



HAL
open science

Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *candida glabrata*

Patrick Vandeputte

► **To cite this version:**

Patrick Vandeputte. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *candida glabrata*. Interactions entre organismes. Université d'Angers, 2008. Français. NNT : . tel-00433842

HAL Id: tel-00433842

<https://theses.hal.science/tel-00433842>

Submitted on 1 Jan 2012

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

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

MECANISMES MOLECULAIRES DE LA RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES CHEZ *CANDIDA GLABRATA*

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie des organismes

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le : 31 octobre 2008

à : Angers

par : Patrick Vandeputte

Devant le jury ci-dessous :

Dominique CHABASSE (président), Professeur, Université d'Angers

Claude GAILLARDIN (rapporteur), Professeur, INA-PG

Dominique SANGLARD (rapporteur), Professeur, Université de Lausanne

Thierry BERGES (examineur), Professeur, Université de Poitiers

Jean-Philippe BOUCHARA (examineur), Maître de Conférence, Université d'Angers

Directeur de thèse :

Jean-Philippe Bouchara, Maître de Conférence, Université d'Angers

Nom et coordonnées du Laboratoire :

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142

Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment Montéclair

4 rue Larrey

49933 Angers cedex 9

www.med.univ-angers.fr/GEIHP/

ED 363

*A mon étoile,
qui a su m'accompagner jusqu'ici de la plus belle
et la plus brillante des manières qui soit.*

REMERCIEMENTS

Voici certainement la partie d'une thèse la moins aisée à rédiger, tâchons de ne pas faire de fausse note et de n'oublier personne...

Tout d'abord, toute ma reconnaissance va à toi Jean-Philippe. Malgré toutes ces embûches, la question qui me vient à l'esprit est : "Aurais-je pu soutenir une thèse si ce n'était pas toi qui m'avais encadré?". De toutes façons la question ne se pose plus (tant mieux!). Je te remercie pour ton aide, ton dévouement et ta persévérance. Et aussi d'avoir crû en moi jusqu'au bout et tout fait pour que cette thèse soit une réussite.

Je remercie les membres du jury, Monsieur le Professeur Dominique Chabasse du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Monsieur le Professeur Claude Gaillardin du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire de l'INA-PG, Monsieur le Professeur Dominique Sanglard de L'Institut de Microbiologie de l'Université de Lausanne et Monsieur le Professeur Thierry Bergès du Laboratoire Physiologie Moléculaire des Transporteurs de Sucre de l'Université de Poitiers, qui me font l'honneur d'évaluer mon travail.

Je remercie de nouveau Monsieur le Professeur Dominique Chabasse, pour son dévouement, son soutien et son appui auprès de MSD et du CHU, qui m'ont permis de mener à bien cette thèse en assurant mon confort matériel et celui de ma famille. Cette thèse n'aurait peut-être pas pu être ce qu'elle a été sans vos interventions, soyez assuré de ma reconnaissance.

Je remercie également une deuxième fois Monsieur le Professeur Thierry Bergès, ainsi que son équipe, pour avoir réalisé les analyses des stérols et pour avoir confirmé, au vu des résultats de mes propres tentatives, que les spécialistes ne sont pas là pour rien!

Merci à toutes les personnes qui m'ont, de près ou de loin, aidé à réaliser ce travail et collaboré à mes expériences. Je pense à Monsieur le Professeur Alain Morel du Centre de Lutte contre le Cancer Paul Papin d'Angers, ainsi qu'aux thésards, stagiaires et techniciens du Laboratoire d'Oncopharmacologie qui m'ont laissé libre accès à leurs locaux, réactifs et appareils pour mes expériences de PCR quantitative. Je pense également à Monsieur le Professeur Pascal Reynier et aux techniciens du Laboratoire de Biologie Moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers qui m'ont toujours laissé une place sur une plaque de séquençage, malgré un planning parfois chargé et mes venues souvent à l'improviste. Je pense aussi à Monsieur le Professeur Guy Tronchin de la Faculté de Pharmacie de l'Université

d'Angers qui a réalisé l'ensemble des clichés de microscopie électronique figurant dans ce manuscrit. Je pense enfin à Monsieur le Professeur Gilles Renier du Laboratoire d'Immunologie du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers qui a toujours répondu présent, et avec enthousiasme, pour une cytométrie en flux sur des levures.

Je remercie tous les membres du personnel du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers ainsi que tous ceux du Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène. Tous ont plus ou moins participé à ce travail. La liste de toutes ces personnes serait vraiment trop longue, avec mes 7 années de présence au laboratoire, je fais désormais partie des anciens... Que de chemin parcouru!

Je remercie ma maman, mes sœurs, mon frère, ainsi que toute ma famille pour leur soutien.

Enfin, je remercie Estelle, Paolo et Thom, juste d'être là, auprès de moi.

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	p. 1
CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	p. 4
I. Biologie de <i>Candida glabrata</i>	p. 5
A. Classification.....	p. 5
B. Morphologie	p. 6
C. Génome	p. 7
D. Physiologie	p. 9
II. Pathogénicité de <i>Candida glabrata</i>	p. 10
A. Candidoses à <i>Candida glabrata</i>	p. 10
B. Incidence.....	p. 11
C. Facteurs de virulence	p. 13
III. Les antifongiques	p. 15
A. Les fluoropyrimidines	p. 15
1. Historique, structure et pharmacologie	p. 15
2. Mode d'action	p. 16
3. Mécanismes de résistance	p. 17
B. Les polyènes	p. 18
1. Historique	p. 18
2. Structure	p. 18
3. Mode d'action	p. 19
4. Pharmacologie.....	p. 19
5. Spectre d'activité.....	p. 20
6. Résistance aux polyènes	p. 20
a. Incidence	p. 20
b. Mécanismes	p. 21
C. Les azolés.....	p. 22
1. Historique, structure et pharmacologie	p. 22
2. Mode d'action	p. 24
3. Mécanismes de résistance.....	p. 26

D. Les échinocandines	p. 29
1. Historique, structure et pharmacologie	p. 29
2. Mode d'action	p. 30
3. Mécanismes de résistance	p. 32
IV. Biosynthèse et fonctions de l'ergostérol.....	p. 33
A. Voie de biosynthèse	p. 33
1. Description.....	p. 33
2. Régulation	p. 34
B. Fonctions de l'ergostérol	p. 36
V. Objectifs.....	p. 36
CHAPITRE II : RESISTANCE AUX POLYENES	p. 38
Etude n°1 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51: 982-990)	p. 41
Etude n°2 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52: 3701-3709).....	p. 60
CHAPITRE III : RESISTANCE A LA 5-FLUOROCYTOSINE	p. 78
Etude n°3	p. 81
CHAPITRE IV : RESISTANCE AUX AZOLES	p. 98
Etude n°4	p. 101
CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p. 117
I. Mécanismes de résistance aux polyènes	p. 118
II. Mécanismes de résistance à la 5-fluorocytosine	p. 130
III. Mécanismes de résistance aux azolés	p. 133
CONCLUSION	p. 141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p. 143

LISTE DES ABBREVIATIONS

5-FC	5-fluorocytosine
5-FdUMP	5-fluoro désoxyribouridine monophosphate
5-FU	5-fluorouracile
5-FUMP	5-fluorouridine monophosphate
5-FUTP	5-fluorouridine triphosphate
ABC	ATP-binding cassette
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AmB	amphotéricine B
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine triphosphate
bHLH	basic helix-loop-helix
CMI	concentration minimale inhibitrice
CoA	coenzyme A
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
EPA	epithelial adhesin
FDA	Food and Drug Administration
GFP	green fluorescent protein
GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositol
MALDI-TOF/TOF	matrix assisted LASER desorption/ionization-time of flight/time of flight
MFS	major facilitator superfamily
NADP(H)	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
pb	paire de bases
Pi	phosphate inorganique
PDRE	pleiotropic drug responsive element
RMN	résonance magnétique nucléaire
SAP	secreted aspartyl protease
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SRE	sterol responsive element
SREBP	sterol responsive element binding protein
UPRT	uridine phosphoribosyl transférase

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1 :** Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences de l'ARN ribosomique 18S de trois espèces du genre *Candida* et de quatre autres Hémiascomycètes.
- Figure 2 :** Morphologie de *Candida glabrata*.
- Figure 3 :** Représentation schématique des 13 chromosomes nucléaires de *C. glabrata*.
- Figure 4 :** Génome mitochondrial de *C. glabrata*.
- Figure 5 :** Incidence et fréquence des cinq espèces principales du genre *Candida* responsables d'infections systémiques aux Etats-Unis de 1989 à 2003.
- Figure 6 :** Structure chimique de la cytosine et de deux analogues fluorés des pyrimidines.
- Figure 7 :** Métabolisation intracellulaire et mode d'action de la 5-fluorocytosine chez *S. cerevisiae*.
- Figure 8 :** Structure chimique des trois antifongiques polyéniques majeurs.
- Figure 9 :** Modélisation tri-dimensionnelle du pore formé par l'amphotéricine B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique.
- Figure 10 :** Structure chimique des principaux antifongiques azolés.
- Figure 11 :** Structure tri-dimensionnelle de la stérol 14 α déméthylase de *Mycobacterium tuberculosis* en interaction avec le fluconazole.
- Figure 12 :** Modélisation cellulaire des principaux mécanismes de résistance aux antifongiques azolés.
- Figure 13 :** Structure chimique des trois échinocandines actuellement utilisées en clinique.
- Figure 14 :** Représentation schématique de la paroi chez *S. cerevisiae*
- Figure 15 :** Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *S. cerevisiae*.
- Figure 16 :** Analyse électrophorétique des protéines de la fraction soluble ou des différentes fractions liées des deux isolats cliniques à croissance pseudohyphale ou de morphologie normale.
- Figure 17 :** Fitness de l'isolat résistant aux polyènes de morphologie normale.
- Figure 18 :** Chaîne respiratoire mitochondriale chez *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 19 : Domaines du facteur de transcription Pdr1p chez *S. cerevisiae* et modèle proposé de Pdr1p chez les deux isolats de *C. glabrata* étudiés (*PDR1^{Δ727-1107}*).

Figure 20 : Mécanisme proposé de l'effet du bicarbonate sur la sensibilité aux antifongiques azolés des mutants *petite* d'origine mitochondriale chez *C. glabrata*.

Tableau 1 : Comparaison des génomes de *C. glabrata* et *S. cerevisiae*.

Tableau 2 : Protéines solubles différenciellement exprimées entre les deux isolats cliniques présentant une moindre sensibilité aux polyènes.

Tableau 3 : Protéines liées différenciellement exprimées entre les deux isolats cliniques présentant une moindre sensibilité aux polyènes.

Tableau 4 : Principales modifications phénotypiques liées à la mutation du gène *ERG6* chez les deux isolats cliniques de *C. glabrata* présentant une moindre sensibilité aux polyènes et mécanismes mis en jeu.

Tableau 5 : CMI du fluconazole chez une souche sauvage, un mutant *petite* (sélectionné par exposition au fluconazole) et trois isolats cliniques de *Candida glabrata* en fonction de la concentration en bicarbonate de sodium dans le milieu de culture.

Tableau 6 : CMI du voriconazole chez une souche sauvage, son mutant *petite* (sélectionné par exposition au fluconazole) et trois isolats cliniques de *Candida glabrata* en fonction de la concentration en bicarbonate de sodium dans le milieu de culture.

Tableau 7 : CMI du fluconazole et du voriconazole chez une souche sauvage, son mutant *petite* (sélectionné par exposition au fluconazole) et trois isolats cliniques de *Candida glabrata* en fonction de la concentration en CO₂ dans l'enceinte de culture.

Avec l'augmentation des situations d'immunodéficience, les infections fongiques sont devenues aujourd'hui à travers le monde une cause importante de mortalité. Ces infections sont déterminées par deux types de micro-organismes, les champignons filamenteux et les levures. Parmi ces dernières, les levures appartenant au genre *Candida* sont de loin les plus représentées et à l'origine de tableaux cliniques extrêmement variés, allant des candidoses superficielles aux candidoses profondes ou systémiques. Par ailleurs, l'augmentation de la fréquence des infections à levures durant ces trois dernières décennies s'est également accompagnée d'une augmentation de l'incidence de certaines espèces auparavant peu représentées. Ainsi, si *C. albicans* reste de loin l'espèce la plus fréquente, *C. glabrata* est devenue aujourd'hui, selon les études et la forme clinique de l'infection, la deuxième ou troisième espèce la plus fréquemment retrouvée.

Bien que la communauté scientifique soit constamment à la recherche de nouvelles molécules à activité antifongique, le nombre de cibles cellulaires utilisables est limité pour satisfaire aux critères de toxicité chez le patient. Ainsi, le traitement des infections fongiques repose à l'heure actuelle sur l'utilisation de quatre types de molécules, agissant sur trois mécanismes cellulaires. La 5-fluorocytosine, un analogue des bases pyrimidiques, inhibe la croissance fongique en perturbant la synthèse protéique et la réplication de l'ADN. Les antifongiques polyéniques et azolés agissent au niveau de l'ergostérol, principal composant de la membrane plasmique des champignons, ou de sa voie de biosynthèse. Enfin, les échinocandines perturbent la synthèse de la paroi fongique en inhibant une enzyme responsable de la synthèse de certains polysaccharides pariétaux.

L'utilisation intensive de ces molécules a malheureusement conduit à une augmentation de l'incidence des résistances aux antifongiques. C'est notamment le cas de la 5-fluorocytosine qui n'est plus administrée qu'en association avec un autre antifongique. De même, l'utilisation préférentielle des azolés s'accompagne d'une fréquence élevée de la résistance à ces antifongiques. En revanche, bien que les cas de résistance aux polyènes soit de plus en plus fréquemment décrits chez les levures du genre *Candida*, la résistance à ces antifongiques est plus rare. Concernant les échinocandines, leur utilisation récente ne permet pas aujourd'hui de dire si la résistance à ces molécules est un phénomène fréquent ou non, bien que des cas de résistance aient déjà été identifiés.

Concernant *C. glabrata*, s'il est clairement établi que cette espèce est moins sensible aux antifongiques azolés que la plupart des autres espèces du genre *Candida*, il semble également que l'acquisition d'une résistance aux autres classes d'antifongiques soit plus fréquente. Cette observation serait peut-être même en partie à l'origine de l'augmentation de l'incidence de cette espèce.

Nous avons donc caractérisé des isolats cliniques ou des mutants induits de *C. glabrata* et étudié les mécanismes moléculaires à l'origine de leur résistance aux antifongiques pyrimidiques, azolés ou polyéniques.

La première partie de ce manuscrit donne une description des connaissances actuelles, concernant aussi bien la physiologie, l'importance clinique et la virulence de *C. glabrata*, que le mode d'action des différentes classes d'antifongiques et les stratégies adoptées par les micro-organismes pour contourner leurs effets.

Les travaux personnels sont présentés sous la forme de quatre publications originales. Ces publications décrivent l'étude de deux isolats cliniques présentant une moindre sensibilité aux polyènes, chacun faisant l'objet d'une publication distincte. Les résistances à la 5-FC et aux azolés sont ensuite abordées par l'étude de mutants induits résistants à la 5-FC et celle de deux isolats cliniques dont l'un présentait un phénotype de sensibilité aux azolés peu ordinaire. Les deux publications portant sur les mécanismes de résistance aux antifongiques polyéniques ont été acceptées par la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, celle décrivant la caractérisation des mécanismes de résistance à la 5-FC chez des mutants induits a été soumise dans la même revue et enfin, celle portant sur l'étude de la sensibilité aux azolés d'un mutant *petite* est en cours de préparation pour soumission, également dans la même revue.

Enfin, les résultats obtenus sont discutés dans une dernière partie, qui expose également les questions soulevées et les pistes d'investigations possibles permettant d'y répondre.

I. Biologie de *Candida glabrata*

A. Classification

La classification de l'espèce dont le nom généralement admis aujourd'hui est *Candida glabrata* (bien que certains dénomment encore ce champignon *Torulopsis glabrata* [Liu *et al.*, 2006, 2007a et 2007b]) est pour le moins une histoire à rebondissements (Odds *et al.*, 1997; Barnett, 2004). L'espèce *C. glabrata* a été décrite pour la première fois en 1895 par Berlese qui l'avait alors appelée *Cryptococcus glabratus*, à l'aube de la découverte des champignons microscopiques en tant qu'organismes vivants (le premier genre, *Saccharomyces*, n'a été décrit qu'en 1838 par Meyen). Ce nom a été repris en 1917 par Anderson jusqu'à ce qu'en 1938, Lodder et DeVries renomment cette espèce *Torulopsis glabrata*, en référence au genre *Torulopsis* dont les espèces sont caractérisées par l'absence de production de filaments mycéliens. Puis, dès le début des années 70, une polémique s'installe au sein de la communauté scientifique à propos du statut du genre *Torulopsis* vis-à-vis du genre *Candida* (Lodder, 1970) et finalement, en 1978, les genres *Torulopsis* et *Candida* sont tombés en synonymie et les 66 espèces du genre *Torulopsis* sont reclassées au sein du genre *Candida*, dont *C. glabrata* (Yarrow et Meyer, 1978). Avec l'avènement de la biologie moléculaire, l'étude des séquences de l'ARN ribosomique a démontré que *C. glabrata* est phylogénétiquement plus proche de *Saccharomyces cerevisiae* que des autres espèces du genre *Candida* (Figure 1; Barns *et al.*, 1991). De plus, *C. glabrata*, contrairement aux autres espèces du genre *Candida*, ne donne jamais de filaments mycéliens, excepté dans des conditions de culture particulières (Csank et Haynes, 2000; Lachke *et al.*, 2002).

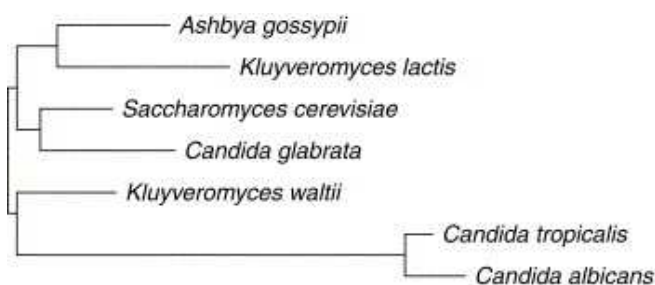


Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences de l'ARN ribosomique 18S de trois espèces du genre *Candida* et de quatre autres Hémiascomycètes. *C. glabrata* et *S. cerevisiae* montrent un rapprochement étroit et sont bien distincts de *C. albicans* et *C. tropicalis* (Kaur *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, la classification généralement admise de *C. glabrata* est donc la suivante (Bialkova et Subik, 2006):

Royaume:	Fungi
Division:	Ascomycota
Sous-division:	Ascomycotina
Classe:	Ascomycètes
Sous-classe:	Hémiascomycètes
Ordre:	Saccharomycétales
Famille:	Saccharomycetaceae
Genre:	<i>Candida</i>

B. Morphologie

Macroscopiquement, *C. glabrata* se présente sur milieu standard sous la forme de colonies lisses et brillantes de couleur blanc ou crème (Figure 2A). Microscopiquement, *C. glabrata* se présente uniquement sous forme levure et produit de petites blastospores ovoïdes de 1 à 4 μm , se multipliant par bourgeonnement. L'absence de filaments mycéliens est caractéristique (Figure 2B).

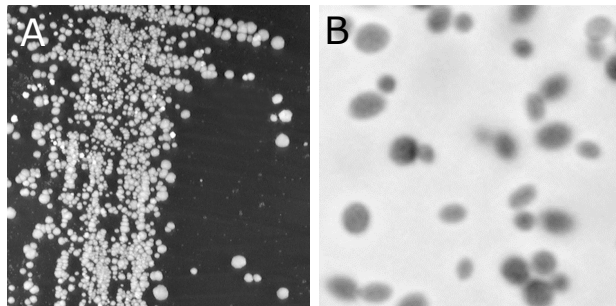


Figure 2 : Morphologie de *Candida glabrata*. (A) Observation macroscopique de colonies sur milieu de Sabouraud (taille réelle). (B) Observation en microscopie photonique de blastospores en suspension dans du bleu lactique (grossissement x 1000).

