ : Non-Homology End Joining

NTC : Nourséothricine

PAM : Protospacer Adjacent Motif

Pb : Paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

POS : Posaconazole

RNP : Nuclear Ribonucleoprotein

RT : Repair Template

SDD : Sensible Dose-Dependant

TAC1 : Transcriptional Activator of CDR genes

UPC2 : Uptake Control 2 gene

VRC : Voriconazole

YPD : Yeast extract Peptone Dextrose

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique du genre *Candida* (Papon *et al.*, 2013) 12
Figure 2. Les différents mécanismes de résistances aux antifongiques (Morio *et al.*, 2017)... 17
Figure 3. Synthèse du polymorphisme du gène *ERG11* chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature 22
Figure 4. Synthèse du polymorphisme du gène *UPC2* (facteur de transcription de *ERG11*) chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature 22
Figure 5. Synthèse du polymorphisme du gène *TAC1* (facteur de transcription de *CDR1*) chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature 23
Figure 6. Synthèse du polymorphisme du gène *MRR1* (facteur de transcription de *MDR1*) chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature 24
Figure 7. Synthèse du polymorphisme du gène *ERG3* chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature 24
Figure 8. Synthèse du polymorphisme du gène *FKS1* chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature 25
Figure 9. Schéma illustrant les différentes étapes de la méthode « URA blaster » utilisée chez *C. albicans* pour l'inactivation du gène *YTG* (Xu *et al.*, 2014) 28
Figure 10. Schéma illustrant les différentes étapes de la méthode « SAT1-flipper » utilisée chez *C. albicans* pour l'inactivation du gène *YTG* (Xu *et al.*, 2014) 29
Figure 11. Schéma représentant les différentes étapes de la méthode « PCR fusion » permettant de déléter des gènes décrite chez *C. albicans* (Noble & Johnson, 2005) 30
Figure 12. Schéma représentant le système CRISPR-Cas9 (Jinek *et al.*, 2012) 32
Figure 13. Carte du plasmide pCP-tRNA utilisé pour l'édition du génome de *C. parapsilosis* (Lombardi *et al.*, 2019) 39
Figure 14. Schéma représentant la cassette d'expression de l'ARN guide contenu dans le plasmide pCP-tRNA (Lombardi *et al.*, 2019) 40
Figure 15. Principe de la génération du RT par extension d'un couple d'amorces par PCR (ici pour l'inactivation du gène *ADE2*) 41
Figure 16. Représentation schématique des deux différents types de Repair Template utilisés dans notre travail 42
Figure 17. Schéma représentant la PCR TAG utilisée lors du screening des colonies pour vérifier la présence ou non de la cassette d'inactivation lors des manipulations d'inactivation de gène 43
Figure 18. Inactivation du gène *ADE2* (CPAR2_805940) de *C. parapsilosis* (souche ATCC 22019) 48
Figure 19. Confirmation par séquençage de l'obtention de mutants homozygote et hétérozygote pour la mutation A395T (Y132F) du gène *ERG11* (souche ATCC 22019) 53
Figure 20. PCR allèle spécifique pour le screening des mutants A395T (Y132F) sur le fond génétique STZ5 55
Figure 21. Comparaison des Etest® (Fluconazole) entre la souche parentale et les mutants générés pour la mutation A395T (Y132F) sur le gène *ERG11* 60
Figure 22. Comparaison des Etest® (Fluconazole) entre la souche parentale et les mutants générés G650E et L978W sur le gène *TAC1* 62
Figure 23. Comparaison des Etest® (Fluconazole) entre la souche sauvage et le mutant G583R 63

Figure 24. Comparaison des Etest® (Posaconazole) entre la souche parentale et le mutant G111R 63
Figure 25. Comparaison des Etest® (Micafungine) entre la souche parentale et le mutant G111R 64
Figure 26. Comparaison des Etest® (Amphotéricine B) entre la souche parentale et le mutant G111R 64
Figure 27. Confirmation par séquençage de l'obtention du mutant homozygote T395A (F132Y) du gène *ERG11* par la réversion de la mutation Y132F (flèche rouge) de la souche clinique Nice2. 66
Figure 28 . Comparaison des Etest® (Fluconazole) entre la souche parentale et le mutant F132Y 67
Figure 29 : Schéma modifié issu de la publication de Martel *et al.* représentant la voie de l'ergostérol chez *C. albicans* lors de la perturbation de Erg3 en l'absence d'antifongiques azolés (absence d'inhibition de Erg11) avec accumulation des stérols intermédiaires (Martel *et al.*, 2010) 80

Liste des tableaux

Tableau 1. Synthèse des principales molécules antifongiques systémiques disponibles 14
Tableau 2. Les différents mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques 15
Tableau 3. Souches de *C. parapsilosis* utilisées dans notre étude 37
Tableau 4. Valeurs de référence définies par le CLSI et adaptées à la méthode Etest® 45
Tableau 5. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par méthode Etest® pour le mutant CRISPR-Cas9 dont le gène *MSH2* a été inactivé 50
Tableau 6. Résultats de la transformation visant à inactiver le gène *MSH2* sur différents fonds génétiques de *C. parapsilosis* (n=6) 51
Tableau 7. Résultats des deux transformations réalisées avec des RT de 60 pb pour l'introduction de mutations ponctuelles sur le gène *ERG11* de *C. parapsilosis* (ATCC 22019) 52
Tableau 8. Comparaison de l'efficacité de transformation, en fonction de la taille des bras d'homologie (30 pb vs 50 pb) pour introduire la mutation ponctuelle A395T (Y132F) sur le gène *ERG11* de *C. parapsilosis* 54
Tableau 9. Résultats des différentes transformations pour introduire la mutation A395T (Y132F) sur le gène *ERG11* de *C. parapsilosis* 55
Tableau 10. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par méthode Etest® pour les souches ATCC 22019 et STZ5 et chaque mutant CRISPR-Cas9 59
Tableau 11. CMI obtenues par méthode Etest® pour le mutant CRISPR-Cas9 pour le gène *ERG11* de la souche de *C. parapsilosis* Nice2 67
Tableau 12. Résultats du séquençage pour la transformation qui avait pour objectif d'introduire la combinaison de mutations Y132F et R398I sur le gène *ERG11* de *C. parapsilosis* ATCC 22019 68
Tableau 13. Synthèse des différents mutants générés lors des manipulations d'inactivation de gènes 69
Tableau 14. Synthèse des différents mutants générés sur les différents fonds génétiques lors des manipulations d'introduction de mutations ponctuelles 70
Tableau 15. Résultats du dosage des stérols pour les mutants homozygotes G111R et les souches parentales correspondantes 78
Tableau 16. Synthèse de l'impact des mutations sur la sensibilité aux différents antifongiques 81

Introduction

I. Introduction

A. Généralités sur *C. parapsilosis*

Candida parapsilosis, notre modèle d'étude, est une levure ascomycète, commensale et saprophyte faisant partie de la flore normale de la peau chez l'Homme. Sur le plan taxonomique, l'espèce *C. parapsilosis* appartient, comme *Candida albicans* et *Candida tropicalis*, au clade dit « CTG » (Figure 1). L'appartenance à ce clade se traduit par une particularité dans la traduction de l'ARNm, le codon « CTG » étant traduit comme une sérine au lieu d'une leucine (Papon *et al.*, 2013). La séquence complète du génome de la souche de référence CDC317 a été publiée en 2009 (Butler *et al.*, 2009). *Candida parapsilosis* est une espèce diploïde dont le génome de 13 Mb est distribué sur 8 chromosomes dont la taille varie de 0.9 à 3 Mb (Tóth *et al.*, 2019). Il comprend 5837 gènes dont la fonction de l'immense majorité est encore inconnue (http://www.candidagenome.org/cache/C_parapsilosis_CDC317_genomeSnapshot.html).

En 2005, Tavanti *et al.* montraient que *C. parapsilosis* est un complexe d'espèces composé de 3 espèces : *C. parapsilosis sensu stricto*, et deux espèces dites cryptiques, *Candida orthopsilosis* et *Candida metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005). Dans ce travail, nous nous intéresserons uniquement à *C. parapsilosis*, qui est aussi l'espèce la plus fréquente en clinique.

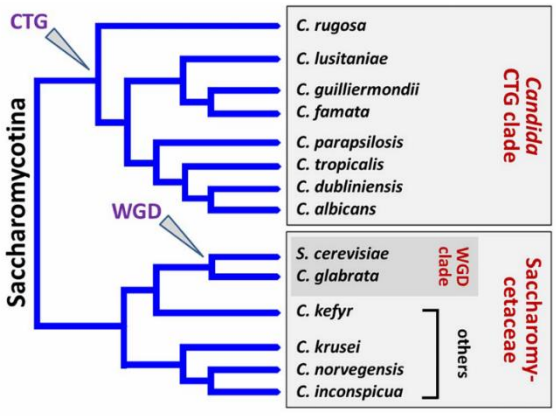


Figure 1. Arbre phylogénétique du genre *Candida* (Papon *et al.*, 2013)

B. Pouvoir pathogène de *C. parapsilosis*

Candida parapsilosis fait partie de la flore normale de la peau chez l'Homme. Grâce à sa capacité d'adhérence élevée, elle est capable de former du biofilm sur les cathéters veineux centraux et autres dispositifs implantables. Cette espèce a une croissance rapide dans les formulations de nutrition parentérale utilisées en unités de soins intensifs (chez les enfants dénutris et de faible poids en réanimation néonatale notamment) (Tóth *et al.*, 2019). La part de *C. parapsilosis* dans les infections superficielles est mal connue du fait de son caractère commensal. En revanche, *C. parapsilosis* est une des espèces responsable d'infections invasives, en particulier de candidémies (2 ou 3ème espèce après *C. albicans* en termes de prévalence), dont la mortalité associée est de l'ordre de 15-20% (Mohr *et al.*, 2020; Tadec *et al.*, 2016). Elle peut enfin se transmettre de façon horizontale étant ainsi responsable d'épidémies clonales, de plus en plus rapportées (Tóth *et al.*, 2019).

C. Sensibilité et résistance de *C. parapsilosis* aux antifongiques

i. Molécules antifongiques disponibles et modes d'action

A l'heure actuelle, il existe seulement quatre classes d'antifongiques systémiques permettant de traiter les infections fongiques invasives : les azolés, les échinocandines, les polyènes et la flucytosine (5-FC). Chaque classe d'antifongiques a son propre mécanisme d'action (Tableau 1). A titre d'exemple, les azolés bloquent la biosynthèse de l'ergostérol, principal stérol membranaire, via l'inhibition de la lanostérol 14 α déméthylase (gène *ERG11*). Les antifongiques azolés et la 5-FC ont une action fongistatique vis-à-vis des levures (Gonçalves *et al.*, 2016; Vermes *et al.*, 2000) alors que les échinocandines et l'amphotéricine B ont une action fongicide (Cappelletty & Eiselstein-McKitrick, 2007; Tollemar *et al.*, 2001). L'efficacité *in vivo* des échinocandines sur *C. parapsilosis* reste discutée du fait de la présence à l'état naturel d'une mutation sur le gène *FKS1*, responsable des CMIs plus élevées observées *in vitro* pour cette espèce (Garcia-Effron *et al.*, 2008).

Les azolés, et plus particulièrement le fluconazole, sont une option thérapeutique encore largement utilisée pour la prise en charge des infections systémiques, non compliquées à *C. parapsilosis* dans les recommandations internationales. La société européenne de maladies infectieuses et de microbiologie clinique (ESCMID) recommande en première intention

l'utilisation des échinocandines lors d'une candidémie (recommandation grade AI). Si le fluconazole est moins recommandé (CI), elle mentionne que pour *C. parapsilosis*, le fluconazole peut être un meilleur traitement que les échinocandines (Cornely *et al.*, 2012). De son côté, la société américaine des maladies infectieuses (IDSA) recommande le traitement des candidémies par des échinocandines en première intention. Elle conseille également l'utilisation du fluconazole en première intention si le patient n'est pas en soins critiques et que l'épidémiologie locale n'est pas en faveur d'une espèce résistante au fluconazole (Pappas *et al.*, 2016). De plus, elle recommande de tester la sensibilité *in vitro* aux antifongiques azolés et aux échinocandines notamment pour *C. parapsilosis.*

Tableau 1. Synthèse des principales molécules antifongiques systémiques disponibles

Classe	Molécule	Mécanisme d'action	Cible
Azolés	Fluconazole Itraconazole Voriconazole Posaconazole Isavuconazole	Inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol : Inhibiteurs de la lanostérol 14 α déméthylase (gène *ERG11*)	Membrane
Echinocandines	Caspofungine Micafungine Anidulafungine	Inhibiteur de la ß-1-3 glucane synthase (gène *FSK1-FSK2*)	Paroi
Polyènes	Amphotéricine B (forme déoxycholate et formes lipidiques)	Formation de pores dans la membrane plasmique	Membrane
Pyrimidines	Flucytosine	Inhibition de la synthèse protéique et transcription	Noyau

ii. Phénotype sauvage et résistance acquise

Candida parapsilosis est une espèce naturellement sensible à tous les antifongiques. Elle présente des CMIs basses pour tous les antifongiques azolés, l'amphotéricine B et la flucytosine (Pfaller *et al.*, 2011, 2014). En revanche, comparée à d'autres espèces de *Candida, C. parapsilosis* a la particularité de présenter une sensibilité diminuée aux échinocandines *in vitro*. Elle s'explique par la présence d'une alanine au lieu d'une proline en position 660 au niveau du gène *FKS* qui est la cible des échinocandines (Garcia-Effron *et al.*, 2008).

Néanmoins comme les autres espèces de *Candida*, en cas d'exposition aux antifongiques, une résistance acquise peut survenir et est redoutée car elle peut contribuer à l'échec thérapeutique. Les mécanismes de résistance aux antifongiques, initialement explorés chez *C. albicans* et *Nakaseomyces glabrata* (syn. *Candida glabrata*), sont désormais aussi mieux connus chez les autres espèces de *Candida*. Malgré des variations propres à chaque espèce fongique, les grands principes de résistance semblent conservés parmi les levures (Tableau 2).

Tableau 2. Les différents mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques

Classe d'antifongiques	Mécanismes de résistance
Azolés	Modification de la cible (mutations sur le gène *ERG11*), Surexpression de la cible (*ERG11*), Surexpression transporteur d'efflux (ex *CDR*, *MDR*), Déviation de la voie de la biosynthèse de l'ergostérol (ex : *ERG3*)
Echinocandines	Modification de la cible (mutation(s) au niveau des gènes *FKS1/ FKS2*)
Polyènes	Modification de la cible : mutation au niveau des gènes codant pour des enzymes nécessaires à la biosynthèse de l'ergostérol (*ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6*, *ERG11*)
Pyrimidines	Modification du gène codant pour le transport de la molécule dans le noyau (*FCY2*) Modification des enzymes permettant à la molécule d'être active (*FCY1* et *FUR1*)

Il existe ainsi quatre principaux mécanismes susceptibles de conférer la résistance aux antifongiques azolés :

- **Mutation(s) ponctuelle(s) du gène cible des azolés (*ERG11*)** : il s'agit d'un changement d'acide aminé causé par la substitution d'une base nucléique par une autre au sein du gène *ERG11* (I dans la Figure 2). Chez *C. albicans*, il a été démontré que ces mutations ne sont pas régulièrement distribuées mais surviennent préférentiellement dans des régions particulières du gène *ERG11* appelées des « hot-spot » (Marichal *et al.*, 1999). Ces mutations peuvent être situées à proximité du site catalytique de l'enzyme ce qui est le cas de la mutation Y132F (Flowers *et al.*, 2015), décrite également chez *C. parapsilosis* (Singh *et al.*, 2019) ou à proximité du canal d'accès ce qui conduit à empêcher l'antifongique d'accéder au site actif (Marichal *et al.*, 1999).

- **Une surexpression de la cible des azolés**. Elle repose sur l'acquisition de mutations au niveau du facteur de transcription Upc2 gouvernant l'expression du gène *ERG11* et d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol (II dans la Figure 2). Ce mécanisme de dérégulation transcriptionnelle a été décrit chez *C. albicans* dans les travaux de MacPherson *et al.* (MacPherson *et al.*, 2005). Plusieurs mutations au niveau du facteur de transcription Upc2, responsables d'un gain de fonction de celui-ci, c'est-à-dire provoquant une augmentation de l'expression de Erg11, ont été décrites chez *C. albicans* (Flowers *et al.*, 2012). Cette augmentation de l'expression de Erg11 entraîne une diminution de la sensibilité au fluconazole chez *C. albicans*. Il existe un gène orthologue de *UPC2* chez *C. parapsilosis* mais à ce jour aucune mutation gain de fonction a été formellement démontrée (bien que des mutations ont été décrites chez des isolats cliniques résistants au fluconazole).

- **Mécanismes d'efflux actifs impliquant des transporteurs membranaires**. A l'instar d'Upc2, des mutations « gain de fonction », présentes au niveau des facteurs de transcription Tac1 et Mrr1, peuvent entraîner une surexpression constitutive des pompes d'efflux Cdr1 et Mdr1 ATP-Binding Cassette (ABC) et Major Facilitator Superfamily (MFS) ce qui va engendrer une résistance aux antifongiques azolés (III dans la Figure 2). La surexpression de ces pompes d'efflux va entraîner une expulsion plus importante des antifongiques azolés de la cellule, expliquant la diminution de la sensibilité pour l'antifongique. Le rôle de ces deux facteurs de transcription dans la résistance au fluconazole a été très étudié chez *C. albicans* (A. T. Coste *et al.*, 2004; Morschhäuser *et al.*, 2007) mais est partagé par d'autres espèces dont *C. parapsilosis* (Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020; Berkow *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2018).

- **Déviation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol**. Des mutations au niveau du gène *ERG3* et d'autres gènes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol ont été décrites chez plusieurs espèces de *Candida* (IV dans la Figure 2). Il s'agit d'une voie alternative utilisée par la cellule fongique en présence d'antifongiques azolés. L'inhibition de Erg11 due aux antifongiques azolés va donc solliciter cette voie alternative, utilisant l'enzyme codée par le gène *ERG3*, qui va convertir des intermédiaires non toxiques en toxiques (14 alpha methyl stérols). Une mutation sur ce gène peut alors entraîner une réduction ou une perte d'activité de cette enzyme ayant pour conséquence d'empêcher l'accumulation d'intermédiaires toxiques et d'entraîner une résistance aux antifongiques azolés. En l'absence d'azolés, ces souches, présentant une

altération du gène *ERG3*, ont un défaut de la production d'ergostérol ce qui conduit à une moindre sensibilité à l'amphotéricine B (Morio *et al.*, 2012).

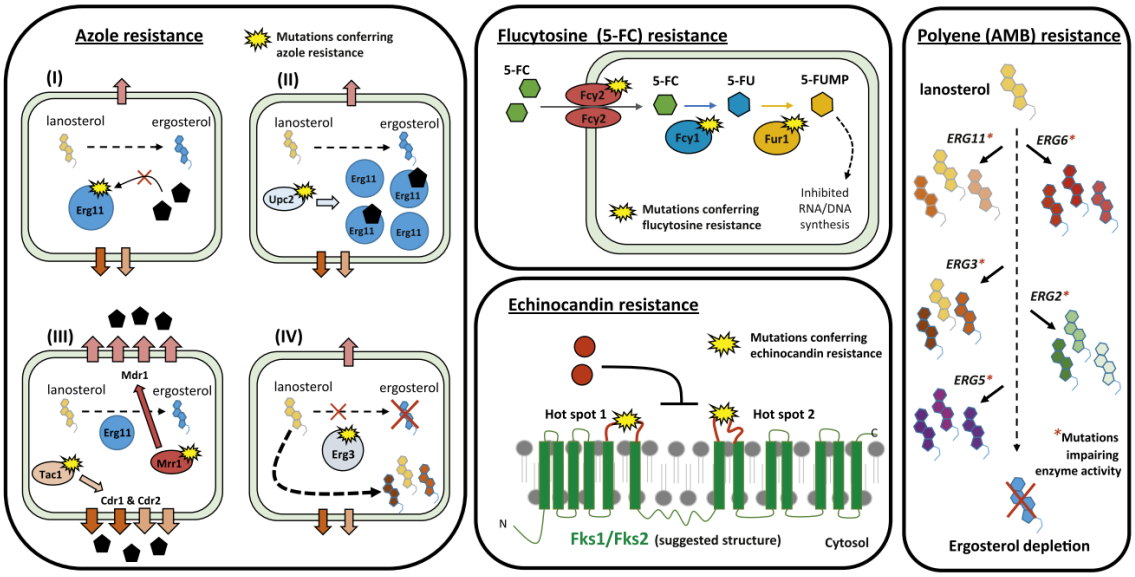


Figure 2. Les différents mécanismes de résistances aux antifongiques (Morio *et al.*, 2017)

La plasticité du génome de certaines espèces de *Candida* a un rôle important dans l'acquisition de la résistance aux antifongiques. En effet, des modifications structurales des chromosomes ou du nombre de chromosomes (aneuploïdie) ont été décrites en réponse à l'exposition aux antifongiques azolés (Poláková *et al.*, 2009; Selmecki *et al.*, 2010). La plasticité du génome a été également très étudiée chez *C. albicans*. Il a été démontré qu'une aneuploïdie était liée à la résistance aux antifongiques azolés avec notamment la formation d'un isochromosome tel que le chromosome 5 (i(5L) chez *C albicans* (Selmecki *et al.*, 2006). Cet isochromosome contribue ainsi à augmenter le nombre de copies des gènes *ERG11* et *TAC1*, deux gènes qui sont situés sur un des bras du chromosome 5. Ce chromosome surnuméraire est rapidement perdu à l'arrêt de l'exposition à l'antifongique. Ce phénomène n'a pas été décrit à ce jour chez *C. parapsilosis*.

iii. Prévalence de la résistance chez *C. parapsilosis*

La résistance aux antifongiques, en particulier aux azolés, est un phénomène qui a émergé ces dernières années et qui constitue un enjeu de santé publique du fait du nombre limité d'antifongiques disponibles (Fisher *et al.*, 2018). Différents mécanismes de résistance ont été

décrits depuis une dizaine d'années, notamment grâce à l'étude d'isolats cliniques de *C. albicans* et *N. glabrata* résistants du fait de traitement par azolés au long cours (Morio *et al.*, 2017; Pristov & Ghannoum, 2019). Selon les différentes régions du monde, il existe une répartition variable de la résistance au fluconazole de *C. parapsilosis* comme le montrent différentes publications (Astvad *et al.*, 2018; Castanheira *et al.*, 2020; Desnos-Ollivier *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2019; Lockhart *et al.*, 2012; Tadec *et al.*, 2016). Si elle reste moins fréquente que pour *N. glabrata*, bien que moins étudiée, elle est beaucoup plus fréquemment observée que pour *C. albicans*.

Au CHU de Nantes, une étude épidémiologique a été conduite entre 2004 à 2010 sur les différentes espèces retrouvées lors des épisodes de candidémies (n=188 patients, 191 épisodes) et leur profil de sensibilité *in vitro* aux antifongiques (Tadec *et al.*, 2016). Vingt-huit isolats de *C. parapsilosis* ont été retrouvés soit 14,2% (2ème espèce la plus fréquemment isolée). Pour le fluconazole, la distribution des CMIs, réalisée par méthode Etest® (bioMérieux), s'étendait de 0,047 à 96 µg/mL avec 11% des isolats non sensibles au fluconazole. Aucune souche n'était résistante à la caspofungine ni au fluconazole pour *C. albicans*.

Une étude française récente, réalisée par le Centre National de Référence des Mycoses invasives et Antifongiques (CNRMA), a testé la sensibilité aux antifongiques (fluconazole, voriconazole et posaconazole) par méthode EUCAST d'isolats responsables d'infections fongiques invasives, principalement issus d'hémocultures et reçus au CNRMA entre 2003 et 2019 (Desnos-Ollivier *et al.*, 2021). Huit cent vingt isolats de *C. parapsilosis* dont 708 isolats issus d'hémocultures ont été reçus. Cinquante-deux isolats de *C. parapsilosis* soit 6,3% se sont révélés non sensibles au fluconazole. Dix-huit isolats soit 2,2% étaient non sensibles au voriconazole et 196 de ces isolats soit 23,9% étaient résistants au posaconazole.

Une large étude américaine, réalisée dans les hôpitaux d'Atlanta (n=24) et de Baltimore (n=17) entre 2008 et 2011, s'est intéressée aux levures retrouvées dans les épisodes de candidémies et à leur profil de sensibilité *in vitro* aux antifongiques (Lockhart *et al.*, 2012). Sur la période d'étude, 389 isolats de *C. parapsilosis* ont été identifiés soit 17% des isolats (3ème espèce la plus fréquemment isolée). Pour le fluconazole, les CMIs de *C. parapsilosis* réalisées selon la méthode du CLSI allaient de 0,125 à 64 µg/mL avec 4,1% d'isolats résistants au fluconazole. En revanche, seulement 2,3% des isolats de *C. albicans* étaient résistants au fluconazole. Pour

la micafungine, la distribution des CMIs a été indiquée allant de 0,008 à 4 µg/mL sans isolats résistants à la micafungine (Lockhart *et al.*, 2012).

Une étude récente, non européenne (Koweit), révèle une augmentation progressive de la prévalence de la résistance au fluconazole de *C. parapsilosis* ces dernières années : moins de 1% des isolats de *C. parapsilosis* étaient résistants au fluconazole entre 2006 et 2011 contre 4,7% entre 2012 et 2017 (Khan *et al.*, 2019).

Une large étude Norvégienne réalisée de 2004 à 2012 dans 22 hôpitaux montrait que la distribution des CMIs (méthode Etest®, bioMérieux) au fluconazole lors de candidémies à *C. parapsilosis* varie de 0,125 à ≥32 µg/mL avec 2,7% des isolats résistants au fluconazole (Hesstvedt *et al.*, 2015). Dans une étude plus récente au Danemark, 6,5% des isolats de *C. parapsilosis* étaient résistants au fluconazole dans les candidémies. *Candida parapsilosis* est la seconde espèce après *N. glabrata* en termes de résistance aux antifongiques azolés dans cette étude (Astvad *et al.*, 2018).

A l'échelle mondiale, les données produites par l'équipe de Michael Pfaller notamment dans le cadre du réseau SENTRY sont très instructives. Une de ces études incluait des isolats d'infections invasives (n=2936 souches) issus de 60 hôpitaux du monde entier (25 pays) entre 2016 et 2017 (Castanheira *et al.*, 2020). Ces travaux permettaient de comparer le pourcentage d'isolats non sensibles pour chaque antifongique entre les différents continents et les différentes espèces. Au total, 8% des isolats de *C. parapsilosis* étaient non sensibles au fluconazole. En Europe, le pourcentage d'isolats de *C. parapsilosis* non sensibles au fluconazole était plus élevé (15,1%) mais plus faible en Amérique du Nord (3,6%). En comparaison, le pourcentage d'isolats de *C. albicans* présentant un profil non sensible au fluconazole était plus faible (0,4% au total, 1% en Amérique Latine et du Nord et 0,1% en Europe).

La résistance acquise aux échinocandines a quant à elle été longtemps sous-estimée (Garcia-Effron *et al.*, 2012; Pfaller *et al.*, 2019). Les premiers cas de résistance avérée de *C. parapsilosis* aux échinocandines ont été décrits récemment dans la publication de Arastehfar *et al.* (Arastehfar, Daneshnia, *et al.*, 2021). Dans cette étude, la mutation R658G du gène *FKS1* a été identifiée sur quatre isolats cliniques retrouvés chez différents patients. Cette substitution est équivalente à la mutation R631G précédemment décrite chez *N. glabrata*. Ces quatre isolats étaient résistants à la micafungine mais partiellement résistants à la caspofungine. Trois des

souches étaient également résistantes au fluconazole via la présence de la mutation Y132F au niveau du gène *ERG11* conférant ainsi un phénotype « Multiple Drug Resistance » (MDR).

Même si nous n'avons présenté qu'un nombre restreint d'études épidémiologiques, et que la comparaison entre études n'est pas toujours pertinente du fait des différences entre les méthodes utilisées pour la détermination des CMIs et du design variable de ces études d'ailleurs quasi-exclusivement limitées aux souches d'infections invasives, nous constatons une augmentation de la description de souches résistantes de *C. parapsilosis*, en particulier aux azolés. La prévalence de la résistance aux azolés augmente d'ailleurs dans certains centres et pose un nouveau challenge avec l'émergence de cas groupés en milieu hospitalier. La description de cas groupés d'infections invasives en secteur hospitalier, impliquant des souches clonales et résistantes au fluconazole avec une résistance parfois croisée avec le voriconazole, est un phénomène alarmant et de plus en plus décrit à travers le Monde (Corée du Sud, France, Italie, Brésil, Inde) (Choi *et al.*, 2018; Fekkar *et al.*, 2021; Martini *et al.*, 2020; Pinhati *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2019; Thomaz *et al.*, 2018). La France n'est pas épargnée puisque l'hôpital de la Pitié Salpêtrière a récemment constaté la diffusion clonale de souches résistantes de *C. parapsilosis* portant la mutation Y132F (gène *ERG11*) entre différents patients (Fekkar *et al.*, 2021). Des investigations supplémentaires sur cette résistance sont nécessaires d'autant plus que l'émergence de souches MDR est désormais possible et décrite (Arastehfar, Daneshnia, *et al.*, 2021).

Il semble donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires participant à l'acquisition de la résistance de *C. parapsilosis* et ainsi optimiser la prise en charge de ces infections.

iv. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *C. parapilosis*

Pour ce travail, nous avons conduit une revue exhaustive de la littérature visant à mieux comprendre le polymorphisme génétique des gènes impliqués dans la résistance de *C. parapsilosis*. Cette recherche a été réalisée à partir de la base de données Pubmed en utilisant les mots-clefs suivants : *Candida parapsilosis*, resistance, azole, echinocandin, *ERG11*, *TAC1*, *MRR1*, *UPC2*, *ERG3*, *FKS1*.

Au total, 27 publications ont été ainsi sélectionnées et analysées (Arastehfar, Daneshnia, *et al.*, 2021; Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020; Arastehfar, Daneshnia, Najafzadeh, *et al.*, 2020; Arastehfar, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2021; Asadzadeh *et al.*, 2017, 2021; Berkow *et al.*, 2015; Branco *et al.*, 2015, 2017; Castanheira *et al.*, 2020; Choi *et al.*, 2018; Corzo-Leon *et al.*, 2021; Demirci-Duarte *et al.*, 2021; Fekkar *et al.*, 2021; Grossman *et al.*, 2015; Magobo *et al.*, 2020; Martí-Carrizosa *et al.*, 2015; Martini *et al.*, 2020; Papp *et al.*, 2018, 2020; Rybak *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2015; Thomaz *et al.*, 2020, 2021; Zhang *et al.*, 2015).