Toutefois, *C. glabrata* est capable de produire de courts pseudohyphes dans des conditions de culture particulières. Ainsi, Csank *et al.* (2000) on démontré que *C. glabrata* pousse sous forme pseudohyphale et est capable d'envahir la gélose lorsqu'il est cultivé sur un milieu carencé en azote. De même, l'addition de sulfate de cuivre dans le milieu de culture induit un changement réversible de la coloration et de la morphologie des colonies de *C. glabrata* (Lachke *et al.*, 2002).

C. Génome

C. glabrata, de part son intérêt médical et sa génétique particulière, fait partie des organismes dont le génome est totalement séquencé (Dujon *et al.*, 2004). Contrairement aux autres levures du genre *Candida*, et en dépit de la présence de gènes impliqués dans la reproduction sexuée, la principale particularité du génome de *C. glabrata* est d'être haploïde. Totalisant 12,3 Mpb, il est organisé en 13 chromosomes nucléaires qui comportent tous un centromère, une nécessaire à la ségrégation des chromosomes en mitose et des régions télomériques (Figure 3).

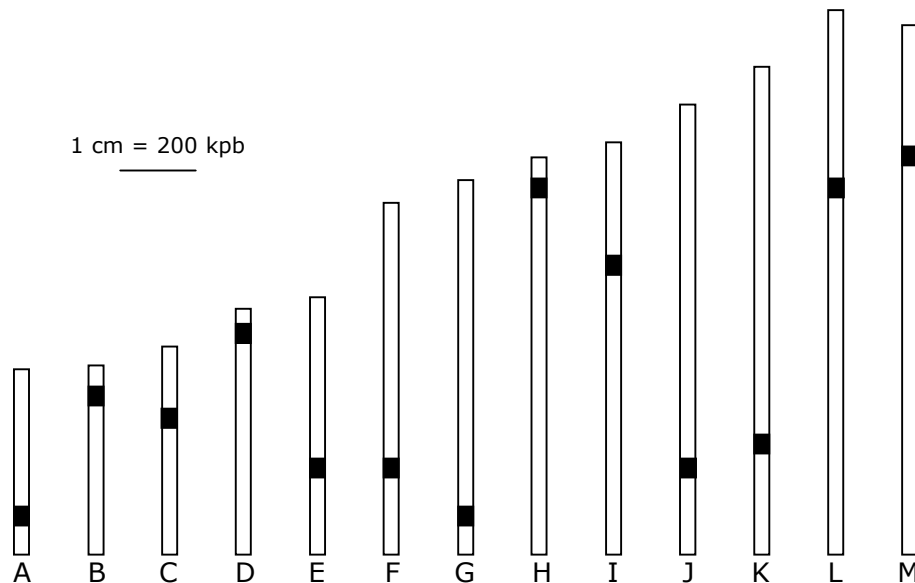


Figure 3 : Représentation schématique des 13 chromosomes nucléaires (nommés A à M) de *C. glabrata*. D'après le consortium Génolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>). Les centromères sont figurés par des rectangles noirs.

L'organisation générale du génome de *C. glabrata* rapproche encore une fois cette espèce de *S. cerevisiae*. En plus de partager des caractéristiques communes (Tableau 1), la plupart des protéines de *S. cerevisiae* ont des orthologues chez *C. glabrata* et on estime à environ 65% le degré d'identité entre les séquences en acides aminés des protéines orthologues de ces deux organismes (Kaur *et al.*, 2005). Cependant le génome de *C. glabrata* est caractérisé par une évolution régressive par rapport à *S. cerevisiae*. L'hypothèse la plus vraisemblable est que certains gènes de *S. cerevisiae*, qui n'est pas pathogène, n'auraient pas été conservés par *C. glabrata* en conséquence de son adaptation à l'hôte.

Tableau 1 : Comparaison des génomes de *C. glabrata* et *S. cerevisiae*.

	<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Ploïdie	n	2n
Taille (Mpb)	12,3	12,1
Nombre de chromosomes	13	16
Nombre de gènes	5283	5807
GC %	38,8	38,3

Le génome mitochondrial de *C. glabrata* est un des plus petits génomes mitochondriaux connus chez les Hémiascomycetes, avec une taille d'environ 20 kpb (Figure 4). C'est un chromosome circulaire dont la séquence est entièrement connue, et comporte 8 gènes codant pour des protéines (essentiellement des enzymes de la chaîne respiratoire), 23 gènes codant pour des ARNt et les gènes codant pour les sous-unités des ribosomes mitochondriaux (Kozul, 2003). La principale particularité du génome mitochondrial de *C. glabrata* est son caractère non-indispensable. En effet, par opposition aux autres levures du genre *Candida* mais comme *S. cerevisiae*, la perte totale (ρ^0) ou partielle (ρ^-) du génome mitochondrial est viable chez *C. glabrata*, et représenterait même un avantage sélectif en présence d'antifongiques azolés, puisque cette mutation *petite* s'accompagne d'une résistance à ces antifongiques par surexpression des protéines d'efflux de type ABC (Sanglard *et al.*, 2001; Brun *et al.*, 2004).

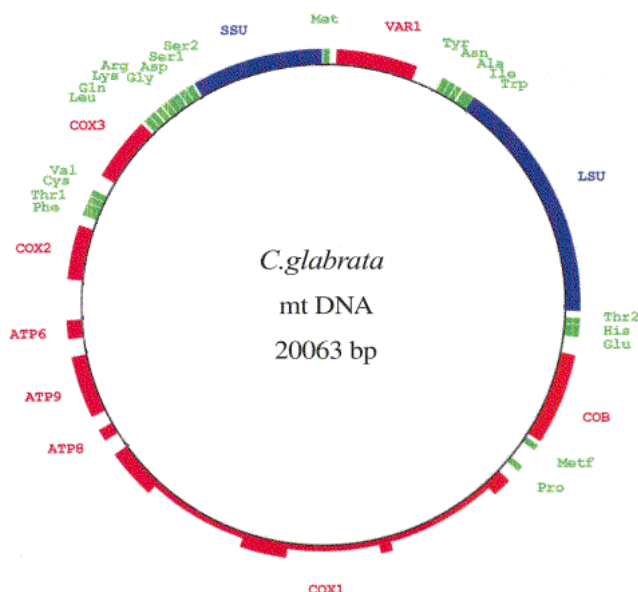


Figure 4 : Génome mitochondrial de *C. glabrata*. Les gènes codant les protéines sont en rouge, les sous-unités ribosomiques en bleu, et les ARNt en vert, d'après Kozul *et al.* (2003).

Malgré l'absence de reproduction sexuée, qui interdit les possibilités d'étude génétique classique basée sur la sporulation ou la conjugaison, de nombreux outils moléculaires ont été développés pour manipuler génétiquement *C. glabrata*. La plupart de ces outils utilisés chez *C. glabrata* ont été mis au point chez *S. cerevisiae*, avec pour principal avantage que les gènes de *S. cerevisiae* sont capables de remplacer la fonction de leurs orthologues chez *C. glabrata*. Ils sont basés soit sur la complémentation de la fonction d'un gène d'auxotrophie par des plasmides aussi bien réplcatifs (contenant une séquence *CEN/ARS* [Zhou *et al.*, 1994; Hanic-Joyce et Jones, 1998]) qu'intégratifs (*C. glabrata* étant capable de recombinaison homologue [Cormack et Falkow, 1999; Dogson *et al.*, 2005; Edlind *et al.*, 2005]), soit par l'intégration d'une cassette de résistance à un antibiotique (kanamycine [Castano *et al.*, 2003] ou auréobasidine A [Hashida-Okado *et al.*, 1998]). De même, des systèmes d'expression sous le contrôle de promoteurs inductibles ont été développés pour *C. glabrata* (Merha *et al.*, 1992; Nakayama *et al.*, 1998). Enfin, les méthodes de transformation classiques ont été adaptées chez *C. glabrata*, aussi bien les méthodes chimiques à l'acétate de lithium (Gietz *et al.*, 1992) que l'électroporation (Varma *et al.*, 1992).

D. Physiologie

Sans vouloir établir une liste exhaustive des caractéristiques physiologiques de *C. glabrata*, deux caractères particuliers chez cet organisme méritent d'être cités, son profil d'assimilation des sucres et son mode de reproduction.

L'adaptation à l'hôte chez *C. glabrata* a conduit à un profil d'assimilation des sucres très particulier, cette espèce n'étant capable d'utiliser que le glucose et le tréhalose (Meyer *et al.*, 1984; Hazen, 1995). Ainsi, la plupart des gènes "perdus" par *C. glabrata* au cours de son évolution régressive par rapport à *S. cerevisiae* correspondent à des gènes impliqués dans le métabolisme de sucres tels que le galactose, le raffinose ou le maltose (Dujon *et al.*, 2004). De même, ce profil d'assimilation des sucres différencie *C. glabrata* des autres espèces appartenant au genre *Candida*, et ce critère est fréquemment utilisé pour l'identification de cette espèce en mycologie médicale (Piens *et al.*, 2003).

Il n'y a pas de cycle sexuel chez *C. glabrata*. Une formulation plus adaptée serait certainement : il n'y a pas de cycle sexuel connu chez *C. glabrata*. En effet, des travaux ont révélé la présence de trois loci sexuels particulièrement semblables à ceux de *S. cerevisiae*, qui, lui, est capable de reproduction sexuée (Srikantha *et al.*, 2003). Ainsi, comme chez *S. cerevisiae*, le locus *MTL1* serait fonctionnel et porteur de l'information de mating (a ou α) tandis que les loci *MTL2* et *MTL3* seraient silencieux (Srikantha *et al.*, 2003). De même, plusieurs données suggèrent l'existence d'un cycle sexuel chez *C. glabrata*, comme la capacité de recombinaison (Cormack et Falkow, 1999; Dogson *et al.*, 2005), appuyée par l'observation de distributions non clônales chez certaines populations (De Meeus *et al.*, 2002;

Brockert *et al.*, 2003), ou la présence d'orthologues chez *C. glabrata* qui n'ont pas d'autres fonctions connues chez *S. cerevisiae* en dehors de leur rôle dans la reproduction sexuée (Wong *et al.*, 2003). Plus récemment, un mécanisme de contrôle du mating type a été mis en évidence chez *C. glabrata* (Muller *et al.*, 2008).

Il semblerait donc que *C. glabrata* possède la faculté de se multiplier par reproduction sexuée et non pas uniquement par mitose, mais que les conditions permettant d'induire ce cycle sexuel cryptique n'ont pas encore pu être reproduites *in vitro* et sont difficilement observables chez l'hôte. Par analogie, l'existence d'un cycle sexuel hautement contrôlé chez *C. albicans*, qui était considéré jusqu'alors comme asexué, tout comme *C. glabrata*, n'a été découverte que récemment (Hull *et al.*, 2000).

II. Pathogénicité de *C. glabrata*

Les levures du genre *Candida* sont pour la plupart des commensales des muqueuses chez l'homme et sont des pathogènes opportunistes. C'est le cas de *C. glabrata* qui est considérée comme un constituant naturel de la flore microbienne des muqueuses des mammifères et n'est en revanche pas retrouvée dans l'environnement. Si cette espèce était considérée à l'origine comme non pathogène, elle est devenue aujourd'hui la deuxième espèce en fréquence dans les candidoses, après *C. albicans*. En outre, les candidoses à *C. glabrata* sont associées à un taux de mortalité particulièrement élevé dans les formes systémiques.

A. Candidoses à *C. glabrata*

Les candidoses à *C. glabrata* peuvent être réparties en deux grandes catégories : les candidoses superficielles et les candidoses systémiques.

Les candidoses superficielles touchent les muqueuses des patients présentant un terrain favorisant le développement de la levure. Ces facteurs prédisposant à l'infection sont soit des facteurs physiologiques tel que l'âge (Blot *et al.*, 2001), soit des facteurs pathologiques tels que le diabète ou des déficits immunitaires (Leon *et al.*, 2002). Les formes cliniques les plus fréquentes sont les candidoses oropharyngées, les candidoses oesophagiennes, les candidoses vulvo-vaginales et les candidoses urinaires. Les candidoses oropharyngées, notamment, sont particulièrement fréquentes chez les patients atteints du SIDA puisqu'on estime à environ 80% la proportion de ces patients qui développeront une candidose oropharyngée, et cette infection est souvent un signe d'entrée dans la phase clinique du SIDA (Diamond, 1991). *C. glabrata* représente environ 5% des isollements dans les candidoses oropharyngées (Pons *et al.*, 1993), les candidoses oesophagiennes (la deuxième forme clinique la plus fréquente) et les candidoses vulvo-vaginales (Cauwenbergh, 1990; Sobel *et al.*, 1998). Enfin, l'incidence des candidoses du tractus urinaire est en augmentation, mais contrairement aux autres formes de candidoses superficielles, pour

lesquelles *C. albicans* représente environ 90% des prélèvements, 50% des candidoses urinaires ne sont pas dues à *C. albicans*, et *C. glabrata* est responsable de plus de 20% de ces infections (Sobel *et al.*, 2000).

L'avancée technologique en matière médicale et chirurgicale ainsi que l'utilisation quasi systématique d'antibiotiques et d'antifongiques à titre prophylactique ont eu pour effet d'améliorer considérablement les chances de survie des patients touchés par des maladies auparavant létales. Cependant, elles ont également conduit à une augmentation, elle aussi considérable, du nombre des candidoses profondes ou systémiques. Les candidoses profondes peuvent toucher tous les organes, et il n'existe pas de signes cliniques propres à ces infections. Elles s'accompagnent d'une dégradation de l'état de santé du patient et vont d'une simple fièvre modérée à un choc septique brutal. De même, les candidoses systémiques à *C. glabrata* ne présentent pas de manifestations particulières, mais sont caractérisées par une plus grande mortalité (Komshian *et al.*, 1989) et par une moins bonne réponse au traitement par les antifongiques azolés (Rex *et al.*, 1995).

B. Incidence

A la fin du XIX^{ème} siècle, les infections bactériennes étaient prédominantes et posaient un réel problème de santé publique à l'échelle planétaire. Parallèlement, les infections fongiques n'étaient quasiment pas prises en compte. Cependant, depuis les années 1960, avec l'explosion de l'antibiothérapie, l'augmentation du nombre de cancers, le vieillissement de la population, et plus récemment l'épidémie de SIDA, la multiplication des techniques chirurgicales invasives et le développement des transplantations d'organes ou des greffes de moëlle, on observe une augmentation de l'incidence des infections fongiques (Figure 5). Ainsi, les levures du genre *Candida* représentent aujourd'hui la quatrième cause d'infections nosocomiales aux Etats-Unis (Beck-Sague *et al.*, 1993). De plus, si *C. albicans* est de loin l'espèce la plus fréquemment isolée, on observe un bouleversement du profil des espèces isolées avec une augmentation de l'incidence de certaines espèces jusqu'alors peu représentées (Hazen, 1995; Figure 5). C'est le cas de *C. glabrata* qui fut considérée comme émergente seulement à partir de 1991 (Komshian *et al.*, 1989; Badenhorst *et al.*, 1991; Banerjee *et al.*, 1991; Samonis et Bafaloukos, 1992; Borg von-Zepelin *et al.*, 1993; Glick *et al.*, 1993; Wingard *et al.*, 1993).

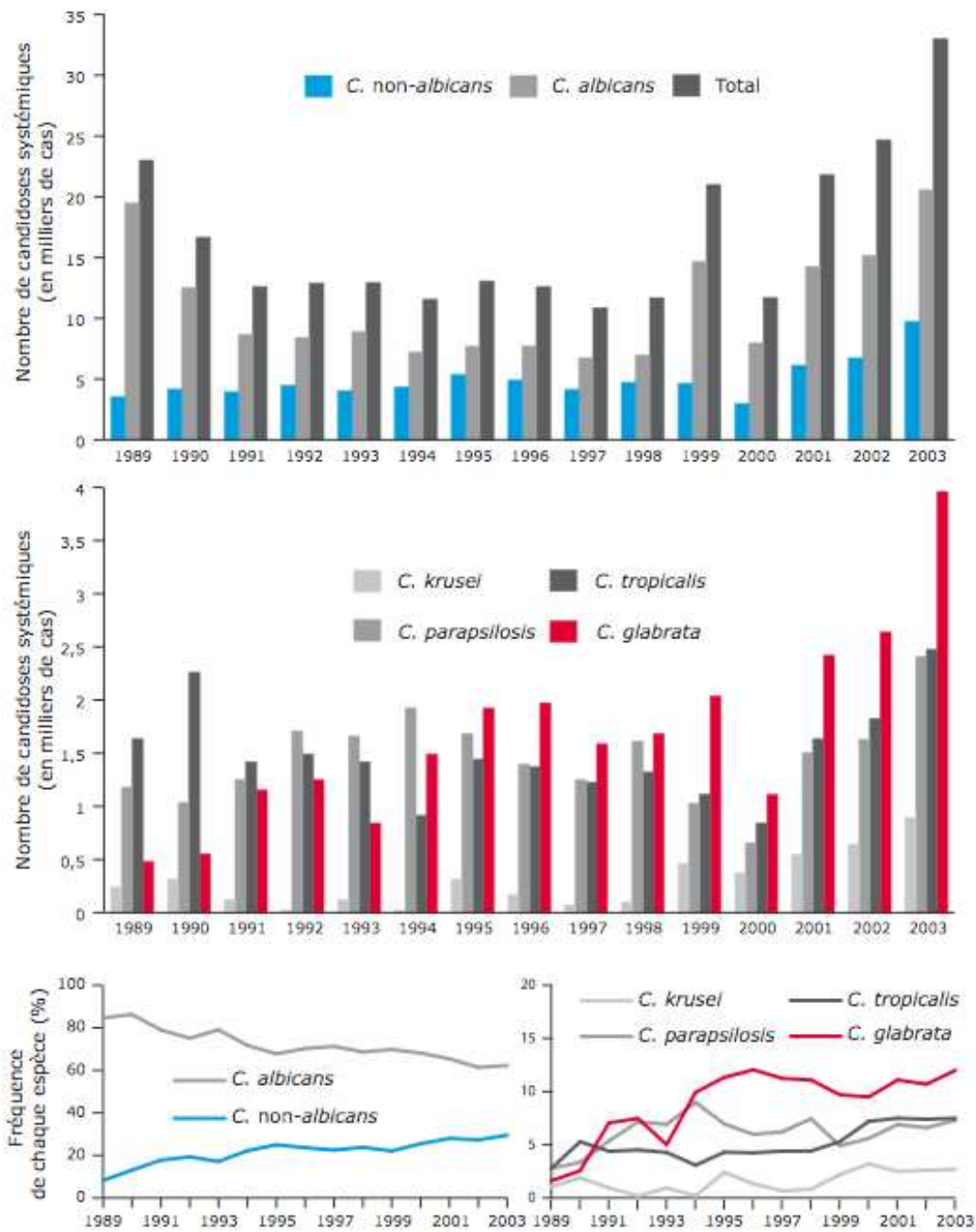


Figure 5 : Incidence et fréquence des cinq principales espèces du genre *Candida* responsables d'infections systémiques aux Etats-Unis de 1989 à 2003, d'après Trick *et al.* (2002) et Pfaller *et al.* (2005).

Depuis, même si les résultats sont variables en fonction des études (localisations géographiques, formes cliniques, catégories de patients, ...), *C. glabrata* est devenue la deuxième espèce responsable de candidoses, toutes formes cliniques confondues, et représente environ 15% de l'ensemble des isollements de levures (Abu-Elteen, 2001; Pfaller *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2005; Pfaller et Diekema, 2007; Figure 5). Cette augmentation est probablement la conséquence directe de la moindre sensibilité de cette espèce aux antifongiques azolés, puisque l'intensification de leur utilisation prophylactique coïncide avec l'émergence des espèces non-*albicans* (Price *et al.*, 1994). Cependant, il semble que d'autres facteurs prédisposent à l'infection par *C. glabrata*. Ainsi, l'âge du patient, l'existence simultanée d'une antibiothérapie ou la nature de la maladie sous-jacente semblent avoir plus d'incidence sur la probabilité de développer une candidose profonde ou systémique à *C. glabrata* que l'utilisation prophylactique d'antifongiques azolés (Pfaller et Diekema, 2007).

C. Facteurs de virulence

L'absence de croissance mycélienne et d'expression de certains antigènes de surface dont le rôle dans la virulence a été démontré chez *C. albicans*, ainsi que la faible capacité d'adhérence aux cellules endothéliales ne laissaient pas présager une virulence élevée chez *C. glabrata*. Pourtant, le pronostic vital des patients présentant une candidose profonde ou systémique ou une septicémie à *C. glabrata* est souvent compromis.