L'ensemble des polymorphismes nucléotidiques, décrit chez des isolats sensibles et/ou résistants, est indiqué en Annexe 1. Au total, plus de 80 polymorphismes ont été décrits sur les gènes *ERG11* (n=16), *UPC2* (n=11), *TAC1* (n=23), *MRR1* (n=31), *ERG3* (n=3), *FKS1* (n=9). Nous pouvons remarquer un nombre important de mutations ponctuelles décrites au niveau des gènes *TAC1* (n=23) et *MRR1* (n=31), codant des facteurs de transcription assurant notamment la régulation des pompes d'efflux Cdr1 et Mdr1. Toutefois, dans la plupart des cas, l'imputabilité de ces mutations dans le phénotype de résistance n'a pas été confirmée de manière expérimentale mais suspectée en particulier en extrapolant à partir des données précédemment décrites chez *C. albicans* et *N. glabrata*. De plus, dans la majorité des cas, il existe très peu d'informations sur l'impact de ces mutations sur le voriconazole, l'isavuconazole et le posaconazole. Ainsi, l'activité de ces autres triazolés notamment l'isavuconazole (représentant de la dernière génération des triazolés) reste difficile à prédire. Enfin, l'impact du dosage allélique sur le phénotype de résistance, bien qu'important pour les espèces diploïdes telle que *C. parapsilosis*, est peu exploré.

Concernant le gène *ERG11*, sur les 16 mutations décrites (Figure 3) (Annexe 1), seules deux mutations (Y132F et K143R), ont été formellement impliquées dans la résistance aux azolés chez *C. parapsilosis*. Les auteurs ont utilisé la méthode « gap repair cloning » qui consiste à exprimer, par l'intermédiaire d'un plasmide, le gène *ERG11* muté de *C. parapsilosis*, chez la souche de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Singh *et al.*, 2019). Des tests de sensibilité *in vitro* (méthode de référence CLSI) ont ensuite été réalisés chez la souche de *S. cerevisiae* ainsi modifiée, révélant des CMIs de 128 µg/ml et 64-128 µg/mL respectivement pour les mutants Y132F et K143R, bien supérieures à celles de la souche parentale (8-16 µg/mL).

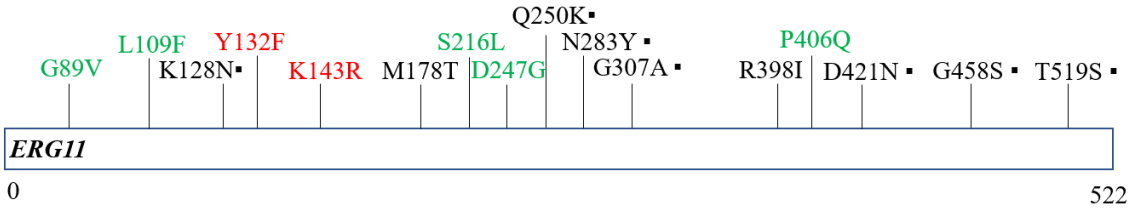


Figure 3. Synthèse du polymorphisme du gène *ERG11* chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature

En rouge, les mutations dont l'impact sur la sensibilité au fluconazole a été prouvé de manière expérimentale.
▪ Mutations suspectées de conférer une moindre sensibilité au fluconazole car uniquement décrites chez des isolats non sensibles au fluconazole.
En vert, les mutations retrouvées chez des isolats sensibles au fluconazole (polymorphisme naturel).
Les autres mutations indiquées ont été décrites chez des souches sensibles et résistantes, ou sont en association avec des mutations dont l'impact sur la sensibilité au fluconazole a été documenté.

Pour le gène *UPC2*, exploré à ce jour dans seulement deux études (Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020; Choi *et al.*, 2018), 11 mutations ont été décrites (Figure 4) (Annexe 1) mais seule la mutation G342S a été identifiée uniquement chez un isolat résistant au fluconazole.

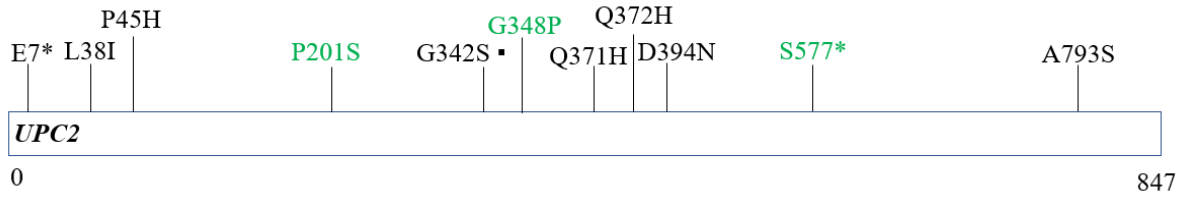


Figure 4. Synthèse du polymorphisme du gène *UPC2* (facteur de transcription de *ERG11*) chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature

▪ Mutations suspectées de conférer une moindre sensibilité au fluconazole car uniquement décrites chez des isolats non sensibles au fluconazole.
En vert, les mutations retrouvées chez des isolats sensibles au fluconazole (polymorphisme naturel).
Les autres mutations indiquées ont été décrites chez des souches sensibles et résistantes, ou sont en association avec des mutations dont l'impact sur la sensibilité au fluconazole a été documenté.

Concernant le gène *TAC1*, 23 mutations ont été identifiées (Figure 5) (Annexe 1). A ce jour, l'implication de ces mutations dans la résistance aux antifongiques azolés n'a pas été prouvée. En revanche, deux mutations (G650E et L978W) ont été fortement suspectées comme pouvant

conférer un « gain de fonction » du fait de la forte expression de Cdr1 chez les isolats cliniques correspondants (Berkow *et al.*, 2015).

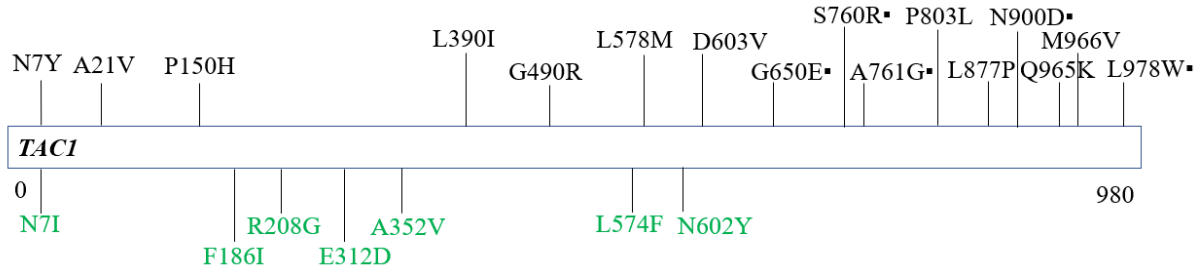


Figure 5. Synthèse du polymorphisme du gène *TAC1* (facteur de transcription de *CDR1*) chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature

▪ Mutations suspectées de conférer une moindre sensibilité au fluconazole car uniquement décrites chez des isolats non sensibles au fluconazole.
En vert, les mutations retrouvées chez des isolats sensibles au fluconazole (polymorphisme naturel).
Les autres mutations indiquées ont été décrites chez des souches sensibles et résistantes, ou sont en association avec des mutations dont l'impact sur la sensibilité au fluconazole a été documenté.

Parmi les 31 mutations identifiées sur le gène *MRR1* (Figure 6**) (**Annexe 1**),** seul l'impact de deux d'entre elles (G583R et K873N) sur la résistance aux azolés a été prouvé chez *C. parapsilosis* (Branco *et al.*, 2015). Les auteurs ont utilisé la méthode SAT1-flipper couplée à la méthode PCR de fusion. Alors que la souche parentale présentait des CMIs basses pour le fluconazole (1 µg/mL) et le voriconazole (0,03 µg/mL), les mutants G583R et K873N présentaient tous deux des CMIs élevées à 64 µg/mL pour le fluconazole et à 2 µg/mL pour le voriconazole. Aucun impact significatif sur les CMIs du posaconazole n'était mis en évidence. Ces travaux confirmaient le caractère gain de fonction de ces deux mutations (Branco *et al.*, 2015). A noter qu'une insertion d'un nucléotide en amont du gène (-102_-101insT, insertion d'un nucléotide T en position -101) a aussi été identifiée chez un isolat résistant au fluconazole (Grossman *et al.*, 2015).

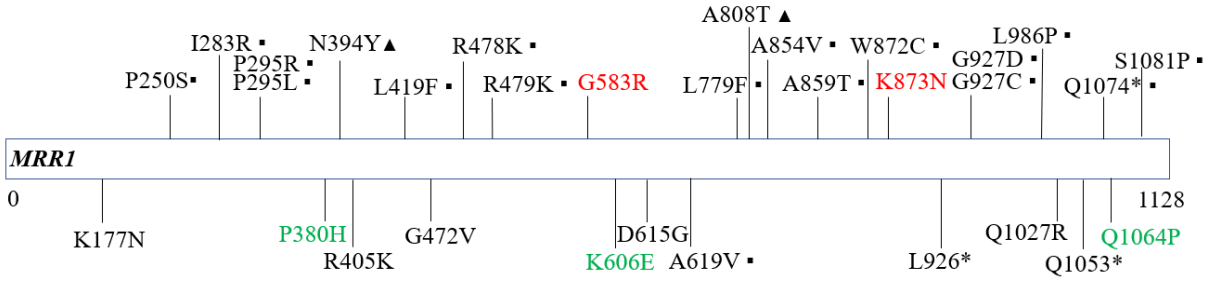


Figure 6. Synthèse du polymorphisme du gène *MRR1* (facteur de transcription de *MDR1*) chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature

En rouge, les mutations dont l'impact sur la sensibilité au fluconazole a été prouvé de manière expérimentale.
▪ Mutations suspectées de conférer une moindre sensibilité au fluconazole car uniquement décrites chez des isolats non sensibles au fluconazole.
En vert, les mutations retrouvées chez des isolats sensibles au fluconazole (polymorphisme naturel).
Les autres mutations indiquées ont été décrites chez des souches sensibles et résistantes, ou sont en association avec des mutations dont l'impact sur la sensibilité au fluconazole a été documenté.
▲ Mutation observée *in vitro* par des approches expérimentales.

Concernant le gène *ERG3*, seules trois mutations ont été décrites à ce jour (Figure 7) (Annexe 1). L'impact de la mutation G111R sur le profil de sensibilité *in vitro* aux azolés a été prouvé par une approche utilisant la méthode SAT1-flipper (Rybak *et al.*, 2017). De façon inattendue, les auteurs montraient également que l'acquisition de cette mutation sur le gène *ERG3*, réduisait aussi la sensibilité aux échinocandines.

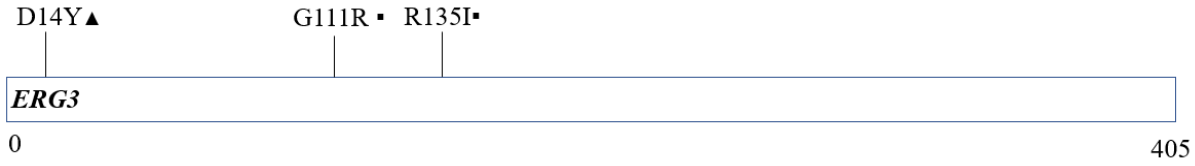


Figure 7. Synthèse du polymorphisme du gène *ERG3* chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature

▪ Mutations suspectées de conférer une moindre sensibilité au fluconazole car uniquement décrites chez des isolats non sensibles au fluconazole.
▲ Mutation observée *in vitro* par des approches expérimentales.

Concernant le gène *FKS1*, 9 mutations ont été décrites (Figure 8) (Annexe 1). L'impact sur la résistance aux échinocandines n'a pas pu être prouvé pour ces mutations. A ce jour, seule la mutation R658G a été retrouvée chez des isolats résistants à la micafungine (Arastehfar,

Daneshnia, *et al.*, 2021). A noter que certaines de ces mutations ont été observées *in vitro*, par des approches d'évolution expérimentales : S656P, L703F et W1370R (Papp *et al.*, 2018).

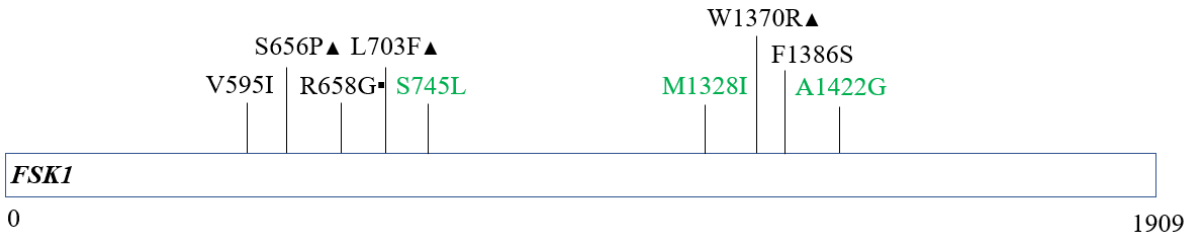


Figure 8. Synthèse du polymorphisme du gène *FKS1* chez *C. parapsilosis* d'après notre revue de la littérature

▪Mutation résistante à la micafungine.
En vert, les mutations retrouvées chez des isolats sensibles aux échinocandines.
Pour les autres mutations, le profil de sensibilité aux échinocandines est variable selon la méthode utilisée.
▲ Mutation observée *in vitro* par des approches expérimentales.

En conclusion, cette synthèse de la littérature montre que le polymorphisme de ces gènes est important mais que son impact sur l'efficacité des antifongiques est encore mal compris et peu étudié.

v. Rôle de *MSH2*

Le gène *MSH2*, impliqué dans la réparation de l'ADN, suscite de nombreuses discussions suite aux travaux pionniers de l'équipe de David Perlin (Healey *et al.*, 2016). Les auteurs montraient l'existence de polymorphismes nucléotidiques du gène *MSH2* (tels que E231G/L269F, P208S/N890I), associée à une résistance accrue de *N. glabrata* aux antifongiques ainsi que la capacité de souches Δ*MSH2* de *N. glabrata* à présenter un phénotype « hypermutator » (Healey *et al.*, 2016). Lors de l'exposition à un antifongique (par exemple à la caspofungine), il a été observé chez ces mutants une augmentation de la résistance pour cet antifongique. Cette augmentation de la résistance a aussi été observée avec le fluconazole, le voriconazole, l'amphotéricine B, et la micafungine.

En revanche, des travaux ultérieurs tendent à montrer que les polymorphismes du gène *MSH2* ne sont pas corrélés à la résistance. En Espagne, les travaux de Bordallo-Cardona *et al.* ont

montré que les mutations retrouvées au niveau du gène *MSH2* ne présageaient pas de la résistance aux antifongiques de souches de *N. glabrata* (Bordallo-Cardona *et al.*, 2019). Une étude réalisée en Inde a retrouvé des mutations au niveau de gène *MSH2* sur des isolats cliniques de *N. glabrata*, considérés comme non résistants aux antifongiques. (Singh *et al.*, 2018). Toujours chez *N. glabrata*, un étude réalisée en Chine a mis en évidence que tous les isolats cliniques résistants au fluconazole n'avaient pas de mutations au niveau du gène *MSH2* (Hou *et al.*, 2018), ce qui est également le cas dans une étude française réalisée à l'hôpital Saint-Louis à Paris (Dellière *et al.*, 2016). De plus, il a été mis en évidence que les capacités d'adaptation face à une exposition aux antifongiques sont plus importantes chez *N. glabrata* que chez les autres espèces de *Candida* par l'intermédiaire de nombreux facteurs avec notamment de fortes réponses au stress cellulaire et/ ou par des mécanismes d'adaptation aux antifongiques. Le gène *MSH2* est donc un des facteurs permettant l'échappement aux antifongiques mais n'est pas le seul (Healey & Perlin, 2018).

Ces travaux montrent qu'il est difficile de prédire la résistance aux antifongiques azolés chez *N. glabrata* en fonction du génotype de *MSH2*.

A ce jour, aucune publication ne mentionne l'existence de phénotype « hypermutator » chez *C. parapsilosis*. En revanche, *C. parapsilosis* possède un gène orthologue de *MSH2* chez cette espèce. Si ce phénotype « hypermutator » existe chez *C. parapsilosis*, la génération de mutants, dont le gène *MSH2* est inactivé pourrait s'avérer être un outil intéressant pour mieux comprendre la résistance aux antifongiques.

D. Outils d'édition du génome

Les méthodes d'édition du génome sont devenues des outils incontournables et précieux pour améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques tels que les facteurs de virulence ou bien encore l'analyse des mécanismes de résistance aux antifongiques. L'objectif de ces outils est de permettre de moduler le génome à façon afin par exemple de corréler le génotype au phénotype. Appliquée aux antifongiques, l'édition du génome permet donc l'analyse précise des mécanismes moléculaires participant à la résistance acquise aux antifongiques. Cela permet aussi d'aider au screening de futurs antifongiques en les testant vis-

à-vis de ces mutants afin de trouver des antifongiques capables de contourner le phénomène de résistance.

Toutefois, l'appartenance au clade « CTG », l'absence de marqueur universel, l'absence de cycle sexuel, la nature diploïde du génome de certaines espèces, l'absence de plasmide à l'état naturel et le faible taux de recombinaison homologue rendent difficiles la modification d'un gène chez les levures du genre *Candida* (Lombardi *et al.*, 2017). Ainsi, et comme illustré ci-dessous à travers un rapide aperçu des méthodes disponibles pour l'édition du génome de *Candida*, cet objectif a longtemps été rendu très difficile. Plusieurs techniques d'édition du génome ont ainsi été développées, avant l'avènement de la technique CRISPR-Cas9, importée initialement chez *S. cerevisiae* (DiCarlo *et al.*, 2013), puis *C. albicans* dès 2015 (Vyas *et al.*, 2015).

i. Avant l'utilisation de CRISPR-Cas9

La méthode « **URA blaster** » a été la première méthode utilisée pour l'inactivation de gènes chez *C. albicans* (Staab & Sundstrom, 2003). Cette méthode consiste à insérer par recombinaison homologue, au niveau du gène à inactiver, une cassette *URA3* flanquée de deux séquences répétées (*hisG* de *Salmonella typhimurium)* (Figure 9). Le gène *URA3* code l'enzyme orotidine-5'-phosphate décarboxylase nécessaire à la production d'uracile, essentielle pour la croissance des levures. Cette méthode nécessite donc l'utilisation de souches rendues auxotrophes pour l'uracile (exemple CAI4). La sélection des clones ayant inséré la cassette s'effectue sur un milieu sans uracile. La présence de ces séquences répétées *hisG*, conférant une certaine instabilité au génome, permet le retrait du gène *URA3* et donc sa régénération, en cultivant les clones sur milieu contenant du 5-FOA (Acide 5-fluoro-orotique, réactif mutagène). Seule subsistera une séquence *hisG* dans le locus édité (Alani *et al.*, 1987; Fonzi & Irwin, 1993). Par ailleurs, afin d'inactiver les deux allèles du gène, deux transformations séquentielles seront nécessaires. Enfin, des modifications du génome inattendues ont été remarquées à cause de l'utilisation de 5-FOA et un changement phénotypique des mutants a aussi été décrit (Samaranayake & Hanes, 2011).

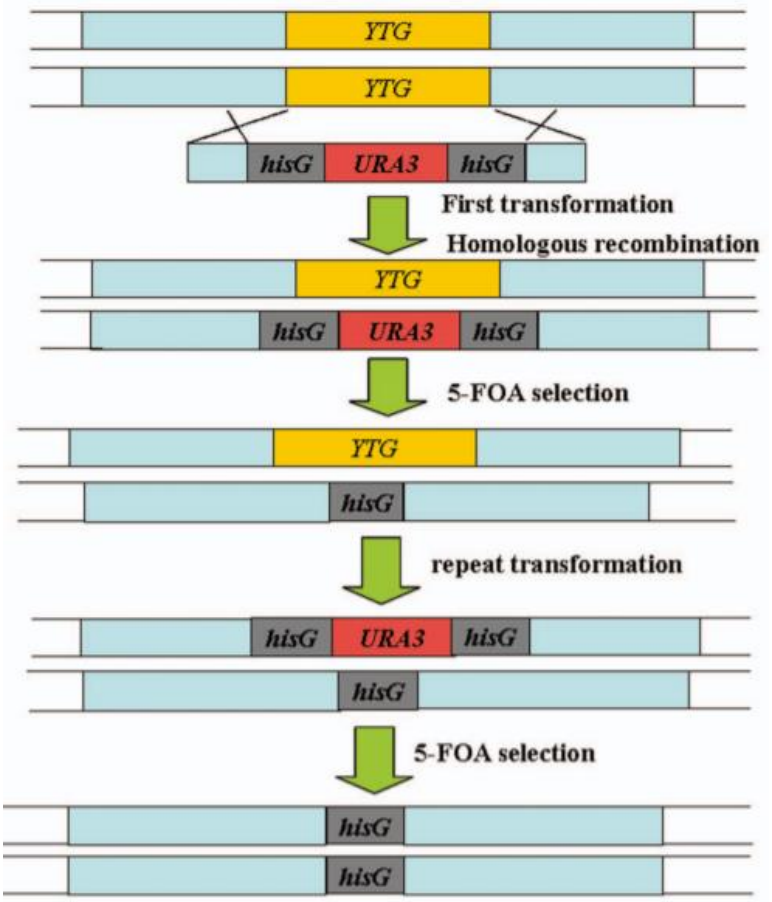


Figure 9. Schéma illustrant les différentes étapes de la méthode « URA blaster » utilisée chez *C. albicans* pour l'inactivation du gène *YTG* (Xu *et al.*, 2014)

L'introduction d'un gène conférant la résistance à un antimicrobien est une autre approche qui a été utilisée pour l'inactivation de gènes chez *C. albicans*. C'est le principe de la méthode « **SAT1-flipper** » (Reuss *et al.*, 2004). Cette méthode utilisée par de nombreuses équipes consiste à insérer une cassette composée du gène *SAT1* (qui code une streptothricine acétyltransférase, enzyme capable d'inactiver la nourséothricine, NTC), du gène *FLP recombinase* et de séquences de recombinaison FRT (Figure 10). La sélection des mutants, effectuée sur milieu NTC, permet de détecter les clones ayant intégré la cassette et donc devenus résistants à la nourséothricine. Le marqueur de résistance est ensuite recyclé par recombinaison de la FLP recombinase à l'aide des sites FRT. *In fine,* un de ces sites FRT restera intégré dans le locus du gène ciblé. Comme pour l'approche précédente, l'inactivation d'un gène chez une souche diploïde est réalisée allèle par allèle et nécessite donc deux transformations successives. Cette méthode a été adaptée chez *C. parapsilosis* pour inactiver des gènes pour l'étude de la régulation génétique du biofilm (Ding & Butler, 2007). Cette technique a également été utilisée

pour la réalisation de mutations ponctuelles pour l'étude de la résistance chez *C. parapsilosis* et *C. orthopsilosis*. Elle est cependant plus complexe notamment concernant la construction de la cassette (Branco *et al.*, 2015; Rizzato *et al.*, 2018) La quasi-totalité des manipulations génétiques pour étudier la résistance aux antifongiques azolés chez *C. parapsilosis* a été réalisée avec cette cassette « SAT1-flipper » (Berkow *et al.*, 2015; Branco *et al.*, 2015, 2017; Rybak *et al.*, 2017). Seule dans les travaux de Singh *et al.*, une autre méthode a été utilisée, appelée « gap repair cloning » (Singh *et al.*, 2019). Cette technique est un système d'expression hétérologue utilisant une souche de *S. cerevisiae* pour laquelle le gène *ERG11* natif est encore présent et dont l'expression du plasmide est hétérogène et conditionnée par la force du promoteur choisi.

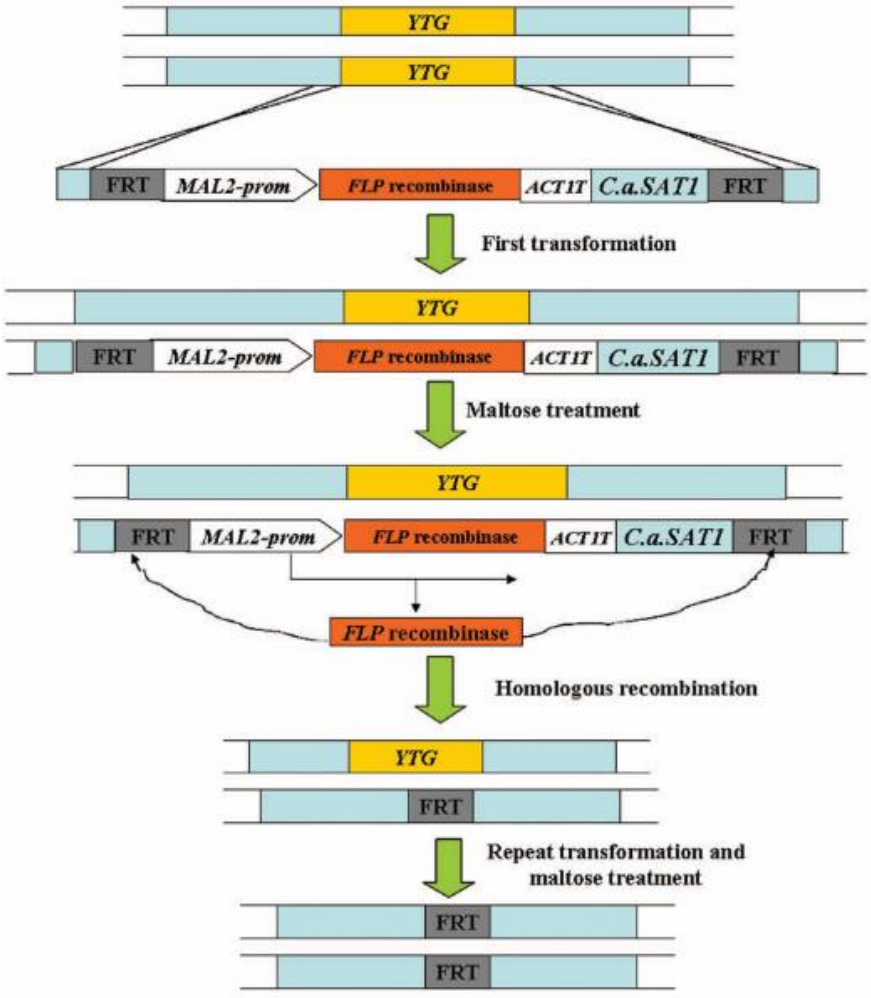


Figure 10. Schéma illustrant les différentes étapes de la méthode « SAT1-flipper » utilisée chez *C. albicans* pour l'inactivation du gène *YTG* (Xu *et al.*, 2014)

Une dernière technique a été publiée par Noble & Johnson chez *C. albicans* (Noble & Johnson, 2005) et également exploitée chez *C. parapsilosis* (Holland *et al.*, 2014). Elle repose sur la délétion de gène par **PCR fusion** (Figure 11). Elle utilise des souches préalablement rendues auxotrophes vis-à-vis de l'histidine, de la leucine, et de l'arginine (His-, Leu-, Arg-). L'inactivation d'un gène cible utilise une cassette (élaborée par deux étapes de PCR dites « PCR fusion ») contenant un des gènes permettant de complémenter l'auxotrophie (*HIS1*, *LEU2*, ou *ARG4*). L'intégration de la cassette est réalisée par recombinaison homologue. L'introduction de ces gènes va permettre de sélectionner les mutants dont le gène est inactivé car ils seront les seuls à pouvoir pousser sur un milieu dépourvu de ces acides aminés. Sur chaque allèle est introduit un gène de sélection différent. Il faut donc les cibler de façon séquentielle. Cette technique reste moins longue (la cassette étant plus simple à produire) et surtout plus efficace que les précédentes. Cette technique a ainsi permis de constituer des librairies de mutants délétés chez *C. parapsilosis* (Holland *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'introduction des gènes *HIS1*, *LEU2* et *ARG4* n'a pas d'impact sur la virulence contrairement à l'utilisation du marqueur *URA3*.

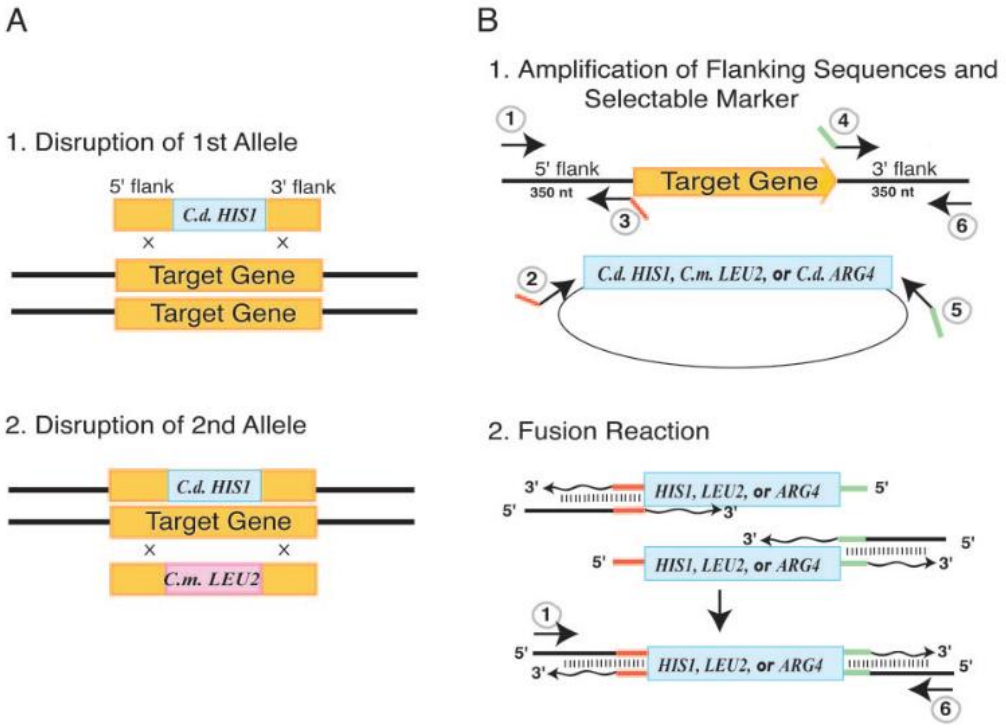


Figure 11. Schéma représentant les différentes étapes de la méthode « PCR fusion » permettant de déléter des gènes décrite chez *C. albicans* (Noble & Johnson, 2005)

A gauche, représentation schématique globale de la méthode. A droite, représentation détaillée des 2 étapes de PCR réalisées avec les différentes amorces.

Ces techniques présentent toutefois certains inconvénients tels que le recours à des souches auxotrophes, la nécessité pour les espèces diploïdes de répéter les transformations pour chacun des allèles ce qui allonge le temps des manipulations et donc le délai d'obtention des mutants désirés. Enfin, le nombre limité de marqueurs disponibles et l'absence de recyclage de ces marqueurs intégrés au génome, empêchent la réalisation de multiples délétions sur un même fond génétique.

Pour toutes ces raisons, l'avènement de CRISPR-Cas9 et son application aux levures d'intérêt médical constitue une véritable révolution, permettant d'élargir le champ des modifications génétiques possibles et notamment l'édition de souches cliniques (=souches non auxotrophes), ainsi que la possibilité de réaliser des mutants homozygotes en une seule étape de transformation, sans intégration de marqueurs (« marker-free editing »). Cela permet ainsi d'avoir la possibilité d'inactiver plusieurs gènes chez une même souche.

ii. CRISPR-Cas9 : des ciseaux moléculaires

Il est possible de résumer le système CRISPR-Cas9 comme étant une sorte de « ciseaux moléculaires » capable de couper l'ADN double brin à un endroit précis du génome ce qui va permettre d'éditer le génome à façon. Le système CRISPR-Cas9 est à l'origine retrouvé chez les bactéries et chez les archées et fait partie de leur système d'immunité adaptative vis-à-vis d'un bactériophage, d'un plasmide, d'un ADN étranger (Mojica & Rodriguez-Valera, 2016).

La protéine Cas9, assurant le rôle de « ciseaux moléculaires », va cliver l'ADN double brin à un endroit précis, déterminé par la séquence d'ARN guide auquel elle va s'apparier. La coupure par la protéine Cas9 est toujours effectuée trois nucléotides en amont du motif NGG appelé « Protospacer Adjacent Motif » (PAM) (Figure 12) (Jinek *et al.*, 2012). Il existe d'autres protéines Cas où le motif PAM est différent (Morio *et al.*, 2020; Verwaal *et al.*, 2018).

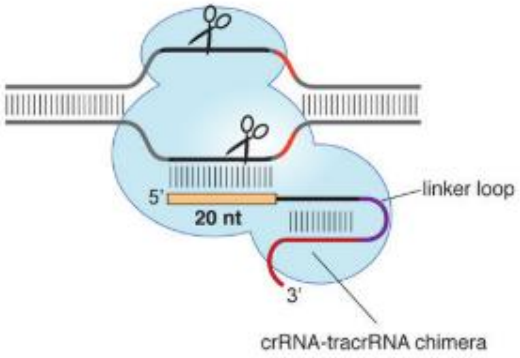


Figure 12. Schéma représentant le système CRISPR-Cas9 (Jinek *et al.*, 2012)

En bleu, la protéine Cas9 avec les ciseaux représentant l'activité de clivage de l'ADN double brin de la protéine Cas9 qui a lieu trois nucléotides avant le PAM (en rouge sur la séquence d'ADN). En orange, l'ARN guide de 20 nucléotides (crRNA) avec son tracrRNA (crRNA-tracrRNA), couple essentiel en fonctionnement de la protéine Cas9.

Deux grands types de techniques CRISPR-Cas9 ont été développés chez les levures du groupe *Candida*. La première repose sur l'expression du système CRISPR-Cas9 à l'intérieur de la cellule fongique alors que la seconde consiste en la transformation de complexes ribonucléoprotéiques préformés *in vitro* parfois appelés « RNP » (Grahl *et al.*, 2017). Cette dernière technique présente l'avantage de ne pas nécessiter d'adapter l'expression de l'ARN guide à l'espèce utilisée, étape souvent longue et fastidieuse. Par ailleurs, les méthodes utilisant les RNPs permettent de réduire le risque d'édition non spécifique lié à l'intégration non souhaitée de Cas9 dans le génome de la levure receveuse.

La première méthode mise en place chez *C. albicans* est celle décrite par Vyas *et al.* qui a démontré la possibilité de construire des mutants homozygotes, pour le gène *ADE2* en une seule transformation, sur des souches de laboratoire et des souches cliniques (Vyas *et al.*, 2015). Ces travaux pionniers menés chez *C. albicans* avaient toutefois un rendement modéré et nécessitaient l'intégration de la protéine Cas9 dans le génome de *C. albicans*.
Pour éviter ces effets délétères, d'autres auteurs ont développé une méthode reposant sur une expression transitoire de Cas9, sans intégration (Min *et al.*, 2016). D'autres évolutions de cette technique CRISPR-Cas9 ont été rapidement effectuées dans un but d'optimiser le rendement de l'édition et d'éviter l'intégration des marqueurs de sélection ou de simplifier les protocoles techniques notamment en s'affranchissant de plasmides, comme dans la méthode développée

par Nguyen *et al.* utilisant un fragment linéaire, non intégrable au génome de *C. albicans* (Nguyen *et al.*, 2017).
Enfin, l'efficacité d'édition de génome par le système CRISPR-Cas9 étant directement liée à l'expression de l'ARN guide, les travaux de Ng & Dean ont pu démontrer la supériorité des promoteurs dépendant de l'ARN polymérase II pour l'expression de l'ARN guide (Ng & Dean, 2017).

En 2017, Grahl *et al.* rapportaient la première méthode CRISPR-Cas9 chez trois autres espèces, *Candida lusitaniae*, *N. glabrata* et *Candida auris*, utilisant le principe des RNPs (Grahl *et al.*, 2017).

iii. CRISPR-Cas9 chez *C. parapsilosis*

Pour ce travail, nous avons utilisé un système d'expression CRISPR-Cas9 mis au point par l'équipe du Pr. Geraldine Butler spécifiquement développé pour éditer le génome de *C. parapsilosis* (Lombardi *et al.*, 2017) puis ultérieurement optimisé afin de faciliter les étapes de clonage (Lombardi *et al.*, 2019).

Cette méthode repose sur l'utilisation d'un plasmide unique (pCP-tRNA). Ce plasmide, épisomal (=non intégratif) contient tous les éléments nécessaires dont la protéine Cas9 et une cassette permettant l'expression du guide. Introduit dans la levure par transformation chimique, il va permettre l'expression du guide et de la protéine Cas9, qui une fois assemblés, vont pouvoir cliver l'ADN génomique, à l'endroit souhaité défini par l'ARN guide.

La levure *C. parapsilosis* n'étant pas capable de réparer cette cassure par le processus de « NHEJ » (Non Homology End Joining), présent chez d'autres espèces comme *C. albicans* ou *C. tropicalis*, cette situation est mise à profit pour l'édition du génome. Ainsi, la réparation de la cassure double brin est effectuée par recombinaison homologue grâce à une séquence d'ADN donneur (appelé « Repair Template » (RT) dans ce manuscrit), transformée de manière simultanée au plasmide.

Cette méthode d'édition du génome présente de multiples avantages par rapport aux autres méthodes : i) aucune intégration du marqueur et de la protéine Cas9 ; ii) applicable à n'importe

quel fond génétique et donc à fortiori à des souches cliniques ; iii) présente une efficacité élevée. Ce sont pour toutes ces raisons que cette technique a été retenue pour notre projet qui vise à créer des mutations ponctuelles, n'affectant pas la fonctionnalité du gène, au sein du génome de *C. parapsilosis.*

La preuve de concept de cette technique à permettre la réalisation de mutations ponctuelles a d'ailleurs été validée dans un travail antérieur, sur l'espèce cryptique *C. orthopsilosis,* dans le laboratoire du Pr Butler, (Morio *et al.,* 2019).

E. Problématique de recherche et objectifs

L'émergence de la résistance aux antifongiques azolés chez *C. parapsilosis* en milieu hospitalier impose une étude plus approfondie des mécanismes de résistance chez ce pathogène à travers notamment l'étude de l'impact du polymorphisme génétique sur la sensibilité aux antifongiques et en premier lieu des azolés. En cas d'exposition aux antifongiques, la levure met en place des stratégies d'adaptation rapide pour permettre sa survie. Ses stratégies d'adaptation conduisent à des modifications génétiques complexes et parfois combinées chez une même souche et sélectionnées sous l'effet de la pression antifongique. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier séparément ces processus sur un fond génétique connu et maîtrisé afin de mieux les comprendre et ainsi pouvoir éventuellement optimiser la stratégie antifongique. En effet, la seule découverte d'une mutation sur un gène donné, décrite chez une souche résistante à un antifongique n'est pas suffisante pour pouvoir affirmer qu'elle est seule responsable de ce phénotype.

Flowers *et al.* ont réalisé un travail semblable chez *C. albicans* visant à étudier, mutation par mutation, l'impact sur l'activité *in vitro* de trois antifongiques azolés (fluconazole, voriconazole, itraconazole) (Flowers *et al.,* 2015). Seuls des mutants homozygotes ont été générés dans cette étude. Aucune étude à ce jour n'a réalisé ce type d'évaluation chez *C. parapsilosis,* en particulier du fait de la lourdeur des outils de génie génétique disponibles jusqu'à présent pour répondre à cette problématique.

Le système CRISPR-Cas9 dont nous disposons (Lombardi *et al.,* 2019), plus simple et plus efficace que toutes les précédentes méthodes d'éditions du génome, permet d'envisager

d'introduire, à façon, les mutations d'intérêt identifiées à partir des données de la littérature. Cela permet d'étudier leur impact sur l'activité des antifongiques *in vitro* et ainsi mieux corréler le génotype au phénotype de résistance. Par ailleurs, la possibilité de cette approche de générer des mutations sur un seul des allèles (i.e. hétérozygote), pourrait permettre d'étudier l'impact du dosage allélique sur le phénomène de résistance.

Dans ce contexte, nous avions pour objectifs :

Objectif principal

Générer une librairie de mutants de *C. parapsilosis*, présentant des mutations faux sens, à l'état homozygote et hétérozygote, sur les gènes *ERG11, ERG3,* et les gènes codant les facteurs de transcription Tac1 (*TAC1*), Mrr1 (*MRR1*) et Upc2 (*UPC2*). Afin d'évaluer l'impact possible du fond génétique, nous avions pour ambition de réaliser les manipulations sur deux souches différentes de *C. parapsilosis*. L'objectif était ensuite d'évaluer la sensibilité *in vitro* des mutants obtenus, vis-à-vis de quatre antifongiques azolés (fluconazole, voriconazole, posaconazole et isavuconazole), afin de connaître le poids respectif de chacun de ces polymorphismes sur l'efficacité de ces molécules, évaluée par la mesure de la CMI (Concentration minimale inhibitrice) par méthode Etest®.

Objectifs secondaires

Evaluer la possibilité i) d'appliquer cette méthode à la réversion de mutations ponctuelles acquises chez des souches cliniques après exposition *in vivo* aux antifongiques et suspectes de conférer la résistance ii) de réaliser des combinaisons de mutations afin de permettre la compréhension des mécanismes de résistance complexe.

Générer des mutants homozygotes pour lesquels le gène *MSH2*, impliqué dans la réparation de l'ADN, a été inactivé afin d'évaluer son rôle dans l'acquisition de la résistance chez *C. parapsilosis*.

Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthodes

A. Souches mycologiques

La principale souche de *C. parapsilosis* utilisée dans ce travail est la souche de référence ATCC 22019 (Tableau 3). Cette souche est sensible aux antifongiques azolés (phénotype sauvage). D'autres fonds génétiques de *C. parapsilosis* (souches cliniques), présentant différents profils de sensibilité aux azolés, ont également été utilisés (Tableau 3). Toutes ces souches sont prototrophes et ont été cryoconservées à -80°C (15% de glycérol final).

Tableau 3. Souches de *C. parapsilosis* utilisées dans notre étude

N°	Origine	CMI FLC Etest®, µg/mL (S/R)	Mutations identifiées sur le gène *ERG11*(AA)
ATCC 22019	Souche de référence ATCC	1,5 (S)	WT
STZ5	CHU Strasbourg	0,38 (S)	NR
STZ9	CHU Strasbourg	0,38 (S)	NR
STZ1	CHU Strasbourg	>256 (R)	WT
Nice2	CHU Nice	>256 (R)	A395T (Y132F) + G1193T (R398I)
PSL0004	APHP, La Pitié Salpétrière	>256 (R)	A395T (Y132F)
PSL0007	APHP La Pitié Salpétrière	24 (R)	A395T (Y132F)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire ; APHP : Assistance Publique Hôpitaux de Paris
S : sensible ; R : résistant ; FLC : Fluconazole ; WT : Wild type (souche sauvage) ; NR : non réalisé

B. Gènes étudiés dans le cadre de ce projet

Le gène *ADE2* (CPAR2_805940) a été utilisé pour l'étape de mise au point de la technique CRISPR-Cas9. Une fois la technique en place, elle a été appliquée à l'inactivation du gène *MSH2* (CPAR2_500160) avant d'aborder l'introduction de mutations ponctuelles.

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes donc intéressés à l'impact de mutations ponctuelles au niveau de quatre gènes du génome de *C. parapsilosis* : *ERG11* (GQ302972.1), *TAC1* (CPAR2_303510), *MRR1* (CPAR2_807270) et *ERG3* (CPAR2_105550). Les séquences nucléotidiques des gènes *ADE2*, *MSH2*, *TAC1*, *MRR1* et *ERG3* ont été extraites à partir des ressources du projet génome de *C. parapsilosis,* disponibles sur le site Candida Genome

Database (http://www.candidagenome.org/). En revanche, la souche de *C. parapsilosis* du projet génome (souche CDC317) n'étant pas sensible au fluconazole (Gómez-Molero *et al.*, 2020), nous avons pris pour référence la séquence du gène *ERG11* GQ302972.1, issue de Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore).

Nous avons choisi les mutations en fonction des données retrouvées dans notre revue de la littérature.

Pour le gène *ERG11*, les trois mutations les plus fréquentes, à savoir, Y132F et K143R et R398I ont été sélectionnées.

Pour le gène *MRR1*, deux mutations (G583R et K873N) ont été choisies car l'impact de celles-ci sur la résistance aux azolés (fluconazole et voriconazole) a été prouvé chez *C. parapsilosis* (Branco *et al.*, 2015). Cependant, l'impact de ces deux mutations sur les autres azolés n'est pas connu.

Pour le gène *TAC1*, deux mutations (G650E et L978W) ont été sélectionnées car elles ont été identifiées chez des isolats cliniques résistants au fluconazole et sont suspectées de conférer un « gain de fonction » (Berkow *et al.*, 2015).

Pour le gène *ERG3*, nous avons retenu la mutation G111R, la seule décrite comme associée à la résistance. L'objectif est d'explorer l'impact de cette mutation dont le phénotype de résistance semble original, impactant plusieurs classes d'antifongiques (Rybak *et al.*, 2017).

C. Edition du génome de *C. parapsilosis* par la technique CRISPR-Cas9

i. Principe

La méthode d'édition du génome de *C. parapsilosis*, utilisée pour ce travail (protocole en Annexe 2), repose sur un plasmide épisomal et non intégratif (pCP-tRNA), gracieusement transmis par l'équipe du Pr. Butler (University College of Dublin, Irlande) (Figure 13) (Lombardi *et al.*, 2017, 2019). Il est composé d'une origine de réplication (ORI), d'un gène de résistance à l'Ampicilline (*ampR*) et d'un gène de résistance à la nourséothricine (*SAT1*) dont l'expression est assurée par le promoteur ACT1 de *C. albicans* (Figure 13). Ce marqueur permet la sélection des colonies ayant incorporé le plasmide pCP-tRNA, seules capables de croître sur milieu contenant la nourséothricine (200 µg/mL). Il contient également la séquence ARS7 permettant la réplication

autonome du plasmide chez *C. parapsilosis* et le gène codant la protéine Cas9 (*CAS9*), dont la séquence a été modifiée pour s'adapter au code génétique de *C. parapsilosis* (levure du groupe CTG) et l'expression est gouvernée par le promoteur TEF1 de *C. parapsilosis* (CpTEF1).

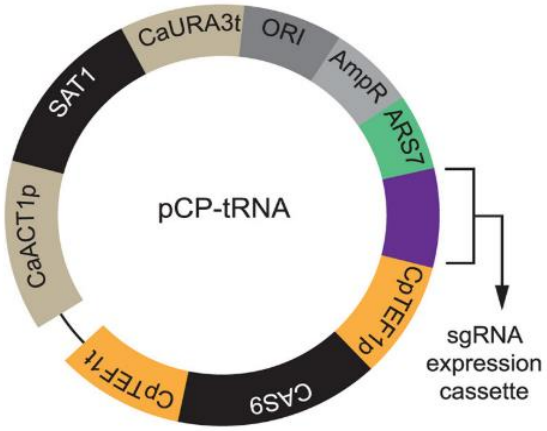


Figure 13. Carte du plasmide pCP-tRNA utilisé pour l'édition du génome de *C. parapsilosis* (Lombardi *et al.*, 2019)

Dans ce plasmide, il est également prévu une cassette pour l'expression du sgRNA (Figure 14) (Lombardi *et al.*, 2019). L'expression du sgRNA est contrôlée par le promoteur GAPDH de *C. parapsilosis* (CpGAPDH). L'utilisation de ce promoteur dépendant de l'ARN polymérase II permet une plus forte expression du sgRNA (Ng & Dean, 2017). La présence d'un ARN de transfert $ARNt^{Ala}$ et du ribozyme HDV (Hepatitis Delta Virus) aux deux extrémités de la séquence du guide permet de le protéger de l'ajout respectivement en 5'et en 3' d'une coiffe et d'une queue polyA par l'ARN polymérase II lors de la transcription (Ng & Dean, 2017). Enfin, ce plasmide a pour particularité que sa cassette comporte déjà la séquence de positionnement de l'ARN (« scaffold RNA », crRNA+tracrRNA) permettant le recrutement de la protéine Cas9. Pour chaque nouveau gène à éditer, il suffit donc simplement d'y insérer l'ADN guide de 20 pb au niveau du site de restriction SapI, ce qui s'effectue en une seule étape de clonage.

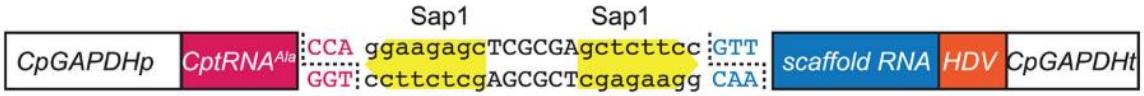


Figure 14. Schéma représentant la cassette d'expression de l'ARN guide contenu dans le plasmide pCP-tRNA (Lombardi *et al.*, 2019)

A noter que les extrémités CCA en 5' et CAA en 3'sont ajoutées à la séquence guide, afin de permettre sa ligation dans le plasmide pCP-tRNA, préalablement ouvert au niveau des sites de restriction SapI, surlignés en jaune (extrémités cohésives).

ii. Construction des ARN guides et clonage dans le plasmide pCP-tRNA

Le choix des ARN guides (20 pb) a été réalisé à l'aide du programme EuPaGDT (http://grna.ctegd.uga.edu/). Les critères suivants ont été retenus pour le choix des guides : i) score élevé (>0,5), ii) absence de région homologue au guide dans le génome de *C. parapsilosis* afin de réduire le risque d'édition non désirée du génome (« off target »), iii) être le plus proche possible de la (les) base(s) à éditer, idéalement <20 pb entre le site de coupure de Cas9 et la base à éditer. Afin de permettre le clonage dans le plasmide, les extrémités CCA et CAA, ont été ajoutées respectivement à la séquence ADN du guide (gTOP) et à sa séquence complémentaire (gBOT), lors du design des amorces. Les séquences des amorces ainsi déterminées ont été commandées chez Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne).

Chaque guide, obtenu par hybridation des deux amorces complémentaires gTOP/gBOT, a été ensuite cloné par ligation dans le plasmide pCP-tRNA tel que décrit précédemment (Lombardi *et al.*, 2019). Le plasmide ainsi complet est alors transformé par choc thermique chez *Escherichia coli* (souche DH5α) afin d'être amplifié. La sélection a été effectuée sur milieu LB+Ampicilline (100 µg/mL). La présence du sgRNA dans le plasmide a été vérifiée par PCR en utilisant une amorce universelle M13 s'hybridant sur le plasmide (M13-FWD) et l'amorce anti-sens correspondant au guide (CPXXXXXX-gBOT) L'extraction du plasmide a été réalisée selon un protocole maison. L'extrait plasmidique est ensuite quantifié puis conservé à -20°C avant d'être utilisé pour l'étape de transformation. Toutes les amorces utilisées sont listées en Annexe 3.

iii. Construction de l'ADN donneur (ou Repair Template, RT)

Le Repair Template utilisé dans notre méthode permet d'introduire la (les) mutation(s) souhaitée(s) en réparant l'ADN génomique clivé à l'endroit souhaité par la protéine Cas9. Chaque RT a été généré par extension d'un couple d'amorces complémentaires sur 20 pb (amorces nommées RT-TOP et RT-BOT pour ce travail), par PCR (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega) (Figure 15). Les séquences des amorces utilisées pour la réalisation des RT sont indiquées en Annexe 3. La taille du produit de PCR obtenu a été vérifié sur gel d'agarose à 1%. Ce produit d'amplification a été directement utilisé pour l'étape de transformation (pas d'étape de purification).

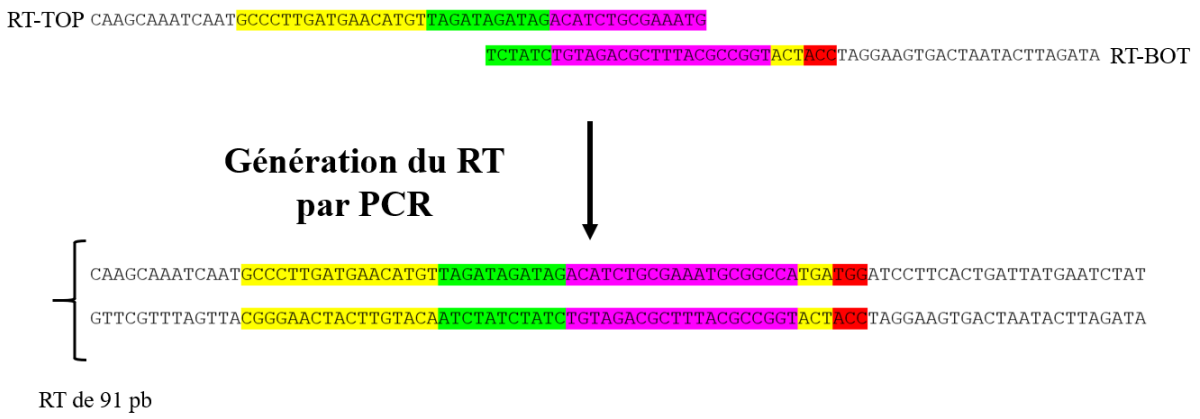


Figure 15. Principe de la génération du RT par extension d'un couple d'amorces par PCR (ici pour l'inactivation du gène *ADE2*).

Construction du RT de 91 pb (ADN double brin) par extension de 2 amorces complémentaires entre elles sur 20 pb (RT-CP805940-BOT / RT-CP805940-BOT) par PCR. Noter la présence de la séquence de codons stop (surlignée en vert), de la séquence TAG (surlignée en mauve) au sein de ce RT et de la séquence du guide (surlignée en jaune). Noter la complémentarité sur 20 pb entre les deux amorces et qui permet l'élongation.

Deux types de RT ont été utilisés dans notre travail (Figure 16) :

- **Des RT pour l'inactivation de gène** (stratégie « knock-in »), d'une longueur de 91 pb que nous avons utilisés pour les gènes *ADE2* et *MSH2*. Ils sont composés d'une séquence de 11 pb permettant l'introduction d'une séquence de codons STOP (TAGATAGATAG) et ce, quel que soit le cadre de lecture d'une séquence TAG de 20 pb (ACATCTGCGAAATGCGGCCA) ; ainsi que de bras d'homologie de 30 pb (par rapport au site de coupure de Cas9). Ces bras d'homologie permettent la recombinaison homologue avec l'ADN génomique, au niveau du gène cible (ils sont donc propres au

gène à inactiver). La séquence TAG est une séquence unique, absente du génome de *C. parapsilosis*, qui va permettre de faciliter la détection des colonies éditées, par PCR.

- **Des RT pour l'introduction de mutation(s) ponctuelle(s),** d'une longueur de 60 pb ou de 100 pb. Cette approche a été utilisée pour l'introduction de mutations dans les gènes *ERG11*, *TAC1*, *MRR1* et *ERG3* afin d'étudier leur impact sur l'activité des antifongiques. Le RT de 60 pb a des bras d'homologie de 30 pb alors que le RT de 100 pb a des bras d'homologie de 50 pb. Ce dernier a été utilisé pour optimiser le rendement des transformations.

Important : Afin de prévenir tout recyclage du guide et une nouvelle coupure par la protéine Cas9 après la recombinaison homologue, ce qui pourrait réduire le rendement de l'édition, deux mutations silencieuses ont été systématiquement introduites au niveau de la séquence du sgRNA (idéalement +4 à +7 pb en amont du PAM) (Morio *et al.*, 2019). Dans le cas particulier de réversions de mutations, une mutation silencieuse supplémentaire, localisée à environ +10 pb en amont du PAM, a été ajoutée, afin de pouvoir différencier les mutants révertés de la souche parentale.

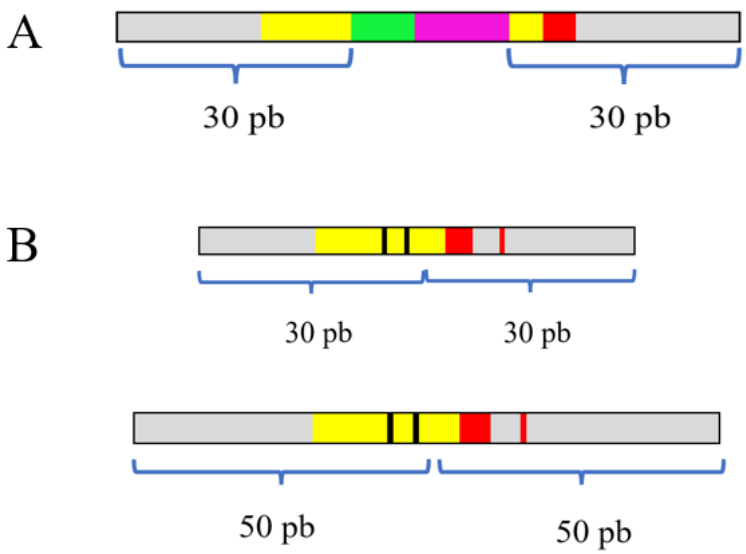


Figure 16. Représentation schématique des deux différents types de Repair Template utilisés dans notre travail

A) RT utilisé pour l'inactivation de gène.
B) RT utilisés pour l'introduction de mutations ponctuelles. Au milieu, le RT de 60 pb avec les bras 30 pb d'homologie et en bas le RT de 100 pb avec les bras de 50 pb d'homologie. En jaune, la séquence du guide (20 pb). En rouge, la séquence du PAM (NGG). En vert, la séquence codon STOP. En violet, la séquence TAG. La mutation ponctuelle est représentée par un trait rouge. En noir, les mutations silencieuses ajoutées pour prévenir le recyclage du guide.

iv. Transformation chez *C. parapsilosis*

La transformation de *C. parapsilosis* a été réalisée par méthode chimique (acétate de lithium) à l'aide de 5 µg du plasmide pCP-tRNA contenant le guide et 25 µL de produit de PCR correspondant au RT (Lombardi *et al.*, 2019). L'expression du plasmide est ensuite obtenue par culture des cellules sur milieu sélectif YPD+ nourséothricine (200 µg/mL) à 30°C, pendant 48h à 72h.

v. Identification des mutants CRISPR-Cas9

Deux situations se sont présentées selon l'objectif désiré.

- ✓ Dans le cas d'inactivation de gène, les colonies, ayant incorporé la cassette d'inactivation contenant la séquence TAG, ont été détectées par PCR en utilisant l'amorce CP-TAG1-F et une amorce reverse, située en aval du TAG (CPXXXXXX-eDWST) (Figure 17) (Annexe 3).

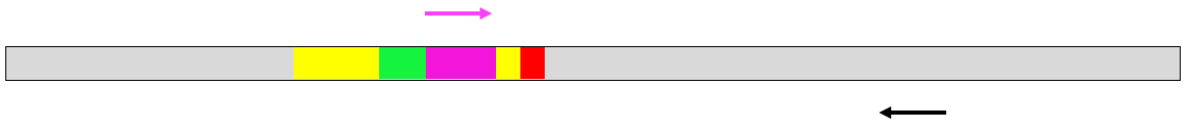


Figure 17. Schéma représentant la PCR TAG utilisée lors du screening des colonies pour vérifier la présence ou non de la cassette d'inactivation lors des manipulations d'inactivation de gène

En jaune, la séquence du guide (20 pb). En rouge, la séquence du PAM (NGG). En vert, la séquence codon STOP. En violet, la séquence TAG. La flèche violette représente l'amorce complémentaire de la séquence TAG. La flèche noire représente l'amorce complémentaire d'une séquence du gène située en aval de la séquence TAG.

- ✓ Dans le cadre de l'introduction de mutation(s) ponctuelle(s), du fait de l'absence de codon STOP et de séquence TAG détectables par PCR, des PCR spécifiques d'allèles ont été mises en place afin de distinguer les clones porteurs des mutations ponctuelles désirées. Cette technique repose sur l'utilisation d'amorces dont l'une est spécifique de l'allèle muté alors que l'autre est spécifique de l'allèle sauvage (Ugozzoli & Wallace, 1991) (Annexe 3). Cette approche permet de déterminer si la mutation est présente à l'état homozygote (présence uniquement de l'allèle muté) ou hétérozygote (présence de

l'allèle muté et de l'allèle sauvage), lors de révélation des produits d'amplification sur gel.

Cette méthode de screening des mutants porteurs des mutations ponctuelles (inactivation du gène ou mutation ponctuelle) a été systématiquement confirmée par séquençage Sanger (Eurofins Genomics). Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Geneious Prime®.
Une fois les mutants souhaités obtenus, une étape de subculture (3 à 5 repiquages) a été réalisée sur milieu YPD sans NTC afin d'éliminer le plasmide pCP-tRNA dont l'absence d'intégration a été également vérifiée (les mutants n'étant plus capables de croître sur YPD+NTC). Chaque mutant a été ensuite cryoconservé à -80°C avant la détermination de la sensibilité *in vitro* aux azolés.