La première raison est certainement la faible sensibilité de cette espèce aux antifongiques azolés, dont l'utilisation prophylactique est à l'origine non seulement de l'augmentation de l'incidence de *C. glabrata*, mais également de la sélection fréquente d'isolats résistants à ces antifongiques (Fidel *et al.*, 1999). Cependant, plusieurs facteurs dont le rôle dans la virulence a été démontré pour d'autres espèces ont été identifiés chez *C. glabrata* (Kaur *et al.*, 2005).

Le premier facteur de virulence, déterminant l'infection, est la capacité d'adhérer aux cellules de l'hôte. Si des travaux ont montré que *C. glabrata* avait une capacité d'adhérence limitée par rapport à *C. albicans* notamment (Bendel et Hostetter, 1991), des études récentes montrent que *C. glabrata* possède des gènes impliqués dans l'adhérence, qui de plus lui sont spécifiques. Au moins une vingtaine de ces gènes dénommés EPA, pour "epithelial adhesin", ont été identifiés chez *C. glabrata*. Ils codent des protéines pariétales à ancre GPI, similaires aux adhésines codées par les gènes *ALS* et *HWP1* de *C. albicans*. Cependant, seule l'adhésine Epa1p semble être active, les autres gènes sont dans des régions subtélomériques du génome et leur expression est réprimée par un phénomène de "transcriptionnal silencing" (Castano *et al.*, 2005), identique au mécanisme caractérisé pour les gènes télomériques de *S. cerevisiae* (Rusche *et al.*, 2003). D'ailleurs, la disruption des gènes impliqués dans le contrôle du silencing produit des souches hyperadhérentes chez *C. glabrata* (Castano *et al.*, 2003; Domergue *et al.*, 2005). Les adhésines de type EPA sont également impliquées dans la

formation de biofilms par *C. glabrata*, mécanisme important pour la virulence de cette espèce, notamment lors de la colonisation de surfaces inertes telles que les cathéters (Iraqi *et al.*, 2005).

Un deuxième facteur déterminant la virulence des espèces du genre *Candida* est la capacité de production de filaments mycéliens. Cependant, hormis dans des conditions de culture bien particulières (Csank et Haynes, 2000; Lachke *et al.*, 2002), *C. glabrata* n'est pas capable de croître sous forme mycélienne, contrairement à *C. albicans*, l'espèce modèle chez les levures Hémiascomycètes pathogènes. Malgré cette observation, il semble que les gènes impliqués dans la transition morphologique (de la forme blastospore à la forme pseudohyphé) chez *C. glabrata*, et notamment les gènes *STE12* et *STE20*, soient requis pour maintenir un niveau normal de virulence. Ces gènes codent respectivement le facteur de transcription final et un messager intermédiaire de la voie de signalisation qui aboutit à la transition morphologique aussi bien chez *C. glabrata* que chez *S. cerevisiae*. Le facteur de transcription *STE12p*, impliqué dans le mating, la filamentation, la virulence, la croissance invasive et l'intégrité de la paroi chez de nombreux champignons, est présent chez *C. glabrata* (Calcagno *et al.*, 2003) et a un rôle non seulement dans la filamentation induite par la carence en azote, mais également dans la virulence et l'intégrité de la paroi. Chez *C. glabrata*, la disruption des gènes *STE12* ou *STE20* conduit à l'obtention de mutants dont la virulence est fortement diminuée dans un modèle murin de candidose disséminée (Calcagno *et al.*, 2003 et 2004). De même, ces gènes ont un rôle indispensable dans le phénomène appelé "phenotypic switching", qui se traduit chez *C. glabrata* par le changement réversible de la couleur des colonies et de la morphologie des cellules sur un milieu contenant du sulfate de cuivre, sans modification associée du génotype (Lachke *et al.*, 2000). Or ce phénomène de "phenotypic switching" semble exercer un rôle dans la virulence de *C. glabrata* et a déjà été observé pour cette espèce *in vivo*, au site de colonisation (Brockert *et al.*, 2003). Une observation appuyant le rôle de la croissance mycélienne dans la virulence est l'obtention de mutants hypervirulents par disruption du gène *ACE2*, qui code un facteur de transcription impliqué dans la séparation entre la cellule mère et la cellule fille après bourgeonnement et cloisonnement, et dont l'inactivation se traduit par la croissance de *C. glabrata* sous forme d'agrégats (Kamran *et al.*, 2004). Il semble donc que *C. glabrata*, bien qu'effectivement incapable de produire des filaments en conditions normales, possède des facteurs de virulence considérés auparavant comme exclusivement liés à la croissance hyphale ou pseudohyphale et qui semblent avoir une fonction sous-jacente, pouvant s'exercer en l'absence de production de filaments mycéliens.

Enfin, *C. glabrata* secrète des hydrolases qui déterminent ses capacités d'invasion des tissus de l'hôte. Ainsi, plusieurs travaux ont mis en évidence la sécrétion de phospholipases chez *C. glabrata*, facilitant la pénétration des blastospores dans les endothéliums (Ghannoum, 2000; Kantarcioglu et Yucel, 2002) et, bien que cette donnée

soit peu documentée, il semble que *C. glabrata* secrète également des protéases de type SAP, pour "secreted aspartyl protease" (Chakrabarti *et al.*, 1991). Plus récemment, Luo *et al.* (2004) ont mis en évidence la production d'une enzyme à activité hémolytique chez *C. glabrata*, codée par le gène *HLP*.

III. Les antifongiques

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limité puisque seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines.

A. Les fluoropyrimidines

1. Historique, structure et pharmacologie

Les fluoropyrimidines, dont les seuls représentants actuellement utilisés chez l'homme sont la 5-fluorocytosine (5-FC) et le 5-fluorouracile (5-FU), sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la cytosine (Figure 6).

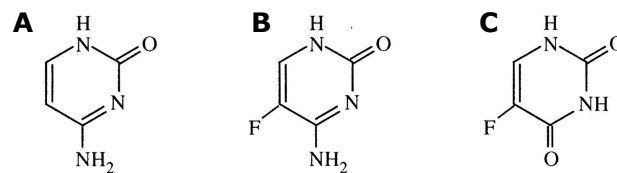


Figure 6: Structure chimique de la cytosine (**A**) et de deux analogues fluorés des pyrimidines, la 5-fluorocytosine (**B**) et le 5-fluorouracile (**C**).

La 5-FC a été synthétisée pour la première fois en 1957 par Duchinsky et ses collaborateurs, à des fins antitumorales (Duchinsky *et al.*, 1957). Ce n'est qu'en 1963 que l'équipe de Grunberg découvre son potentiel antifongique sur des modèles murins de candidose et de cryptococcose (Grunberg *et al.*, 1963), et en 1968, la 5-FC est utilisée avec succès chez l'homme pour traiter une candidose systémique et une méningite à cryptocoque (Tassel et Madoff, 1968).

La 5-FC possède un spectre d'activité étendu. Elle a ainsi démontré son efficacité sur les genres *Candida* et *Cryptococcus*, mais également chez les dématés *Phialophora* et *Cladosporium* ainsi que chez les filamenteux appartenant au genre *Aspergillus*. La 5-FC est également active chez les protozoaires du genre *Leishmania* et *Acanthamoeba* (Scholer, 1980).

De même, en raison de sa grande hydrosolubilité et de sa petite taille, la 5-FC possède des propriétés pharmacocinétiques intéressantes puisqu'elle diffuse très rapidement dans tout l'organisme, même lors d'une administration orale (Daneshmend et Warnock, 1983). En outre, ses effets secondaires sont le plus souvent négligeables, bien que des effets plus graves, se traduisant par une hépatotoxicité et une atteinte de la moëlle osseuse (Stamm *et al.*, 1987 ; Francis et Walsh, 1992; Kauffman et Frame, 1997 ; Vermes *et al.*, 2000b), puissent survenir (Scholer, 1980). De façon surprenante, ces effets secondaires sont identiques à ceux observés lors d'une administration de 5-FU, bien que l'homme ne possède pas de cytosine désaminase, l'enzyme responsable de la conversion de la 5-FC en 5-FU au sein de la cellule fongique (Diasio *et al.*, 1978 ; Williams *et al.*, 1981). Des travaux suggèrent que la flore intestinale serait responsable de cette conversion et à l'origine des effets secondaires graves de la 5-FC (Harris *et al.*, 1986).

Malgré sa bonne tolérance, ses propriétés pharmacocinétiques et son spectre étendu, la 5-FC est de moins en moins fréquemment utilisée en mycologie médicale, en raison de la survenue fréquente de résistance chez les champignons pathogènes. Ainsi, à quelques exceptions près (Benson et Nahata, 1988), la 5-FC n'est jamais utilisée en monothérapie, mais toujours en association avec un autre antifongique, le plus souvent l'amphotéricine B (Bennett *et al.*, 1979 ; Patel, 1998). Cependant, compte-tenu de la forte toxicité rénale et hépatique de l'amphotéricine B, qui potentialise la toxicité hépatique de la 5-FC, cette dernière est aujourd'hui de plus en plus fréquemment associée à des antifongiques azolés.

2. Mode d'action

La 5-FC n'a pas d'activité antifongique, c'est sa conversion en 5-FU par les cellules fongiques qui lui confère son pouvoir fongistatique (Bennett, 1977 ; Polak et Scholer, 1980; Benson et Nahata, 1988). En effet, la 5-FC pénètre rapidement à l'intérieur des cellules fongiques par des transporteurs plus ou moins spécifiques, tels que la cytosine perméase ou des transporteurs des pyrimidines (Polak et Grenson, 1973), puis elle est métabolisée en 5-FU par la cytosine désaminase (Polak et Scholer, 1975). Le 5-FU est ensuite converti en 5-fluorouracile monophosphate par l'uridine phosphoribosyl-transférase ou UPRT. A partir de cette étape, deux voies distinctes permettent d'aboutir au blocage de la multiplication cellulaire. Le 5-fluorouracile monophosphate peut être converti en 5-fluorouracile triphosphate qui s'incorpore dans les ARN à la place de l'uracile triphosphate et bloque ainsi la synthèse protéique. Le 5-fluorouracile monophosphate peut également être converti par l'UPRT en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate, composé qui va inhiber la thymidylate synthétase, une enzyme clé de la biosynthèse de l'ADN, et bloque ainsi la multiplication cellulaire (Scholer, 1980 ; Waldorf et Polak, 1983; Bennett, 1996; Figure 7).

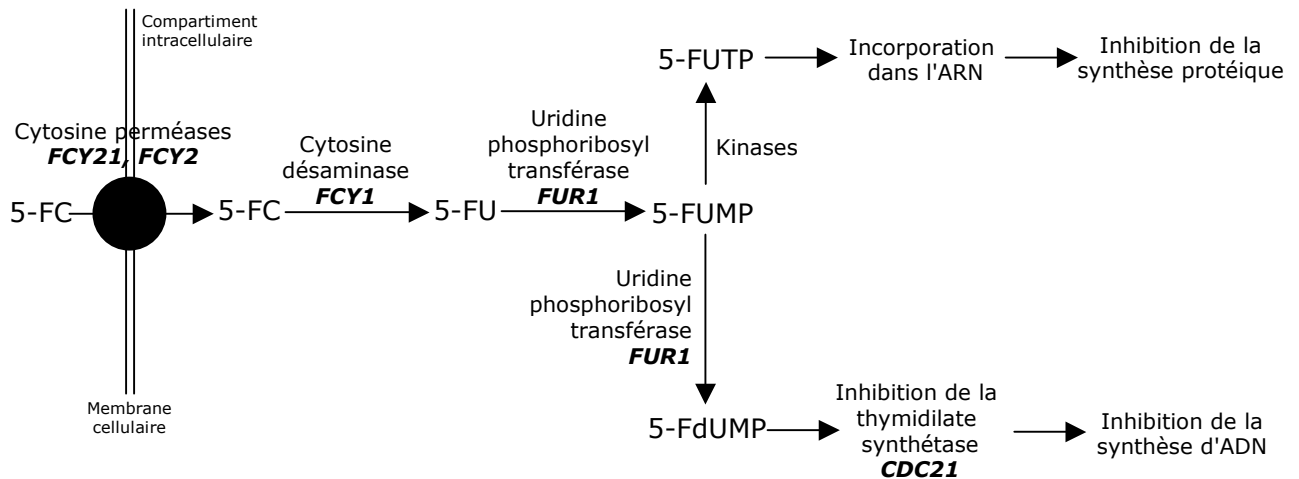


Figure 7: Métabolisation intracellulaire et mode d'action de la 5 fluorocytosine chez *S. cerevisiae*, d'après Vermes *et al.* (2000a). En gras sont indiqués les noms des gènes codant pour chaque enzyme. 5-FC: 5-fluorocytosine; 5-FU: 5-fluorouracile; 5-FUMP: 5-fluorouridine monophosphate; 5-FUTP: 5-fluorouridine triphosphate; 5-FdUMP: 5-fluoro désoxyribouridine monophosphate.

3. Mécanismes de résistance

La résistance à la 5-FC est un phénomène relativement fréquent (Tassel et Madoff, 1968; Normark et Schönebeck, 1972; Polak et Scholer, 1975). Cette résistance peut être intrinsèque, c'est-à-dire une caractéristique d'espèce comme chez *Candida tropicalis*, ou acquise, par sélection de mutants résistants après exposition à l'antifongique (Normark, 1973). Chez le genre *Candida*, on estime à 7-8% la proportion d'isolats résistants, et ce taux passe à 22% si on ne considère que les *Candida non-albicans*. Chez *Cryptococcus neoformans*, 1 à 2% des isolats cliniques sont résistants à la 5-FC (Medoff et Kobayashi, 1980).

En raison de la complexité du mode d'action de la 5-FC, de nombreux événements peuvent expliquer la résistance à cet antifongique. Ces mécanismes de résistance peuvent être regroupés en deux catégories.

- la résistance peut survenir par mutation d'un gène codant une enzyme impliquée dans le métabolisme de la 5-FC (Polak, 1977; Fasoli et Kerridge, 1988). Ainsi, le mécanisme le plus fréquent à l'origine de la résistance acquise à la 5-FC est une mutation sur le gène *FUR1*, codant l'UPRT (Francis et Walsh, 1992).
- la résistance à la 5-FC peut également résulter d'une induction du métabolisme des pyrimidines, qui entrent alors en compétition avec l'antifongique (Polak, 1977). Ce mécanisme de résistance se traduit notamment par une surexpression du gène *CDC21*, codant la thymidilate synthétase.

B. Les polyènes

1. Historique

Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, pour la plupart isolées chez des bactéries du genre *Streptomyces*, ont une activité antifongique. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotéricine B (AmB), la nystatine et la natamycine.

En 1950, Hazen et Brown découvrent fortuitement la nystatine, produite par une culture de *Streptomyces noursei*, une bactérie filamenteuse isolée dans un prélèvement de sol aux Etats-Unis. Puis, en 1959, Dutcher et ses collaborateurs isolent l'AmB, produite par une culture de *Streptomyces nodosus*, bactérie prélevée dans un échantillon de sol de la rivière Orinoco au Vénézuéla (Dutcher *et al.*, 1959). La natamycine est quant à elle produite par la bactérie *Streptomyces natalensis*. On sait aujourd'hui que la synthèse des polyènes par les bactéries du genre *Streptomyces* se fait par l'intermédiaire d'un cluster de gènes relativement bien conservés entre les différentes espèces de ce genre. Ce cluster contient des gènes codant plusieurs polykétides synthétases, des transporteurs membranaires de type ABC, des enzymes à cytochrome P450 et des enzymes chargées de la synthèse et de l'attachement du groupement mycosamine (Caffrey *et al.*, 2001). Bien que les polyènes puissent être synthétisés chimiquement (Nicolaou *et al.*, 1988), ils sont encore produits aujourd'hui, pour des raisons économiques, à partir de cultures de *Streptomyces spp.*

2. Structure

Les polyènes sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères. La plupart sont constitués d'un cycle macrolactone de 20 à 40 atomes de carbone sur lequel est branché un groupement d-mycosamine. Leur caractère amphotère est lié au regroupement de plusieurs doubles liaisons conjuguées (d'où leur nom de "poly-ène") sur une face du cycle macrolactone, qui est donc hydrophobe, et de groupements hydroxyles sur l'autre face, qui est hydrophile (Figure 8; Lemke *et al.*, 2005).

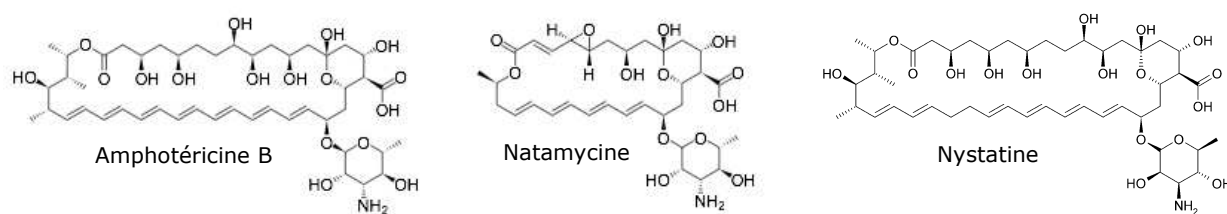


Figure 8 : Structure chimique des trois antifongiques polyéniques majeurs.

3. Mode d'action

Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons. Leur caractère amphotère leur permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores. Les données de résonance magnétique nucléaire indiquent que 8 molécules d'AmB s'associent à 8 molécules d'ergostérol par leur partie polyénique tandis que les faces hydrophiles ménagent un canal central de 70 à 100 nm de diamètre (Figure 9). La formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique tandis que le canal permet la fuite de composants intracellulaires, et notamment d'ions K^+ , à l'origine de la lyse cellulaire (Lemke *et al.*, 2005).

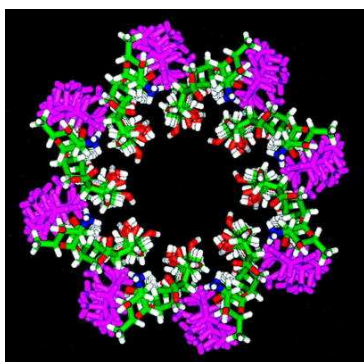


Figure 9 : Modélisation tri-dimensionnelle du pore formé par l'amphotéricine B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique, d'après Baginski *et al.* (1997). Amphotéricine B : blanc (H), vert (C), rouge (O), bleu (N); ergostérol : rose.

Si les données structurales concernant ces molécules indiquent que leur cible cellulaire est l'ergostérol, et bien que leur liaison à l'ergostérol ait été démontrée (Baginski *et al.*, 1997; Milhaud *et al.*, 2002; Paquet *et al.*, 2002), une controverse existe quant à une éventuelle action au niveau intracellulaire. Des travaux ont en effet suggéré que les polyènes seraient capables d'induire un stress oxydatif, notamment chez *C. albicans* (Ghannoum et Rice, 1999; Akins, 2005; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006); de plus, il semble que leur activité soit diminuée en conditions hypoxiques (Warn *et al.*, 2004).

4. Pharmacologie

Bien qu'infiniment inférieure à leur affinité pour l'ergostérol, les polyènes possèdent une affinité non négligeable pour le cholestérol, l'équivalent chez l'homme de l'ergostérol fongique, ce qui leur confère une forte toxicité, à l'origine de multiples effets secondaires (Lemke *et al.*, 2005). Ainsi, seule l'AmB est utilisée par voie systémique en raison de sa moindre toxicité, la nystatine et la natamycine n'étant utilisées que par voie locale ou orale. Ces dernières possèdent heureusement une action systémique très limitée car leur absorption par les muqueuses gastro-intestinales lors d'une administration orale est quasi inexistante (Zotchev, 2003; Cevher *et al.*, 2008). La natamycine est d'ailleurs pour ces raisons utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour la conservation d'aliments, notamment pour limiter la croissance fongique à la surface de certains fromages (Holley, 1981; Suloff *et al.*, 2003).

Pour ces raisons, l'AmB est de loin l'antifongique polyénique de choix pour traiter les infections systémiques. Etant très peu hydrosoluble et donc très peu absorbée au niveau de la muqueuse gastro-intestinale, son action systémique nécessite une administration intraveineuse (Lemke *et al.*, 2005). Toutefois, son administration s'accompagne d'effets indésirables parfois importants, surtout au niveau du foie et des reins. L'utilisation de formulations récentes, telles que les complexes lipidiques d'AmB ou l'AmB liposomale, permet de limiter ces effets secondaires (Barrett *et al.*, 2003).

5. Spectre d'activité

Depuis plus de 40 ans, l'AmB est, avec certains antifongiques azolés, la molécule de choix pour traiter les infections fongiques systémiques, et ce malgré sa relative toxicité lorsqu'elle est administrée à forte dose (Ellis, 2002). Ceci est dû principalement au fait que les cas de résistance à cette molécule sont rares, mais aussi et surtout à son spectre d'activité étendu (Ellis, 2002). En effet, l'AmB est non seulement active sur la plupart des levures et champignons filamenteux (elle est ainsi indiquée pour le traitement des infections à *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, ...), mais elle est également un antiparasitaire de premier ordre, utilisé pour traiter les leishmanioses et certaines amibiases (Lemke *et al.*, 2005). La nystatine et la natamycine, bien que contre-indiquées pour une utilisation systémique, ont quant à elles démontré leur efficacité sur les champignons des genres *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* et *Fusarium*. La nystatine est par exemple un antifongique de choix pour traiter les candidoses cutanées, vaginales ou oesophagiennes, et la natamycine peut être utilisée pour le traitement des kératoses fongiques ou des infections fongiques de la cornée (Zotchev, 2003).

6. Résistance aux polyènes

a. Incidence

Bien que de plus en plus fréquemment rapportée, la résistance aux polyènes reste un événement relativement rare chez les isolats cliniques de champignons pathogènes (Kanafani et Perfect, 2008). Cette observation est tout d'abord la conséquence directe du mode d'action de ces antifongiques, leur cible extracellulaire limitant le nombre de mécanismes permettant d'échapper à leur action.

Cependant, si la résistance aux polyènes reste un événement rare, c'est aussi parce que la sensibilité aux polyènes des isolats cliniques fongiques n'est pas systématiquement déterminée et que les méthodes de détermination de sensibilité ne sont pas suffisamment standardisées (Pfaller et Yu, 2001). L'incidence de souches résistantes aux polyènes pourrait être ainsi largement sous-estimée.

Si la plupart des espèces fongiques sont considérées comme sensibles aux antifongiques polyéniques, il semble que certaines espèces leur soient naturellement peu

sensibles, comme *C. glabrata* chez les levures ou *Scedosporium prolificans* et *Aspergillus terreus* chez les filamenteux (Ellis, 2002), trois espèces considérées comme susceptibles dose-dépendantes. Il semble également que certaines espèces aient une plus forte propension à développer une résistance aux polyènes. C'est notamment le cas pour les espèces *C. lusitaniae* (Powderly *et al.*, 1988; Karyotakis et Anaissie, 1994), *C. guilliermondii* (Powderly *et al.*, 1988), *C. krusei* (Ellis, 2002) et *Trichosporon beigeli* chez les levures. Chez les champignons filamenteux, on peut nommer *Scedosporium apiospermum* et *Sporothrix schenckii* (White *et al.*, 1998; Perea et Patterson, 2002).

b. Mécanismes

Les polyènes n'ont pas besoin d'agir au niveau intracellulaire pour exercer leur activité lytique puisqu'ils s'intègrent à la membrane plasmique par sa face externe. Ils échappent ainsi à une éventuelle métabolisation par les enzymes intracellulaires ainsi qu'aux systèmes d'efflux, dont l'hyperactivité est à l'origine de la majorité des résistances aux antifongiques azolés. Ainsi, la seule possibilité pour la cellule fongique de résister à l'action des polyènes est de modifier leur cible, l'ergostérol. Ce dernier étant nécessaire à l'intégrité de la membrane et donc à la survie cellulaire, les alternatives permettant de le substituer sont en nombre limité.

D'autres travaux ont cependant suggéré un autre mécanisme possible expliquant la résistance aux polyènes. Yoon et ses collaborateurs ont montré chez *Candida lusitaniae* que la résistance aux polyènes pouvait être la conséquence d'une diminution de l'accessibilité de la membrane, par modification de la structure de la paroi fongique (Yoon *et al.*, 1999).

Bien que rarement décrits, les mécanismes de résistance acquise ou induite aux polyènes ont été étudiés chez plusieurs espèces fongiques. Comme nous l'avons vu, il s'agit, à quelques exceptions près, d'une diminution du contenu en ergostérol des membranes plasmiques, voire une absence totale d'ergostérol dans les membranes, par mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Vanden Bossche *et al.*, 1994). Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux polyènes ont été principalement décrits chez des mutants induits de levures du genre *Candida* et chez *S. cerevisiae*. Ainsi, la délétion du gène *ERG11* chez *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 2003) ou du gène *ERG3* chez *S. cerevisiae* (Watson *et al.*, 1998) conduisent à l'obtention de colonies présentant une résistance croisée aux antifongiques azolés et polyéniques. De même, l'inactivation du gène *ERG6* conduit à une résistance à l'AmB chez *C. lusitaniae* (Young *et al.*, 2003) et chez *S. cerevisiae* (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998). Toutefois, peu de données concernant les mécanismes de résistance aux antifongiques polyéniques sont disponibles pour des isolats cliniques de champignons pathogènes et les études ont essentiellement porté sur l'espèce *C. albicans*. Ainsi, des travaux ont montré qu'un déficit en $\Delta 5,6$ désaturase, codée par le gène *ERG3*, pouvait être à l'origine de la résistance aux polyènes chez des

isolats cliniques de *C. albicans* prélevés chez des patients atteints de leucémie ou du SIDA (Kelly *et al.*, 1997b; Nolte *et al.*, 1997).

C. Les azolés

1. Historique, structure et pharmacologie

Les dérivés azolés sont de loin les antifongiques les plus utilisés en clinique et pour cette raison, ce sont aussi les antifongiques les plus étudiés par la communauté scientifique, aussi bien au niveau de leur propriétés pharmacologiques et de leur mode d'action, que des stratégies de défense adoptées par les micro-organismes. Les antifongiques azolés ont été également très étudiés par les industries pharmaceutiques qui n'ont cessé d'améliorer leur efficacité, à la recherche de l'antifongique parfait.

Les dérivés azolés sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazolés, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (Figure 10; Maertens, 2004).

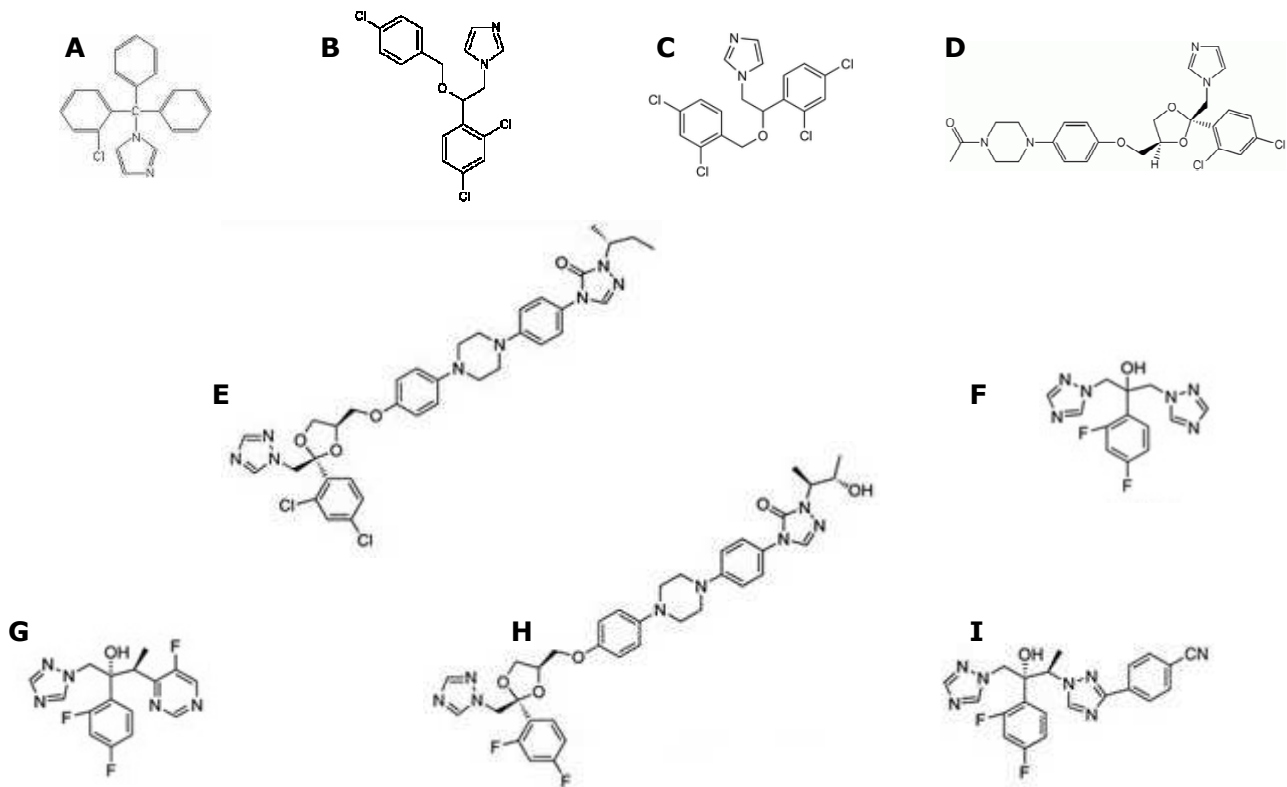


Figure 10 : Structure chimique des principaux antifongiques azolés. Sont représentés quatre imidazolés : le clotrimazole (A), l'éconazole (B), le miconazole (C) et le kétoconazole (D); deux triazolés : l'itraconazole (E) et le fluconazole (F); ainsi que les trois triazolés dits de seconde génération : le voriconazole (G), le posaconazole (H) et le ravuconazole (I).

Le premier antifongique azolé est synthétisé par Woolley en 1944, mais ce n'est qu'en 1958 que la communauté scientifique commence à s'intéresser aux azolés pour leurs propriétés antifongiques (Woolley, 1944). Vers la fin des années 1960, le clotrimazole, l'éconazole et le miconazole, trois imidazolés, sont mis sur le marché (Fromtling, 1988). Cependant, leur utilisation se limite à un usage externe en raison de leur forte toxicité lors d'une administration orale (Burgess et Bodey, 1972; Tettenborn, 1974). Le miconazole, en 1968, est le premier antifongique utilisable par injection parentérale, mais en raison de sa forte toxicité et de son spectre d'activité peu étendu (Heel *et al.*, 1980), son utilisation a peu à peu diminué jusqu'à l'arrêt de sa commercialisation.

En 1981, la Food and Drug Administration (FDA) approuve un nouvel imidazolé, le kétoconazole, développé par Heeres et ses collaborateurs (Heeres *et al.*, 1979). Il sera pendant près de 10 ans le seul antifongique disponible pour traiter les infections fongiques systémiques. Cependant, son absorption lors d'une administration orale est très variable et aucune forme injectable n'a été mise au point; il ne franchit pas la barrière méningée et montre une moindre efficacité chez les patients immunodéprimés (Van Der Meer *et al.*, 1980; Brass *et al.*, 1982; Perfect *et al.*, 1982; Fromtling, 1988). De plus, ses effets secondaires peuvent être non négligeables comme une diminution de la synthèse de testostérone ou des glucocorticoïdes et des atteintes hépatiques ou gastrointestinales sévères (Pont *et al.*, 1982; Lewis *et al.*, 1984; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group, 1985). Enfin, de nombreuses interactions médicamenteuses ont été rapportées.

C'est pour ces raisons que les triazolés ont fait leur apparition. Le fluconazole devient utilisable en clinique en 1990. Contrairement aux imidazolés, il est très hydrosoluble et donc facilement administré par voie intraveineuse, son absorption après administration orale est quasi totale et il diffuse largement dans tout l'organisme, y compris dans le liquide céphalo-rachidien (Arndt *et al.*, 1988; Brammer *et al.*, 1990). Il est indiqué pour le traitement des candidoses superficielles (oropharyngées, oesophagiennes ou vaginales), des candidoses disséminées, des méningites à cryptocoques, des coccidioïdomycoses et des candidoses mucocutanées. Ses bonnes propriétés pharmacocinétiques ainsi que son spectre d'activité étendu ont fait du fluconazole l'antifongique de référence pendant les années 1990. Cependant, son utilisation systématique aussi bien à titre curatif que prophylactique a joué en sa défaveur. En effet, la mise sur le marché du fluconazole coïncide avec l'augmentation des cas de résistance aux antifongiques azolés ainsi qu'à un changement de l'incidence des différentes espèces rencontrées en mycologie médicale.

Dans le but de trouver une molécule ayant un spectre plus étendu que le fluconazole, l'itraconazole est mis au point et approuvé par la FDA en 1992. En effet, ce triazolé a un spectre d'activité plus étendu que le fluconazole, comparable à celui du kétoconazole. De plus, il est beaucoup moins toxique que ce dernier et l'a peu à peu remplacé pour le traitement des histoplasmoses, blastomycoses et paracoccidioïdomycoses. Il est également

efficace, contrairement au fluconazole, sur les genres *Aspergillus* et *Sporothrix* (Espinell-Ingroff *et al.*, 1984). Cependant, en raison de son caractère liposoluble, l'itraconazole possède une toxicité plus forte que le fluconazole ainsi que des propriétés pharmacocinétiques moins intéressantes. Il est donc seulement indiqué pour le traitement des onychomycoses et des infections fongiques superficielles ainsi que dans certains cas d'aspergilloses systémiques (Terrell, 1999). Une nouvelle formulation d'itraconazole, permettant d'améliorer son absorption et de diminuer sa toxicité, a été approuvée par la FDA en 1997 (Barone *et al.*, 1998). De même, une forme injectable d'itraconazole a été récemment mise à la disposition des praticiens (Boogaerts *et al.*, 2001).

Cependant, le fluconazole et l'itraconazole ne sont pas encore les antifongiques parfaits puisqu'ils présentent des interactions médicamenteuses non anodines, par exemple avec les traitements anti-rejet, la chimiothérapie et le traitement du SIDA. Ces interactions se traduisent par une diminution de la concentration en azolé ou même par une augmentation de leur toxicité (Albengres *et al.*, 1998). De plus, l'itraconazole et le fluconazole ne sont pas efficaces contre certains pathogènes émergents tels que les genres *Scedosporium*, *Fusarium* et les Zygomycètes. Enfin, la résistance à ces antifongiques devient de plus en plus fréquente (Denning *et al.*, 1997).

Les triazolés dits de deuxième génération ont donc fait logiquement leur apparition. Ce sont le voriconazole, le posaconazole et le ravuconazole, respectivement approuvés par la FDA en 2002 et en 2006 pour les deux premiers et en cours d'évaluation clinique pour le dernier. Ils possèdent un spectre d'activité plus étendu que l'itraconazole, puisqu'ils sont actifs sur les genres *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Acremonium* et *Trichosporon*, les champignons dimorphiques, les dermatophytes et sur *Cryptococcus neoformans* (Sabo et Abdel-Rahman, 2000). Bien que ces azolés de deuxième génération aient démontré une plus grande efficacité que les premiers triazolés sur les genres *Candida* et *Aspergillus* (Chiou *et al.*, 2000), et bien qu'ils soient disponibles aussi bien sous forme orale qu'injectable, leurs effets secondaires et les possibilités d'interactions médicamenteuses sont similaires à ceux de l'itraconazole et du fluconazole (Potoski et Brown, 2002). De même, les isolats résistants aux triazolés classiques présentent le plus souvent une résistance croisée au voriconazole, au posaconazole et au ravuconazole.

2. Mode d'action

Les antifongiques azolés ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane fongique. Ils inhibent spécifiquement la lanostérol 14 α déméthylase à cytochrome P450, codée par le gène *ERG11*. Cette inhibition se fait par la liaison de l'atome d'azote libre du cycle imidazolé ou triazolé à l'atome de fer de l'hème de l'enzyme (Figure 11) et a pour conséquence l'accumulation de dérivés 14 α méthylés, dont la

métabolisation par les enzymes situées en aval d'ERG11p dans la voie de biosynthèse produit des dérivés toxiques, incapables de remplacer l'ergostérol (Carillo-Munoz *et al.*, 2006).

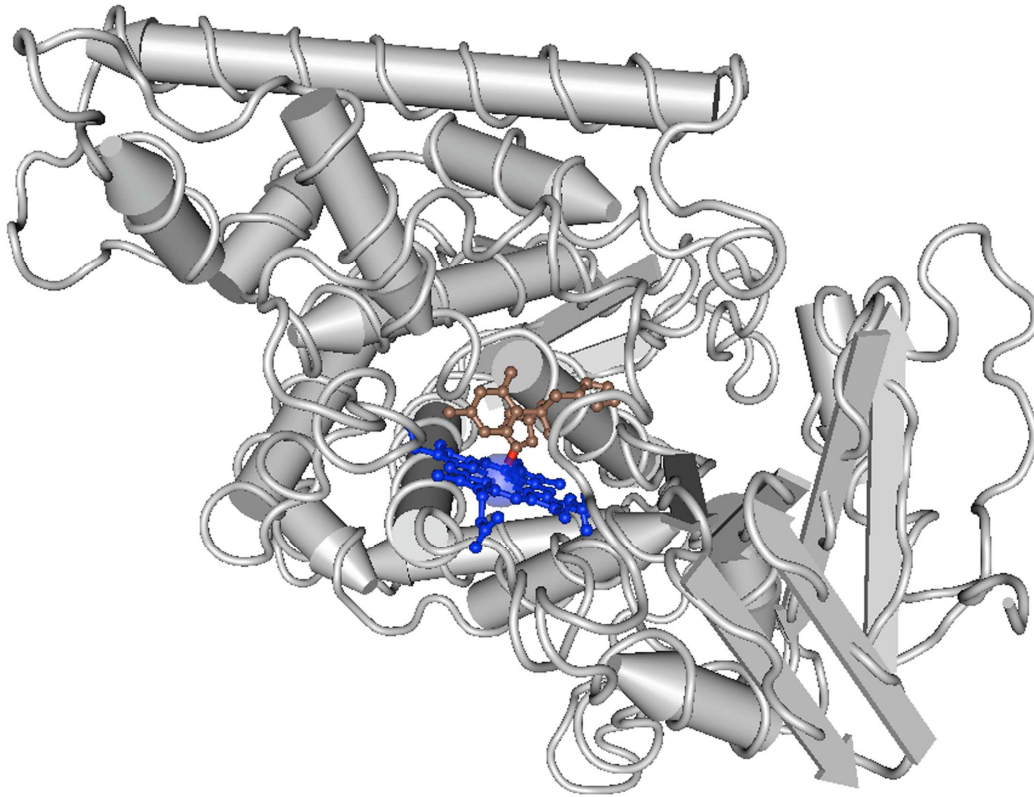


Figure 11 : Structure tri-dimensionnelle de la stérol 14 α déméthylase de *Mycobacterium tuberculosis* en interaction avec le fluconazole, d'après Podust *et al.* (2001). En gris, ERG11p; en marron, fluconazole; en bleu, hème; et en rouge, liaison entre l'azote libre du fluconazole et le fer de l'hème.

La spécificité de chaque azolé est dépendante de la nature du substituant sur le carbone en position β sur la chaîne latérale greffée sur l'atome d'azote en 1 du noyau imidazole ou triazole. De même, les effets secondaires observés avec les antifongiques azolés sont le plus souvent la conséquence de l'affinité des azolés pour les cytochromes P450, présents également chez l'homme (White *et al.*, 1998; Sanglard, 2002; Carillo-Munoz *et al.*, 2006,).

3. Mécanismes de résistance

Bien que depuis quelques années la fréquence de la résistance aux antifongiques azolés n'augmente plus en raison de l'amélioration des thérapies antifongiques, le début des années 1990 s'est accompagné d'une augmentation considérable du nombre d'isolats cliniques résistants. De même, si le profil des espèces rencontrées s'est modifié depuis ces vingt dernières années, c'est en partie en raison de l'utilisation croissante des antifongiques azolés et de la sélection des espèces qui leurs sont le moins sensibles, ou ayant la plus forte propension à développer une résistance à cette classe d'antifongiques.