D. Profil de sensibilité aux antifongiques des mutants CRISPR-Cas9

La sensibilité *in vitro* aux antifongiques des mutants de *C. parapsilosis* générés dans notre travail par la technique de CRISPR-Cas9 a été ensuite déterminée par méthode de diffusion en milieu gélosé selon la technique Etest® (bioMérieux). La lecture des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a été effectuée à 80% d'inhibition après 48h d'incubation à 35°C, pour quatre triazolés, le fluconazole (FLC), le voriconazole (VRC), le posaconazole (POS), l'isavuconazole (ISA). Pour certains mutants, les CMIs de la micafungine (MIC) (lecture à 80%), de l'amphotéricine B (AMB) (lecture à 100%) et de la flucytosine (5-FC) (lecture à 90%) ont été également déterminées. L'interprétation des CMIs a été réalisée en utilisant les seuils d'interprétation clinique définis par le CLSI et adaptés à la méthode Etest® (Tableau 4) (Clinical and Laboratory Stantards Institute, 2017).
Il n'existe pas de seuil d'interprétation pour l'amphotéricine B. Néanmoins, il est d'usage de recourir à l'ECV « Epidemiological Cutoff Values », qui est un seuil épidémiologique, considérant une valeur de CMI ≥ 2 µg/mL (également retenue par l'EUCAST, V10.0) comme inhabituellement élevée. De la même manière, l'ECV du posaconazole pour *C. parapsilosis* étant de 0,25 µg/mL, nous avons considéré comme non-sauvage tout mutant présentant une CMI ≥ 0,38 µg/mL en Etest® (Clinical and Laboratory Stantards Institute, 2018).

Tableau 4. Valeurs de référence définies par le CLSI et adaptées à la méthode Etest®

Molécules	CLSI (M60)			Adaptation pour la méthode Etest®		
	S	SDD* ou I	R	S	SDD* ou I	R
Fluconazole	≤ 2	4*	≥8	≤ 2	3-6*	≥8
Voriconazole	≤0.12	0.25-0.5	≥1	≤0.125	0.19-0.75	≥1
Micafungine	≤ 2	4	≥8	≤ 2	3-6	≥8

S : sensible ; I : intermédiaire ; SDD : Sensible Dose-Dependant ; R : résistant

Résultats

III. Résultats

A. Mise en place de la technique CRISPR-Cas9

La mise au point a tout d'abord été effectuée en inactivant le gène *ADE2* de *C. parapsilosis* impliqué dans la biosynthèse de l'adénine. Ce locus a été retenu car son inactivation entraîne un phénotype particulier et facilement repérable à l'œil nu. Elle provoque l'accumulation d'un intermédiaire qui libère un pigment rose colorant ainsi les colonies génétiquement modifiées en rose. Comme expliqué dans la partie matériel et méthodes, la stratégie d'inactivation choisie repose sur l'utilisation d'une cassette d'inactivation contenant une séquence de codons STOP et une séquence TAG (Figure 14), cette dernière pouvant aussi être utilisée pour le screening des colonies par PCR (Figure 17).

Plusieurs transformations pour inactiver le gène *ADE2* ont été effectuées sur la souche de *C. parapsilosis* ATCC 22019 afin de mettre en place la méthode, tester sa reproductibilité et optimiser le rendement d'édition. L'étape de screening par PCR ayant pour objectif d'identifier les clones mutés a permis de confirmer la présence de la cassette d'inactivation pour une des cinq colonies testées (efficacité 20%). Une répétition de cette expérience a permis d'isoler d'autres mutants. Au total, le séquençage de deux clones a confirmé l'insertion de la séquence de codons STOP et du code-barre, sur les deux allèles, permettant l'inactivation complète du gène *ADE2,* en accord avec la couleur rose de ces colonies sur milieu YPD (Figure 18). Enfin, comme attendu, l'absence d'intégration du plasmide pCP-tRNA dans le génome a été vérifiée par l'absence de croissance des clones édités sur milieu YPD+NTC, après trois à cinq repiquages sur le milieu sans marqueur de sélection.

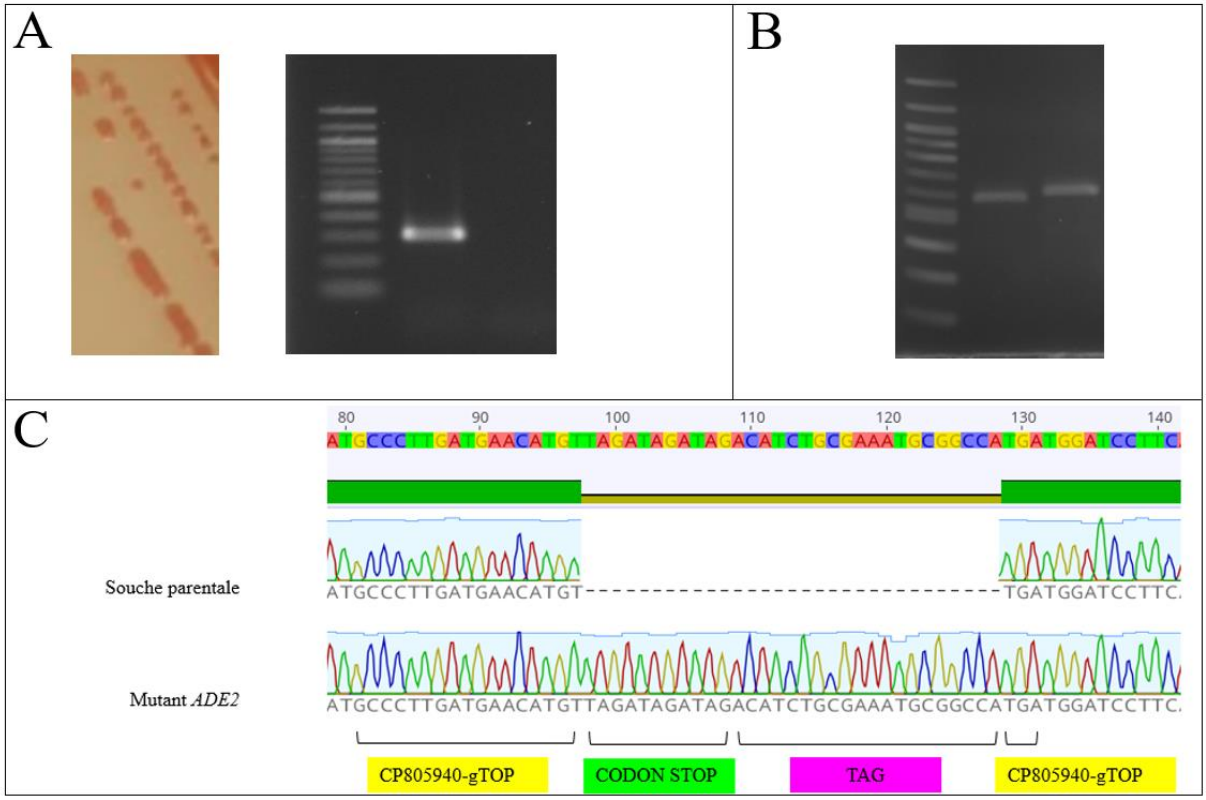


Figure 18. Inactivation du gène *ADE2* (CPAR2_805940) de *C. parapsilosis* (souche ATCC 22019)

A) A gauche, phénotype rose d'une colonie pour laquelle le gène *ADE2* a été inactivé. A droite, aspect des amplicons obtenus par la PCR de screening réalisée avec l'amorce « TAG » (CP-TAG1-F/ CP805940-eDWST), 1 : marqueur de poids moléculaire (100 pb) ; 2 : mutant *ADE2*, 3 : colonie non éditée (colonie blanche)
B) Aspect des amplicons sur gel, obtenus à l'issue de l'étape de séquençage,
1 : marqueur de poids moléculaire (100 pb), 2 : souche de référence ATCC 22019 ; 3 : mutant *ADE2*.
La différence de taille observée entre les produits de PCR s'explique par l'insertion de la cassette d'inactivation de 31 pb au sein du gène *ADE2*.
C) Le résultat du séquençage confirme la présence de la cassette de 31 pb à l'état homozygote présente sur les deux allèles.

Cette mise au point expérimentale confirmait donc la capacité de cette technique à inactiver, en une seule transformation, les deux allèles du gène *ADE2* de la souche de référence ATCC.

B. Application de la technique CRISPR-Cas9 pour l'inactivation du gène *MSH2*

i. Application sur la souche *C. parapsilosis* ATCC 22019

Chez *N. glabrata,* les données de la littérature mettent en évidence que l'inactivation du gène *MSH2*, impliqué dans la réparation de l'ADN, est responsable d'un phénotype « hypermutator »

(Healey *et al.*, 2016). Après exposition *in vitro* aux antifongiques, il a été montré une augmentation plus rapide de la résistance aux antifongiques de ces mutants Δ*msh2*. Ce phénomène n'a pas été étudié chez *C. parapsilosis* mais ce gène étant largement conservé, il existe un gène orthologue à *MSH2* chez *C. parapilosis* (CPAR2_500160). Notre objectif a donc été de générer des souches de *C. parapsilosis* inactivées pour le gène *MSH2* et d'évaluer ensuite l'impact de cette inactivation sur le profil de sensibilité *in vitro* aux antifongiques.

Suite à la mise en place de la méthode CRISPR-Cas9, nous nous sommes focalisés sur cet objectif selon le même plan expérimental que pour le gène *ADE2*. Nous avons pu obtenir 15 colonies sur milieu YPD+NTC à l'issue de la transformation. La différenciation par la couleur entre les colonies mutées et non mutées n'étant possible que pour le gène *ADE2*, le screening des colonies éditées a été uniquement réalisé avec la PCR, en utilisant l'amorce TAG. La PCR de screening s'est révélée positive pour toutes les colonies testées (5/5, rendement 100%). Le séquençage effectué pour deux d'entre elles confirme l'insertion de la cassette d'inactivation à l'endroit souhaité et sur les deux allèles (mutant homozygote *msh2-/-*).

Ces résultats montrent que le gène *MSH2*, connu pour être impliqué dans la réparation de l'ADN notamment chez *N. glabrata* et *C. albicans*, peut être aisément inactivé par cette méthode, sans affecter la viabilité des mutants homozygotes *msh2-/-*. Ce gène est donc non essentiel chez *C. parapsilosis*. Comme lors de la mise en place de la technique avec le gène *ADE2*, le plasmide pCP-tRNA a pu être éliminé facilement après trois à cinq repiquages (comme en atteste l'absence de croissance sur milieu YPD+NTC) confirmant l'absence d'intégration dans le génome.

Ces premiers résultats montrent que la méthode utilisée permet de générer aisément, à partir de la souche de référence *C. parapsilosis* ATCC 22019, des mutants homozygotes *msh2-/-* en une seule étape de transformation, à l'aide de RT de petite taille (i.e. flanqués de bras d'homologie de 30 pb).

ii. Sensibilité *in vitro* aux antifongiques de la souche ATCC 22019 *msh2-/-*

Afin d'évaluer l'impact de l'inactivation du gène *MSH2* sur la sensibilité *in vitro* sur les antifongiques, des CMIs ont été réalisées par méthode Etest®. Comme illustré dans le Tableau 5, aucun impact de cette inactivation sur la sensibilité *in vitro* au fluconazole et à la micafungine n'a été observé par rapport à la souche sauvage ATCC 22019.

Tableau 5. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par méthode Etest® pour le mutant CRISPR-Cas9 dont le gène *MSH2* a été inactivé

Souche	CMI déterminée par Etest® (µg/mL)	
	FLC	MIC
ATCC 22019 WT	**1.5**	**0.5**
ATCC 22019 *msh2-/-*	**1**	**0.5**

L'inactivation du gène *MSH2* ne modifie pas la sensibilité au fluconazole et à la micafungine pour le mutant ATCC 22019.

iii. Application à d'autres fonds génétiques de *C. parapsilosis* (souches cliniques)

Un des intérêts de la technique que nous utilisons est de pouvoir éditer le génome de souches non-auxotrophes, tels que des isolats cliniques. Nous avons utilisé le gène *MSH2* et cette stratégie d'inactivation, comme marqueur pour déterminer la réceptivité de plusieurs autres souches cliniques.

Pour cette expérience, nous avons utilisé la cassette d'insertion décrite précédemment sur six souches cliniques de *C. parapsilosis* (Tableau 6). Ces souches ont été choisies en fonction de leur profil de sensibilité *in vitro* vis-à-vis du fluconazole (sensibles ou résistantes).

Tableau 6. Résultats de la transformation visant à inactiver le gène *MSH2* sur différents fonds génétiques de *C. parapsilosis* (n=6)

Souche n°	Origine	CMI FLC Etest®, µg/mL (S/R)	Nb de colonies sur milieu sélectif YPD+NTC	Nb de colonies éditées/ nb de colonies testées (PCR de screening)
Nice2	CHU Nice	**>256 (R)**	85	5 /5 (100%)
STZ1	CHU Strasbourg	**>256 (R)**	0	NA
STZ9	CHU Strasbourg	0,38 (S)	2	2/2 (100%)
STZ5	CHU Strasbourg	0,38 (S)	9	5/5 (100%)
PSL 0007	APHP, La Pitié Salpêtrière	**24 (R)**	9	5/5 (100%)
PSL 0004	APHP La Pitié Salpêtrière	**>256 (R)**	2	2/2 (100%)

NA : non applicable ; R : résistant ; S : sensible

Nos résultats montrent que dans ces conditions expérimentales, la majorité des souches testées a pu être éditée, avec un rendement de 100% (Tableau 6). La technique utilisée est donc applicable à d'autres fonds génétiques et notamment à des isolats cliniques, et ce indépendamment de leur profil de sensibilité aux antifongiques azolés.

Cette expérience nous a permis de retenir la souche STZ5 comme second fond génétique pour les expériences ultérieures d'insertion de mutations ponctuelles. Ce choix a été motivé car cette souche STZ5 est également sensible au fluconazole mais sa CMI est plus basse que celle de la souche ATCC 22019 (0,38 µg/mL au lieu de 1,5 µg/mL).

C. Introduction de mutations ponctuelles

Après avoir mis en place la technique CRISPR-Cas9 en inactivant le gène *ADE2* puis *MSH2*, nous avons pu initier notre projet dont l'objectif est de réaliser des mutations ponctuelles afin d'évaluer l'impact du polymorphisme nucléotidique sur le profil de sensibilité aux antifongiques.

Pour cette approche expérimentale, et afin de ne pas affecter le cadre de lecture, le RT comprend uniquement la mutation ponctuelle souhaitée ainsi que deux mutations silencieuses introduites afin de prévenir le recyclage du guide. A noter également que l'absence de séquence TAG ne permet pas la réalisation d'une PCR de screening, nous avons donc envoyé systématiquement deux colonies au séquençage pour chaque mutation.

i. Mise au point et optimisation de la technique

Dans un premier temps, nous avons conservé la même taille pour les bras d'homologie soit 30 pb, comme décrit précédemment. L'absence de la cassette d'inactivation conduit alors un RT de taille significativement réduite (60 pb au lieu de 91 pb) (Figure 16). La manipulation a tout d'abord été réalisée sur la souche *C. parapsilosis* ATCC 22019 et pour chacune des trois mutations (Y132F, K143R et R398I) de façon simultanée.

Comme illustré dans le Tableau 7, une faible efficacité de transformation a été observée (< 5 colonies) pour chacune des mutations. Cette expérience a été répétée et confirme le faible rendement d'édition dans ces conditions expérimentales utilisant un RT de 60 pb. Néanmoins, le séquençage de deux colonies issues de ces transformations a permis de confirmer l'obtention d'un mutant hétérozygote et d'un mutant homozygote pour la mutation A395T (Y132F), comme illustré dans la Figure 19. Comme pour l'inactivation du gène *ADE2* et du gène *MSH2*, une étape de culture (trois à cinq repiquages) pour chaque mutant généré a été réalisée sur milieu YPD, en l'absence de NTC afin d'éliminer le plasmide pCP-tRNA.

Tableau 7. Résultats des deux transformations réalisées avec des RT de 60 pb pour l'introduction de mutations ponctuelles sur le gène *ERG11* de *C. parapsilosis* (ATCC 22019)

Mutations	Nb de colonies sur YPD+NTC 1ère /2ème transformation
A395T (Y132F)	1/3
A428G (K143R)	0/4
G1193T (R398I)	0/0

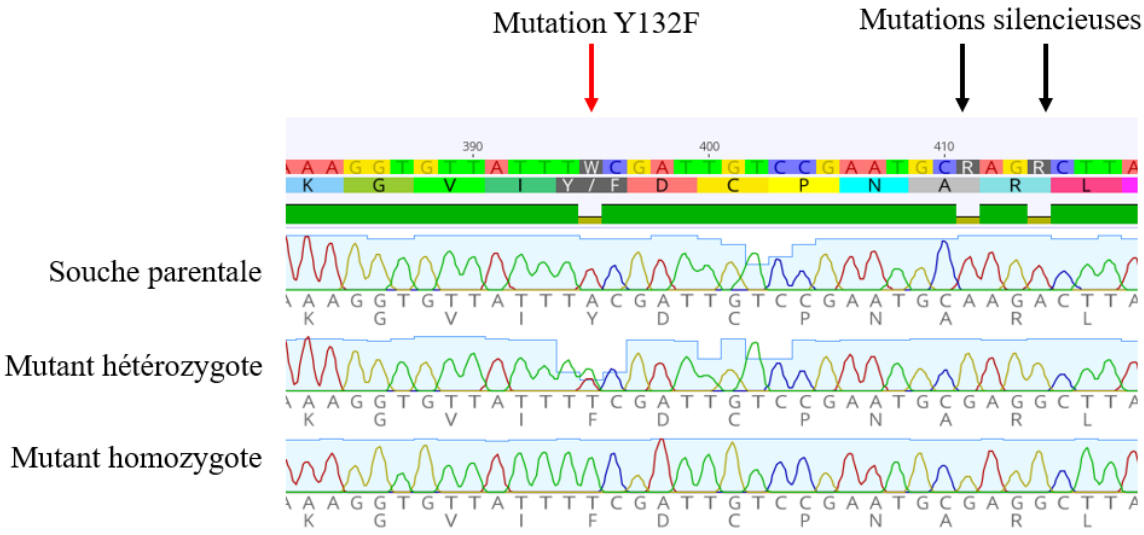


Figure 19. Confirmation par séquençage de l'obtention de mutants homozygote et hétérozygote pour la mutation A395T (Y132F) du gène *ERG11* (souche ATCC 22019)

En haut, séquence nucléotidique de la souche parentale ATCC 22019 de *C. parapsilosis*, prise comme référence. En milieu chromatogramme correspondant à un mutant hétérozygote édité par la technique CRISPR-Cas9 (A395T/A395A). Au bas, chromatogramme correspondant à un mutant homozygote pour cette même mutation (A395T/A395T). Flèche rouge indiquant la mutation A395T (Y132F). Flèches noires indiquant les mutations silencieuses.

En conclusion, bien que nous ayons obtenu deux des mutants CRISPR-Cas9 souhaités pour la mutation A395T (Y132F), avec ce protocole expérimental, nous constatons une faible efficacité de transformation, pouvant éventuellement mettre en péril notre projet.

Une hypothèse possible pouvant expliquer la faible efficacité de transformation pour la réalisation de mutations ponctuelles, pourrait être la petite taille des RT, susceptible de réduire le rendement de recombinaison homologue. Afin de tester cette hypothèse, nous avons reproduit cette expérience et comparé le rendement d'édition obtenu en utilisant des bras d'homologie plus longs de 50 pb (soit un RT de 100 pb). Cette expérimentation a été testée pour la mutation A395T (Y132F) sur les souches ATCC 22019 et STZ5. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Comparaison de l'efficacité de transformation, en fonction de la taille des bras d'homologie (30 pb vs 50 pb) pour introduire la mutation ponctuelle A395T (Y132F) sur le gène *ERG11* de *C. parapsilosis*

Souche	Nb de colonies sur YPD+NTC avec RT de 60 pb	Nb de colonies sur YPD+NTC avec RT de 100 pb
ATCC 22019	2	50
STZ5	2	30

Le plus grand nombre de colonies obtenues avec des bras d'homologie de 50 pb (RT de 100 pb) laisse supposer un nombre important de colonies éditées.

Ces résultats suggèrent une meilleure efficacité de transformation avec l'utilisation de RT de 100 pb (bras d'homologie de 50 pb) par rapport à ceux de 60 pb (bras d'homologie de 30 pb) et ce, quel que soit le fond génétique. Cette stratégie de RT de 100 pb a donc été retenue pour l'introduction de mutations ponctuelles dans la suite de ce travail.

ii. Introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *ERG11*

Les expérimentations décrites ci-dessous ont donc été réalisées avec le protocole optimisé, utilisant des plus grands bras d'homologie, tel que décrit en Annexe 2.

a. Mutation A395T (Y132F)

Etant donné le nombre important de colonies obtenues sur milieu YPD+NTC avec ce protocole optimisé appliqué à la souche STZ5 (Tableau 9), nous avons souhaité développer une PCR allèle spécifique afin d'identifier les clones porteurs de la mutation A395T.

Cette approche a permis de détecter un mutant homozygote (présence d'un amplicon uniquement seulement avec la PCR spécifique de l'allèle muté) et un mutant hétérozygote (présence d'un amplicon avec la PCR spécifique de l'allèle muté et de l'allèle sauvage) parmi les 12 colonies testées (Figure 20). Ce résultat a été ultérieurement confirmé par séquençage Sanger, montrant l'intérêt de la PCR allèle spécifique pour le screening des mutants.

Tableau 9. Résultats des différentes transformations pour introduire la mutation A395T (Y132F) sur le gène *ERG11* de *C. parapsilosis*

Souches de *C. parapsilosis*	Nb de colonies sur YPD+NTC*	Nb de colonies testées par PCR allèle spécifique	Nb de colonies éditées (confirmé par séquençage) / nombre de colonies séquencées
ATCC 22019	56	12	2/2
STZ5	32	12	2/2

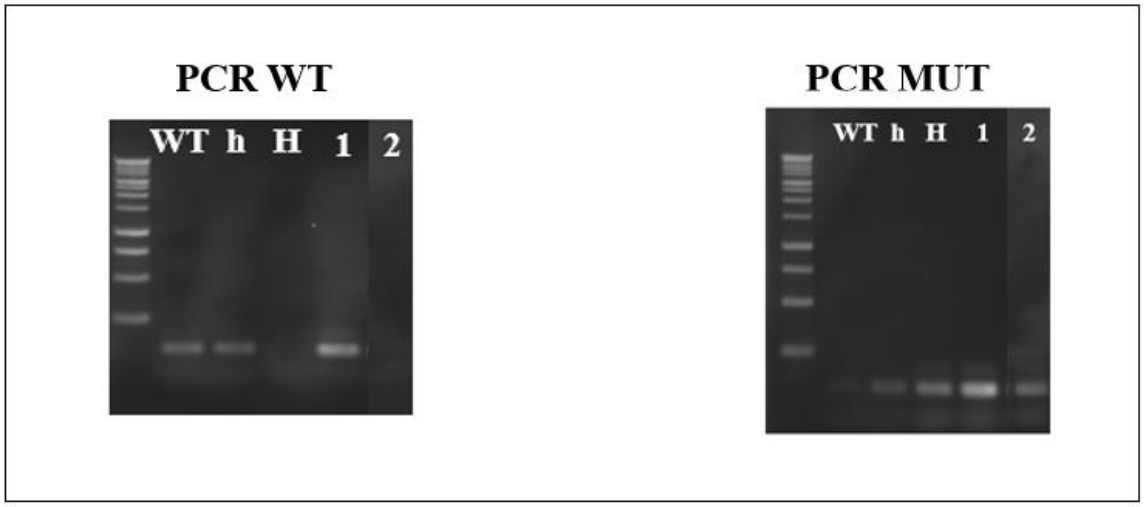


Figure 20. PCR allèle spécifique pour le screening des mutants A395T (Y132F) sur le fond génétique STZ5

A gauche : PCR spécifique de l'allèle sauvage Y132 (A395) (amorces CP303740-WT-A395A-F/Cp303740-R1). A droite, PCR spécifique de l'allèle muté F132 (T395) (amorces CP303740-Mut-A395T-F/Cp303740-R1).
WT : souche parentale sauvage (ATCC22019) ; h : mutant hétérozygote Y132F pris comme témoin (ATCC22019); H : mutant homozygote Y132F pris comme témoin (ATCC 22019) ;
colonie 1 : visiblement hétérozygote Y132F (STZ5) ; colonie 2 : visiblement homozygote Y132F (STZ5).

b. Mutation A428G (K143R)

Un mutant homozygote et un hétérozygote ont été générés pour chacun des fonds génétiques. En effet, comme attendu, l'utilisation de RT de 100 pb a permis l'obtention d'un nombre important de colonies (environ 100 colonies). Le développement d'une nouvelle PCR allèle spécifique a été nécessaire pour la souche STZ5 afin de faciliter l'identification des colonies éditées à envoyer au séquençage.

c. Mutation G1193T (R398I)

Un mutant homozygote a été généré pour chacun des fonds génétiques. En revanche, malgré plusieurs tentatives, aucun mutant hétérozygote n'a été obtenu (ATCC 22019 et STZ5) et ce, malgré le screening de colonies grâce à la mise en place d'une PCR allèle spécifique (n=13).

En conclusion, le premier objectif qui était de réussir à générer des mutants pour chacune des substitutions Y132F, K143R, R398I à l'état homozygote et hétérozygote et sur deux fonds génétiques (*C. parapsilosis* ATCC 22019 et STZ5) a été atteint à l'exception de mutant hétérozygote pour la mutation R398I.

iii. Introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *TAC1*

A partir de la revue de la littérature exposée précédemment, deux mutations (G650E et L978W) ont été choisies pour être introduites sur le gène codant le facteur de transcription *TAC1* pour chacun des deux fonds génétiques de *C. parapsilosis* (ATCC 22019 et STZ5).

a. Mutation G1949A (G650E)

Pour cette mutation, un plus faible nombre de colonies a été obtenu après transformation : une seule colonie pour la souche ATCC 22019 de *C. parapsilosis* et deux colonies pour celle de STZ5. Un séquençage a été réalisé sur toutes ces colonies. Au total, un mutant G650E homozygote (ATCC 22019) a été obtenu.

b. Mutation T2933G (L978W)

De même pour la mutation L978W, un faible nombre de colonies a été obtenu après transformation. Un séquençage a pu être réalisé pour les deux colonies obtenues pour ATCC 22019 et pour la seule colonie STZ5. Au final, seul un mutant homozygote a pu être confirmé (ATCC 22019).

Au total, les transformations effectuées en vue d'éditer le gène *TAC1* ont permis de générer deux mutant homozygotes, le premier pour la mutation G650E et le second pour la mutation L978W, tous deux sur le fond génétique ATCC 22019.

iv. Introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *MRR1*

Deux mutations G583R et K873N, sélectionnées à partir de la littérature pour ce gène codant un facteur de transcription, ont été introduites dans chacun des deux fonds génétiques. Comparé aux transformations réalisées sur le gène *TAC1*, un plus grand nombre de colonies a pu être obtenu notamment pour le fond génétique ATCC 22019.

a. Mutation G1747A (G583R)

Les deux transformations réalisées ont permis d'obtenir 13 colonies pour le fond génétique ATCC 22019 et six colonies pour celui de STZ5. Un séquençage a été réalisé sur sept colonies pour le fond génétique ATCC 22019 et six colonies pour STZ5. Au total, pour ce gène, deux mutants G583R ont été obtenus : un mutant G583R homozygote (STZ5) et un mutant G583R hétérozygote (ATCC 22019).

b. Mutation A2619C (K873N)

Les deux transformations réalisées ont permis d'obtenir 14 colonies pour le fond génétique ATCC 22019 et deux colonies pour STZ5. Aucune des quatre colonies testées n'a été éditée.

Au total, pour le gène *MRR1*, un mutant homozygote G583R (STZ5) et un mutant hétérozygote G583R (ATCC 22019) ont pu être générés. En revanche, aucun mutant K873N n'a pu être obtenu.

v. Introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *ERG3*

a. Mutation G331A (G111R)

Les deux transformations ont permis d'obtenir deux colonies pour le fond génétique ATCC 22019 et trois colonies pour STZ5. Sur les quatre colonies envoyées au séquençage, toutes étaient éditées avec la présence de la mutation G111R à l'état homozygote. Aucun mutant hétérozygote n'a donc été obtenu.

Au total, pour le gène *ERG3*, au moins un mutant homozygote G111R a pu être obtenu pour chacun des deux fonds génétiques.

vi. Sensibilité *in vitro* aux antifongiques des mutants CRISPR-Cas9

Après avoir réussi à générer les mutants CRISPR-Cas9, l'autre objectif de notre travail consistait à étudier l'impact des mutations introduites dans ces différents gènes sur le profil de sensibilité *in vitro* aux triazolés. Pour certaines mutations, la sensibilité à la micafungine, à l'amphotéricine B et à la 5-FC, a été également déterminée. Les données de CMIs sont présentées dans le Tableau 10 et sont commentées ci-après.

Tableau 10. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par méthode Etest® pour les souches ATCC 22019 et STZ5 et chaque mutant CRISPR-Cas9

Gène	Souche / Mutation	Homozygote/ hétérozygote	CMI déterminée par Etest® (µg/mL)						
			FLC	VRC	POS	ISA	MIC	AMB	5-FC
	ATCC 22019	**WT**	**1.5 (S)**	**0.023 (S)**	**0.032**	**0.023**	**0.5 (S)**	**0.5**	**0.125**
ERG11	**Y132F**	Hétérozygote	6 (SDD)	0.125 (S)	0.023	0.032	-	-	-
		Homozygote	24 (R)	0.25 (I)	0.016	0.032	-	-	-
	K143R	Hétérozygote	4 (SDD)	0.047 (S)	0.032	0.023	-	-	-
		Homozygote	8 (R)	0.094 (S)	0.047	0.032	-	-	-
	R398I	Homozygote	0.75 (S)	0.016 (S)	0.023	0.023	-	-	-
TAC1	**G650E**	Homozygote	6 (SDD)	0.125 (S)	0.125	0.094	-	-	-
	L978W	Homozygote	12 (R)	0.064 (S)	0.094	0.094	0.50 (S)	0.38	-
MRR1	**G583R**	Hétérozygote	32 (R)	0.25 (I)	0.064	0.125	0.38 (S)	1.5	0.50
ERG3	**G111R**	Homozygote	0.5* (S)	0.012* (S)	0.012*	0.006*	1.5 (S)	1.5	-
	STZ5	**WT**	**0.38 (S)**	**0.023 (S)**	**0.032**	**0.032**	**1.5 (S)**	**0.5**	**0.094**
ERG11	**Y132F**	Hétérozygote	4 (SDD)	0.19 (I)	0.023	0.032	-	-	-
		Homozygote	8 (R)	0.38 (I)	0.023	0.032	-	-	-
	K143R	Hétérozygote	3 (SDD)	0.064 (S)	0.047	0.032	-	-	-
		Homozygote	8 (R)	0.064 (S)	0.047	0.047	-	-	-
	R398I	Homozygote	0.38 (S)	0.023 (S)	0.032	0.032	-	-	-
MRR1	**G583R**	Homozygote	>256 (R)	3 (R)	0.38	0.25	1.5(S)	1	0.75
ERG3	**G111R**	Homozygote	0.125* (S)	0.016* (S)	0.032*	0.012*	3-4 (I)	2	-

S : Sensible SDD ; Sensible Dose-Dependant ; I : Intermédiaire ; R : Résistant
WT : souche sauvage
*Lecture très difficile due à un effet de traîne important, suggérant une augmentation de la tolérance à ces antifongiques

a. Impact des mutations Y132F, K143R et R398I (*ERG11*)

Concernant la mutation Y132F, les résultats des tests de sensibilité *in vitro* ont permis de confirmer son impact sur la sensibilité au fluconazole chez *C. parapsilosis* (Tableau 10) (Figure 21). Pour le mutant hétérozygote, la CMI du fluconazole a été multipliée par quatre par rapport à la souche parentale ATCC 20019. Ainsi, la présence de la mutation sur un seul des deux allèles suffit pour augmenter le risque d'échec thérapeutique, la CMI du mutant hétérozygote étant au-dessus du seuil d'interprétation clinique (S ≤2 µg/mL). La présence de la mutation sur les deux allèles augmente quant à elle la CMI au fluconazole d'un facteur 16 sur ce même fond génétique. *In fine,* cette mutation homozygote suffit à conférer la résistance, telle que définie par le CLSI (R ≥8 µg/mL). Des résultats similaires pour les CMIs du fluconazole sont observés avec le fond génétique STZ5.