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux antifongiques azolés ont été largement étudiés, principalement chez les levures du genre *Candida* et *S. cerevisiae*, et peuvent être répartis en quatre catégories (Figure 12; Sanglard, 2002).

- une diminution de l'affinité des azolés pour leur cible peut être à l'origine de la résistance. Ainsi, une mutation ponctuelle du gène *ERG11*, se traduisant par une modification de la séquence en acides aminés de la lanostérol 14 α déméthylase, suffit à empêcher la liaison entre l'antifongique et l'enzyme (Vanden Bossche *et al.*, 1990, Marichal *et al.*, 1999). De nombreuses mutations, dont le rôle dans la résistance a été démontré expérimentalement, ont été identifiées, notamment chez *Cryptococcus neoformans* (Lamb *et al.*, 1995), *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1998) et *C. tropicalis* (Vandeputte *et al.*, 2005).
- la résistance aux antifongiques azolés peut également résulter d'une multiplication du nombre de copies de la 14 α déméthylase. Dans cette situation, les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanostérol en stérol 14 α déméthylé. Ainsi, la surexpression du gène *ERG11*, par duplication chromosomique ou modification du promoteur, comme l'augmentation de la demi-vie des ARNm, peut aboutir à la résistance (Vanden Bossche *et al.*, 1994; Sanglard *et al.*, 1995; Marichal *et al.*, 1997; White, 1997; De Backer *et al.*, 2001).
- un mécanisme moins fréquemment observé chez les isolats cliniques résistants aux antifongiques azolés est le blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol après l'intervention de l'enzyme codée par *ERG11*. L'effet fongistatique des azolés reposant sur la conversion en stérols toxiques des intermédiaires 14 α méthylés synthétisés suite au blocage de la lanostérol 14 α déméthylase, la mutation d'un gène responsable de la synthèse de ces intermédiaires toxiques aura pour conséquence une résistance aux azolés. C'est notamment le cas pour *C. albicans*, chez qui la mutation du gène *ERG3* aboutit à une résistance aux azolés (Nolte *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 1999).
- enfin, la résistance peut être la conséquence d'une diminution de la concentration intracellulaire en antifongique, par surexpression des protéines d'efflux. Les protéines d'efflux sont des transporteurs membranaires très ubiquitaires qui ont pour rôle de rejeter en dehors des cellules une grande variété de substances.

Les azolés peuvent être les substrats de deux types de protéines d'efflux, les protéines de type ABC pour "ATP-binding cassette", utilisant l'ATP comme source d'énergie pour le transfert, et les MFS pour "major facilitator superfamily", qui utilisent comme source d'énergie un gradient de protons (Marger et Saier, 1993; Michaelis et Berkower, 1995). Il semble que les ABC protéines soient capables de prendre en charge tous les azolés alors que les MFS seraient plus spécifiques du fluconazole (Sanglard *et al.*, 1995 et 1996).

La résistance aux antifongiques azolés par surexpression des protéines d'efflux est le mécanisme le plus fréquemment retrouvé chez les isolats cliniques des espèces appartenant au genre *Candida*. Chez *C. glabrata* et *C. albicans*, ce mécanisme est aussi à l'origine de la résistance aux azolés des mutants *petite*, pour qui une surexpression des gènes *CDR1* et *CDR2*, codant des ABC protéines, a été identifiée (Sanglard *et al.*, 2001; Brun *et al.*, 2004; Coste *et al.*, 2004).

Si la surexpression des protéines d'efflux est maintenant aisément caractérisée chez les isolats cliniques résistants aux antifongiques azolés, l'enjeu de la recherche dans ce domaine depuis le début des années 2000 est de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la dérégulation de l'expression de ces gènes. Il semble que la surexpression des gènes codant les protéines d'efflux soit plus dépendante du contrôle de ces gènes par un facteur de transcription que par une modification de leur promoteur ou de l'augmentation de la demi-vie des ARNm (Borst, 1991).

En effet, les gènes codant les protéines d'efflux de type ABC contiennent dans leur promoteur une séquence, nommée PDRE pour "pleiotropic drug responsive element", reconnue par un facteur de transcription appelé *PDR1* chez *S. cerevisiae* (Balzi *et al.*, 1987) et *C. glabrata* (Tsai *et al.*, 2006) ou *TAC1* chez *C. albicans* (Coste *et al.*, 2004). Le rôle de ce facteur de transcription dans la surexpression des protéines d'efflux de type ABC, et par conséquent dans la résistance aux azolés, a été mis en évidence. Ainsi, la disruption de ce gène chez des isolats résistants aux azolés de *C. glabrata* aboutit à la restauration d'une sensibilité normale (Vermitsky *et al.*, 2006). De même, des travaux ont montré qu'une activation constitutive de ce facteur de transcription, obtenue par mutation ponctuelle du gène correspondant, était suffisante pour induire la résistance aux antifongiques azolés (Devaux *et al.*, 2001). Cependant, si des travaux récents suggèrent que les azolés sont capables de se lier directement au facteur de transcription et de l'activer (Thakur *et al.*, 2008), les mécanismes à l'origine de son activation chez les isolats cliniques résistants restent à élucider. Un début de réponse a été fourni pour *C. albicans*. En effet, des travaux récents ont montré que chez des isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azolés, des mutations portées à l'état homozygote sur le gène *TAC1* peuvent aboutir à une activation constitutive de l'expression de ce facteur de transcription (Coste *et al.*, 2006). Une dizaine de ces mutations conférant une activation constitutive ont été identifiées (Coste *et al.*, 2007). De même, comme précédemment décrit pour le gène *ERG11*, la duplication du chromosome

5, porteur du gène *TAC1*, peut aboutir à une surexpression des protéines d'efflux et donc à la résistance aux azolés par augmentation du nombre de copies du gène (Coste *et al.*, 2007).

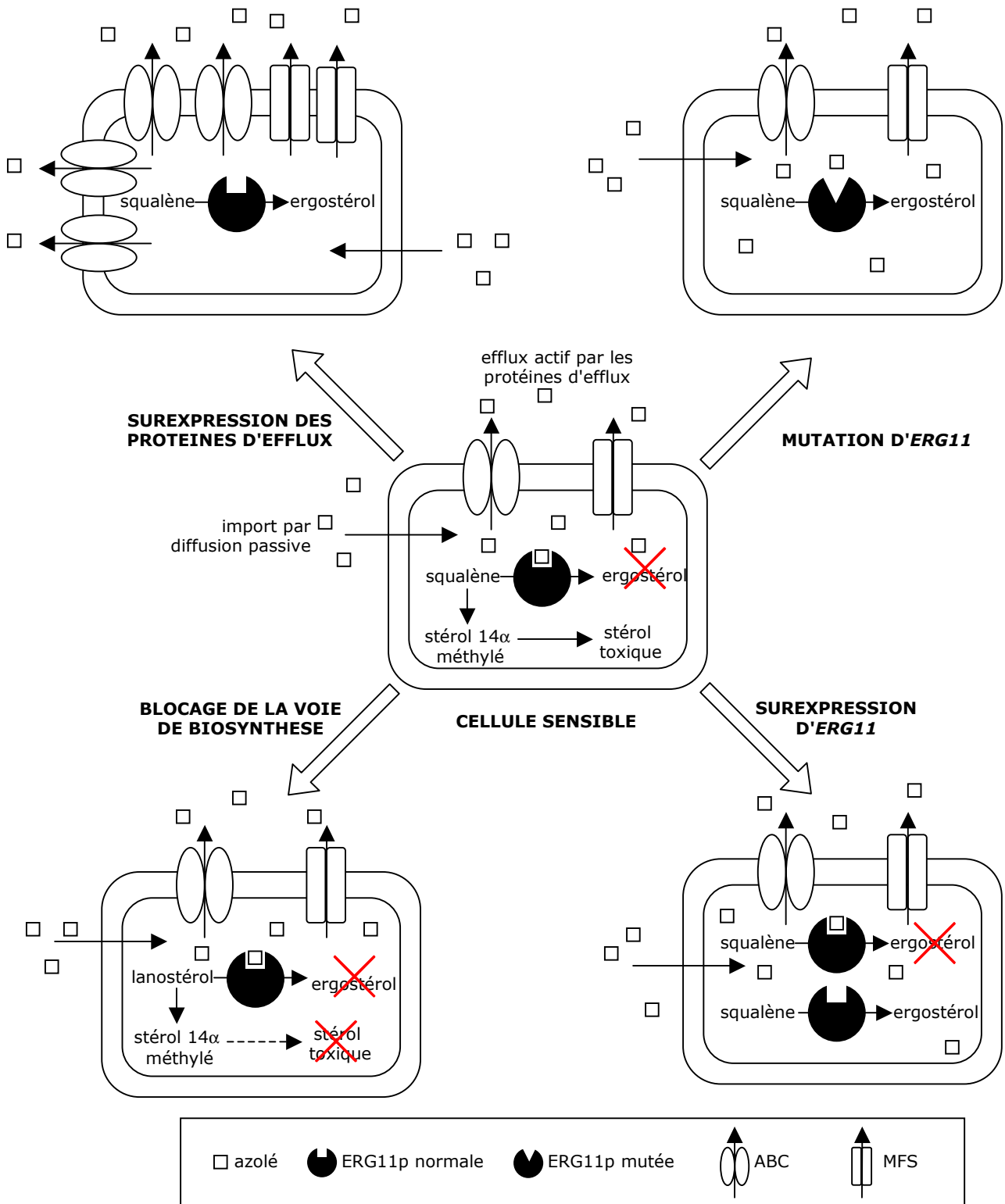


Figure 12 : Modélisation cellulaire des principaux mécanismes de résistance aux antifongiques azolés, d'après Sanglard (2002).

Par ailleurs, si un mécanisme moléculaire basé sur un évènement mutationnel peut expliquer la résistance aux azolés, cette résistance peut également résulter d'un mécanisme épigénétique, par exemple la capacité à former des biofilms qui limitent le passage de l'antifongique à l'intérieur de la cellule (Douglas, 2003). Un autre exemple de mécanisme non-moléculaire participant à la résistance aux azolés est la capacité à contourner l'absence d'ergostérol suite au blocage de sa voie de biosynthèse par l'antifongique. Ce mécanisme est observé chez *C. glabrata* qui, contrairement aux autres levures du genre *Candida* et notamment à *C. albicans*, mais comme *S. cerevisiae*, est capable d'assimiler et d'utiliser une source de stérol exogène en présence d'azolés, telle que le cholestérol présent chez l'homme (Nakayama *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2004; Bard *et al.*, 2005). Cette observation pourrait d'ailleurs en partie expliquer la moindre sensibilité de cette espèce aux antifongiques azolés.

D. Les échinocandines

1. Historique, structure et pharmacologie

Depuis ces 15 dernières années, les échinocandines représentent la seule nouvelle classe d'antifongiques mise à disposition des praticiens pour lutter contre les infections fongiques invasives (Denning, 2002).

A l'heure actuelle, trois échinocandines ont vu leur utilisation clinique approuvée aux Etats-Unis par la FDA et par la suite en Europe par l'Agence Européenne pour l'Evaluation des Médicaments (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - EMEA): la caspofungine en 2001 par la FDA et en 2002 par l'EMEA, la micafungine en 2005 et enfin l'anidulafungine en 2006.

Les échinocandines sont des dérivés synthétiques de lipopeptides (Figure 13). Ces lipopeptides sont sécrétés à l'état naturel par plusieurs espèces de champignons, telles qu'*Aspergillus rugulovalvus* qui synthétise la caspofungine B, *Zalerion arboricola* la pneumocandine B, ou *Papularia sphaerosperma* la papulacandine.

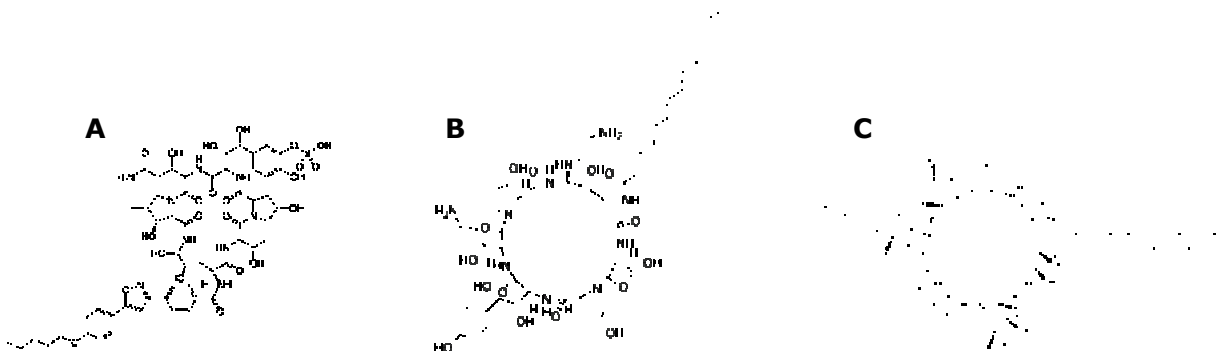


Figure 13 : Structure chimique des trois échinocandines actuellement utilisées en clinique, la micafungine (A), la caspofungine (B) et l'anidulafungine (C).

En raison de leur haut poids moléculaire, ces molécules sont très peu absorbées par voie orale et sont uniquement utilisées par voie intraveineuse. Les caractéristiques pharmacologiques des échinocandines sont une des raisons principales expliquant leur validation par la FDA et l'EMA. Ces molécules présentent en effet une faible toxicité (très peu d'effets secondaires, pour la plupart mineurs, ayant été rapportés), une vitesse d'élimination très lente qui permet de n'effectuer qu'une administration par jour, ainsi qu'une faible interaction avec d'autres médicaments à l'inverse des autres antifongiques (Denning, 2002). L'association d'échinocandines avec l'amphotéricine B ou un dérivé azolé aboutit d'ailleurs le plus souvent à un effet synergique ou tout au moins additif (Franzot et Casadevall, 1997; Pfaller *et al.*, 1999).

La deuxième raison expliquant la mise sur le marché des échinocandines est leur spectre d'activité. En effet, les échinocandines sont efficaces sur les genres *Candida* et *Aspergillus*, bien que ces molécules soient, pour une raison encore non totalement élucidée, fongicides chez *Candida* et seulement fongistatiques sur les *Aspergillus* (Espinel-Ingroff, 1998; Oakley *et al.*, 1998). Il existe cependant quelques exceptions, parmi lesquelles *Cryptococcus neoformans* (Feldmesser *et al.*, 2000), les espèces du genre *Trichophyton* ainsi que celles appartenant au genre *Fusarium*, qui sont insensibles aux échinocandines. D'autres espèces semblent avoir une sensibilité intermédiaire aux échinocandines, par exemple *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans* et *Cladophialophora bantiana* (Espinel-Ingroff, 1998).

Malgré ces exceptions, les échinocandines représentent une alternative de choix pour lutter contre les infections fongiques, notamment parce que la plupart des pathogènes réfractaires à un traitement par les antifongiques traditionnels (polyènes, azolés et 5-FC) répondent bien au traitement par les échinocandines (Denning, 2002). Ainsi, la caspofungine est préconisée pour les candidémies et les candidoses invasives, en prophylaxie des infections fongiques, et pour le traitement de l'aspergillose invasive réfractaire au traitement par l'AmB ou l'itraconazole. La micafungine est quant à elle utilisée pour traiter les candidémies et elle est particulièrement indiquée pour la prophylaxie fongique chez les patients greffés de moëlle osseuse. L'anidulafungine n'a pas d'indications particulières, son principal avantage est d'être lentement dégradée par l'organisme sans intervention du foie ni des reins ; elle peut ainsi être utilisée chez les patients atteints d'insuffisance hépatique et/ou rénale (Cappelletty et Eiselstein-McKittrick, 2007).

2. Mode d'action

L'originalité des échinocandines réside dans leur cible chez le pathogène. Depuis plusieurs années, la paroi fongique était considérée comme une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules à activité antifongique (Georgopapadokou et Tkacz, 1995). En effet, la paroi fongique est constituée de composants qui n'ont pas d'équivalents

chez l'homme (Hector, 1993) et son intégrité est indispensable à la survie du micro-organisme puisque la paroi joue un rôle de protection physique vis-à-vis des cellules immunitaires ou des autres micro-organismes. La paroi est également responsable du maintien de l'osmolarité, de la forme et de la taille de la cellule fongique, mais elle est aussi le siège de nombreuses réactions enzymatiques et a un rôle important dans la communication intercellulaire (Current, 1997). Cette paroi est composée d'une couche interne, constituée par un enchevêtrement de polysaccharides, les $\beta(1-3)$ -glucanes et la chitine, dans lequel sont insérées des mannoprotéines, et d'une couche externe de mannoprotéines (Figure 14; Hector, 1993).

Les échinocandines sont des inhibiteurs non compétitifs de la $\beta(1-3)$ -glucane synthétase, une enzyme qui catalyse la polymérisation de l'uridine diphosphate-glucose en $\beta(1-3)$ glucane, un des composants structuraux responsables du maintien de l'intégrité et de la rigidité de la paroi fongique (Kurtz et Douglas, 1997; Marco *et al.*, 1998). La $\beta(1-3)$ -glucane synthétase est composée d'une sous-unité activatrice et d'une sous-unité catalytique, codée par les gènes *FKS*. Chez la plupart des champignons, deux gènes *FKS* sont présents, *FKS1* serait exprimé lors de la phase végétative de croissance tandis que *FKS2* serait exprimé lors de la sporulation, les échinocandines pouvant inhiber indifféremment les deux formes de l'enzyme (Georgopapadokou et Tkacz, 1995). Le blocage de la $\beta(1-3)$ -glucane synthétase entraîne une fragilisation de la paroi qui se traduit par une fuite des composants intracellulaires, aboutissant à la lyse de la cellule fongique (Stone *et al.*, 2002).

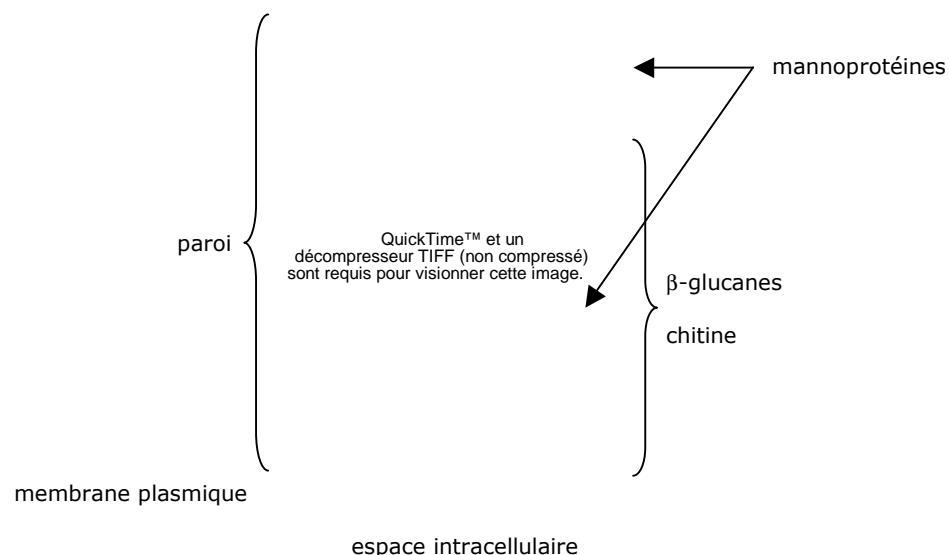


Figure 14 : Représentation schématique de la paroi chez *S. cerevisiae*. D'après Stone *et al.*, (2002).

3. Mécanismes de résistance

La résistance aux échinocandines est un événement relativement rare (Espinel-Ingroff, 2008). On estime à plus de 99% le taux d'isolats sensibles à ces antifongiques chez les espèces du genre *Candida* (Espinel-Ingroff, 2003; Pfaller *et al.*, 2008). Cependant, plusieurs travaux ont mis en évidence une résistance aux échinocandines et déterminé le mécanisme moléculaire à l'origine de cette résistance, en particulier chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Dans tous les cas, il s'agit d'une mutation ponctuelle sur les gènes *FKS1* ou *FKS2* (Park *et al.*, 2005; Balashof *et al.*, 2006). L'analyse de l'ensemble des mutations ponctuelles détectées a permis de définir deux régions dont l'intégrité est indispensable à l'activité de l'enzyme, appelées "hot spots" (Perlin, 2007). Chez les autres espèces, des mutations dans les "hot spots" ont également été mises en évidence, c'est notamment le cas chez *C. glabrata* (Park *et al.*, 2005; Katiyar *et al.*, 2006), *C. krusei* (Kahn *et al.*, 2007) et *A. fumigatus* (Gardiner *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2007).

La résistance innée aux échinocandines chez *C. neoformans* n'est pas liée à une mutation des gènes *FKS1* et *FKS2*. En effet, la $\beta(1-3)$ -glucane synthétase de *C. neoformans* est inhibée par les échinocandines, bien que cet organisme soit capable de croître en présence de fortes concentrations de l'antifongique. Le mécanisme de résistance aux échinocandines chez *C. neoformans* reste donc à élucider, mais il semble lié à la composition de la paroi en polysaccharides qui diffère de celle des autres champignons (Maligie et Selitrennikoff, 2005).

Certaines espèces de levures et de champignons filamenteux sont capables de croître en présence de fortes concentrations en échinocandines, bien supérieures à la CMI (Stevens *et al.*, 2005; Perlin, 2007). Ce phénomène, appelé effet paradoxal, serait dû à une adaptation physiologique du micro-organisme, médiée par la voie de signalisation responsable du maintien de l'intégrité de la paroi, en réponse au blocage de la synthèse des $\beta(1-3)$ -glucanes et à la modification de la structure de la paroi qui en résulte (Stevens *et al.*, 2006; Cota *et al.*, 2007). Des travaux suggèrent que cet effet paradoxal serait plus ou moins important en fonction de la nature de l'agent pathogène, mais également de l'échinocandine utilisée. Ainsi, l'effet paradoxal serait plus prononcé en présence de caspofungine qu'en présence de micafungine ou d'anidulafungine, et il n'est pas observé chez *C. glabrata* (Chamilos *et al.*, 2007). Cependant, la signification clinique de cet effet paradoxal n'a pas encore été étudiée et cet effet n'a d'ailleurs jamais été observé chez les patients traités par les échinocandines (Kanafani et Perfect, 2008).

IV. Biosynthèse et rôles de l'ergostérol

A. Voie de biosynthèse

1. Description

L'ergostérol est spécifique aux membranes cellulaires des champignons, son équivalent chez les mammifères étant le cholestérol. Pour cette raison, sa voie de biosynthèse comporte des étapes spécifiques au règne des Fungi, qui sont donc des cibles de choix pour la conception de molécules antifongiques.

En effet, six enzymes de cette voie de biosynthèse sont des cibles spécifiques de certains antifongiques. L'HMG coA réductase est inhibée par les statines, et notamment la lovastatine, qui présentent des propriétés antifongiques, mais sont utilisées essentiellement pour le traitement de l'hypercholestérolémie chez l'homme (Basson *et al.*, 1986). La squalène monooxygénase (aussi appelée squalène époxydase) est la cible des allylamines telles que la terbinafine, qui est utilisée pour traiter les infections à dermatophytes (Jandrositz *et al.*, 1991). La C14 stérol réductase et la C8 stérol isomérase sont inhibées par le fenpropimorphe, un antifongique de la famille des morpholines principalement utilisées en agriculture (Arthington *et al.*, 1991; Lorenz et Parks, 1991 et 1992). La 14 α stérol déméthylase et la C22 stérol désaturase, les deux seules enzymes à cytochrome P450 de la voie, sont inhibées spécifiquement par les antifongiques azolés (Kalb *et al.*, 1987; Skaggs *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1997a). Enfin, le produit final de la voie, l'ergostérol, est la cible des antifongiques polyéniques.

La voie de biosynthèse de l'ergostérol est une voie métabolique complexe, étudiée principalement chez l'organisme de référence *S. cerevisiae*. Elle comporte plus de 20 enzymes (Figure 15; Paltauf *et al.*, 1992; Lees *et al.*, 1995). La principale singularité de cette voie, qui explique en partie sa complexité, réside dans le fait qu'elle n'est pas une voie métabolique figée, c'est-à-dire qu'une même enzyme peut prendre en charge des substrats différents et ainsi court-circuiter la voie (Lees *et al.*, 1995). Ainsi, toutes les enzymes ne sont pas indispensables et l'inactivation (*in vivo* ou *in vitro*) de certains gènes reste viable pour le champignon. Cette singularité est d'ailleurs à l'origine de résistances aux antifongiques polyéniques et azolés, les deux classes moléculaires ayant pour cible l'ergostérol et sa voie de biosynthèse.

Ainsi, la délétion systématique des phases ouvertes de lecture du génome de *S. cerevisiae* a permis de mettre en évidence le caractère essentiel des gènes *ERG1*, *ERG7*, *ERG8*, *ERG9*, *ERG10*, *ERG11*, *ERG12*, *ERG19*, *ERG20*, *ERG24*, *ERG25*, *ERG26* et *ERG27* (Giaever *et al.*, 2002). La plupart de ces gènes essentiels codent des enzymes très précoces de la voie de biosynthèse de l'ergostérol et, chez *S. cerevisiae*, les mutants pour ces gènes sont auxotrophes pour le mévalonate ou l'ergostérol, en fonction de la position du gène dans la voie. La délétion des gènes *ERG11* et *ERG24* est létale, mais elle peut être compensée par une mutation inactivant le gène *ERG3* pour *ERG11* (Bard *et al.*, 1993) ou par une culture en

anaérobiose pour *ERG24* (Marcireau *et al.*, 1992). De même, la délétion du gène *ERG25* est viable en présence d'azolés dans un contexte où les gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème (*HEM2* ou *HEM4*) sont inactifs (Gachotte *et al.*, 1997).

En revanche, la délétion des gènes *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG5* ou *ERG6* est viable et se traduit par une absence d'ergostérol, une diminution des capacités de croissance, ou une modification de la sensibilité aux azolés et/ou aux polyènes (Gaber *et al.*, 1989; Arthington *et al.*, 1991; Ashman *et al.*, 1991; Lorenz et Parks, 1992; Smith 1993; Hemmi *et al.*, 1995; Lees *et al.*, 1995; Parks et Casey, 1995).

2. Régulation

Le début de la voie de biosynthèse de l'ergostérol est commun à tous les terpénoïdes tels que le dolichol, les protéines sur lesquelles sont branchés des groupements farnésyl, l'hème ou l'ubiquinone. Cette voie est même appelée la voie du mévalonate, dont le produit final, le farnésyl pyrophosphate, est à l'intersection de nombreuses voies métaboliques (Goldstein et Brown, 1990; Paradise *et al.*, 2008). Pour cette raison, la machinerie enzymatique responsable de ces premières réactions est extrêmement régulée, notamment par un mécanisme de rétro-contrôle négatif exercé par le farnésyl pyrophosphate sur sa propre biosynthèse (Dimster-Denk *et al.*, 1999).

La partie propre à la synthèse de l'ergostérol commence à partir de la formation du squalène et le premier intermédiaire stérolique synthétisé est le lanostérol. Le rétrocontrôle négatif est également un mécanisme par lequel l'ergostérol est capable de réguler sa propre biosynthèse (Servouse et Karst, 1986; Goldstein et Brown, 1990; Dimster-Denk et Rine, 1996; Smith *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 2001). Des travaux ont mis en évidence la présence d'une séquence régulatrice au niveau du promoteur des gènes appartenant à la voie de biosynthèse (Dimster-Denk et Rine, 1996). Cette séquence, appelée SRE pour "Sterol Response Element", est reconnue par un facteur de transcription appelé SREBP pour "Sterol Response Element Binding Protein". SREBP appartient à la famille des facteurs de transcription de la famille bHLH, il est localisé dans le cytoplasme sous une forme complète. Quand le taux d'ergostérol diminue dans la cellule fongique, SREBP est clivé et sa partie active se retrouve dans le noyau où elle active la transcription des gènes contenant une séquence SRE dans leur promoteur (Gasic, 1994).

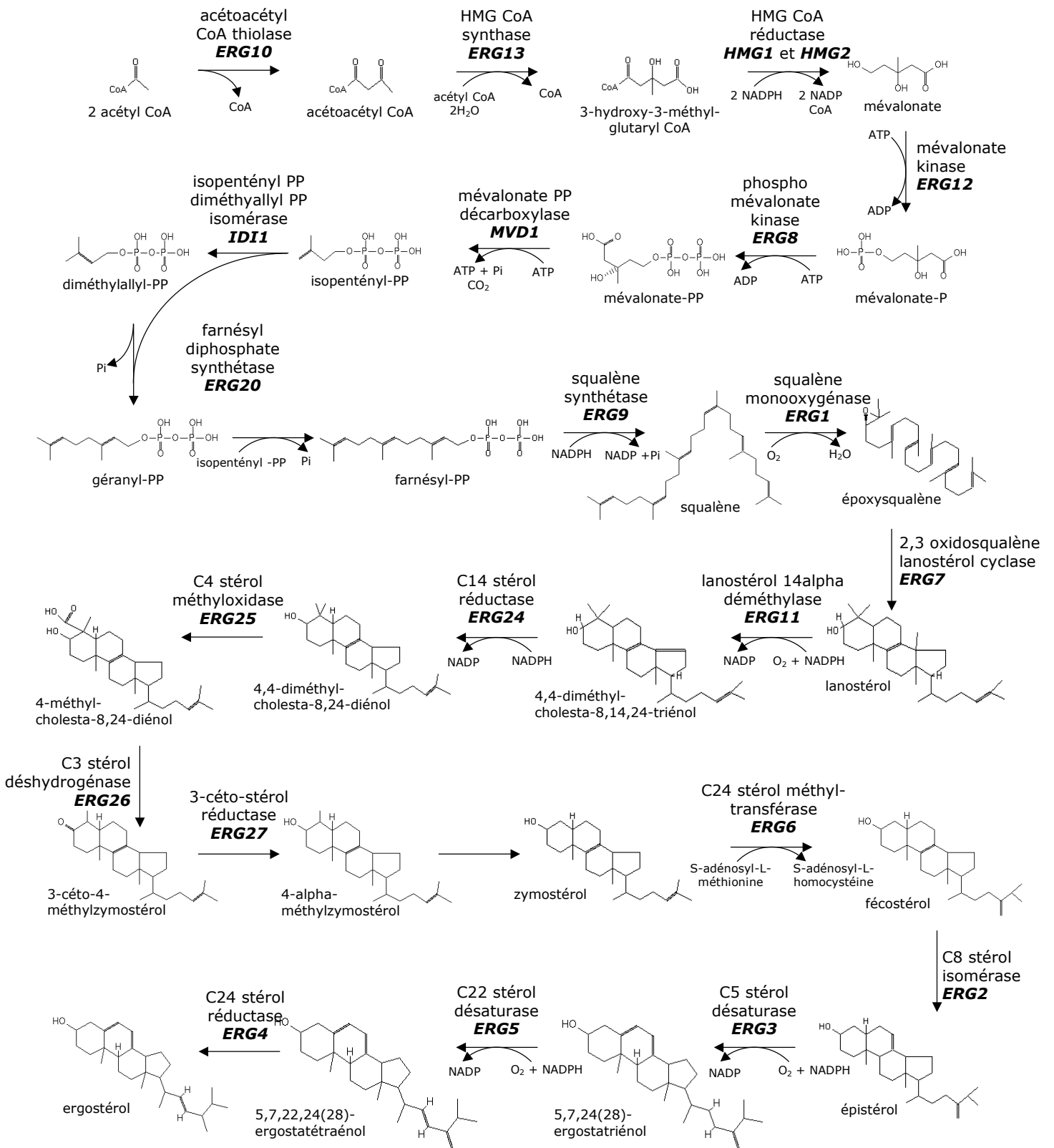


Figure 15 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *S. cerevisiae*. Le nom des gènes codant chaque enzyme est indiqué en gras, d'après Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>; Cherry *et al.*, 1998).

B. Fonctions de l'ergostérol

L'ergostérol, principal composant lipidique des membranes de la cellule fongique avec les sphingolipides, est responsable du maintien des propriétés des membranes cellulaires, tant au niveau de leur fluidité que de leur perméabilité, et ainsi leur permettent d'exercer leur rôle de barrière physique (Lees *et al.*, 1979 et 1989).

L'ergostérol joue également un rôle prépondérant dans la composition en protéines des membranes et par conséquent dans une multitude de phénomènes cellulaires dépendants de ces protéines membranaires. En effet, la présence de radeaux lipidiques, qui sont des portions membranaires dont la composition en stérols se distingue du reste de la membrane cellulaire (Wachtler et Balasubramanian, 2006), détermine l'adressage des protéines membranaires (Bagnat et Simon, 2002). Ainsi, en influençant l'activité des enzymes liées à la membrane, l'ergostérol détermine les capacités de croissance cellulaire ou la progression du cycle cellulaire lui-même (Dahl *et al.*, 1987).

V. Objectifs

L'incidence croissante de l'espèce *C. glabrata*, et le pronostic vital souvent compromis pour les patients atteints de candidose systémique à *C. glabrata*, rendent urgente la connaissance exacte de sa physiologie, de ses mécanismes de virulence et d'échappement à l'action des antifongiques actuellement utilisés en clinique. Par ailleurs, son génome haploïde qui lui confère semble-t-il une plus grande propension à développer une résistance aux différentes classes d'antifongiques, ainsi que sa parenté étroite avec la levure de référence *S. cerevisiae*, facilitent l'étude de la génétique de *C. glabrata*. Nous nous sommes donc proposés de déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance à la 5-FC, aux polyènes et aux azolés chez *C. glabrata*.

En raison de la faible occurrence de la résistance aux antifongiques polyéniques chez les champignons pathogènes, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette résistance demeurent peu étudiés et peu connus. Ainsi, nous nous sommes proposés au cours de ce travail de déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux polyènes chez deux isolats cliniques appartenant à l'espèce *C. glabrata* qui présentaient d'emblée à l'isolement une moindre sensibilité aux polyènes.

Si la plupart des espèces fongiques, à quelques exceptions près, sont sensibles à la 5-fluorocytosine, le développement d'une résistance consécutif à l'exposition à cet antifongique est un phénomène fréquent. Ne disposant pas d'isolats cliniques présentant d'emblée une résistance à la 5-fluorocytosine, nous nous sommes proposés d'induire des mutants résistants chez *C. glabrata* et de déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance à la 5-fluorocytosine pour deux de ces mutants.

Enfin, contrairement à la plupart des autres espèces du genre *Candida*, *C. glabrata* présente une moindre sensibilité aux antifongiques azolés et possède la particularité d'être une levure *petite* positive, c'est-à-dire que la perte totale ou partielle de l'ADN mitochondrial ou une mutation de l'ADN nucléaire, aboutissant à la perte de l'activité respiratoire et à des colonies de petite taille sur milieu fermentescible, est possible et survient même avec une fréquence relativement élevée, à la fois *in vitro* mais également *in vivo*. En outre, cette mutation *petite* s'accompagne habituellement d'une résistance aux antifongiques azolés par surexpression de gènes codant des protéines d'efflux, responsables du rejet accru des azolés en dehors de la cellule. Devant l'isolement au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers d'une souche de *C. glabrata* présentant à la fois une déficience respiratoire et, singulièrement, une hypersensibilité aux antifongiques azolés, nous sommes proposés de déterminer les mécanismes moléculaires responsables de ce phénotype.

Devant le peu de données disponibles concernant les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux polyènes chez les levures pathogènes, nous nous sommes proposés de déterminer la ou les cause(s) moléculaire(s) à l'origine de la moindre sensibilité aux polyènes de deux isolats cliniques de *Candida glabrata*.

Ces deux isolats, dont la faible sensibilité aux polyènes a été déterminée par une méthode de diffusion en gélose et confirmée par détermination de la concentration minimale inhibitrice, ont été identifiés chez deux patients distincts, tous deux traités par de l'amphotéricine B.

Le contenu en stérols de ces isolats a été déterminé quantitativement par spectrophotométrie, mais également qualitativement par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats de ces analyses étaient très proches pour les deux isolats, suggérant un mécanisme similaire. Alors que l'analyse quantitative n'a pas montré de différence significative pour les deux isolats cliniques peu sensibles aux polyènes comparativement à une souche de référence, l'analyse qualitative a permis de mettre en évidence une diminution drastique de l'ergostérol membranaire, accompagnée d'une accumulation d'intermédiaires tardifs de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, suggérant un blocage de cette voie à une de ses dernières étapes.

Le séquençage des gènes *ERG11*, *ERG6*, *ERG5*, et *ERG4*, codant des enzymes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, a confirmé l'origine commune de la résistance aux polyènes chez les deux isolats. En effet, ces deux isolats présentaient une mutation au niveau du gène *ERG6*. Cependant, la nature de cette mutation était différente pour les deux isolats. Chez l'un, le remplacement d'une guanine par une thymine en position 592 de la région codante se traduit par une mutation faux sens, aboutissant à la substitution d'une cystéine par une phénylalanine au niveau de l'enzyme codée par le gène *ERG6*, la C24 stérol méthyltransférase; chez l'autre, la substitution d'une cytosine par une thymine en position 994 introduit un codon stop (mutation non sens) qui tronque l'enzyme de 41 acides aminés. L'étude de la relation structure/fonction dans différents modèles de stérol méthyltransférases a fortement suggéré que ces mutations ont un effet délétère sur l'activité de l'enzyme.

De plus, des expériences de PCR quantitative en temps réel ont montré une surexpression des gènes codant les enzymes impliquées dans les étapes tardives de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, traduisant une induction de cette voie, probablement en réponse au déficit en ergostérol.

De même, nous avons étudié les conséquences des mutations retrouvées chez ces isolats tant sur la morphologie, l'ultrastructure, la vitalité et la viabilité des cellules, que sur leur sensibilité à certaines molécules agissant au niveau de la paroi.

L'isolat porteur de la mutation faux sens présentait une croissance pseudohyphale, indépendamment du milieu de culture utilisé, et des modifications de l'ultrastructure de la paroi des blastoconidies ont été observées, en particulier un amincissement de la couche

pariétale interne. Ces modifications de la structure de la paroi s'accompagnaient également d'une augmentation de la sensibilité des cellules au Calcofluor white. Un amincissement de la couche pariétale interne a également été observé chez l'isolat portant la mutation stop sur le gène *ERG6*, associé à des rétractions du cytoplasme sous-jacent ainsi qu'à une augmentation de la sensibilité des cellules aux agents ayant pour cible la paroi. De plus, ces mutations se traduisent par une diminution notable de la vitalité de ces isolats cliniques, en corrélation avec une mortalité accrue des cellules.

Enfin, les multiples modifications phénotypes observées chez ces isolats cliniques ont été restaurées par la complémentation du gène *ERG6* en transformant ces isolats avec un plasmide centromérique contenant une copie fonctionnelle du gène *ERG6*.

L'ensemble des résultats obtenus démontre que la mutation du gène *ERG6* aboutit à la diminution de la sensibilité aux polyènes chez ces isolats cliniques de *Candida glabrata*. En outre, bien que ces isolats partagent des caractères phénotypiques communs tels qu'une sensibilité accrue aux agents ayant pour cible la paroi ou une vitalité diminuée, il semble qu'en conséquence directe de la nature de la mutation portée par le gène *ERG6*, une activité résiduelle de la stérol méthyltransférase persiste dans le second isolat contrairement au premier isolat à croissance pseudohyphale, expliquant les différences observées entre les deux isolats dans leur mode de croissance.

Ainsi, compte-tenu des conséquences de la modification du contenu en ergostérol des membranes sur l'adressage des protéines membranaires, ces isolats pourraient constituer des outils précieux pour étudier les protéines impliquées dans la libération des cellules filles après bourgeonnement et cloisonnement.