Pour le voriconazole, malgré une augmentation des CMIs d'un facteur 10 à 16, la présence de cette mutation à l'état homozygote, confère un phénotype de sensibilité intermédiaire. Enfin, il est intéressant de noter que pour tous ces mutants Y132F, il n'existe pas d'augmentation significative de la CMI et donc pas d'impact sur le profil de sensibilité au posaconazole et à l'isavuconazole, et ce, quel que soit le fond génétique.

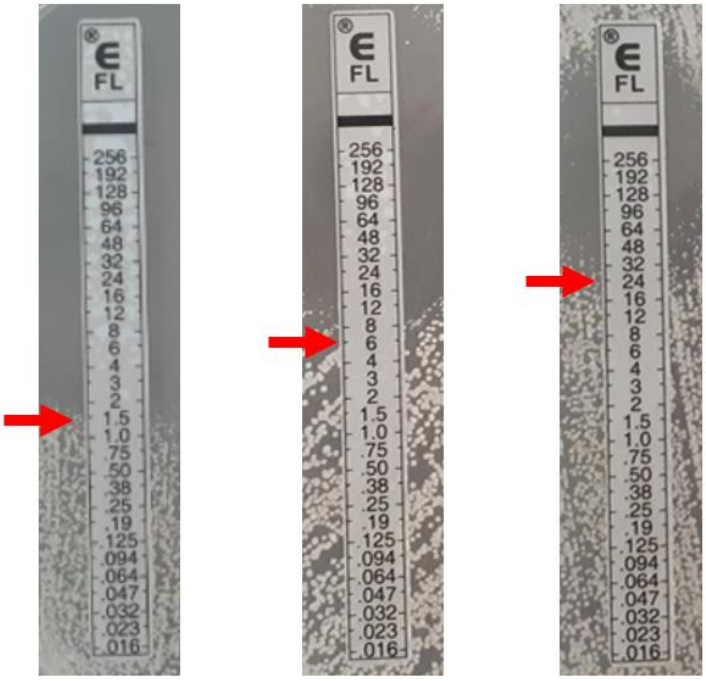


Figure 21. Comparaison des Etest® (Fluconazole) entre la souche parentale et les mutants générés pour la mutation A395T (Y132F) sur le gène *ERG11*

A gauche, souche parentale de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CMI = 1,5 µg/mL).
Au milieu, mutant hétérozygote (CMI = 6 µg/mL)
A droite, mutant homozygote (CMI = 24 µg/mL).

Une augmentation progressive des CMIs au fluconazole est visible sur cette figure en fonction de la présence ou non de la mutation Y132F sur un allèle ou sur les deux allèles du gène *ERG11*

Concernant la mutation K143R, pour la souche ATCC 22019, l'augmentation des CMIs au fluconazole pour les mutants (hétérozygote et homozygote) est un peu plus modérée (x5 pour le mutant homozygote) (Tableau 10). En revanche, l'augmentation semble plus importante pour le fond génétique STZ5 (x21 pour le mutant homozygote). Ce possible impact du fond génétique n'a cependant pas de conséquence sur le profil de sensibilité au fluconazole. En effet, les mutants hétérozygotes K143R ont un profil de sensibilité « intermédiaire » au fluconazole. A contrario, l'acquisition de la mutation K143R à l'état homozygote, confère la résistance au fluconazole (CMI ≥8 µg/mL), à l'instar de la mutation Y132F. Concernant le profil de sensibilité au voriconazole, l'augmentation des CMIs est moindre que pour celles du fluconazole et les souches restent sensibles *in vitro*, y compris les mutants homozygotes. Enfin, à l'image de la

mutationY132F, la mutation K143R, n'a aucun impact sur la sensibilité *in vitro* au posaconazole et à l'isavuconazole.

Concernant la mutation R398I, nous n'avons constaté aucun impact sur la sensibilité *in vitro* aux azolés, quel que soit le fond génétique et le type de mutation (hétérozygote ou homozygote) (Tableau 10).

b. Impact des mutations L978W et G650E (*TAC1*)

Concernant la mutation L978W, les tests de sensibilité *in vitro* (Tableau 10) montrent l'impact de cette substitution réduisant la sensibilité au fluconazole, la CMI étant multipliée par huit par rapport à la CMI de la souche parentale ATCC 22019 (CMI 12 µg/mL vs 1,5 µg/mL). L'acquisition de la mutation L978W à l'état homozygote suffit pour conférer la résistance au fluconazole (CMI ≥ 8 µg/mL).

Concernant la mutation G650E, la répercussion sur le profil de sensibilité au fluconazole est moins importante (Tableau 10). A l'état homozygote, la CMI a été multipliée par quatre par rapport à la CMI de la souche parentale ATCC 22019 (CMI 6 µg/mL vs 1,5 µg/mL), conférant un profil « Sensible Dose-Dependant » pour le fluconazole (CMI 3-6 µg /mL).

La Figure 22 illustre les modifications du profil de sensibilité au fluconazole de ces deux mutations au niveau du gène *TAC1* par rapport à la souche parentale ATCC 22019.

De façon intéressante, si l'acquisition de ces deux mutations L978W et G650E n'a pas d'impact sur le profil de sensibilité au voriconazole, posaconazole et isavuconazole, on constate néanmoins une augmentation des CMIs pour ces trois azolés. En revanche, aucun effet n'a été observé sur les CMIs de la micafungine ni de l'amphotéricine B pour la mutation L978W.
Enfin, la comparaison n'est pas possible avec le second fond génétique puisque qu'aucun mutant n'a été obtenu pour la souche STZ5, ainsi que l'impact du dosage allélique puisque qu'aucun mutant hétérozygote n'a été généré.

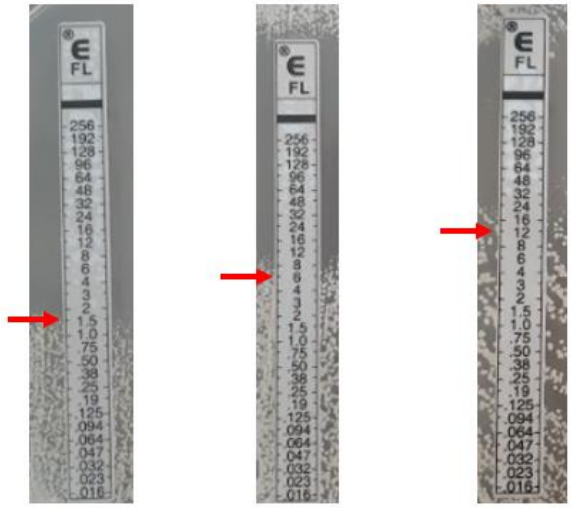


Figure 22. Comparaison des Etest® (Fluconazole) entre la souche parentale et les mutants générés G650E et L978W sur le gène *TAC1*

A gauche, souche de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CMI = 1,5 µg/mL) (souche parentale).
Au milieu, mutant homozygote G650E (CMI = 6 µg/mL).
A droite, mutant homozygote L978W (CMI = 12 µg/mL).

c. Impact de la mutation G583R (*MRR1*)

La seule présence de la mutation G583R à l'état homozygote suffit pour conférer une résistance de très haut niveau, au fluconazole celle-ci étant multipliée par 650 (CMI >256 µg/mL) par rapport à la CMI de la souche sauvage (CMI = 0,38 µg/mL) (Tableau 10) (Figure 23). Cette mutation a également une répercussion sur la sensibilité aux autres azolés puisque ce mutant est également résistant au voriconazole (CMI ≥1 µg/mL). Enfin, une augmentation des CMIs, pour le posaconazole dépassant l'ECV et pour l'isavuconazole est constatée. A noter que la présence de cette mutation à l'état hétérozygote, obtenue pour la souche ATCC 22019, confère également la résistance au fluconazole et une sensibilité intermédiaire au voriconazole. Cette mutation confère aussi une légère augmentation des CMIs pour le posaconazole et l'isavuconazole par rapport à la souche parentale. Un impact sur la sensibilité au 5-FC est mis en évidence avec une augmentation des CMIs de 0,094 à 0,75 µg/mL pour le mutant homozygote STZ5 et de 0,125 à 0,5 µg/mL pour le mutant hétérozygote ATCC 22019.

Figure 23. Comparaison des Etest® (Fluconazole) entre la souche sauvage et le mutant G583R

A gauche, souche de *C. parapsilosis* STZ5 (CMI = 0,38 µg/mL) (souche parentale). A droite, mutant homozygote (CMI>256 µg/mL)

d. Mutants *ERG3*

La lecture des tests de sensibilité *in vitro* des mutants G111R s'est montrée plus difficile que pour les autres gènes. Un effet de traîne important pour chacun de ces mutants suggère une augmentation de la tolérance aux antifongiques azolés (Figure 24). Nous avons également constaté une légère augmentation des CMIs pour la micafungine (Figure 25) et pour l'amphotéricine B (

Figure 26). Les résultats des tests de sensibilité *in vitro* se trouvent dans le Tableau 10.

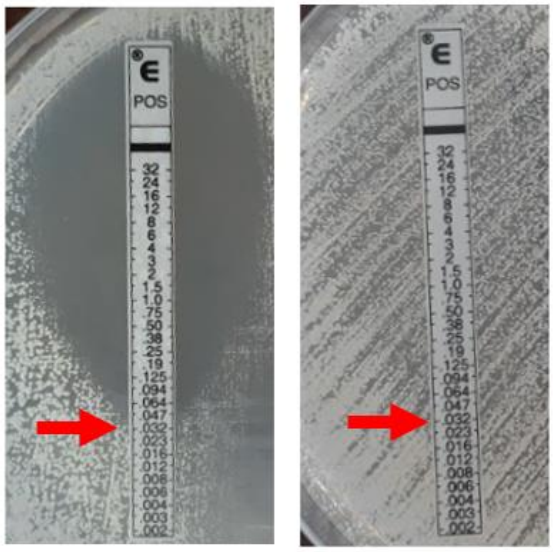


Figure 24. Comparaison des Etest® (Posaconazole) entre la souche parentale et le mutant G111R

A gauche, souche de *C. parapsilosis* STZ5 (CMI = 0,032 µg/mL) (souche parentale). A droite, mutant homozygote (CMI = 0,032 µg/mL).

Figure 25. Comparaison des Etest® (Micafungine) entre la souche parentale et le mutant G111R

A gauche, souche de *C. parapsilosis* STZ5 (CMI = 1,5 µg/mL) (souche parentale).
A droite, mutant homozygote (CMI 3-4 µg/mL).

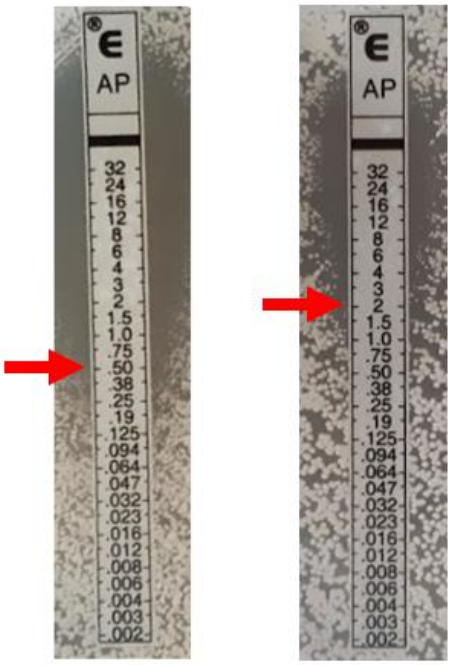


Figure 26. Comparaison des Etest® (Amphotéricine B) entre la souche parentale et le mutant G111R

A gauche, souche de *C. parapsilosis* STZ5 (CMI = 0,5 µg/mL) (souche parentale).
A droite, mutant homozygote (CMI = 2 µg/mL).

D. Apport de la technique CRISPR-Cas9 pour l'étude de phénotype de résistance complexe

La résistance acquise aux antifongiques azolés des isolats cliniques est souvent le résultat d'une combinaison de mutations sur un ou plusieurs gènes comme illustré dans notre revue de la littérature (Annexe 1). Le séquençage de nos souches, présentant un très haut niveau de résistance aux azolés, a permis d'identifier certaines de ces mutations comme par exemple Y132F au niveau du gène *ERG11*. Il a donc semblé intéressant de voir s'il était possible d'appliquer cette méthode CRISPR-Cas9 pour réaliser la réversion de cette mutation afin d'étudier son impact sur le profil de sensibilité global aux antifongiques de ces isolats cliniques.

i. Réversion de la mutation Y132F sur le gène *ERG11*

Trois souches portant la mutation Y132F à l'état homozygote ont été choisies pour réaliser cette expérience. Il s'agit de deux souches cliniques, présentant une résistance acquise aux azolés (Nice 2, PSL0004), et du mutant CP303740-CL3-A395T (ATCC 22019) généré dans le cadre de notre étude. A noter que les deux souches cliniques présentent des CMIs très élevées au fluconazole (CMI >256 µg/mL). Nous avons antérieurement démontré que ces deux souches sont réceptives à l'édition du génome par notre approche CRISPR lors des expériences d'inactivation du gène *MSH2*.

Au total, sur les trois souches testées, dix colonies ont été obtenues pour la souche Nice 2 lors de cette transformation. Sur les deux colonies envoyées au séquençage, une colonie a été éditée avec la réversion de la mutation A395T (Y132F) (Figure 27).

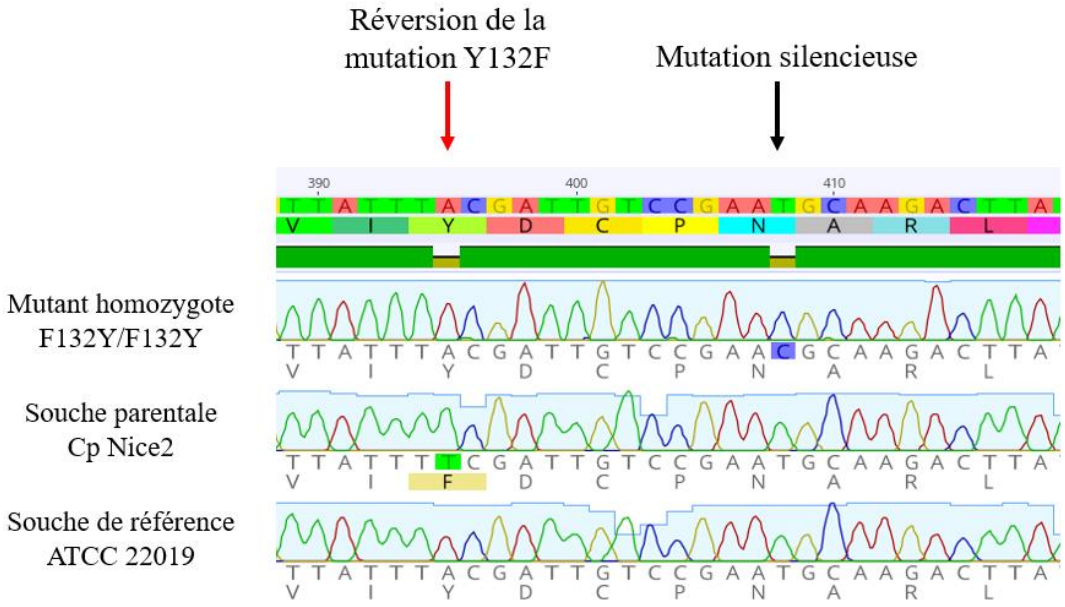


Figure 27. Confirmation par séquençage de l'obtention du mutant homozygote T395A (F132Y) du gène *ERG11* par la réversion de la mutation Y132F (flèche rouge) de la souche clinique Nice2.

Présence de la mutation silencieuse T408C (flèche noire) ajoutée volontairement afin de confirmer l'obtention du mutant par transformation. Comparaison avec la souche de référence de *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Les tests de sensibilité *in vitro* réalisés sur ce mutant réverté et sur la souche parentale correspondante sont présentés dans le Tableau 11. La souche Nice2 présente un très haut niveau de résistance au fluconazole (CMI > 256 µg/mL). A la lumière de nos travaux, ce résultat n'est pas explicable par la seule présence de la mutation Y132F. La réversion de la mutation Y132F par la technique CRISPR est associée à une forte diminution de la CMI du fluconazole (CMI = 48 µg/mL) bien que la souche soit toujours résistante au fluconazole (CMI ≥ 8 µg/mL) (Figure 28).

A noter que la réversion a également un impact sur le profil de sensibilité au voriconazole (confirmant les données obtenues précédemment sur l'impact de cette mutation). En effet, même si la souche Nice2 était initialement résistante au voriconazole (CMI ≥ 1 µg/mL), la réversion a provoqué une franche diminution de la CMI (CMI 32 µg/mL vs 0,38 µg/mL) vers une sensibilité intermédiaire au voriconazole. Aucun impact sur le profil de sensibilité aux autres antifongiques pour ce mutant n'a été observé.

Tableau 11. CMI obtenues par méthode Etest® pour le mutant CRISPR-Cas9 pour le gène *ERG11* de la souche de *C. parapsilosis* Nice2

Gène	Souche Mutation	Homozygote/ hétérozygote	CMI déterminée par Etest® (µg/mL)			
			FLC	VRC	POS	ISA
	Nice2	**Y132F**	**>256 (R)**	**>32 (R)**	**0,19**	**0,25**
ERG11	**Nice 2 rev**	**F132Y**	48 (R)	0,38 (I)	0,19	0,19

S : Sensible I : Intermédiaire R : Résistant

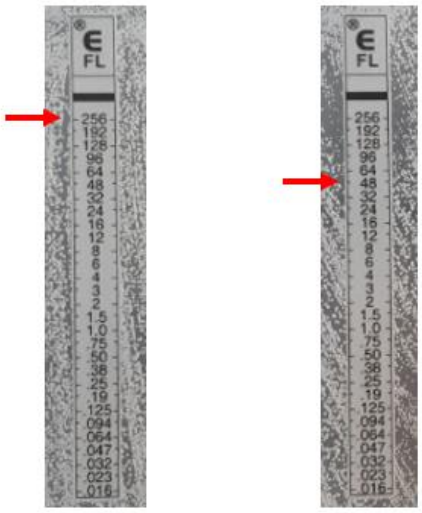


Figure 28 . Comparaison des Etest® (Fluconazole) entre la souche parentale et le mutant F132Y

A gauche, souche de *C. parapsilosis* Nice 2 (CMI >256 µg/mL) (souche parentale).
A droite, mutant homozygote F132Y (CMI = 48 µg/mL).

Au total, cette première approche, nous montre l'intérêt de la méthode à travers sa capacité à reverter des mutations acquises sous traitement, perspective intéressante pour l'étude de phénotypes de résistance complexes.

ii. Génération simultanée de mutants multiples (exemple de la combinaison de la mutation Y132F et R398I sur le gène *ERG11*)

Comme expliqué précédemment, la résistance étant fréquemment la combinaison de plusieurs mécanismes, nous avons souhaité évaluer la possibilité de reproduire plusieurs mutations de façon simultanée pour pouvoir étudier leur profil de sensibilité aux antifongiques. La technique que nous utilisons permet la réalisation de combinaisons de mutations soit en enchaînant les

transformations (car le plasmide ne s'intègre pas au génome) soit éventuellement en utilisant plusieurs plasmides simultanément à l'étape de transformation, avec les RT adaptés.

Une tentative d'édition simultanée des mutation Y132F et R398I (gène *ERG11*) a donc été testée avec la souche de *C. parapsilosis* ATCC 22019 lors d'une seule et même transformation. Pour réaliser cette expérience, les deux plasmides permettant d'introduire la mutation Y132F et R398I ont été transformés de manière simultanée avec leurs RT respectifs.

Sur les six colonies obtenues, le séquençage a été réalisé pour deux des mutants. Les résultats du séquençage sont présentés dans le Tableau 12. Aucun des mutants ne possédait les deux mutations mais tous deux étaient partiellement édités. Pour les quatre colonies restantes, la PCR allèle spécifique ne confirmait pas non plus la présence des mutations Y132F et R398I.

Tableau 12. Résultats du séquençage pour la transformation qui avait pour objectif d'introduire la combinaison de mutations Y132F et R398I sur le gène *ERG11* de *C. parapsilosis* ATCC 22019

Souche ATCC 2219	Résultats du séquençage pour Y132F	Résultats du séquençage pour R398I
CL1	WT[1]	R398I[3]
CL2	WT[2]	WT[4]

1 Absence de la mutation A395T (Y132F) et des deux mutations silencieuses
2 Absence de la mutation A395T (Y132F) mais présence des deux mutations silencieuses à l'état homozygote
3 Présence de la mutation R398I et des deux mutations silencieuses à l'état homozygote
4 Absence de la mutation R398I et des deux mutations silencieuses

Au total, cette première tentative n'a pas permis de générer de double mutant Y132F + R398I et devra être reproduite en changeant les conditions expérimentales.

E. Collection de mutants générés au cours de ce travail

Au total, 23 mutants CRISPR-Cas9 différents ont été générés lors de toutes les transformations. L'ensemble des mutants confirmés par séquençage et générés dans le cadre de ce travail est listé dans le Tableau 13 pour les manipulations d'inactivation de gènes et dans le Tableau 14 pour les manipulations d'introduction de mutations ponctuelles.

Un des objectifs était de générer un mutant homozygote et un hétérozygote pour chaque mutation sélectionnée lors la revue de la littérature, sur différents gènes (*ERG11*, *TAC1*, *MRR1*,

et *ERG3*) connus pour être impliqués dans la résistance aux antifongiques, et pour chacun des fonds génétiques. Dans notre librairie de mutants, nous avons quasiment obtenu au moins un mutant homozygote et/ou hétérozygote pour chacune des mutations.
L'autre objectif était de générer des mutants *msh2*Δ*/msh2*Δ où le gène *MSH2*, impliqué dans la réparation de l'ADN, a été inactivé pour pouvoir évaluer son rôle potentiel dans l'acquisition de la résistance chez *C. parapsilosis*. Nous avons aussi montré que la technique CRIPSR-Cas9 était également réalisable sur différents fonds génétiques.

L'objectif, qui consistait à appliquer cette méthode CRISPR-Cas9 pour la réversion de mutations suspectées de conférer la résistance d'isolats cliniques, a été atteint pour l'isolat clinique Nice2. La génération de mutants avec une combinaison de mutations n'a pas été réussie à ce jour et n'a pas pu être reproduite. Pour ces deux derniers objectifs, des manipulations supplémentaires auraient été nécessaire pour pouvoir les atteindre.

Tableau 13. Synthèse des différents mutants générés lors des manipulations d'inactivation de gènes

	ATCC 22019	STZ5	Nice2	STZ1	STZ9	PSL0007	PSL0004
Profil vis-à-vis du fluconazole	S	S	R	R	S	R	R
Inactivation gène *MSH2*	✓	✓	✓		✓	✓	✓

✓Mutant avec gène d'intérêt S : sensible R : Résistant

Tableau 14. Synthèse des différents mutants générés sur les différents fonds génétiques lors des manipulations d'introduction de mutations ponctuelles

Gène	Mutation	*	ATCC 22019	STZ5	Nice 2	PSL0004	CP303740-CL3-A395T
ERG11	Y132F	20	✓✓+✓	✓✓+✓	-	-	-
	K143R	12	✓✓+✓	✓✓+✓	-	-	-
	R398I	2	✓✓	✓✓	-	-	-
	F132Y	20	-	-	✓✓	☒	☒
TAC1	G650E	4	✓✓	☒	-	-	-
	L978W	10	✓✓	☒	-	-	-
MRR1	G583R	17	✓	✓✓	-	-	-
	K873N	23	☒	☒	-	-	-
ERG3	G111R	4	✓✓	✓✓	-	-	-

*Nombre de pb par rapport au site de coupure
✓✓ Mutant homozygote ✓ Mutant hétérozygote ✓ ✓+✓ Mutant homozygote et hétérozygote
☒ Aucun mutant généré -: non applicable

Discussion

IV. Discussion

Il est important de rappeler que ce projet, comme beaucoup d'autres a été largement impacté par la crise sanitaire. En effet, l'impossibilité d'accéder au laboratoire de recherche pendant plus de trois mois a réduit fortement le temps de manipulation et donc freiné le déroulement de ce projet. Ce manque de temps ne nous a pas permis de reproduire certaines manipulations, notamment la réalisation de réversions et combinaisons de mutations ponctuelles, et de générer des mutants sur le gène codant le facteur de transcription *UPC2*, ce qui était prévu initialement.

Néanmoins, nous avons pu mettre en place la technique CRISPR-Cas9 et démontrer sa faisabilité pour inactiver des gènes chez *C. parapsilosis* et introduire des mutations ponctuelles ce qui était l'objectif principal de ce projet. Cette approche s'est montrée rapide et efficace comparée aux précédentes méthodes d'édition du génome. En effet, une seule transformation est nécessaire pour pouvoir inactiver les deux allèles d'un gène avec la technique CRISPR-Cas9 contrairement aux approches précédentes telle que la PCR de fusion, rapportée précédemment chez *C. parapsilosis* (Holland *et al.*, 2014). Dans cette dernière, il est nécessaire de déléter les deux allèles de manière successive ce qui augmente le délai pour l'obtention des mutants souhaités. Le même inconvénient est constaté pour la délétion de gènes par la méthode SAT1-flipper (Ding & Butler, 2007). Un autre atout de la technique mise en place pour ce projet est qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser des souches auxotrophes contrairement à la plupart des méthodes d'éditions du génome ce qui rend plus simple son utilisation (Holland *et al.*,2014).
Dans les travaux de Branco *et al.* de 2015 où l'objectif était d'introduire des mutations ponctuelles au niveau du gène *MRR1*, il a été nécessaire de déléter le gène *MRR1* avec la méthode PCR de fusion avant l'introduction de la cassette SAT1-flipper ce qui a donc rajouté plusieurs étapes de PCR et donc allongé le temps de manipulation (Branco *et al.*, 2015).
Le haut rendement d'édition observé avec la méthode CRISPR-Cas9 chez *C. parapsilosis*, s'explique par plusieurs facteurs dont la quasi-absence de réparation des cassures de l'ADN par le processus de jonctions d'extrémités non homologues (NHEJ « non-homology end joining ») chez cette espèce. Ainsi, la réparation est principalement obtenue par recombinaison homologue (HDR). C'est ce processus que nous avons utilisé en transformant de manière simultanée l'ADN donneur ou repair template, permettant d'introduire la mutation souhaitée. La génération des RT est aisée et repose sur une simple PCR comparée aux autres méthodes qui nécessitent la génération de cassettes relativement complexes et de grandes tailles. Par exemple, lors de l'introduction de mutations ponctuelles réalisées avec la technique

SAT1-flipper chez *C. orthopsilosis*, les auteurs mentionnent qu'il est nécessaire de réaliser plusieurs étapes (3 PCR avec deux purifications, lier 2 plasmides) pour générer la cassette de 6450 pb (Rizzato *et al.*, 2018). Nous pouvons également remarquer que la longueur des bras d'homologie pour les RT varie d'une méthode à l'autre, une plus grande taille étant associée à un plus fort taux de recombinaison homologue. Selon les publications, les bras d'homologie entourant la cassette SAT1-flipper font entre 500 et 2000 pb pour introduire une mutation ponctuelle chez d'autres espèces de *Candida* (Flowers *et al.*, 2015; Rizzato *et al.*, 2018). A l'opposé, dans la technique CRISPR-Cas9 que nous avons utilisée, les bras d'homologie sont de taille très réduite (50 pb) tout en conservant une efficacité d'édition importante.

Un des objectifs de notre travail était notamment de générer des mutants hétérozygotes, en plus de mutants homozygotes, afin d'observer l'impact du dosage allélique, impact déjà décrit chez *C. albicans* (Liang & Bennett, 2019). En effet, dans un premier temps, l'acquisition de la résistance aux antifongiques chez les espèces diploïdes repose sur l'acquisition d'une mutation sélectionnée sous l'effet de la pression antifongique, survenant sur l'un des allèles (mutation hétérozygote). Dans un second temps, un processus de recombinaison mitotique (perte d'hétérozygotie) permettra à la mutation sélectionnée de gagner le second allèle (mutation homozygote) (A. Coste *et al.*, 2006; Liang & Bennett, 2019). Il a donc semblé intéressant de pouvoir évaluer le profil de sensibilité aux antifongiques de ces mutants afin d'étudier l'influence du dosage allélique. Malgré l'efficacité et la simplicité de cette technique CRISPR-Cas9, la génération de mutants porteurs de substitutions ponctuelles, à l'état hétérozygote, est apparue difficile. La position de la mutation en fonction du site de cassure de Cas9 pourrait être une des raisons de la difficulté à générer des mutants hétérozygotes. Les travaux de Paquet *et al.* réalisés sur des cellules souches pluripotentes induites humaines, montrent que l'efficacité d'édition diminue au fur et à mesure de l'éloignement du nucléotide à éditer du site de coupure de Cas9 (Paquet *et al.*, 2016). Il semble donc exister une relation directe entre l'éloignement au site de coupure et le ratio homozygote/hétérozygote. Ainsi, plus la base à éditer est proche du site de coupure de Cas9, plus la proportion de mutants homozygotes sera importante. A l'inverse, plus la base à éditer est éloignée du site de coupure de Cas9, plus la proportion de mutants homozygotes diminue. Trois des mutations (R398I (gène *ERG11*), G650E (gène *TAC1*), G111R (gène *ERG3*)), sélectionnées pour notre projet, se situent à moins de 5 pb du site de coupure. Pour ces mutations, l'efficacité a été optimale, et seuls des mutants homozygotes ont été obtenus ce qui est en accord avec les observations de Paquet *et al.*. A l'inverse, l'efficacité diminue drastiquement quand le nucléotide à éditer est

trop éloigné du site de coupure. Dans cette situation, il est plus probable d'obtenir des mutants hétérozygotes ce qui s'est vérifié pour les mutations K143R (gène *ERG11*) et G583R (gène *MRR1*), situées entre 5 et 17 pb de coupure de Cas9. Au-delà de 17 pb du site de coupure, l'efficacité d'édition diminue drastiquement. C'est le cas pour la mutation K873N (gène *MRR1*) pour laquelle aucun mutant n'a pu être généré dans le cadre de notre projet. Cependant, pour cette mutation et pour chacun des fonds génétiques, seules deux colonies ont été envoyées au séquençage sur les 16 colonies obtenues au total.