**ETUDE N°1 PUBLIEE DANS LA REVUE ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY
2007, 51:982-990.**

Réduction de la sensibilité aux polyènes associée à une mutation faux-sens sur le gène *ERG6* chez un isolat clinique de *Candida glabrata* présentant une croissance pseudohyphale

Patrick Vandeputte,¹ Guy Tronchin,¹ Thierry Bergès,² Christophe Hennequin,³ Dominique Chabasse,¹ et Jean-Philippe Bouchara¹

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite, UPRES-EA 3142, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, 49933 Angers Cedex 9,¹ Laboratoire de Génétique de la Levure, CNRS UMR 6161, Faculté des Sciences, 86022 Poitiers Cedex,² et Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Tenon, 75970 Paris Cedex 20³

Peu d'informations sont disponibles concernant les mécanismes moléculaires de la résistance aux polyènes chez les levures pathogènes. Un isolat clinique de *Candida glabrata*, dont la moindre sensibilité aux polyènes a été déterminée par une technique de diffusion en gélose et confirmée par détermination de la CMI, a été obtenu chez un patient recevant de l'amphotéricine B. L'analyse quantitative des stérols a révélé une absence d'ergostérol et une accumulation d'intermédiaires tardifs de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, suggérant un blocage de cette voie à une de ses dernières étapes. Le séquençage des gènes *CgERG11*, *CgERG6*, *CgERG5*, et *CgERG4* a révélé la présence d'une seule mutation faux-sens sur le gène *CgERG6*, qui se traduit par la substitution d'une cystéine par une phénylalanine au niveau de la protéine correspondante. En outre, des expériences de PCR quantitative en temps réel ont démontré que les gènes codant les enzymes tardives de la voie de biosynthèse de l'ergostérol étaient surexprimés. De plus, cet isolat présentait une croissance pseudohyphale indépendamment du milieu de culture utilisé et des modifications de l'ultrastructure cellulaire, sous forme d'un amincissement de la couche pariétale interne, ont été observées. Cette modification de la paroi était accompagnée par une augmentation de la sensibilité des cellules au Calcofluor white. Enfin, la complémentation de cet isolat par une copie fonctionnelle du gène *CgERG6* a restauré une sensibilité normale aux polyènes ainsi qu'une morphologie classique pour *C. glabrata*. Ces résultats démontrent que la mutation du gène *CgERG6* peut aboutir à la diminution de la sensibilité aux polyènes et à une croissance pseudohyphale par modification du contenu en ergostérol membranaire.

Reduced Susceptibility to Polyenes Associated with a Missense Mutation in the *ERG6* Gene in a Clinical Isolate of *Candida glabrata* with Pseudohyphal Growth[Ⓞ]

Patrick Vandeputte,^{1*} Guy Tronchin,¹ Thierry Bergès,² Christophe Hennequin,³ Dominique Chabasse,¹ and Jean-Philippe Bouchara¹

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite, UPRES-EA 3142, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, 49933 Angers Cedex 9,¹ Laboratoire de Génétique de la Levure, CNRS UMR 6161, Faculté des Sciences, 86022 Poitiers Cedex,² and Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Tenon, 75970 Paris Cedex 20,³ France

Received 1 December 2005/Returned for modification 30 November 2006/Accepted 2 December 2006

Little information is available about the molecular mechanisms responsible for polyene resistance in pathogenic yeasts. A clinical isolate of *Candida glabrata* with a poor susceptibility to polyenes, as determined by disk diffusion method and confirmed by determination of MIC, was recovered from a patient treated with amphotericin B. Quantitative analysis of sterols revealed a lack of ergosterol and an accumulation of late sterol intermediates, suggesting a defect in the final steps of the ergosterol pathway. Sequencing of *CgERG11*, *CgERG6*, *CgERG5*, and *CgERG4* genes revealed exclusively a unique missense mutation in *CgERG6* leading to the substitution of a cysteine by a phenylalanine in the corresponding protein. In addition, real-time reverse transcription-PCR demonstrated an overexpression of genes encoding enzymes involved in late steps of the ergosterol pathway. Moreover, this isolate exhibited a pseudohyphal growth whatever the culture medium used, and ultrastructural changes of the cell wall of blastoconidia were seen consisting in a thinner inner layer. Cell wall alterations were also suggested by the higher susceptibility of growing cells to Calcofluor white. Additionally, complementation of this isolate with a wild-type copy of the *CgERG6* gene restored susceptibility to polyenes and a classical morphology. Together, these results demonstrated that mutation in the *CgERG6* gene may lead to a reduced susceptibility to polyenes and to a pseudohyphal growth due to the subsequent changes in sterol content of the plasma membrane.

* Corresponding author. Mailing address: Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite, UPRES-EA 3142, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France. Phone: 33 02 41 35 34 72. Fax: 33 02 41 35 36 16. E-mail: patrick.vandeputte@etud.univ-angers.fr.

[Ⓞ]Published ahead of print on 11 December 2006.

Among pathogenic yeast species, *Candida glabrata*, which accounts for 5% to 40% of all yeast isolates depending on the studies (16), ranks second in all clinical forms of candidiasis today. This opportunistic pathogen is critical in immunocompromised patients, like those receiving cytotoxic drugs for bone marrow or organ transplantation as well as patients infected by the human immunodeficiency virus (21, 31). Moreover, due to its poor susceptibility to current antifungals and to the emergence of resistance (26, 29), there is growing concern for the treatment of infections caused by *C. glabrata*.

To fight these infections, four classes of antifungal molecules are now available, e.g., polyenes, pyrimidin analogs, azoles, and echinocandins. Amphotericin B and nystatin, the two major representatives of polyene molecules, destabilize the yeast membrane by their binding to ergosterol, which is the main sterol species of the plasma membrane in yeasts (10).

If resistance mechanisms to azole antifungals have been widely investigated, mechanisms of polyene resistance are poorly understood in clinical isolates, since resistance to these antifungals remains uncommon. Since ergosterol is the main target of polyenes, resistance may arise from a decrease in ergosterol content or from a complete lack of ergosterol in the plasma membrane as a consequence of mutations in genes encoding some of the enzymes involved in the ergosterol biosynthesis pathway (10). Mutations in several genes leading to polyene resistance, but permitting cell viability, have been described for *Candida lusitanae* and *Candida albicans* (28, 42). Proteins encoded by these genes are usually involved in the last steps of the ergosterol pathway, and mutations in these genes lead to a decreased susceptibility to polyenes without destabilization of the plasma membrane. Polyene resistance is frequently associated with resistance to azoles (28). When cells lack ergosterol or when the ergosterol amount dramatically decreases, the role of the cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase in membrane constitution is less important and azole drugs have a lower effect on cell viability and growth.

Among *Candida* species, *C. glabrata* is particular, as it is genetically closer to *Saccharomyces cerevisiae* than other *Candida* species. Moreover, like *S. cerevisiae*, *C. glabrata* cannot perform dimorphic transition from blastoconidia to hyphae or pseudohyphae under usual culture conditions (23). However, *C. glabrata* can produce pseudohyphae, as has been reported for both yeast species, in special culture conditions like nitrogen starvation (8) or in the presence of CuSO₄ (17). The recent recovery in our hospital laboratory of a clinical isolate of *C. glabrata* with a poor susceptibility to polyene drugs associated with a pseudohyphal growth led us to investigate the mechanisms responsible for its particular phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and culture conditions. This study was carried out using two *C. glabrata* clinical isolates. The first one, designated 40400178, was recovered in the Laboratory of Parasitology and Mycology of Angers University Hospital in 2004 from a 75-year-old man hospitalized for an erysipelas of the left leg associated with a heel scab. Despite antibiotic treatment, he developed gangrene and his left leg was amputated in January 2004. From December 2003 to January 2004, he received amphotericin B (1 g per day orally) for stomatitis. At the end of December, he presented with a cutaneous rash and developed a fever at the beginning of January. Culture of a urine sample collected at this date revealed the exclusive growth of a yeast that was identified as *C. glabrata* using the ID32C test strip (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). Antifungal susceptibility testing, performed using a Fungitest strip (Bio-Rad, Marnes-la-Vallée, France), revealed a low susceptibility to amphotericin B for this isolate. The patient died at the end of January 2004. Since no matched susceptible isolate was available for further study of antifungal resistance mechanisms, another clinical isolate, designated 90.1085 and already described in previous studies from our group (4, 5, 9), was used as a control.

The two clinical isolates were maintained by biweekly passages on yeast extract-peptone-glucose (YEPD) agar plates containing (in g/liter): yeast extract, 5; peptone, 10; glucose, 20; chloramphenicol, 0.5; agar, 20. Both isolates were preserved by lyophilization and by freezing at - 80°C in 20% (wt/vol) glycerol. In addition, they were deposited at the IHEM (Institute of Hygiene and Epidemiology, Mycology section) Culture Collection (Brussels, Belgium) and are publicly available under the accession numbers 21231 and 21229 (for 90.1085 and 40400178, respectively).

Antifungal susceptibility testing. Susceptibility to polyene and azole drugs was determined by a disk diffusion method on Casitone agar (Bacto-Casitone, 9 g/liter; glucose, 20 g/liter; yeast extract, 5 g/liter; chloramphenicol, 0.5 g/liter; agar, 18 g/liter; pH 7.2) using Neosensitab tablets from Rosco Diagnostic (Taastrup, Denmark) as previously described (4, 5, 9). Determination of MICs was performed by the Etest procedure on Casitone agar plates according to the recommendations of the manufacturer (AB Biodisk, Solna, Sweden). All experiments were performed in triplicate, and results, which are expressed as mean values, were compared using the Wilcoxon-Mann-Whitney test.

TABLE 1. Oligonucleotides used for gene sequencing and evaluation of gene expression

Gene name (gene product)	GenBank accession no.	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Nucleotide coordinates ^a
<i>CgERG4</i> (C-24[28] sterol reductase)	NC005967	ERG4-1F	CAACACAATAATCGGTGGGGT	44666–44686
		ERG4-1R	CAAGGATGTTACAATAATGCA	44082–44102
		ERG4-2F	CTCCAGTGATAAACATAAACG	44228–44248
		ERG4-2R	AAACACCTGGCAGAGTGTA	43654–43673
		ERG4-3F ^b	TCATCGGCAAACCTTTACCA	43794–43812
		ERG4-3R ^b	AGCCATATGTTTCATATTGCT	43333–43353
		ERG4-4F	TTGACTTGAAGATGTTCTTCG	43380–43400
		ERG4-4R	TGATCCATTGGAAGTGACCA	42895–42914
		ERG4-5F	TGTCTGGCGATAAGACTGTCA	42945–42965
		ERG4-5R	CCCATGAACCGTTTTCTCTT	42414–42433
<i>CgERG5</i> (C-22 sterol desaturase)	NC006036	ERG5-1F	TTGACTACCGTATCGGGGATT	765352–765372
		ERG5-1R	TGGCATTTCATGCTCATATGC	765995–765814
		ERG5-2F ^b	TGCAATTGGGATACCCGATT	765699–765718
		ERG5-2R ^b	CCATCAATTCTTCAAAGGAG	766301–766321
		ERG5-3F	AAAGCCCACACCGACTATAGA	766231–766251
		ERG5-3R	GCATCTTGAGAAGCGAACAA	766762–766781
		ERG5-4F	AACCGTACCGACGATGACTCT	766684–766704
		ERG5-4R	ACCGATCAAAGCAGTCATGGT	767215–767235
		ERG5-5F	TCCACACGTTTGTCTAGGTCA	767178–767198
ERG5-5R	CTGGGAAAGATTTGCAATAGG	767510–767530		
<i>CgERG6</i> (Δ[24] sterol C-methyltransferase)	NC006031	ERG6-1F	CGGCATTTGGATTTTCTCGT	444995–445014
		ERG6-1R	TCGGGAGAATTTCAATTCC	445490–445508
		ERG6-2F	CAGTTTATTGTGCTCTTGACG	445443–445463
		ERG6-2R	TGAATCTGGCGATGGTACG	445932–445949
		ERG6-3F ^b	GCATACATGGCCGGTATCAA	445862–445881
		ERG6-3R ^b	ACTTCCATTCACCGGTCAAT	446395–446414
		ERG6-4F	TTTGAAGAACGTCGGTTCG	446317–446336
		ERG6-4R	CATGTGGAATGAAATTCAGTG	446821–446841
<i>CgERG11</i> (lanosterol 14-α demethylase)	L40389	ERG11-1F	CTACAATCGAGTGAGCTTG	17–35
		ERG11-1R	GTAGAACACAAGTGGTGG	729–746
		ERG11-2F	GGTCGTTGAACTATTGGAG	584–602
		ERG11-2R	GGACCCAAGTAGACAGTC	863–880
		ERG11-3F ^b	CCATCACATGGCAATTGC	688–705
		ERG11-3R ^b	GGTCATCTTAGTACCATCC	1445–1463
		ERG11-4F	CGTGAGAAGAACGATATCC	1380–1398
		ERG11-4R	CACCTTCAGTTGGGTAAC	2047–2064
		ERG11-5F	CGCTTACTGTCAATTGGG	1991–2008
		ERG11-5R	GTCATATGCTTGCACTGC	2397–2414
<i>CgERG9</i> (squalene synthase)	AB009978	ERG9 F ^b	TGATTCTGAGGGCTTTGGA	725–743
		ERG9 R ^b	TACAATCGACACCCCTTTGG	1293–1312
<i>CgERG1</i> (squalene epoxydase)	AF006033	ERG1 F ^b	CGTTGCTTTTGTTCATGGTAG	1–21
		ERG1 R ^b	ATACCACCACAGTTAGAGGG	589–609
<i>CgERG2</i> (C-8 sterol isomerase)	NC006035	ERG2 F ^b	TGTACTTGCCAAACACAACG	1142387–1142406
		ERG2 R ^b	ACAAATCCAAAGTGGAGGAGA	1142840–1142860
<i>CgERG3</i> (C-5 sterol desaturase)	L40390	ERG3 F ^b	AAGATTGCGCCTGTTGAGTT	615–634
		ERG3 R ^b	TACCACAGTCGGTGAAGAAGA	1129–1149
<i>CgCDR1</i> (ABC transporter)	AF109723	CDR1 F ^b	GAAGTCTATGGAAGGTGC	1084–1101
		CDR1 R ^b	GTCTAGCGTAAGTCTCTC	1383–1400
<i>CgCDR2</i> (ABC transporter)	AF251023	CDR2 F ^b	GTTGAGTACTGGCACAAAC	362–379
		CDR2 R ^b	GATGGCAAAGAACATGGC	695–712
<i>CgSTE12</i> (MAP-activated transcription factor)	AJ515385	STE12 F ^b	AAGCTGTAACACATCTCATGC	855–875
		STE12 R ^b	AACAGGAGTCATATGCGAAG	1472–1491
<i>CgACT</i> (β actin)	AF069746	ACT F ^b	TATTGACAACGGTTCGGG	949–966
		ACT R ^b	TAGAAAGTGTGATGCCAG	1177–1194

^a Nucleotide coordinates refer to the corresponding gene sequence in the GenBank database.

^b Primers used for evaluation of gene expression.

Gene sequencing. Primers used for *CgERG4*, *CgERG5*, and *CgERG6* gene sequencing are presented in Table 1. They were designed with the WebPrimer program (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) from *C. glabrata* CBS138 *CgERG4*, *CgERG5*, and *CgERG6* gene sequences (GenBank accession numbers NC005967, NC006036, and NC006031, respectively) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). The *CgERG11* gene was sequenced using primers previously designed in our laboratory (5). The sequencing products were prepared as previously described (38) and analyzed on a CEQ8000 DNA analysis system (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA).

mRNA extraction and real-time reverse transcription-PCR. Total RNA was extracted from exponential-phase (24 h at 37°C) YEPD broth cultures as previously described (38) and used to quantify the expression of genes involved in drug efflux (*CgCDR1* and *CgCDR2*) or in ergosterol biosynthesis (*CgERG1*, *CgERG2*, *CgERG3*, *CgERG4*, *CgERG5*, *CgERG6*, *CgERG9*, and *CgERG11*). The mRNA level of *CgSTE12*, a gene coding a transcription factor involved in morphology switching in *C. glabrata* (6), was also quantified. Reverse transcription (RT) and real-time PCR were performed in triplicate as previously described (38), and standard deviations were calculated for each value. Primers used to perform real-time RT-PCR experiments are described in Table 1.

Other phenotype studies. Total sterols of the two clinical isolates were extracted as described before (5), and the amount of $\Delta 5,7$ -dienols was evaluated by the maximum absorbance at 281.5 nm (33). The sterol species of the heptanic fraction were separated and analyzed by gas chromatography using an AT-1 capillary column (25 m by 0.32 mm; Alltech Canada Biotechnology Centre Inc., Guelph, Canada) as previously described (38).

The cell morphology of both isolates was studied microscopically from cultures grown for 48 h at 37°C on various agar-based media, all containing chloramphenicol (0.5 g/liter): YEPD agar, yeast extract-peptone-glycerol agar (yeast extract, 5 g/liter; peptone, 10 g/liter; glycerol, 20 g/liter; agar, 20 g/liter), Casitone agar, RPMI-glucose agar (RPMI 1640 from Sigma Aldrich, 10.4 g/liter; 3-[*N*morpholino]-propanesulfonic acid hemisodium salt, 165 mM; L-glutamine, 2 mM; glucose, 20 g/liter; agar, 15 g/liter), Shadomy medium (yeast nitrogen base, 13.4 g/liter; glucose, 20 g/liter; L-asparagine, 1.5 g/liter; agar, 18 g/liter), rice extract agar-Tween medium (rice extract, 2.5 g/liter; Tween 80, 10 ml; agar, 20 g/liter), and malt agar (malt extract, 15 g/liter; agar, 15 g/liter). Ultrastructure was investigated by transmission electron microscopy performed as previously described (35) on blastoconidia from YEPD agar plates with a JEM-2010 transmission electron microscope (Jeol, Paris, France).

Susceptibility of isolate 21229 to Congo red and calcofluor white, two markers of the cell wall structure polysaccharides β -glucans and chitin, was evaluated in comparison with isolate 21231 by determining the minimum concentration of the dye that inhibited growth of the same quantity of cells for the two isolates. To visualize the cell wall structure

polysaccharides, blastoconidia were labeled with calcofluor white by incubation for 30 min in a 10 g/ml solution of the fluorescent dye and examined at 500 nm with an Olympus microscope equipped with epifluorescence.

For both isolates, growth curves were determined by monitoring the absorbance at 590 nm of three independent cultures in YEPD broth at 37°C for 30 h with constant shaking.

Complementation study. To verify the role of the *CgERG6* mutation in the decreased susceptibility to amphotericin B and in its pseudohyphal growth, a plasmid containing a wild-type copy of the *CgERG6* gene and derived from pRS416, a centromeric plasmid containing the *URA3* open reading frame (ORF) of *S. cerevisiae* which has been described to efficiently complement the uracil auxotrophy in *C. glabrata* (39), was used to transform a *ura3* derivative of the clinical isolate 21229. Briefly, a PCR fragment containing the wild-type *ERG6* ORF was obtained from *C. glabrata* isolate 21231 and cloned into pGEM-T (Promega, Madison, WI). After release from pGEM-T by digestion with the restriction endonucleases *SacI* and *SacII* (New England Biolabs, Ipswich, MA), the *ERG6* gene was cloned into pRS416 (LGC Promochem, Teddington, United Kingdom), and the obtained plasmid was named pRSERG628. A *ura3* derivative of the clinical isolate 21229 was selected on YEPD agar plates containing 1 g/liter 5-fluoroorotic acid. Inactivity of the *URA3* gene leading to uracil auxotrophy was verified by transformation of this mutant with pRS416. This *ura3* mutant, named 21229F34, was transformed with the pRSERG628 plasmid by following the procedure described for *S. cerevisiae* *ERG6* mutants (11). Two clones growing on selective medium were tested for amphotericin B susceptibility, and their morphology was studied by light microscopy as described above. Efficiency of the transformation was checked by plasmid extraction performed with the Zymoprep II kit (Zymoresearch, Orange, CA), followed by digestion of the plasmid by *SacI* and *SacII*.

Nucleotide sequence accession numbers. Sequences determined for *CgERG4*, *CgERG5*, *CgERG6*, and *CgERG11* for isolates 21231 and 21229 were deposited in the GenBank database and are available under accession numbers AY942649, AY942651, AY942653, DQ060157, AY942648, AY942650, AY942652, and AY942647, respectively (see Table 4).