Dans cette technique CRISPR-Cas9, la distance de la mutation souhaitée par rapport au site de coupure de Cas9 est donc cruciale. La nécessité d'avoir un motif PAM (NGG) pour l'enzyme Cas9 à proximité immédiate de la base à éditer peut donc représenter une contrainte. En effet, un motif PAM n'est pas toujours présent à proximité du nucléotide à éditer ce qui réduit les chances d'obtenir le(les) mutant(s) souhaité(s). Pour contourner ce problème, une alternative envisageable serait tout d'abord d'introduire un motif PAM en prenant soin de ne pas impacter sur le cadre de lecture ni la transcription, à proximité de la base à éditer. Dans une seconde étape, ce PAM, ainsi généré, serait utilisé lors d'une seconde transformation qui permettrait d'éditer la base souhaitée. L'autre solution serait d'utiliser d'autres enzymes de type Cas, capables de reconnaître d'autres motifs PAM tel que TTN pour l'enzyme Cas12a (Cpf1) utilisée chez *S. cerevisiae* par exemple (Morio *et al.*, 2020; Verwaal *et al.*, 2018).
Une autre approche aurait pu être utilisée pour contourner cette difficulté d'obtenir des mutants hétérozygotes. Il s'agit de transformer simultanément à proportion égale le RT avec la mutation souhaitée et le RT sans cette mutation, stratégie déjà utilisée avec succès chez *C. parapsilosis* (Lombardi *et al.*, 2019).

Comment présenté dans notre revue de la littérature, il existe quelques études similaires à la nôtre, dont l'objectif était de générer des mutants porteurs de mutations ponctuelles chez *C. albicans* et *C. parapsilosis* (Branco *et al.*, 2015; Flowers *et al.*, 2015). Il est donc intéressant de comparer les résultats obtenus avec les nôtres même si les méthodologies ne sont pas parfaitement superposables notamment pour déterminer les CMIs.

Concernant les mutations au niveau du gène *ERG11*, nous avons démontré que l'acquisition des mutations Y132F et K143R confère la résistance au fluconazole. En revanche, aucun impact sur la sensibilité *in vitro* aux azolés de la mutation R398I (gène *ERG11*) peu importe le fond génétique, n'a été observé. Ces résultats confirment le fait que cette mutation, décrite chez des

isolats cliniques sensibles et résistants au fluconazole, ne participe pas à la résistance de *C. parapsilosis* aux azolés (Choi *et al.*, 2018; Grossman *et al.*, 2015; Thomaz *et al.*, 2018). Nombre de ces polymorphismes neutres du gène *ERG11* a également été décrit chez *C. albicans* (Morio *et al.*, 2010; Sitterlé *et al.*, 2020).

Nos résultats sont en accord avec les observations de Singh *et al.* où l'impact des mutations Y132F et K143R sur la résistance au fluconazole avait été étudié avec un système d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* (Singh *et al.*, 2019). Néanmoins dans cette publication, seul le fluconazole avait été testé. Notre travail apporte donc des informations supplémentaires sur l'impact de ces mutations sur les autres triazolés utilisés en clinique. Au total, seule la mutation Y132F a un impact significatif sur la résistance au voriconazole. En effet, s'il est intéressant de noter une légère augmentation des CMIs pour le voriconazole suite à l'acquisition de la mutation K143R, cela n'affecte pas le profil de sensibilité au voriconazole de ces mutants. Enfin, aucun impact sur les CMIs au posaconazole et à l'isavuconazole n'a été observé pour ces deux mutations, en accord avec les travaux de Demirci-Duarte *et al.* et Singh *et al.* (Demirci-Duarte *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2019). Cela s'explique par la présence d'une chaîne latérale qui va interagir avec le canal d'accès au substrat et stabiliser l'interaction du substrat avec la protéine Erg11(Hargrove *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2004). La capacité à faciliter l'insertion de mutations ponctuelles dans le gène *ERG11* devrait ainsi permettre de mieux comprendre les interactions entre les azolés et la structure tridimensionnelle de l'enzyme et ainsi accélérer le développement et design rationnel de nouveaux azolés. L'impact de ces deux mutations sur la résistance au fluconazole avait été précédemment démontré chez *C. albicans* (Flowers *et al.*, 2015). Les auteurs montraient toutefois un impact plus important de la mutation K143R sur la CMI au fluconazole que la mutation Y132F ce qui n'a pas été mis en évidence dans notre travail. Des isolats résistants au fluconazole, présentant les mutations Y132F et K143R, ont aussi été décrits chez *C. auris* (Ahmad *et al.*, 2020; Alfouzan *et al.*, 2020) et chez *C. tropicalis* (Arastehfar, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020; Castanheira *et al.*, 2020; Jin *et al.*, 2018; Xisto *et al.*, 2017). L'impact de ces deux mutations, sur le profil de sensibilité au fluconazole et de façon moins importante au voriconazole, a également été prouvé chez *C. auris* (Healey *et al.*, 2018) ainsi que l'impact de la mutation Y132F sur le profil de sensibilité au fluconazole chez *C. tropicalis* (Fan *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2013) à l'aide d'un système d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae*. Ces observations montrent l'importance de ces acides aminés Y132 et K143, très conservés au sein du genre *Candida* et fréquemment impliqués dans l'acquisition de la résistance. En revanche, aucune étude sur l'effet de ces mutations à l'état hétérozygote versus homozygote n'avait été effectuée jusqu'à présent. Dans notre travail, nous avons pu mettre en

évidence un effet du dosage allélique sur la résistance aux antifongiques. La présence des mutations Y132F et K143R sur un seul des allèles suffit pour que les mutants ne soient plus sensibles mais « Sensible Dose-dependant » (SDD) au fluconazole. Cela a pour conséquence d'augmenter le risque d'échec thérapeutique en l'absence d'augmentation des posologies de fluconazole chez le patient infecté par une souche ayant acquis une de ces mutations. La mutation Y132F, présente à l'état homozygote, suffit quant à elle à conférer la résistance, telle que définie par le CLSI. Cette observation est importante car il s'agit de la mutation la plus fréquemment identifiée dans la littérature, notamment à l'origine de cas groupés d'infections invasives en secteur hospitalier (Arastehfar, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2021; Corzo-Leon *et al.*, 2021; Fekkar *et al.*, 2021; Martini *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2019; Thomaz *et al.*, 2018, 2021).

Concernant les mutations sur le gène *MRR1*, l'augmentation des CMIs induite par l'acquisition la mutation G583R est observée pour tous les antifongiques et de façon considérable pour le fluconazole. L'augmentation des CMIs au posaconazole mise en évidence dans notre travail est également constatée dans l'étude de Silva (Silva *et al.*, 2011) mais pas dans les travaux de Branco *et al.* (Branco *et al.*, 2015) où aucune augmentation significative de la CMI au posaconazole n'a été mise en évidence. A ce jour, la mutation G583R n'a été décrite que chez *C. parapsilosis*. Des travaux récents ont montré qu'une autre mutation de ce facteur de transcription (V668G) considérée comme « gain de fonction » au niveau du gène *MRR1*, de *C. lusitaniae*, a conduit à augmenter les CMIs de la 5-FC (Kannan *et al.*, 2019). Notre travail montre également que l'introduction de la mutation gain de fonction G583R chez *C. parapsilosis* permet l'augmentation de la CMI à la 5-FC, cette augmentation étant plus importante quand la mutation est présente à l'état homozygote.

Concernant les mutations sur le gène *TAC1*, les deux mutations, G650E et L978W ont été mises en évidence pour la première fois chez des isolats résistants au fluconazole dans les travaux de Berkow *et al.* (Berkow *et al.*, 2015). Notre travail permet de confirmer que ces deux mutations à l'état homozygote ont un impact sur la résistance au fluconazole, même si celui-ci est moins important pour la mutation G650E. Ce sont donc probablement des mutations « gain de fonction ». Cette hypothèse sera à confirmer en mesurant l'expression des transporteurs d'efflux de type Cdr chez nos mutants. Les mutations « gain de fonction » au niveau du gène *TAC1* sont bien connues chez *C. albicans* et décrites chez de nombreux isolats cliniques (A. Coste *et al.*, 2006; A. T. Coste *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2020; Morschhäuser, 2010). La délétion du gène *TAC1b* (gène homologue du gène *TAC1* chez *C. parapsilosis* et *C. albicans*) chez un isolat résistant au

fluconazole de *C. auris* a permis de mettre en évidence une diminution de la CMI au fluconazole. Cette diminution a montré également un rôle de Tac1b dans la résistance au fluconazole mais de façon intéressante, indépendamment de la pompe d'efflux Cdr1 (Li *et al.*, 2021; Mayr *et al.*, 2020; Morio *et al.*, 2013).

Chez *C. albicans*, plusieurs mutations gains de fonction sont localisées dans le domaine d'activation C-terminal du facteur de transcription ce qui aurait un impact sur l'activité transcriptionnelle de Tac1 (A. Coste *et al.*, 2006; Morschhäuser, 2010), à l'instar de L978W. *In fine*, ces mutations, G650E et L978W, malgré une légère augmentation des CMIs, ne semblent pas affecter le profil de sensibilité *in vitro* au voriconazole, au posaconazole, et à l'isavuconazole. Cette augmentation des CMIs est en accord avec la littérature, la pompe d'efflux Cdr1 étant décrite pour avoir un large spectre de substrats et notamment tous les azolés chez *C. albicans* (Cannon *et al.*, 2009).

Concernant la mutation G111R, seule mutation introduite au niveau du gène *ERG3*, nous avons observé ce qui ressemble à un effet de traîne, pouvant suggérer une augmentation de la tolérance aux antifongiques azolés compliquant la lecture des CMIs des azolés et pouvant faire se poser la question d'une résistance. De façon intéressante, Rybak *et al.* ayant observé cette mutation chez un isolat clinique, n'ont pas formellement mentionné cette difficulté de lecture et concluait à une résistance acquise aux azolés en lien avec cette mutation (Rybak *et al.*, 2017). Pourtant, dans les données publiées, ces auteurs montrent que cette souche était sensible à 24h au fluconazole, ce qui va à l'encontre d'un phénotype de résistance et suggère plutôt un effet de traîne important ayant pu conduire à surestimer la résistance à 48h. Ce phénotype particulier observé avec les mutants *ERG3* a été récemment discuté par Luna-Tapia *et al.* (Luna-Tapia *et al.*, 2019). Les auteurs ont mis en évidence que les mutants *ERG3* de *C. albicans* avaient un phénotype particulier mais qu'il ne s'agissait pas d'un réel effet de traîne ni d'une réelle résistance.

Un point intéressant à notre connaissance encore inexpliqué est le lien entre l'acquisition de la mutation G111R du gène *ERG3* et une réduction de la sensibilité aux échinocandines rapporté par Rybak *et al.* (Rybak *et al.*, 2017). En effet, le gène *ERG3* n'est pas la cible des échinocandines. Ces résultats sont concordants avec les résultats de notre travail puisque nous avons également observé une discrète augmentation de la CMI à la micafungine suggérant une tolérance accrue pour les mutants G111R et ce, quel que soit le fond génétique. En revanche, nous avons également observé une légère augmentation des CMIs, à l'amphotéricine B qui n'avait pas été observée dans les travaux de Rybak *et al.* (Rybak *et al.*, 2017). Chez *C. albicans*,

une augmentation des CMIs à l'amphotéricine B a également été rapportée par plusieurs auteurs, chez des isolats porteurs de mutations au niveau du gène *ERG3* ce qui suit la tendance de nos résultats (Kelly *et al.*, 1997; Martel *et al.*, 2010; Morio *et al.*, 2012; Nolte *et al.*, 1997; Vale-Silva *et al.*, 2012).

Des manipulations supplémentaires ont été réalisées sur ces mutants au sein de notre équipe (Dr. Ourliac-Garnier). Elles ont consisté au dosage des stérols membranaires des souches ATCC 22019 et STZ5 et de leurs mutants respectifs portant la mutation G111R afin de vérifier la perte de fonctionnalité induite par cette mutation. Il est normalement attendu une modification de la répartition des stérols membranaires, notamment une forte diminution de l'ergostérol membranaire (Tableau 15).

Tableau 15. Résultats du dosage des stérols pour les mutants homozygotes G111R et les souches parentales correspondantes

Stérol	**ATCC 22019 % (total)**	***ERG3*^{G111R} Homozygote ATCC 22019 % (total)**	**STZ5 % (total)**	***ERG3*^{G111R} Homozygote STZ5 % (total)**
cholesterol	11.01	7	8.93	6.15
ergosta-8,22,24(28)-trienol			0.18	
dehydroergosterol	0.49		0.51	
PM470		3.09		3.64
ergosterol Z ou E			0.22	
ergosterol	**77.29**	15.85	**96.01**	23.15
ergosta-7,22-dienol	5.03	**63.73**	0.45	**66.06**
fecosterol		0.74	0.25	0.32
PM472 (pas ergost-7-enol)		1.02		0.66
14(alpha)méthylépistérol	0.49			
14(alpha)méthylfécostérol	1			
ergosta-dien-3b-ol (5,7 ou 5,8)	8.66	2.31	2.19	1.81
episterol	1.12	4.01	0.19	0.91
ergosta-7-enol	1.99	9.09		3.45
lanostérol	3.94	0.15		

Pour les souches ATCC22019 et STZ5, comme attendu l'ergostérol est le stérol membranaire majoritaire identifié (77% et 96% resp.). En revanche, l'acquisition de la mutation G111R homozygote s'accompagne d'une baisse importante de l'ergostérol qui ne représente plus que 15 et 23% et d'une accumulation de ergosta-7,22-dienol (plus de 60%) qui devient le stérol majoritaire. Nous pouvons donc en conclure que la mutation G111R a bien un impact sur Erg3, conduisant à une perte de fonction. Cette observation est concordante avec celle retrouvée dans

les travaux de Rybak *et al.* chez *C. parapsilosis*. Le pourcentage d'ergosta-7,22-dienol est entre 70 et 80% et devient le stérol majoritaire chez l'isolat porteur de la mutation G111R (gène *ERG3*) et de même lorsque le gène *ERG3* est délété (Rybak *et al.*, 2017). Chez *C. albicans*, la même observation a été faite dans les travaux de Martel *et al.* où deux isolats porteurs de mutations au niveau du gène *ERG3* ont présenté des pourcentages d'ergosta-7,22-dienol allant de 50 à 70% et donc devenu le stérol majoritaire (Martel *et al.*, 2010). En effet, comme illustré dans la Figure 29, en cas de perte de fonctionnalité de Erg3 (mutations ou délétions), une voie alternative est mise en place. L'épistérol est alors transformé en ergosta-7,22-dienol par Erg6. La production d'ergostérol est alors réduite.

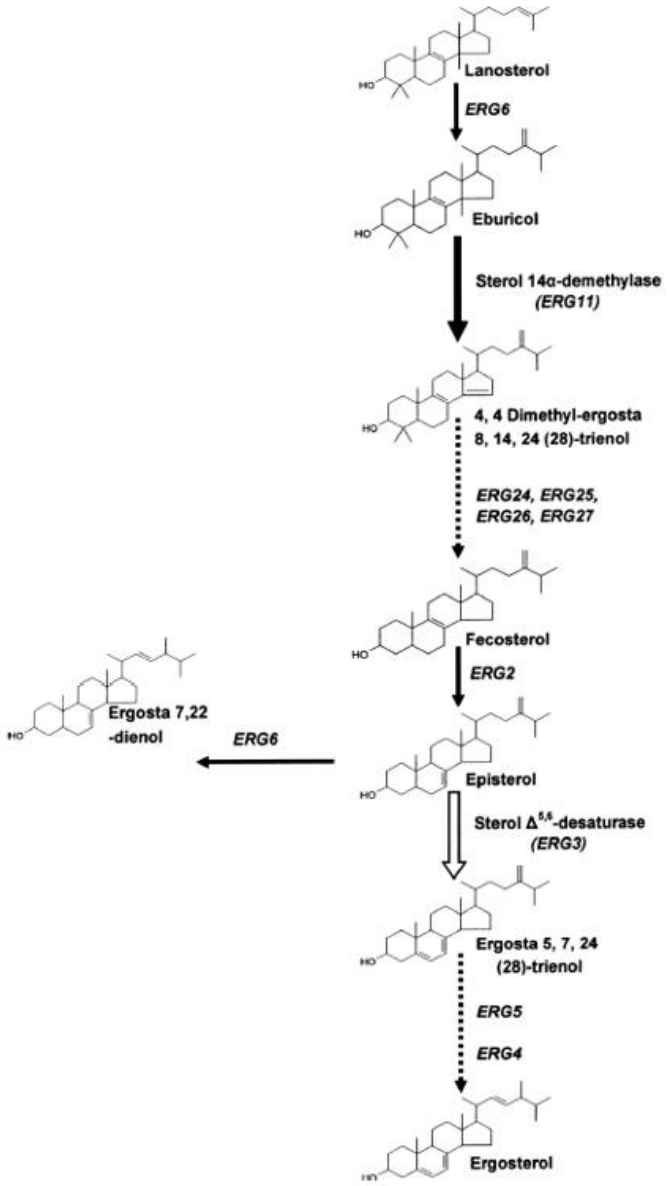


Figure 29 : Schéma modifié issu de la publication de Martel *et al.* représentant la voie de l'ergostérol chez *C. albicans* lors de la perturbation de Erg3 en l'absence d'antifongiques azolés (absence d'inhibition de Erg11) avec accumulation des stérols intermédiaires (Martel *et al.*, 2010)

Enfin, concernant l'inactivation du gène *MSH2*, les résultats des tests de sensibilité *in vitro* pour le mutant *msh2*-/- n'ont pas révélé d'impact de cette inactivation sur la sensibilité *in vitro* au fluconazole et à la micafungine par rapport à la souche sauvage ATCC 22019. Cette observation reste à confirmer sur les autres mutants générés sur d'autres fonds génétiques. Si cette observation peut paraître surprenante, elle est parfaitement concordante avec les résultats précédemment publiés (Healey *et al.*, 2016). Il reste donc à déterminer si l'inactivation du gène *MSH2* est responsable d'un phénotype « hypermutant » pouvant contribuer à une émergence

plus rapide de la résistance aux antifongiques, en cas d'exposition prolongée aux antifongiques, comme observé chez *C. glabrata* avec le fluconazole, le voriconazole, la caspofungine, la micafungine et l'amphotéricine B (Healey *et al.*, 2016). Ce type de souche génétiquement modifiée pourrait s'avérer être un allié précieux pour faire émerger, dans le cadre d'approches d'évolution expérimentale *in vitro*, de nouveaux phénotypes de résistances, avant qu'ils n'apparaissent en clinique.

In fine, ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes et vont nous inciter à poursuivre la constitution de la librairie. Les données déjà générées permettent de corréler l'impact des mutations testées au profil de CMIs et au risque d'échec thérapeutique comme synthétisé dans le Tableau 16.

Tableau 16. Synthèse de l'impact des mutations sur la sensibilité aux différents antifongiques

Gène	Génotype	FLU	VRC	POS	ISA
	Wild type				
ERG11	R398I/R398I	+/-	+/-	+/-	+/-
	Y132F/WT	++	++	+/-	+/-
	Y132F/Y132F	++	++	+/-	+/-
	K143R/WT	++	++	+/-	+/-
	K143R/K143R	++	++	+/-	+/-
TAC1	G650E/G650E	++	++	++	++
	L978W/L978W	++	++	++	++
MRR1	G583R/WT	++	++	++	++
	G583R/G583R	+++	+++	++	++
ERG3	G111R/G111R	T	T	T	T

Pas d'augmentation de la CMI au-dessus du seuil d'interprétation clinique (ou le cas échéant, ECV)
Cette mutation contribue à une diminution de la sensibilité *in vitro* à cet antifongique (profil de sensibilité intermédiaire ou sensible dose-dependant)
Cette mutation est suffisante pour conférer la résistance *in vitro* à cet antifongique
+/- : Absence d'augmentation significative de la CMI (+/- 1 dilution)
++ : Augmentation modérée de la CMI
+++ : Forte augmentation de la CMI (>100 fois)
T : Effet de traîne

Conclusion et Perspectives

V. Conclusion et Perspectives

En conclusion, nous avons mis en place, au laboratoire, une méthode d'édition du génome utilisant la technologie CRISPR Cas9 appliquée à la levure opportuniste *C. parapsilosis*. L'apport de cette technique, pour améliorer la compréhension de la résistance aux antifongiques, est illustré à travers ce travail expérimental. La relative simplicité de la méthode utilisée et son efficacité, optimisée pour l'introduction de mutations ponctuelles, ont permis de générer 23 mutants différents (inactivation du gène *MSH2* et mutations ponctuelles sur les gènes *ERG11*, *TAC1*, *MRR1*, *ERG3*) présentant différents dosages alléliques.

Nos résultats révèlent que toutes les substitutions ne sont pas identiques en termes d'impact sur l'efficacité des antifongiques azolés. Cinq mutations (*ERG11*^{Y132F} et *ERG11*^{K143R}, *TAC1*^{G650E}, *TAC1*^{L978W}, *MRR1*^{G583R}) suffisent à rendre les souches non sensibles au fluconazole voire à conférer l'échec thérapeutique tel que défini par les seuils d'interprétation clinique usuel. *MRR1*^{G583R} est la mutation qui affecte le plus la sensibilité au fluconazole mais également les autres triazolés. *ERG11*^{Y132F}, mutation qui est la plus fréquemment décrite dans la littérature, a un impact sur le profil de sensibilité au fluconazole et au voriconazole seulement.

Ces données *in vitro* mériteraient d'être évaluées *in vivo* sur le modèle invertébré *Galleria mellonella* déjà présent au laboratoire afin de vérifier nos hypothèses dans un modèle expérimental d'infections. Aussi nous pourrions étudier « le fitness cost » de ces mutants toujours à l'aide de ce modèle (Ben-Ami *et al.*, 2011; Popp *et al.*, 2017).

Ce travail préliminaire montre la validité du modèle et son intérêt, nous incitant à aller plus loin : i) étendre ce travail à d'autres mutations décrites dans la littérature dont l'impact n'est pas encore connu sur ces gènes mais également sur d'autres gènes comme *UPC2, FKS1* ; ii) tester de façon expérimentale des mutations non encore identifiées en clinique mais fortement suspectées d'être associées à la résistance d'après les connaissances de la structure tridimensionnelle de la protéine Erg11 ; iii) reproduire les expériences de combinaisons de mutations sur un même gène afin de les optimiser et tester les combinaisons de mutations sur des gènes différents. En effet, à l'évidence, l'augmentation de la CMI observée avec les mutations testées ne permet pas d'expliquer le phénotype de certaines souches cliniques présentant une résistance de très haut niveau aux azolés, et qui suggère l'existence de mécanismes alternatifs et / combinés chez ces isolats cliniques ; iv) Réaliser d'autres réversions

de d’autres mutations ponctuelles et étudier leur sensibilité *in vitro* vis-à-vis des azolés avant et après la réversion afin de déterminer le réel impact sur la sensibilité *in vitro* des azolés pour ces mutations ponctuelles.

Enfin, cette librairie de souches éditées à façon, aidera aux screening et à l’évaluation de nouveaux antifongiques capables de contourner les mécanismes de résistance (plateforme Fungiline screen, EA1155 IIcimed).

Bibliographie

Ahmad, S., Khan, Z., Al-Sweih, N., Alfouzan, W., & Joseph, L. (2020). Candida auris in various hospitals across Kuwait and their susceptibility and molecular basis of resistance to antifungal drugs. *Mycoses*, *63*(1), 104–112. https://doi.org/10.1111/myc.13022

Alani, E., Cao, L., & Kleckner, N. (1987). A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics*, *116*(4), 541–545. https://doi.org/10.1534/genetics.112.541.test

Alfouzan, W., Ahmad, S., Dhar, R., Asadzadeh, M., Almerdasi, N., Abdo, N. M., Joseph, L., de Groot, T., Alali, W. Q., Khan, Z., Meis, J. F., & Al-Rashidi, M. R. (2020). Molecular Epidemiology of Candida Auris Outbreak in a Major Secondary-Care Hospital in Kuwait. *Journal of Fungi*, *6*(4), 307. https://doi.org/10.3390/jof6040307

Arastehfar, A., Daneshnia, F., Hilmioğlu-Polat, S., Fang, W., Yaşar, M., Polat, F., Metin, D. Y., Rigole, P., Coenye, T., Ilkit, M., Pan, W., Liao, W., Hagen, F., Kostrzewa, M., Perlin, D. S., Lass-Flörl, C., & Boekhout, T. (2020). First Report of Candidemia Clonal Outbreak Caused by Emerging Fluconazole-Resistant Candida parapsilosis Isolates Harboring Y132F and/or Y132F+K143R in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(10). https://doi.org/10.1128/AAC.01001-20

Arastehfar, A., Daneshnia, F., Hilmioglu-Polat, S., Ilkit, M., Yasar, M., Polat, F., Metin, D. Y., Dokumcu, Ü. Z., Pan, W., Hagen, F., Boekhout, T., Perlin, D. S., & Lass-Flörl, C. (2021). Genetically related micafungin-resistant Candida parapsilosis blood isolates harbouring novel mutation R658G in hotspot 1 of Fks1p: a new challenge? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *76*(2), 418–422. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa419

Arastehfar, A., Daneshnia, F., Najafzadeh, M. J., Hagen, F., Mahmoudi, S., Salehi, M., Zarrinfar, H., Namvar, Z., Zareshahrabadi, Z., Khodavaisy, S., Zomorodian, K., Pan, W., Theelen, B., Kostrzewa, M., Boekhout, T., & Lass-Flörl, C. (2020). Evaluation of Molecular Epidemiology, Clinical Characteristics, Antifungal Susceptibility Profiles, and Molecular Mechanisms of Antifungal Resistance of Iranian Candida parapsilosis Species Complex Blood Isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00206

Arastehfar, A., Hilmioğlu-Polat, S., Daneshnia, F., Hafez, A., Salehi, M., Polat, F., Yaşar, M., Arslan, N., Hoşbul, T., Ünal, N., Metin, D. Y., Gürcan, Ş., Birinci, A., Koç, A. N., Pan, W., Ilkit, M., Perlin, D. S., & Lass-Flörl, C. (2020). Recent Increase in the Prevalence of Fluconazole-Non-susceptible Candida tropicalis Blood Isolates in Turkey: Clinical Implication of Azole-Non-susceptible and Fluconazole Tolerant Phenotypes and Genotyping. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.587278

Arastehfar, A., Hilmioğlu-Polat, S., Daneshnia, F., Pan, W., Hafez, A., Fang, W., Liao, W., Şahbudak-Bal, Z., Metin, D. Y., Júnior, J. N. de A., Ilkit, M., Perlin, D. S., & Lass-Flörl, C. (2021). Clonal Candidemia Outbreak by Candida parapsilosis Carrying Y132F in Turkey: Evolution of a Persisting Challenge. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.676177

Asadzadeh, M., Ahmad, S., Al-Sweih, N., & Khan, Z. (2017). Epidemiology and Molecular Basis of Resistance to Fluconazole Among Clinical Candida parapsilosis Isolates in Kuwait. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, *23*(8), 966–972. https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0336

Asadzadeh, M., Dashti, M., Ahmad, S., Alfouzan, W., & Alameer, A. (2021). Whole-Genome and Targeted-Amplicon Sequencing of Fluconazole-Susceptible and -Resistant Candida parapsilosis Isolates from Kuwait Reveals a Previously Undescribed N1132D Polymorphism in CDR1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(2). https://doi.org/10.1128/AAC.01633-20

Astvad, K. M. T., Johansen, H. K., Røder, B. L., Rosenvinge, F. S., Knudsen, J. D., Lemming, L., Schønheyder, H. C., Hare, R. K., Kristensen, L., Nielsen, L., Gertsen, J. B., Dzajic, E., Pedersen, M., Østergård, C., Olesen, B., Søndergaard, T. S., & Arendrup, M. C. (2018). Update from a 12-Year Nationwide Fungemia Surveillance: Increasing Intrinsic and Acquired Resistance Causes Concern. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(4). https://doi.org/10.1128/JCM.01564-17

Ben-Ami, R., Garcia-Effron, G., Lewis, R. E., Gamarra, S., Leventakos, K., Perlin, D. S., & Kontoyiannis, D. P. (2011). Fitness and virulence costs of Candida albicans FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(4), 626–635. https://doi.org/10.1093/infdis/jir351

Berkow, E. L., Manigaba, K., Parker, J. E., Barker, K. S., Kelly, S. L., & Rogers, P. D. (2015). Multidrug Transporters and Alterations in Sterol Biosynthesis Contribute to Azole Antifungal Resistance in Candida parapsilosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(10), 5942–5950. https://doi.org/10.1128/AAC.01358-15

Bordallo-Cardona, M. Á., Agnelli, C., Gómez-Nuñez, A., Sánchez-Carrillo, C., Bouza, E., Muñoz, P., Escribano, P., & Guinea, J. (2019). MSH2 Gene Point Mutations Are Not Antifungal Resistance Markers in Candida glabrata. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(1). https://doi.org/10.1128/AAC.01876-18

Branco, J., Ola, M., Silva, R. M., Fonseca, E., Gomes, N. C., Martins-Cruz, C., Silva, A. P., Silva-Dias, A., Pina-Vaz, C., Erraught, C., Brennan, L., Rodrigues, A. G., Butler, G., & Miranda, I. M. (2017). Impact of ERG3 mutations and expression of ergosterol genes controlled by UPC2 and NDT80 in Candida parapsilosis azole resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(8), 575.e1-575.e8. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.02.002

Branco, J., Silva, A. P., Silva, R. M., Silva-Dias, A., Pina-Vaz, C., Butler, G., Rodrigues, A. G., & Miranda, I. M. (2015). Fluconazole and Voriconazole Resistance in Candida parapsilosis Is Conferred by Gain-of-Function Mutations in MRR1 Transcription Factor Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(10), 6629–6633. https://doi.org/10.1128/AAC.00842-15

Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A. S., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., Agrafioti, I., Arnaud, M. B., Bates, S., Brown, A. J. P., Brunke, S., Costanzo, M. C., Fitzpatrick, D. A., de Groot, P. W. J., Harris, D., … Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes. *Nature*, *459*(7247), 657–662. https://doi.org/10.1038/nature08064

Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V, Keniya, M. V, Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., & Monk, B. C. (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(2), 291–321. https://doi.org/10.1128/CMR.00051-08

Cappelletty, D., & Eiselstein-McKitrick, K. (2007). The Echinocandins. *Pharmacotherapy*,

27(3), 369–388. https://doi.org/10.1592/PHCO.27.3.369

Castanheira, M., Deshpande, L. M., Messer, S. A., Rhomberg, P. R., & Pfaller, M. A. (2020). Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant Candida parapsilosis and Candida tropicalis and country-specific isolate dissemination. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *55*(1). https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.003

Choi, Y. J., Kim, Y.-J., Yong, D., Byun, J.-H., Kim, T. S., Chang, Y. S., Choi, M. J., Byeon, S. A., Won, E. J., Kim, S. H., Shin, M. G., & Shin, J. H. (2018). Fluconazole-Resistant Candida parapsilosis Bloodstream Isolates with Y132F Mutation in ERG11 Gene, South Korea. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(9), 1768–1770. https://doi.org/10.3201/eid2409.180625

Clinical and Laboratory Stantards Institute. (2017). *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts This document includes updated minimal inhibitory concentration, zone diameter, and quality control tables for the Clinical and Laboratory Standards Institute antifungal susceptibility*. www.clsi.org.

Clinical and Laboratory Stantards Institute. (2018). *Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application*. www.clsi.org.

Cornely, O. A., Bassetti, M., Calandra, T., Garbino, J., Kullberg, B. J., Lortholary, O., Meersseman, W., Akova, M., Arendrup, M. C., Arikan-Akdagli, S., Bille, J., Castagnola, E., Cuenca-Estrella, M., Donnelly, J. P., Groll, A. H., Herbrecht, R., Hope, W. W., Jensen, H. E., Lass-Flörl, C., … ESCMID Fungal Infection Study Group. (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clinical Microbiology and Infection*, *18 Suppl 7*, 19–37. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12039

Corzo-Leon, D. E., Peacock, M., Rodriguez-Zulueta, P., Salazar-Tamayo, G. J., & MacCallum, D. M. (2021). General hospital outbreak of invasive candidiasis due to azole-resistant Candida parapsilosis associated with an Erg11 Y132F mutation. *Medical Mycology*, *59*(7), 664–671. https://doi.org/10.1093/mmy/myaa098

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. *Eukaryotic Cell*, *3*(6), 1639–1652. https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1639-1652.2004

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*(4), 2139–2156. https://doi.org/10.1534/genetics.105.054767

Dellière, S., Healey, K., Gits-Muselli, M., Carrara, B., Barbaro, A., Guigue, N., Lecefel, C., Touratier, S., Desnos-Ollivier, M., Perlin, D. S., Bretagne, S., & Alanio, A. (2016). Fluconazole and Echinocandin Resistance of Candida glabrata Correlates Better with Antifungal Drug Exposure Rather than with MSH2 Mutator Genotype in a French Cohort of Patients Harboring Low Rates of Resistance. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02038

Demirci-Duarte, S., Arikan-Akdagli, S., & Gülmez, D. (2021). Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive Candida parapsilosis complex isolates: Increase in fluconazole resistance in 21 years. *Mycoses*, *64*(8), 823–830. https://doi.org/10.1111/myc.13296

Desnos-Ollivier, M., Lortholary, O., Bretagne, S., & Dromer, F. (2021). Azole Susceptibility Profiles of More than 9,000 Clinical Yeast Isolates Belonging to 40 Common and Rare Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(6). https://doi.org/10.1128/AAC.02615-20

DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, *41*(7), 4336–4343. https://doi.org/10.1093/nar/gkt135

Ding, C., & Butler, G. (2007). Development of a gene knockout system in Candida parapsilosis reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation. *Eukaryotic Cell*, *6*(8), 1310–1319. https://doi.org/10.1128/EC.00136-07

Fan, X., Xiao, M., Zhang, D., Huang, J.-J., Wang, H., Hou, X., Zhang, L., Kong, F., Chen, S. C.-A., Tong, Z.-H., & Xu, Y.-C. (2019). Molecular mechanisms of azole resistance in Candida tropicalis isolates causing invasive candidiasis in China. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(7), 885–891. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2018.11.007

Fekkar, A., Blaize, M., Bouglé, A., Normand, A. C., Raoelina, A., Kornblum, D., Kamus, L., Piarroux, R., & Imbert, S. (2021). Hospital outbreak of fluconazole-resistant candida parapsilosis: Arguments for clonal transmission and long-term persistence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(5). https://doi.org/10.1128/AAC.02036-20

Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., & Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, *360*(6390), 739–742. https://doi.org/10.1126/science.aap7999

Flowers, S. A., Barker, K. S., Berkow, E. L., Toner, G., Chadwick, S. G., Gygax, S. E., Morschhäuser, J., & Rogers, P. D. (2012). Gain-of-Function Mutations in UPC2 Are a Frequent Cause of ERG11 Upregulation in Azole-Resistant Clinical Isolates of Candida albicans. *Eukaryotic Cell*, *11*(10), 1289–1299. https://doi.org/10.1128/EC.00215-12

Flowers, S. A., Colón, B., Whaley, S. G., Schuler, M. A., & Rogers, P. D. (2015). Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in Candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(1), 450–460. https://doi.org/10.1128/AAC.03470-14

Fonzi, W. A., & Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in Candida albicans. *Genetics*, *134*(3), 717–728. https://doi.org/10.1093/genetics/134.3.717

Garcia-Effron, G., Canton, E., Peman, J., Dilger, A., Roma, E., & Perlin, D. S. (2012). Epidemiology and echinocandin susceptibility of Candida parapsilosis sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(11), 2739–2748. https://doi.org/10.1093/jac/dks271

Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D., & Perlin, D. S. (2008). A Naturally Occurring Proline-to-Alanine Amino Acid Change in Fks1p in Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis Accounts for Reduced Echinocandin Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(7), 2305–2312. https://doi.org/10.1128/AAC.00262-08

Gómez-Molero, E., Willis, J. R., Dudakova, A., Carreté, L., Weig, M., Groß, U., Gácser, A., Gabaldón, T., & Bader, O. (2020). Phenotypic Variability in a Coinfection With Three Independent Candida parapsilosis Lineages. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01994

Gonçalves, S. S., Souza, A. C. R., Chowdhary, A., Meis, J. F., & Colombo, A. L. (2016). Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in Candida and Aspergillus. *Mycoses*, *59*(4), 198–219. https://doi.org/10.1111/myc.12469

Grahl, N., Demers, E. G., Crocker, A. W., & Hogan, D. A. (2017). Use of RNA-Protein Complexes for Genome Editing in Non-albicans Candida Species. *MSphere*, *2*(3). https://doi.org/10.1128/mSphere.00218-17

Grossman, N. T., Pham, C. D., Cleveland, A. A., & Lockhart, S. R. (2015). Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in Candida parapsilosis Isolates from a U.S. Surveillance System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(2), 1030–1037. https://doi.org/10.1128/AAC.04613-14

Hargrove, T. Y., Friggeri, L., Wawrzak, Z., Qi, A., Hoekstra, W. J., Schotzinger, R. J., York, J. D., Guengerich, F. P., & Lepesheva, G. I. (2017). Structural analyses of Candida albicans sterol 14α-demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(16), 6728–6743. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778308

Healey, K. R., Kordalewska, M., Jiménez Ortigosa, C., Singh, A., Berrío, I., Chowdhary, A., & Perlin, D. S. (2018). Limited ERG11 Mutations Identified in Isolates of Candida auris Directly Contribute to Reduced Azole Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(10). https://doi.org/10.1128/AAC.01427-18

Healey, K. R., & Perlin, D. S. (2018). Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in Candida glabrata. *Journal of Fungi*, *4*(3). https://doi.org/10.3390/jof4030105

Healey, K. R., Zhao, Y., Perez, W. B., Lockhart, S. R., Sobel, J. D., Farmakiotis, D., Kontoyiannis, D. P., Sanglard, D., Taj-Aldeen, S. J., Alexander, B. D., Jimenez-Ortigosa, C., Shor, E., & Perlin, D. S. (2016). Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen Candida glabrata promotes multi-drug resistance. *Nature Communications*, *7*, 11128. https://doi.org/10.1038/ncomms11128

Hesstvedt, L., Gaustad, P., Andersen, C. T., Haarr, E., Hannula, R., Haukland, H. H., Hermansen, N.-O., Larssen, K. W., Mylvaganam, H., Ranheim, T. E., Sandven, P., Nordøy, I., Norwegian Yeast Study Group, Kanestrøm, A., Grub, C., Onken, A., Thielsen, C., Skaare, D., Tofteland, S., … Åsheim, S. (2015). Twenty-two years of candidaemia surveillance: results from a Norwegian national study. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*(10), 938–945. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.008

Holland, L. M., Schröder, M. S., Turner, S. A., Taff, H., Andes, D., Grózer, Z., Gácser, A., Ames, L., Haynes, K., Higgins, D. G., & Butler, G. (2014). Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens Candida parapsilosis and Candida albicans. *PLoS Pathogens*, *10*(9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004365

Hou, X., Xiao, M., Wang, H., Yu, S.-Y., Zhang, G., Zhao, Y., & Xu, Y.-C. (2018). Profiling of PDR1 and MSH2 in Candida glabrata Bloodstream Isolates from a Multicenter Study in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(6).

https://doi.org/10.1128/AAC.00153-18

Jiang, C., Dong, D., Yu, B., Cai, G., Wang, X., Ji, Y., & Peng, Y. (2013). Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of Candida tropicalis in China. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(4), 778–785. https://doi.org/10.1093/jac/dks481

Jin, L., Cao, Z., Wang, Q., Wang, Y., Wang, X., Chen, H., & Wang, H. (2018). MDR1 overexpression combined with ERG11 mutations induce high-level fluconazole resistance in Candida tropicalis clinical isolates. *BMC Infectious Diseases*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s12879-018-3082-0

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, *337*(6096), 816–821. https://doi.org/10.1126/science.1225829

Kannan, A., Asner, S. A., Trachsel, E., Kelly, S., Parker, J., & Sanglard, D. (2019). Comparative Genomics for the Elucidation of Multidrug Resistance in Candida lusitaniae. *MBio*, *10*(6). https://doi.org/10.1128/mBio.02512-19

Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., & Einsele, H. (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in Candida albicans from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Letters*, *400*(1), 80–82. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01360-9

Khan, Z., Ahmad, S., Al-Sweih, N., Mokaddas, E., Al-Banwan, K., Alfouzan, W., Al-Obaid, I., Al-Obaid, K., Asadzadeh, M., Jeragh, A., Joseph, L., Varghese, S., Vayalil, S., & Al-Musallam, O. (2019). Changing trends in epidemiology and antifungal susceptibility patterns of six bloodstream Candida species isolates over a 12-year period in Kuwait. *PloS One*, *14*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216250

Li, J., Coste, A. T., Liechti, M., Bachmann, D., Sanglard, D., & Lamoth, F. (2021). Novel ERG11 and TAC1b mutations associated with azole resistance in Candida auris. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(5). https://doi.org/10.1128/AAC.02663-20

Liang, S.-H., & Bennett, R. J. (2019). The Impact of Gene Dosage and Heterozygosity on The Diploid Pathobiont Candida albicans. *Journal of Fungi*, *6*(1). https://doi.org/10.3390/jof6010010

Liu, J.-Y., Wei, B., Wang, Y., Shi, C., Li, W.-J., Zhao, Y., Meng, L.-N., & Xiang, M.-J. (2020). The H741D mutation in Tac1p contributes to the upregulation of CDR1 and CDR2 expression in Candida albicans. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(4), 1553–1561. https://doi.org/10.1007/s42770-020-00336-8

Lockhart, S. R., Iqbal, N., Cleveland, A. A., Farley, M. M., Harrison, L. H., Bolden, C. B., Baughman, W., Stein, B., Hollick, R., Park, B. J., & Chiller, T. (2012). Species identification and antifungal susceptibility testing of Candida bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(11), 3435–3442. https://doi.org/10.1128/JCM.01283-12

Lombardi, L., Oliveira-Pacheco, J., & Butler, G. (2019). Plasmid-Based CRISPR-Cas9 Gene Editing in Multiple Candida Species. *MSphere*, *4*(2). https://doi.org/10.1128/mSphere.00125-19

Lombardi, L., Turner, S. A., Zhao, F., & Butler, G. (2017). Gene editing in clinical isolates of

Candida parapsilosis using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-08500-1

Luna-Tapia, A., Butts, A., & Palmer, G. E. (2019). Loss of C-5 Sterol Desaturase Activity in Candida albicans: Azole Resistance or Merely Trailing Growth? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(1). https://doi.org/10.1128/AAC.01337-18

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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(5), 1745–1752. https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1745-1752.2005

Magobo, R. E., Lockhart, S. R., Govender, N. P., Wadula, J., Rensburg, V., van Rensburg, C. J., Whitelaw, A., Zietsman, I., Miller, N., Smith, P., van Greune, J., Brink, A., Hoosen, A., Perovic, O., Nchabaleng, M., Orth, H., Coovadia, Y., Badenhorst, L., Moolman, J., … Patel, J. (2020). Fluconazole-resistant Candida parapsilosis strains with a Y132F substitution in the ERG11 gene causing invasive infections in a neonatal unit, South Africa. *Mycoses*, *63*(5), 471–477. https://doi.org/10.1111/myc.13070

Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S., Bellens, D., Verhasselt, P., Luyten, W., Borgers, M., Ramaekers, F. C. S., Odds, F. C., & Vanden Bossche, H. (1999). Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in Candida albicans. *Microbiology*, *145*(10), 2701–2713. https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2701

Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., Warrilow, A. G. S., Rolley, N., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2010). Identification and characterization of four azole-resistant erg3 mutants of Candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(11), 4527–4533. https://doi.org/10.1128/AAC.00348-10

Martí-Carrizosa, M., Sánchez-Reus, F., March, F., Cantón, E., & Coll, P. (2015). Implication of Candida parapsilosis FKS1 and FKS2 mutations in reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(6), 3570–3573. https://doi.org/10.1128/AAC.04922-14

Martini, C., Torelli, R., de Groot, T., De Carolis, E., Morandotti, G. A., De Angelis, G., Posteraro, B., Meis, J. F., & Sanguinetti, M. (2020). Prevalence and Clonal Distribution of Azole-Resistant Candida parapsilosis Isolates Causing Bloodstream Infections in a Large Italian Hospital. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00232

Mayr, E.-M., Ramírez-Zavala, B., Krüger, I., & Morschhäuser, J. (2020). A Zinc Cluster Transcription Factor Contributes to the Intrinsic Fluconazole Resistance of Candida auris. *MSphere*, *5*(2). https://doi.org/10.1128/mSphere.00279-20

Min, K., Ichikawa, Y., Woolford, C. A., & Mitchell, A. P. (2016). Candida albicans Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. *MSphere*, *1*(3). https://doi.org/10.1128/mSphere.00130-16

Mohr, A., Simon, M., Joha, T., Hanses, F., Salzberger, B., & Hitzenbichler, F. (2020). Epidemiology of candidemia and impact of infectious disease consultation on survival and care. *Infection*, *48*(2), 275–284. https://doi.org/10.1007/s15010-020-01393-9

Mojica, F. J. M., & Rodriguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS Journal*, *283*(17), 3162–3169. https://doi.org/10.1111/febs.13766

Morio, F., Jensen, R. H., Le Pape, P., & Arendrup, M. C. (2017). Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *50*(5), 599–606. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.012

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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *66*(4), 373–384. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006

Morio, F., Lombardi, L., Binder, U., Loge, C., Robert, E., Graessle, D., Bodin, M., Lass-Flörl, C., Butler, G., & Le Pape, P. (2019). Precise genome editing using a CRISPR-Cas9 method highlights the role of CoERG11 amino acid substitutions in azole resistance in Candida orthopsilosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(8), 2230–2238. https://doi.org/10.1093/jac/dkz204

Morio, F., Lombardi, L., & Butler, G. (2020). The CRISPR toolbox in medical mycology: State of the art and perspectives. *PLoS Pathogens*, *16*(1). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008201

Morio, F., Pagniez, F., Besse, M., Gay-andrieu, F., Miegeville, M., & Le Pape, P. (2013). Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of Candida albicans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *42*(5), 410–415. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.07.013

Morio, F., Pagniez, F., Lacroix, C., Miegeville, M., & Le Pape, P. (2012). Identification and characterization of four azole-resistant erg3 mutants of Candida albicans. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(9), 2131–2138. https://doi.org/10.1128/AAC.00348-10

Morschhäuser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, *47*(2), 94–106. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.002

Morschhäuser, J., Barker, K. S., Liu, T. T., BlaB-Warmuth, 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 Pathogens*, *3*(11), e164. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030164

Ng, H., & Dean, N. (2017). Dramatic Improvement of CRISPR/Cas9 Editing in Candida albicans by Increased Single Guide RNA Expression. *MSphere*, *2*(2). https://doi.org/10.1128/mSphere.00385-16

Nguyen, N., Quail, M. M. F., & Hernday, A. D. (2017). An Efficient, Rapid, and Recyclable System for CRISPR-Mediated Genome Editing in Candida albicans. *MSphere*, *2*(2). https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00149-17

Noble, S. M., & Johnson, A. D. (2005). Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen Candida albicans. *Eukaryotic Cell*, *4*(2), 298–309. https://doi.org/10.1128/EC.4.2.298-309.2005

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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(1), 196–199. https://doi.org/10.1128/AAC.41.1.196

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

Papp, C., Bohner, F., Kocsis, K., Varga, M., Szekeres, A., Bodai, L., Willis, J. R., Gabaldón, T., Tóth, R., Nosanchuk, J. D., Vágvölgyi, C., & Gácser, A. (2020). Triazole Evolution of Candida parapsilosis Results in Cross-Resistance to Other Antifungal Drugs, Influences Stress Responses, and Alters Virulence in an Antifungal Drug-Dependent Manner. *MSphere*, *5*(5). https://doi.org/10.1128/mSphere.00821-20

Papp, C., Kocsis, K., Tóth, R., Bodai, L., Willis, J. R., Ksiezopolska, E., Lozoya-Pérez, N. E., Vágvölgyi, C., Mora Montes, H., Gabaldón, T., Nosanchuk, J. D., & Gácser, A. (2018). Echinocandin-Induced Microevolution of Candida parapsilosis Influences Virulence and Abiotic Stress Tolerance. *MSphere*, *3*(6). https://doi.org/10.1128/msphere.00547-18

Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, *62*(4). https://doi.org/10.1093/cid/civ933

Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., Olsen, K. M., Gregg, A., Noggle, S., & Tessier-Lavigne, M. (2016). Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, *533*(7601), 125–129. https://doi.org/10.1038/nature17664

Pfaller, M. A., Castanheira, M., Messer, S. A., Rhomberg, P. R., & Jones, R. N. (2014). Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against Candida spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *79*(2), 198–204. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.004

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2019). Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for Candida Species From 1997-2016. *Open Forum Infectious Diseases*, *6*, S79–S94. https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358

Pfaller, M. A., Moet, G. J., Messer, S. A., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2011). Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among Candida bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(1), 396–399. https://doi.org/10.1128/JCM.01398-10

Pinhati, H. M. S., Casulari, L. A., Souza, A. C. R., Siqueira, R. A., Damasceno, C. M. G., & Colombo, A. L. (2016). Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant Candida parapsilosis strains in an intensive care unit. *BMC Infectious Diseases*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12879-016-1767-9

Poláková, S., Blume, C., Zárate, J. A., Mentel, M., Jørck-Ramberg, D., Stenderup, J., & Piskur, J. (2009). Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast Candida glabrata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(8), 2688–2693. https://doi.org/10.1073/pnas.0809793106

Popp, C., Hampe, I. A. I., Hertlein, T., Ohlsen, K., Rogers, P. D., & Morschhäuser, J. (2017).

Competitive Fitness of Fluconazole-Resistant Clinical Candida albicans Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(7). https://doi.org/10.1128/AAC.00584-17

Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(7), 792–798. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028

Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., & Morschhäuser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in Candida albicans. *Gene*, *341*(1–2), 119–127. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.021

Rizzato, C., Poma, N., Zoppo, M., Posteraro, B., Mello, E., Bottai, D., Lupetti, A., Sanguinetti, M., & Tavanti, A. (2018). CoERG11 A395T mutation confers azole resistance in Candida orthopsilosis clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(7), 1815–1822. https://doi.org/10.1093/jac/dky122

Rybak, J. M., Dickens, C. M., Parker, J. E., Caudle, K. E., Manigaba, K., Whaley, S. G., Nishimoto, A. T., Luna-Tapia, A., Roy, S., Zhang, Q., Barker, K. S., Palmer, G. E., Sutter, T. R., Homayouni, R., Wiederhold, N. P., Kelly, S. L., & Rogers, P. D. (2017). Loss of C-5 Sterol Desaturase Activity Results in Increased Resistance to Azole and Echinocandin Antifungals in a Clinical Isolate of Candida parapsilosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(9). https://doi.org/10.1128/AAC.00651-17

Samaranayake, D. P., & Hanes, S. D. (2011). Milestones in Candida albicans gene manipulation. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(9), 858–865. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.04.003

Selmecki, A., Forche, A., & Berman, J. (2006). Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant Candida albicans. *Science*, *313*(5785), 367–370. https://doi.org/10.1126/science.1128242

Selmecki, A., Forche, A., & Berman, J. (2010). Genomic plasticity of the human fungal pathogen Candida albicans. *Eukaryotic Cell*, *9*(7), 991–1008. https://doi.org/10.1128/EC.00060-10

Silva, A. P., Miranda, I. M., Guida, A., Synnott, J., Rocha, R., Silva, R., Amorim, A., Pina-Vaz, C., Butler, G., & Rodrigues, A. G. (2011). Transcriptional Profiling of Azole-Resistant Candida parapsilosis Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(7), 3546–3556. https://doi.org/10.1128/AAC.01127-10

Singh, A., Healey, K. R., Yadav, P., Upadhyaya, G., Sachdeva, N., Sarma, S., Kumar, A., Tarai, B., Perlin, D. S., & Chowdhary, A. (2018). Absence of Azole or Echinocandin Resistance in Candida glabrata Isolates in India despite Background Prevalence of Strains with Defects in the DNA Mismatch Repair Pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(6). https://doi.org/10.1128/AAC.00195-18

Singh, A., Singh, P. K., de Groot, T., Kumar, A., Mathur, P., Tarai, B., Sachdeva, N., Upadhyaya, G., Sarma, S., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2019). Emergence of clonal fluconazole-resistant Candida parapsilosis clinical isolates in a multicentre laboratory-based surveillance study in India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(5), 1260–1268. https://doi.org/10.1093/jac/dkz029

Sitterlé, E., Coste, A. T., Obadia, T., Maufrais, C., Chauvel, M., Sertour, N., Sanglard, D., Puel, A., D'Enfert, C., & Bougnoux, M.-E. (2020). Large-scale genome mining allows identification of neutral polymorphisms and novel resistance mutations in genes involved

in Candida albicans resistance to azoles and echinocandins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(4), 835–848. https://doi.org/10.1093/jac/dkz537

Souza, A. C. R., Fuchs, B. B., Pinhati, H. M. S., Siqueira, R. A., Hagen, F., Meis, J. F., Mylonakis, E., & Colombo, A. L. (2015). Candida parapsilosis Resistance to Fluconazole: Molecular Mechanisms and In Vivo Impact in Infected Galleria mellonella Larvae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(10), 6581–6587. https://doi.org/10.1128/AAC.01177-15

Staab, J. F., & Sundstrom, P. (2003). URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of Candida albicans genes. *Trends in Microbiology*, *11*(2), 69–73. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00029-X

Tadec, L., Talarmin, J.-P., Gastinne, T., Bretonnière, C., Miegeville, M., Le Pape, P., & Morio, F. (2016). Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses*, *59*(5), 296–303. https://doi.org/10.1111/myc.12470

Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A. R., Maiden, M. C. J., & Odds, F. C. (2005). Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. To Replace Candida parapsilosis Groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(1), 284–292. https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005

Thomaz, D. Y., de Almeida, J. N., Lima, G. M. E., Nunes, M. de O., Camargo, C. H., Grenfell, R. de C., Benard, G., & Del Negro, G. M. B. (2018). An Azole-Resistant Candida parapsilosis Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02997

Thomaz, D. Y., de Almeida, J. N., Sejas, O. N. E., Del Negro, G. M. B., Carvalho, G. O. M. H., Gimenes, V. M. F., de Souza, M. E. B., Arastehfar, A., Camargo, C. H., Motta, A. L., Rossi, F., Perlin, D. S., Freire, M. P., Abdala, E., & Benard, G. (2021). Environmental Clonal Spread of Azole-Resistant Candida parapsilosis with Erg11-Y132F Mutation Causing a Large Candidemia Outbreak in a Brazilian Cancer Referral Center. *Journal of Fungi*, *7*(4). https://doi.org/10.3390/jof7040259

Thomaz, D. Y., Melhem, M. de S. C., de Almeida Júnior, J. N., Benard, G., & Del Negro, G. M. B. (2020). Lack of efficacy of echinocandins against high metabolic activity biofilms of Candida parapsilosis clinical isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(3), 1129–1133. https://doi.org/10.1007/s42770-019-00219-7

Tollemar, J., Klingspor, L., & Ringdén, O. (2001). Liposomal amphotericin B (AmBisome) for fungal infections in immunocompromised adults and children. *Clinical Microbiology and Infection*, *7 Suppl 2*, 68–79. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2001.tb00012.x

Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., Bliss, J. M., Nosanchuk, J. D., Turner, S. A., Butler, G., Vágvölgyi, C., & Gácser, A. (2019). Candida parapsilosis : from Genes to the Bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(2). https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18

Ugozzoli, L., & Wallace, R. (1991). Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*, *2*(1), 42–48. https://doi.org/10.1016/S1046-2023(05)80124-0

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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(4), 1960–1968. https://doi.org/10.1128/AAC.05720-11

Vermes, A., Guchelaar, H. J., & Dankert, J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *46*(2), 171–179. https://doi.org/10.1093/jac/46.2.171

Verwaal, R., Buiting-Wiessenhaan, N., Dalhuijsen, S., & Roubos, J. A. (2018). CRISPR/Cpf1 enables fast and simple genome editing of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, *35*(2), 201–211. https://doi.org/10.1002/yea.3278

Vyas, V. K., Barrasa, M. I., & Fink, G. R. (2015). A Candida albicans CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Science Advances*, *1*(3). https://doi.org/10.1126/sciadv.1500248

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 14alpha-sterol demethylases from Aspergillus fumigatus and Candida albicans provide insights into posaconazole binding. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(2), 568–574. https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.568-574.2004

Xisto, M. I. D. S., Caramalho, R. D. F., Rocha, D. A. S., Ferreira-Pereira, A., Sartori, B., Barreto-Bergter, E., Junqueira, M. L., Lass-Flörl, C., & Lackner, M. (2017). Pan-azole-resistant Candida tropicalis carrying homozygous erg11 mutations at position K143R: a new emerging superbug? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(4), 988–992. https://doi.org/10.1093/jac/dkw558

Xu, Q.-R., Yan, L., Lv, Q.-Z., Zhou, M., Sui, X., Cao, Y.-B., & Jiang, Y.-Y. (2014). Molecular genetic techniques for gene manipulation in Candida albicans. *Virulence*, *5*(4), 507–520. https://doi.org/10.4161/viru.28893

Zhang, L., Xiao, M., Watts, M. R., Wang, H., Fan, X., Kong, F., & Xu, Y.-C. (2015). Development of fluconazole resistance in a series of Candida parapsilosis isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. *BMC Infectious Diseases*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s12879-015-1086-6

Annexes

Annexe 1. Substitutions décrites sur les gènes *ERG11*, *UPC2*, *TAC1*, *MRR1*, *ERG3* et *FKS1* chez *C. parapsilosis* dans la littérature internationale

Substitution d'acide aminé	Publications	Profil de sensibilité des isolats au Fluconazole	Notes
Gène *ERG11*			
C-111T	Asadzadeh *et al.*, 2017 Grossman *et al.*, 2015	S et R	En association avec Y132F et R398I (*ERG11*) pour les isolats résistants et seulement R398I pour les isolats sensibles. Située en dehors du gène
G89V	Arastehfar, Daneshnia, Najafzadeh, *et al.*, 2020	S	
L109F	Arastehfar, Daneshnia, Najafzadeh, *et al.*, 2020	S	
K128N	Choi *et al.*, 2018	R	Décrite en combinaison avec W872C (*MRR1*). Correspond à K128T chez *C. albicans* (Morio *et al.*, 2010)
Y132F	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020 Arastehfar, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2021 Asadzadeh *et al.*, 2017 Asadzadeh *et al.*, 2020, Berkow *et al.* 2015 Castanheira *et al.*, 2020, Choi *et al.*, 2018 Corzo-Leon *et al.*, 2021, Demirci-Duarte *et al.*, 2021 Fekkar *et al.*, 2021, Grossman *et al.*, 2015 Magobo *et al.*, 2020, Martini *et al.*, 2020 Singh *et al.*, 2019, Souza *et al.*, 2015 Thomaz *et al.*, 2018, Thomaz *et al.*, 2021	Principalement R	Prouvée (Singh *et al.*, 2019)/ Décrite en combinaison notamment avec K143R, G307A, R398I, D421N et G458S (*ERG11*), K177N et R405K (*MRR1*), L38I et A793S (*UPC2*) / Correspond à Y132F et Y132H chez *C. albicans* (Morio *et al.*, 2010)
K143R	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020 Castanheira *et al.*, 2020, Martini *et al.*, 2020 Singh *et al.*, 2019	R et SDD	Prouvée (Singh *et al.*, 2019)/ En combinaison avec Y132F et R398I (*ERG11*), L38I et A793S (*UPC2*). Correspond à K143R Chez *C. albicans* (Morio *et al.* 2010)
M178T	Asadzadeh *et al.*, 2017 Grossman *et al.*, 2015	S et R	
S216L	Berkow *et al.*, 2015	S	
D247G	Arastehfar, Daneshnia, Najafzadeh, *et al.*, 2020	S	
Q250K	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	En combinaison avec G458S et R398I (*ERG11*), P295L et Q1074* (*MRR1*), L390I (*TAC1*)
N283Y	Grossman *et al.*, 2015	SDD	Mutation hétérozygote. Correspond à H283D (sensibilité diminuée au fluconazole) et H283R chez *C. albicans* (Morio et. al., 2010)
G307A	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020 Arastehfar, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2021	R	Retrouvée uniquement chez des isolats résistants. En combinaison notamment avec Y132F (*ERG11*)

			Correspond G307S chez *C. albicans* (Morio *et al.* 2010)
R398I	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020 Arastehfar, Daneshnia, Najafzadeh, *et al.,* 2020 Arastehfar, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2021 Asadzadeh *et al.,* 2017, Berkow *et al.,* 2015 Castanheira *et al.,* 2020 Choi *et al.,* 2018, Grossman *et al.,* 2015 Magobo *et al.,* 2020, Martini *et al.,* 2020 Singh *et al.,* 2019, Thomaz *et al.,* 2018 Thomaz *et al.,* 2021	S SDD R	Probablement non impliquée dans la résistance. En combinaison notamment avec Y132F et K143R (*ERG11*), L877P (*TAC1*). Correspond à K398N chez *C. albicans* (Morio *et al.,* 2010)
P406Q	Arastehfar, Daneshnia, Najafzadeh, *et al.,* 2020	S	
D421N	Demirci-Duarte *et al.,* 2021	R et SDD	En combinaison notamment avec Y132F et G458S (*ERG11*), R405K (*MRR1*)
G458S	Arastehfar, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2021 Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020 Demirci-Duarte *et al.,* 2021	R et SDD	Combinaison notamment avec Y132F et D421N (*ERG11*)
T519S	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	R	En combinaison avec G458S (*ERG11*) et A793S (*UPC2*)
Gène *UPC2*			
E7*	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	R	En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
L38I	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	S et R	En combinaison notamment avec Y132F et K143R (*ERG11*), A793S (*UPC2*)
P45H	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	R	En combinaison notamment avec Y132F (*ERG11*)
P201S	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	S	
G342S	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	R	
Q348P	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	S	
Q371H	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	R	En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
Q372H	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	R	En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
D394N	Choi *et al.,* 2018	S et R	
S577*	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	S	
A793S	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	S SDD R	En combinaison notamment avec Y132F et K143R (*ERG11*) L578M (*TAC1*) L38I (*UPC2*)
Gène *TAC1*			
N7I	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	S	
N7Y	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	S et R	
A21V	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	R	En combinaison avec Y132F et K143R (*ERG11*)
P150H	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	R	En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
F186I	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.,* 2020	S	
R208G	Choi *et al.,* 2018	S	

E312D	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	S	
A352V	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	S	
L390I	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	S et R	
G490R	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	S et R	
L574F	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	S	
L578M	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	S et R	En combinaison notamment avec Y132F (*ERG11*) A793S (*UPC2*)
N602Y	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	S	
D603V	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
G650E	Berkow *et al.*, 2015	R	Δ En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
S760R	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	
A761G	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	
P803L	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
L877P	Choi *et al.*, 2018	R et S	
N900D	Choi *et al.*, 2018	R	
Q965K	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	En combinaison avec Y132F et K143R (*ERG11*)
M966V	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	En combinaison avec Y132F et K143R (*ERG11*)
L978W	Berkow *et al.*, 2015	R	Δ Mutation hétérozygote En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
Gène *MRR1*			
-102_-101insT	Grossman *et al.*, 2015	R	Située en dehors du gène
G-53A	Grossman *et al.*, 2015	R et SDD	Située en dehors du gène
K177N	Choi *et al.*, 2018, Grossman *et al.*, 2015	S et R	Associée à Q1053* (*MRR1*) En combinaison avec Y132F (*ERG11*) pour isolats résistants
P250S	Choi *et al.*, 2018	R	Mutation hétérozygote
I283R	Berkow *et al.*, 2015	R	□
P295L	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	
P295R	Choi *et al.*, 2018	R	Mutation hétérozygote
P380H	Grossman *et al.*, 2015	S	Mutation hétérozygote
N394Y	Papp *et al.*, 2020	R	○
R405K	Demirci-Duarte *et al.*, 2021, Grossman *et al.*, 2015	S et R	En combinaison avec Y132F et D421N (*ERG11*)
L419F	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	
G472V	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	Combinaison de mutation avec Y132F et K143R (*ERG11*)
R478K	Grossman *et al.*, 2015	SDD	Mutation hétérozygote

R479K	Berkow *et al.*, 2015	R	□
G583R	Branco *et al.*, 2015, Choi *et al.*, 2018 Silva *et al.*, 2011, Magobo *et al.*, 2020	R	Prouvée (Branco *et al.*, 2015) □ Retrouvée à l'état homozygote et hétérozygote
K606E	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	S	
D615G	Grossman *et al.*, 2015	S et R	Mutation retrouvée à l'état homozygote et hétérozygote
A619V	Grossman *et al.*, 2015, Magobo *et al.*, 2020	R et SDD	Mutation hétérozygote
L779F	Grossman *et al.*, 2015	R	
A854V	Berkow *et al.*, 2015	R	□
A859T	Grossman *et al.*, 2015	R	Mutation hétérozygote
W872C	Choi *et al.*, 2018	R	Mutation hétérozygote. En combinaison avec K128N (*ERG11*)
K873N	Branco *et al.*, 2015, Silva *et al.*, 2011	R	Prouvée (Branco *et al.*, 2015) □
L926*	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	En combinaison avec Y132F et K143R (*ERG11*)
G927C	Demirci-Duarte *et al.*, 2021	R	
G927D	Choi *et al.*, 2018	R	Mutation hétérozygote
L986P	Zhang *et al.*, 2015	S et R	□ Mutation retrouvée à l'état homozygote (isolats résistants) et hétérozygote (isolats sensibles)
Q1027R	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	En combinaison avec Y132F (*ERG11*)
Q1053*	Choi *et al.*, 2018, Grossman *et al.*, 2015	S et R	Mutation hétérozygote. En combinaison avec Y132F (*ERG11*) pour les isolats résistants. Associée à K177N (*MRR1*)
Q1064P	Branco *et al.*, 2015	S	
Q1074*	Arastehfar, Daneshnia, Hilmioğlu-Polat, *et al.*, 2020	R	
S1081P	Choi *et al.*, 2018	R	
Gène *ERG3*			
D14Y	Papp *et al.*,2020	R	○
G111R	Rybak *et al.*, 2017	S à 24h et R à 48h	
R135I	Branco *et al.*, 2017	R	
Gène *FKS1* (cible des échinocandines)			
V595I	Martí-Carrizosa *et al.*, 2015	NA	CLSI (isolat sensible) YeastOne (I Caspofungine)
S656P	Papp *et al.*, 2018	S	○
R658G	Arastehfar, Daneshnia, *et al.*, 2021	R SDD	Résistants à la micafungine
L703F	Papp *et al.*, 2018	S	○
S745L	Martí-Carrizosa *et al.*, 2015	NA	Mutations retrouvées à l'état hétérozygote et homozygote Sensible aux échinocandines

M1328I	Martí-Carrizosa *et al.,* 2015	NA	Sensible aux échinocandines
W1370R	Papp *et al.,* 2018	S	○
F1386S	Martí-Carrizosa *et al.,* 2015	NA	Mutation hétérozygote. CLSI (isolat sensible) YeastOne (R Anidulafungine et I Micafungine)
A1422G	Martí-Carrizosa *et al.,* 2015	NA	Sensible aux échinocandines

○ Mutations observées *in vitro* par des approches d'évolution expérimentales
Δ Mutation entraînant un gain de fonction de *TAC1* → surexpression du transporteur CDR1
□ Mutation entraînant un gain de fonction de *MRR1* → surexpression du transporteur MDR1
S : sensible SDD : « Sensible Dose Dependant » I : Intermédiaire R : Résistant

Annexe 2 : Protocole utilisé dans notre projet

Short protocol for CRISPR gene editing in *Candida parapsilosis*

Part 1: CLONING OF THE GUIDE INTO pCP_tRNA

1. Digestion of the sgRNA expression vector (pCP-tRNA) with SapI

a. Digest 2 µg of DNA as follows:
- DNA 2 µg
- 10x CutSmart Buffer 5 µl
- SapI 1 µl
- H_2O to 50 µl

b. Incubate at 37°C for 1h
c. Heat-inactivate SapI (65°C, 20 min)
d. Measure with Nanodrop

2. Anneal sgRNA oligos

a. Add to a tube:

Sample
100µM CPXXXXXX-gTOP 0.5 µl
100µM CPXXXXXX-gBOT 0.5 µl
10x T4 Ligase Buffer 5 µl
H_2O 44 µl

b. Incubate
   i. 95°C for 5 min
   ii. Cool to 16°C

3. Ligate annealed oligos into the vector

a. Assemble :

Sample
10x T4 Ligase Buffer 1 µl
T4 Ligase 0.5 µl
Annealed oligo mix 0.5 µl
Digested vector 40 ng
H_2O to 10 µl

b. Incubate :
   i. 16°C for 30 min
   ii. 65°C for 10 min
   iii. Cool to 25°C

4. Transform chemically competent DH5α

a. 5 µl from the sample/control + 50 µl of cells
b. Keep on ice for 30 min
c. Heat shock 42°C for 30 sec
d. Keep on ice for 2 min
e. Add 700 µL of LB broth

f. Incubate at 37°C with shaking for 1 h
g. Select on LB+Amp plates (spread all of it). Incubate overnight at 37°C

5. Screen the clones by colony PCR

a. Set up the PCR

	Per tube (20µL)
DNA template	2µl
10 µM M13-FWD	0.8 µL
10 µm CPXXXXXX-gBOT	0.8 µL
2X GoTaq MasterMix	10 µL
dd H20	6.4 µL

PCR Program:
95°C 1 min
95°C 30 sec
55°C 30 sec } X30 cycles
72°C 30 sec
72°C 5 min

b. Run on a gel
c. Set up ON from 2 positive colonies in 5 ml LB+Amp. Incubate overnight (37°C, shaker)
d. Make cryostocks (500 µl from culture + 500 µl sterile 50% glycerol). Store at -80°C
e. Run the miniprep
f. Elute the plasmid in TE and determine the concentration on nanodrop. Store at -20°C

Part 2: GENERATION OF RT BY PRIMER EXTENSION

1. For each RT, set up the following PCR reaction.

	Per tube (100 µl)
RT-CPXXXXXX-TOP 100 uM	3 µl
RT-CPXXXXXX-BOT 100 µM	3 µL
GoTaq Master Mix	50 µl
ddH20	44 µL

PCR Program:
94°C 5 min
94°C 30 sec
42°C 45 sec } X35
72°C 30 sec
72°C 10 min

2. Run 4 ul on a gel. Store at -20°C

Part 3: TRANSFORMATION IN *C. PARAPSILOSIS*

IMPORTANT NOTE: from step 4 to step 12, always keep reagents/cells on ice

1. Grow 5ml overnight in YPD shaking at 30°C
2. Get OD600 and dilute to 0.2-0.3 in 30 mls YPD
3. Grow to an OD 600 nm of at least 1.0
4. Centrifuge for 5 min at 4°C (4000 rpm)
5. Discard supernatant
6. Re-suspend pellet in 3 ml of water (ice-cold)
7. Centrifuge again at 4°C (4000 rpm)
8. Re-suspend pellet in 1ml of ice-cold TELIOAC. Transfer to an Eppendorf tube.
9. Centrifuge in bench top centrifuge for 30 sec (full speed, can be done at room T°C)
10. Re-suspend pellet in 200 µl of TELIOAC.
11. Set up the transformation mix as follows in 1.5 mL tubes:
    - Salmon Sperm DNA (stock is 10 mg/ml) : 10 µl
    - Transforming DNA : Usually 1 to ≈ 70-80 µL
    - Cell suspension in TELIOAC : 100 µl

You will have a control (plasmid alone) and the sample (plasmid + RT).

	Components	amount
Control	pCP-tRNA-guide	5 µg
Sample	pCP-tRNA-guide-RT	5 µg 25 µL

12. Shake the tubes gently to combine the contents
13. Incubate at 30°C for 30 min (STATIC)
14. Add 700 µl freshly made PLATE (room temperature). Mix gently to homogenize.
15. Incubate at 30°C overnight (STATIC)
16. Heat shock at 44°C for 15 min
17. Centrifuge at 13000 rpm for 30 seconds
18. Discard supernatant
19. Wash the pellet in 1ml of fresh YPD
20. Re-suspend the pellet in 100 µl of YPD
21. Incubate at 30°C with shaking for 2-4 hours
22. Plate on selective media (YPD + 200 µg/ml NTC)
23. Incubate at 30°C for 2-3 days

TELIOAC (prepare under hood)	
0.5 ml	1 M LiOAc
0.5 ml	10x TE buffer
4 ml	Water
PLATE (prepare under hood)	
0.5 ml	1 M LiOAc
0.5 ml	10x TE buffer
4 ml	50% PEG 3350

Part 4: SCREENING AND SEQUENCING

1. Set up the PCR reaction

Screening PCR program (TAG PCR):

	Per tube (20 µL)
Template	2 µL
10 uM CP-TAG1-F	0.8 µL
10 uM CPXXXXXX-R	0.8 µL
2X MyTaq RedMix	10 µL
ddH2O	6.4 µL

95°C 3 min
95°C 15 sec
55°C 15 sec } X35
72°C 10 sec
72°C 2 min

2. Run on a gel
3. Pick 2 positive colonies/mutant and repeat the PCR with the primers for the sequencing of the fragment (CPXXXXXX-F and CPXXXXXX-R)

Sequencing PCR program:

	Per tube (50 µL)
Template	2 µL
10 µM CPXXXXXX-F	2 µL
10 µM CPXXXXXX-R	2 µL
2X GoTaq	25 µL
ddH2O	19 µL

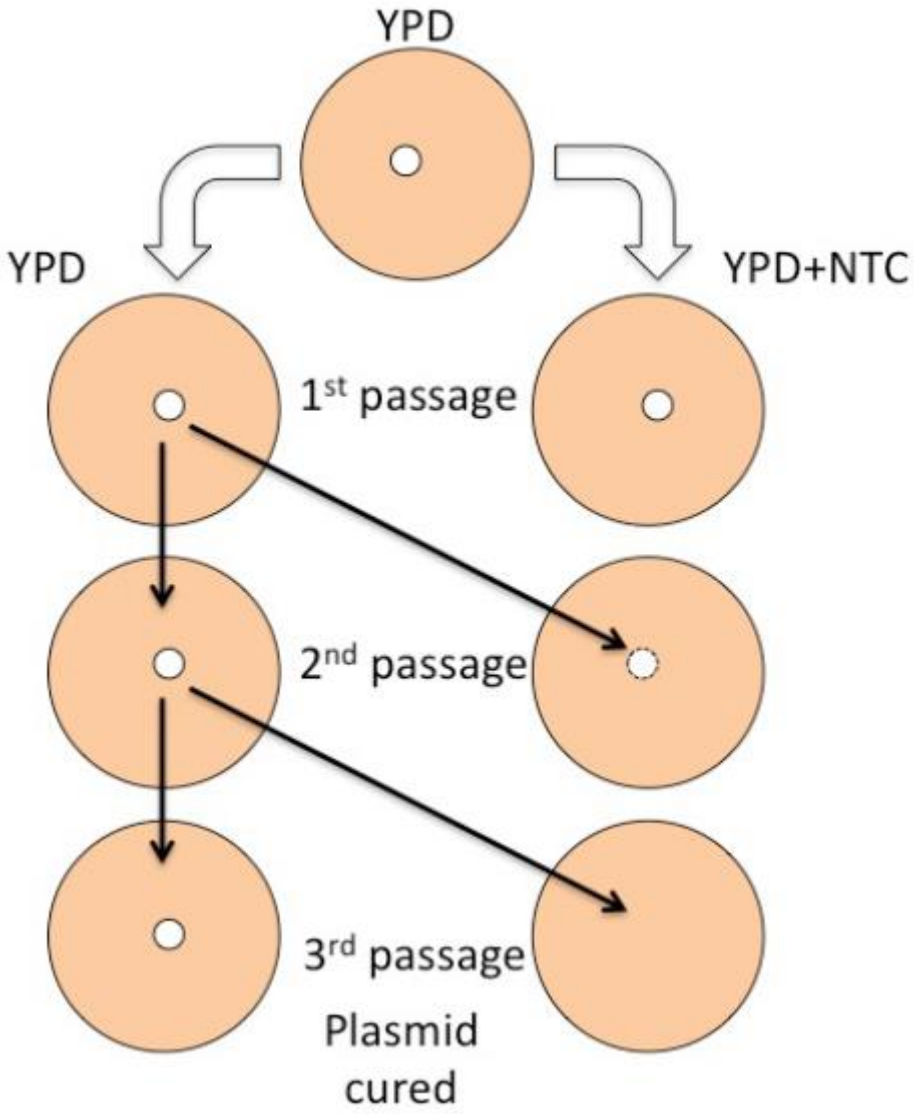
95°C 3 min
95°C 15 sec
55°C 15 sec } X35
72°C 10 sec
72°C 2 min

4. Analyse the sequencing results using Geneious Prime®

Part 5 : PLASMID CURING AND STOCK

1. “cure” the edited strain by sequential passages on YPD in absence of selection (and in parallel on YPD NTC) until the same colony cannot grow anymore on YPD + NTC

2. At that point, set up an ON culture in 5 ml YPD, and in the morning make a stock (**700 ul from the ON culture + 300 ul 50% glycerol**)


YPD
YPD
YPD+NTC
1st passage
2nd passage
3rd passage
Plasmid
cured

Annexe 3 : Oligonucléotides utilisés dans notre étude

Amorce	Séquence nucléotidique (5' →3')
Guide	
CP805940-gTOP	GCCCTTGATGAACATGTTGA
CP805940-gBOT	TCAACATGTTCATCAAGGGC
CP500160-gTOP	GTGGTCGATGAATCTAATGG
CP500160-gBOT	CCATTAGATTCATCGACCAC
CP303740-399-gTOP *	TTGTCCGAATGCAAGACTTA
CP303740-399-gBOT*	TAAGTCTTGCATTCGGACAA
CP303740-1174-gTOP	ACAAAGTATATTGTCCCTAG
CP303740-1174-gBOT	CTAGGGACAATATACTTTGT
CP303740/Y132F-399-gTOP	TTGTCCGAATGCGAGGCTTA
CP303740/Y132F-399-ot	TAAGCCTCGCATTCGGACAA
CP303510-1928-gTOP	AAACGGACAAAGTTGATGCC
CP303510-1928-gBOT	GGCATCAACTTTGTCCGTTT
CP303510-2927-gTOP	ACAACTTGGGTATATAGAAA
CP303510-2927-gBOT	TTTCTATATACCCAAGTTGT
CP807270-1713-gTOP	ATCAGCGTTGGTTGTTCAAA
CP807270-1713-gBOT	TTTGAACAACCAACGCTGAT
CP807270-2579-gTOP	CTGTGTCCAAATTGAGTTCG
CP807270-2579-gBOT	CGAACTCAATTTGGACACAG
CP105550-310-gTOP	CAAAACAAATCGGAGATTTA
CP105550-310-gBOT	TAAATCTCCGATTTGTTTTG
RT de 91 pb	
RT-CP805940-TOP	CAAGCAAATCAATGCCCTTGATGAACATGTTAGATAGATAGACATCTGCGAAATG
RT-CP805940-BOT	ATAGATTCATAATCAGTGAAGGATCCATCATGGCCGCATTTCGCAGATGTCTATCT
RT-CP500160-TOP	GACAATTACATGAAAAAGATGCGTCCACCATAGATAGATAGACATCTGCGAAATG
RT-CP500160-BOT	AATAATCCTTGTTGTGGTCGATGAATCTAATGGCCGCATTTCGCAGATGTCTATCT
RT de 60 pb	
RTCP303740-A395T-1TOP	GTGTTATTTTCGATTGTCCGAATGCGAGGCTTATGGAGCA
RTCP303740-A395T-1BOT	CGGTCTTTGCGAACTTCTTTTGCTCCATAAGCCTCGCATT
RTCP303740-A428G-1TOP	GTGTTATTTACGATTGTCCGAATGCGAGGCTTATGGAGCA
RT-CP303740-A428G-1-BOT	CGGTCTTTGCGAACTTCCTTTGCTCCATAAGCCTCGCATT
RTCP303740-G1193T-1-TOP	GGTTGTGCCAAACACAAAGTATATCGTACCTATAGGACAC
RTCP303740-G1193T-1-BOT	CCTGGTGACACCAATACGTGGTGTCCTATAGGTACGATAT
RT de 100 pb	
RTCP303740-A395T-2-TOP	TACCCCTGTTTTTGGAAAAGGTGTTATTTTCGATTGTCCGAATGCGAGGCTTATGGAGCA
RTCP303740-A395T-2-BOT	AAAAGAATCGGTAGTCAATGCGGTCTTTGCGAACTTCTTTTGCTCCATAAGCCTCGCATT
RTCP303740-A428G-2-TOP	TACCCCTGTTTTTGGAAAAGGTGTTATTTACGATTGTCCGAATGCGAGGCTTATGGAGCA
RTCP303740-A428G-2-BOT	AAAAGAATCGGTAGTCAATGCGGTCTTTGCGAACTTCCTTTGCTCCATAAGCCTCGCATT
RTCP303740-G1193T-2-TOP	AGAAAAGTTGTTTCTCCCTTGGTTGTGCCAAACACAAAGTATATCGTACCTATAGGACAC
RTCP303740-G1193T-2-BOT	TTTCGTTTGTATGAGCATAACCTGGTGACACCAATACGTGGTGTCCTATAGGTACGATAT
RTCP303740/Y132F-2-edTOP	TACCCCTGTTTTTGGAAAAGGTGTTATTTACGATTGTCCGAACGCAAGACTTATGGAGCA
RTCP303740/Y132F-2-edBOT	AAAAGAATCGGTAGTCAATGCGGTCTTTGCGAACTTCTTTTGCTCCATAAGTCTTGCGTT
RTCP303510-G1949A-2-edTOP	TGATGGTAATCAATCGATTTCCATTTGTTGTGCAAACGGACAAAGTGGACGCCGAGAGCC
RTCP303510-G1949A-2-edBOT	CGAGCTGCATCCAACGATGTATTACGAAACTTTAAAATCTGGCTCTCGGCGTCCACTTTG
RTCP303510-T2933G-2-edTOP	AAATGAACAGTATGCCAAATTTCTTTTTTGATAACAACTGGGGTATTTAAAAAAGGCGCC
RTCP303510-T2933G-2-edBOT	TACAGCTCTCATAAAAAATCAAACAAAGTGGACAGGCACAGGCGCCTTTTTTAAATACCC
RTCP807270-G1747A-2-edTOP	CGATGATGGTGATGGGGCTGACTCAAATGGTTTATCAGCGTTGGTGGTGCAAATGGCATA
RTCP807270-G1747A-2-edBOT	ATCGGGAAAATTATCAGGCTCGCGATTAAGTCTCAAAGAGTATGCCATTTGCACCACCAA
RTCP807270-A2619C-2-edTOP	GTTTAACCAGGTCAGCTGAAGTTTCAATTGCCGCTGTGTCCAAATTAAGCTCGAGGTATT

RTCP807270-A2619C-2-edBOT	AAAAAATAAGAATGACTCTTTGTCAA**G**TTCCATGCGTAAAAATACCTCGA**G**CT**T**AATTTG
RTCP105550-G331A-2-edTOP	CCATCTTATTTGTGGTCAAAAGTCATGAGTTTGCAAAACAAATC**A**GA**A**ATTTAT**A**GATTG
RTCP105550-G331A-2-edBOT	AACTTGAGAAATAGTCACCTGCGGGTAAGAAGGTTGGTTTCAATC**T**ATAAAT**T**TC**T**GATT
Séquençage	
CP805940-eUPST	CAGCTTGGTCGTATGATAGTGG
CP805940-eDWST	ATCCATACGCTTGACCAATTTT
CP500160-eUPST	CACTGGCAATGAGAAGCAGT
CP500160-eDWST2	TGAAAGCCGAAATTGTACTGACA
Cp303740-F1	AGCCCTTCATGGGTACAACT
Cp303740-R1	CCCTCTAATCAATGGCACGTA
Cp303740-F3	TGACTGATCAGGAAATTGCTAAC
Cp303740-R3	TCCCATCTGTGAGGGTTGA
Cp-TAC1-F4	CCTTGGAACATTTGAATCTGG
Cp-TAC1-R4	GTGGGGAAATTAACCGAAAA
Cp-TAC1-F5	CATATCAGTTGTACAGAACGATGAA
Cp-TAC1-R5	AAAAATCAAACAAAGTGGACAGG
Cp-MRR1-F3	TCAGCTTGGTTGTGAGTTGC
Cp-MRR1-R3	TTGGCTACCATAGGAATACGC
Cp-MRR1-F5	CGTGATTATCCGCGTTAACTT
Cp-MRR1-R5	CGGTTGCTGTTGCAGATG
Cp-ERG3-F1	CAATTTTTCAAAGACCCACGTT
Cp-ERG3-R1	TCAAAATAAAGACGTGAAAATCCTT
Amorce TAG	
CP-TAG1-F	ACATCTGCGAAATGCGGCCA
Autre amorce :	
M13 FWD	TGTAAAACGACGGCCAGT
PCR allèle spécifique	
CP303740-WT-A395A-F	TGTTTTTGGAAAAGGTGTTATTTA
CP303740-Mut-A395T-F	TGTTTTTGGAAAAGGTGTTATTTT
CP303740-WT-A428A-F	CGGTCTTTGCGAACTTCT
CP303740-Mut-A428G-F	CGGTCTTTGCGAACTTCC
CP303740-WT-G1193G-R	ACACCAATACGTGGTGTCCTC
CP303740-Mut-G1193T-R	ACACCAATACGTGGTGTCCTA

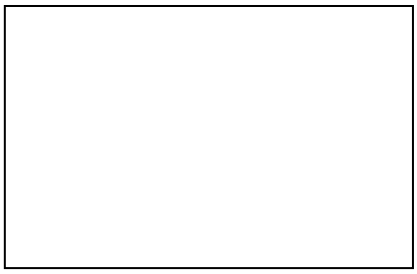
*Ce guide, situé à proximité des acides aminés Y132 et K143 a permis la réalisation des mutations ponctuelles Y132F et K143R du gène *ERG11*

La séquence TAG est indiquée en mauve, la séquence de codons stop en vert. La mutation à introduire est en gras et en rouge, et les mutations silencieuses en gras et soulignées. La mutation silencieuse supplémentaire lors de la réversion de la mutation Y132F chez la souche de *C. parapsilosis* Nice2 est indiquée en gras, soulignée et en vert.

CP805940 : *ADE2* ; CP500160 : *MSH2* ; CP303740 : *ERG11* ; CP303510 : *TAC1* ; CP807270 : *MRR1* ; CP105550 : *ERG3* ; WT : sauvage ; Mut : Muté

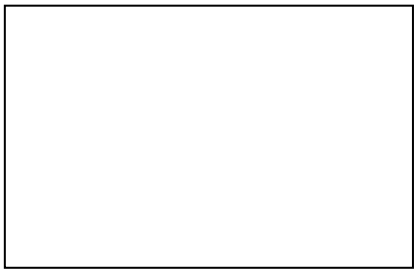
Vu, le Président du jury,

Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE



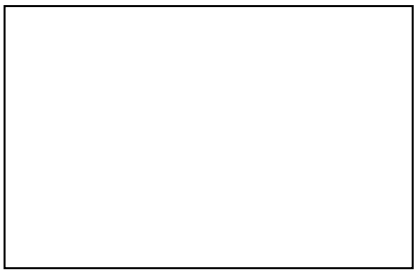
Vu, le Directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Florent MORIO



Vu, le Directeur de l'UFR,

Monsieur le Professeur Gaël GRIMANDI



UNIVERSITÉ DE NANTES **2021**

Nom : HARTUIS **Prénoms : Sophie, Emilie**

Titre de la thèse : Impact du polymorphisme génétique sur la résistance aux antifongiques de *Candida parapsilosis* : développement d'un modèle d'étude utilisant CRISPR-Cas9

Résumé de la thèse :

Candida parapsilosis est à la fois une levure commensale/saprophyte de la peau chez l'Homme et un pathogène opportuniste qui peut être responsable d'infections invasives dont la mortalité globale est de l'ordre de 20 à 40%. La description croissante d'épidémies clonales d'infections invasives en secteur hospitalier, impliquant notamment des souches de *C. parapsilosis* résistantes au fluconazole, est inquiétante et incite à une meilleure compréhension de la résistance aux antifongiques chez cette espèce. L'objectif de notre travail était de mettre en place un modèle d'étude de la résistance, utilisant la méthodologie d'édition du génome CRISPR-Cas9, permettant de mieux comprendre l'impact du polymorphisme génétique de *C. parapsilosis* sur le profil de sensibilité aux antifongiques.

Huit mutations décrites dans la littérature chez des souches cliniques présentant une résistance acquise aux antifongiques, en particulier azolés, ont été sélectionnées pour ce projet (*ERG11*^{Y132F}, *ERG11*^{K143R}, *ERG11*^{R398I}, *TAC1*^{G650E}, *TAC1*^{L978W}, *MRR1*^{G583R}, *MRR1*^{K873N}, *ERG3*^{G111R}). Chacune de ces mutations a été introduite dans le génome de deux souches sensibles au fluconazole de *C. parapsilosis* (ATCC 22019, STZ5) en utilisant une méthode CRISPR-Cas9. La sensibilité *in vitro* des mutants vis-à-vis d'antifongiques a été réalisée par méthode Etest® (bioMérieux).

L'impact sur la sensibilité au fluconazole est apparu très variable selon la mutation introduite. L'impact le plus important sur la sensibilité au fluconazole a été observé pour la mutation *MRR1*^{G583R}. La mutation *ERG3*^{G111R} semble affecter la réponse aux azolés, aux échinocandines et à l'amphotéricine B. Comme prévu chez une espèce diploïde, nous avons noté un impact du dosage allélique. Globalement, l'acquisition des mutations *ERG11*^{Y132F}, *ERG11*^{K143R}, *TAC1*^{L978W}, *MRR1*^{G583R} à l'état homozygote, suffit à conférer un phénotype de résistance *in vitro* et donc de prédire le risque d'échec thérapeutique *in vivo*.

MOTS CLÉS : *CANDIDA PARAPSILOSIS*, POLYMORPHISME GENETIQUE, EDITION DU GENOME, CRISPR-CAS9, RESISTANCE ACQUISE, ANTIFONGIQUES

JURY :

Président du jury : Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE (PU-PH Parasitologie et Mycologie Médicale)
Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Florent MORIO (MCU-PH Parasitologie et Mycologie Médicale)
Membres du jury :
Monsieur le Professeur Stéphane CORVEC (PU-PH Bactériologie)
Monsieur le Professeur Nicolas PAPON (PU-PH Parasitologie et Mycologie Médicale)
Madame le Docteur Rose-Anne LAVERGNE (MCU-PH Parasitologie et Mycologie Médicale)

Adresse de l'auteur : ***92 , boulevard de Doulon 44300 NANTES***