RESULTS

Antifungal susceptibility. Antifungal susceptibility testing showed for isolate 21229 a lower susceptibility to polyenes associated with an increased susceptibility to azoles than for isolate 21231. By the disk diffusion method, large growth inhibition zones were seen on Casitone agar plates with both azoles and polyenes for isolate 21231, whereas they were small-sized with nystatin and amphotericin B and almost twofold larger with azoles for isolate 21229 (Table 2). These results were confirmed by determination of amphotericin B,

ketoconazole, fluconazole, itraconazole, and voriconazole MICs performed by the Etest procedure on Casitone agar plates (Table 3). The amphotericin B MIC for isolate 21229 was more than 40-fold higher than for isolate 21231 (1.3 and 0.029 g/ml, respectively), whereas azoles MICs were on average 5-fold lower than those for isolate 21231. Conversely, no differences were seen between the two isolates regarding their susceptibility to caspofungin, which was not available as Neosensitab tablets and therefore evaluated only the Etest procedure (Table 3).

TABLE 2. Susceptibility of *C. glabrata* isolates 21229 and 21231 to polyenes and azoles^a

Antifungal	Diam (mm) of the inhibition zone with isolate:	
	21231	21229
Polyenes		
Amphotericin B	34	13
Nystatin	34	16
Azoles		
Miconazole	18	30
Clotrimazole	26 (M)	40
Ketoconazole	24 (M)	50
Fluconazole	20 (M)	50
Itraconazole	16	30
Voriconazole	36	43

^aIn vitro susceptibility testing was performed by a disk diffusion method on Casitone agar plates using Neosensitab tablets (containing 1 g of drug for voriconazole, 8 g for itraconazole, 10 g for amphotericin B, econazole, miconazole, and clotrimazole, 15 g for fluconazole and ketoconazole, and 50 g for nystatin). Results, which are expressed as means of triplicate values, correspond to the diameter of growth inhibition zones. Standard deviations of the means represented less than 10% and mean diameters of growth inhibition zones were statistically different between the two isolates using the Wilcoxon-Mann-Whitney test at the unilateral risk of $\alpha = 0.05$. M, presence of resistant colonies in the growth inhibition zone.

TABLE 3. MICs of polyene, azole, and echinocandin drugs for *C. glabrata* isolates 21229 and 21231^a

Antifungal	MIC (mg/ml) for isolate:	
	21231	21229
Amphotericin B	0.029	1.3
Ketoconazole	0.136	0.034
Fluconazole	3.7	1
Itraconazole	18.7	1.8
Voriconazole	0.125	0.047
Caspofungin	0.023	0.024

^aResults are expressed as mean values of three independent determinations. Data were obtained by the E-test procedure using antifungal strips on Casitone agar plates. Mean MICs were statistically different between the two isolates using the Wilcoxon-Mann-Whitney test at the unilateral risk of $\alpha = 0.05$, except for caspofungin.

Sterol composition. Chromatographic analysis of the sterol molecular species revealed severe changes in the sterol composition of polyene-resistant isolate 21229. Indeed, whereas ergosterol was the major sterol species in wild-type isolate 21231, this sterol was not detectable in isolate 21229 (Fig. 1). By contrast, numerous sterol intermediates which could not be identified precisely accumulated in cells of isolate 21229. However, quantitative analysis which is based on the strong absorbance of UV light at 281.5 nm caused by ergosterol and the other $\Delta 5,7$ -dienols (containing two conjugated double bonds in C-5 and C-7), revealed no differences between the two isolates (data not shown). Therefore, sterol intermediates detected in cells of isolate 21229, were considered non-ergosterol $\Delta 5,7$ -dienols.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 1. Variations in sterol profiles of *C. glabrata* isolates 21231 and 21229. Sterols of the heptanic fraction were analyzed by gas chromatography. As highlighted by the dashed line, ergosterol, which was the major sterol species for isolate 21231 (A), was not detectable on the chromatogram of isolate 21229 (B). (C) Percentages of the ergosterol biosynthesis intermediates determined from the corresponding peak areas and retention times.

Analysis of CgERG4, CgERG5, CgERG6, and CgERG11 gene sequences. As illustrated in Table 4, some point mutations were found in CgERG4, CgERG5, CgERG6, and CgERG11 gene sequences for isolates 21231 and 21229 compared with the corresponding sequences from strain CBS 138 available in the GenBank database. Among polymorphisms detected inside or outside the coding sequences, some nucleotide substitutions were shared by the two clinical isolates, whereas others were found only in one isolate or the other. For CgERG4, CgERG5, and CgERG11, no mutation detected inside coding sequences had consequences on the amino acid sequence of the corresponding protein. In addition, silent mutations in the CgERG6 gene sequence were detected for both isolates, but a missense mutation was also seen for polyene-resistant isolate 21229, i.e., replacement of a guanine with a thymine at position 592, leading to the replacement of a cysteine with a phenylalanine at position 198 in the sequence of $\Delta(24)$ sterol C-methyltransferase. All sequences were deposited in GenBank database and are available under the accession numbers indicated in

Table 4.

TABLE 4. Mutations detected in *CgERG4*, *CgERG5*, *CgERG6*, and *CgERG11* genes for *C. glabrata* isolates 21231 and 21229

Isolate	Accession no. and point mutations for gene ^a :			
	<i>CgERG4</i>	<i>CgERG5</i>	<i>CgERG6</i>	<i>CgERG11</i>
21231	AY942649 A-429T ^b T-322C ^b T842A T947C^b G1490A	AY942651 A-373G ^b G-367X ^b G-314A T-35C ^b X-34A C-33T A-32T C-27T	AY942653 G-268A ^b A-209X ^b A524G^b G1064A C1196T ^b	DQ060157 T767C^b C836T A1022G^b T1556A^b
21229	AY942648 A-429T ^b T-322C ^b T947C^b G1394A	AY942650 A-373G ^b G-367X ^b A-311G T-35C ^b C-33X C-31T C426T A1156G	AY942652 G-268A ^b A-209X ^b C-199G T-136A T515C A524G^b G592T C1196T ^b	AY942647 C677T T767C^b A1022G^b T1274C T1520A T1556A^b

^aMutations are described as follows. The first letter corresponds to the nucleotide present in the GenBank database sequence for the corresponding gene (accession numbers NC005967, NC006036, NC006031, and L40389 for *CgERG4*, *CgERG5*, *CgERG6*, and *CgERG11*, respectively), the number represents the relative position from the start of the ORF, and the second letter represents the nucleotide found in the *ERG* gene sequence of isolate 21231 or 21229. Mutations located inside the coding sequences are in boldface type, and the missense mutation found in the isolate 21229 *CgERG6* gene sequence is underlined. Other mutations correspond to polymorphisms outside the coding sequences. The letter X placed after the number indicates a deletion of the corresponding nucleotide, and the same letter placed before the number corresponds to an insertion.

^bMutations shared by isolates 21231 and 21229.

Expression levels of genes potentially involved in the unusual phenotype of isolate 21229. Isolate 21229 displayed overexpression of genes coding for ABC transporters by real-time RT-PCR. Indeed, the *CgCDR1* mRNA level in cells of this isolate was 27.2-fold higher than that for the control isolate, and the relative increase was 17.8 for the *CgCDR2* gene (Fig. 2). Real-time RT-PCR experiments also revealed that all genes encoding enzymes involved in late steps of the ergosterol biosynthesis pathway (after 14 α demethylation) and *CgERG11* itself were overexpressed in isolate 21229, compared to isolate 21231, with relative increases ranging from 13.4 to 43.3. Conversely, no real differences were observed between the two isolates regarding the expression of some genes encoding enzymes involved in early steps of this biosynthesis pathway, *CgERG1* and *CgERG9*. Likewise, no differences were seen between the two isolates in the expression level of the *CgSTE12* gene.

Cell morphology. Microscopic observation of cells of the isolate 21229 grown on different culture media revealed pseudohyphal growth regardless of the culture medium used. As illustrated in Fig. 3, cells of this isolate were arranged in small chains, sometimes

branched. Daughter cells, which remained attached to the mother cells, emitted one or two buds at the opposite pole, a characteristic of pseudohyphae. In contrast, isolate 21231 presented the morphology classically described for *C. glabrata*, with round cells, sometimes budding. Transmission electron microscopy confirmed these observations. As shown in Fig. 4, mother cells bearing up to three daughter cells of similar size were seen for isolate 21229, confirming its pseudohyphal growth. Moreover, the inner layer of the cell wall appeared thinner for this isolate than for control cells (Fig. 4B), suggesting changes in biosynthesis of its components or in their assembly.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 2. Gene expression level in isolate 21229 compared with isolate 21231. The expression levels of genes coding for ABC transporter (*CgCDR1* and *CgCDR2*; black bars), a MAP-activated transcription factor involved in pseudohyphal growth (*STE12*; white bar), or enzymes involved in ergosterol biosynthesis (*ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG5*, *ERG6*, *ERG9*, *ERG11*; gray bars) were determined by RT-PCR. The relative increase (RI) in expression of the studied genes in isolate 21229 was determined as follows: $RI = 2^{\exp[(C_t \text{ gene} - C_t \text{ actin})_{\text{isolate 21229}} - (C_t \text{ gene} - C_t \text{ actin})_{\text{isolate 21231}}]}$. C_t (cycle threshold) is defined as the number of cycles for which the curve representing the fluorescence intensity according to the number of cycles cuts a baseline arbitrarily defined as one fluorescence unit. Results correspond to mean values of results from three independent experiments (\pm standard deviation).

FIG. 3. Morphology of *C. glabrata* isolate 21229 on different agar-based culture media: Shadomy (A), YEPD (B), yeast extract-peptone glycerol (C), RPMI-glucose (D), rice cream-Tween 80 (E), malt (F), and Casitone (G). Fungal cells were suspended in lactic blue dye, mounted on glass slides, and examined by light microscopy. A pseudohyphal growth was seen for isolate 21229 regardless of the culture medium. (H) Isolate 21231 grown on YEPD agar showing solitary blastoconidia and some budding cells. Bars, 20 μm .

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 4. Transmission electron micrographs of *C. glabrata* isolates 21229 (A) and 21231 (B). Transmission electron microscopy confirmed the pseudohyphal growth of isolate 21229, with cells presenting up to three daughter cells of similar size, and revealed the ultrastructural changes of their cell wall with a thinner inner layer compared with cells of control isolate. N, nucleus; mt, mitochondrion; CW, cell wall; DC, daughter cell.

Susceptibility to calcofluor white and Congo red. Susceptibility of the two isolates to markers of the main cell wall polysaccharides was also investigated. The growth of the two isolates was not inhibited by the presence of Congo red in the culture medium, even at the highest concentration used of 4 mg/ml. Conversely, growth of isolate 21229 was inhibited at the lowest concentration of calcofluor white, 0.1 mg/ml (Fig. 5B), whereas a concentration of 2 mg/ml of calcofluor white was required to inhibit growth of isolate 21231 (Fig. 5A). Considering these results, cells of the two isolates were examined by fluorescence microscopy after staining with calcofluor white. The entire periphery was labeled for control cells, as well as septa between mother and daughter cells. Conversely, calcofluor white mainly bound to septa for cells of isolate 21229, whose periphery was slightly labeled (data not shown).

Consequences of the *ERG6* gene mutation on growth capacity. Polyene-resistant isolate 21229 presented a decreased growth rate compared with wild-type isolate 21231 (Fig. 6). If the latency period remained almost unmodified, the generation time during the exponential growth phase of isolate 21229 was of 10 h, whereas it was only 1 h for isolate 21231. Likewise, the maximum absorbance reached by the resistant clinical isolate was about twofold lower than the susceptible one.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 5. Susceptibility of *C. glabrata* isolates 21231 (A) and 21229 (B) to calcofluor white. Susceptibility was evaluated by inoculation of various quantities of cells (from 2×10^6 to 2×10^2) on YEPD agar plates containing increasing concentrations of the dye (from 0.1 to 4 mg/ml). Calcofluor white inhibited the growth of isolate 21229 at a concentration as low as 0.1 mg/ml, whereas a concentration of 2 mg/ml was required to inhibit the growth of isolate 21231.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 6. Growth curves of *C. glabrata* isolates 21231 (black) and 21229 (gray). Growth curves were drawn by monitoring the absorbance at 590 nm of cultures in YEPD broth incubated at 37°C for 30 h. Results correspond to mean absorbances of three independent cultures. For each value, the standard deviation did not exceed 10%.

FIG. 7. Susceptibility to amphotericin B (A, B, and C) and microscopic morphology (D, E, and F) of the cells for *C. glabrata* isolate 21229 (A and D), its *ura3* derivative 21229F34 (B and E), and the complemented strain 21229C218 (C and F). The complementation of isolate 21229 with a wild-type copy of the *ERG6* gene restored the susceptibility to amphotericin B as well as a classical morphology, consisting of solitary blastoconidia.

Phenotype of a complemented *ura3* derivative of the clinical isolate 21229. As illustrated in Fig. 7, the disk diffusion method showed for clinical isolate 21229 and its *ura3* derivative 21229F34 a poor susceptibility to amphotericin B, with growth inhibition zones of 16 mm in diameter, whereas the complemented strain, named 21229C218, was susceptible to this drug (inhibition zone of 30 mm). Likewise, cells of the strain bearing the *ERG6*-containing plasmid presented a classical morphology for *C. glabrata* (Fig. 7F), with solitary round cells, sometimes budding, whereas the clinical isolate and its *ura3* derivative grew as pseudohyphae (Fig. 7D and E).

DISCUSSION

Polyene resistance, with few exceptions (e.g., *Candida dubliniensis* and *C. lusitaniae*), remains extremely rare in clinical isolates of pathogenic yeasts, although cases involving isolates resistant to this class of antifungal have been increasingly reported during the past two decades. Moreover, it has never been described as yet in clinical isolates of *C. glabrata*. Here, we studied a clinical isolate of *C. glabrata* presenting at first isolation a poor susceptibility to polyenes and a pseudohyphal growth.

Standard procedures of antifungal susceptibility testing demonstrated that the 21229 isolate had reduced susceptibility to polyenes and an increased susceptibility to azoles. This may appear somewhat surprising, since polyene resistance is often associated with resistance to azoles. In *S. cerevisiae*, deletion of *ERG3* leads to resistance to both azoles and nystatin (40). Likewise, for *C. albicans*, null mutants for *ERG11*, which can be selected by culture on amphotericin B-containing medium, are also resistant to azoles (28). Moreover, previous works from Kelly et al. (15) and Nolte et al. (22) reported the isolation and characterization of clinical azole- and amphotericin B-resistant *C. albicans* isolates from AIDS or leukemic patients. Likewise, association of resistance to polyenes and azoles have also been demonstrated in laboratory-induced mutants of *C. albicans* (3). However, azole resistance is not systematically associated with an altered susceptibility to polyenes, as demonstrated in *C. albicans* mutants by Niimi et al. (20), and conversely, *erg1* mutants of *C. glabrata* present an increased susceptibility to azoles and are resistant to nystatin (36).

The ergosterol biosynthesis pathway, essentially studied in *S. cerevisiae* (24, 25), is a complex metabolic pathway. More than 20 enzymes and the genes that encode them are known today in this yeast. Although a standard order has been described, different enzymes may act on a same substrate, which increases markedly the number of potential sterol intermediates. Moreover, as demonstrated by the systematic deletion of the *S. cerevisiae* open reading frames, some of these metabolic steps are crucial for cell viability. For example, *ERG7*, *ERG8*, *ERG9*, *ERG10*, *ERG11*, *ERG12*, *ERG19*, *ERG20*, *ERG25*, *ERG26*, and *ERG27* deletions are lethal. Conversely, invalidation of *ERG2* and *ER24* genes results in viable

mutants with minor phenotypic alterations, e.g., moderate growth defect and ergosterol auxotrophy (2, 18, 19), whereas *ERG6* null mutants show defective conjugation and tryptophan uptake as well as a diminished capacity for transformation. In addition, *erg6* mutants grow as short chains of elongated cells and present a resistance to nystatin associated with a hypersensitivity to cycloheximide, anthracyclins, and brefeldin A (11, 12, 14). Likewise, inactivation of the *ERG3* gene in *S. cerevisiae* results in changes in the susceptibility to ketoconazole (40), syringomycin (34), and nalidixic acid (27), and *ERG3* null mutants are unable to grow on nonfermentable carbon sources and are cold sensitive (1, 13, 32).

Since ergosterol is the polyene target, a qualitative and quantitative analysis of sterols was performed. Results from gas chromatography indicated a lack of ergosterol in our polyene-resistant clinical isolate, offset by the accumulation of sterol intermediates identified as $\Delta 5,7$ -dienols on the basis of their strong absorbance at 281.5 nm. These changes in sterol content suggest a mutation in genes encoding enzymes involved in late steps of the ergosterol pathway, as usually reported previously (10, 26).

Ergosterol itself and the other $\Delta 5,7$ -dienols are characterized by the presence of two conjugated double bonds in C-5 and C-7, resulting from the activity of *ERG3* gene product, C-5 sterol desaturase (1). Considering the detection of non-ergosterol $\Delta 5,7$ -dienols in isolate 21229, one may speculate a functional C-5 sterol desaturase and the inactivation of one of the last two enzymes of the ergosterol biosynthesis pathway. However, gene sequencing revealed that C-24 sterol reductase (CgERG4p) and C-22 sterol desaturase (CgERG5p) were not modified. Nevertheless, it is well established that a same enzyme may intervene at different levels of the ergosterol biosynthesis pathway (28). Moreover, previous works demonstrated that an *ERG6* mutation may also cause polyene resistance (11, 42). In the current study, a missense mutation in the CgERG6 gene for isolate 21229 led to a predicted C→F substitution (C198F) in the corresponding protein. Even without the crystal structure of the C-24 methyltransferase, such a nonconservative change might be expected to lead to major changes in enzyme structure and activity.

The ergosterol biosynthesis pathway was further investigated by quantification of gene expression by real-time RT-PCR. In wild-type strains of *S. cerevisiae*, a negative feedback is exercised by ergosterol upon its own biosynthesis from the demethylation step, and the only modification of the side chain is sufficient to disturb this negative feedback (7, 30). For example, disruption of genes encoding enzymes involved in late steps of the ergosterol biosynthesis pathway increased expression of *ERG5*, *ERG6*, and *ERG24* genes (33). In isolate 21229, an induction of the ergosterol biosynthesis pathway was also seen, since all genes encoding enzymes usually involved after demethylation and CgERG11 itself were overexpressed. This overexpression of CgERG11, which is well known as one of the mechanisms of azole resistance (41), may appear to conflict with the increased susceptibility

of isolate 21229 to azoles. In our strain, which seems unable to produce enough ergosterol to supply growth, induction of the sterol biosynthesis pathway may be an obligate adaptation to provide a sufficient amount of non-ergosterol $\Delta 5,7$ -dienols to maintain cell viability. However, accumulation of these intermediates, which cannot absolutely replace ergosterol functionally, therefore renders the isolate 21229 more sensitive to azole drugs, as observed in our experiments. Another observation which seems to be inconsistent with the increased susceptibility to azoles is the overexpression of *CgCDR1* and *CgCDR2* genes revealed by real-time RT-PCR. This increased mRNA level of genes encoding efflux pumps could also be related to the accumulation of nonergosterol $\Delta 5,7$ -dienols. The ABC proteins CgCDR1p and CgCDR2p would be overexpressed to eliminate these abnormal sterol intermediates. Alternatively, one may speculate that lack of ergosterol in our clinical isolate 21229 could also disturb protein trafficking and especially prevent CgCDR1p and CgCDR2p targeting to the plasma membrane. Indeed, alterations of protein trafficking due to modifications of membrane sterol composition have been described for *S. cerevisiae*, which is closely related to *C. glabrata* (37). Thus, the decreased efflux capacity of cells of isolate 21229 would explain their higher susceptibility to azole drugs despite *CgERG11* overexpression.

Neither hyphae or pseudohyphae are produced by *C. glabrata*, except under special culture conditions like nitrogen starvation or in the presence of CuSO_4 , which lead, through a mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade, to the activation of *STE12*, a transcription factor necessary for morphology switching (8, 17). However, pseudohyphal growth of isolate 21229 was not dependent on the culture medium, and no overexpression of *STE12* was seen. Transmission electron microscopy confirmed the pseudohyphal growth of isolate 21229 and revealed a structural modification of the cell wall with a thinner inner layer which was associated with a growth defect, as revealed by growth kinetic experiments. These observations are consistent with the greater susceptibility of the growing cells of this isolate to calcofluor white and with the poor staining of mutant cells by this dye, which suggested modifications of the distribution or composition of the cell wall polysaccharides. All of these phenotypic changes may be related to perturbations of protein trafficking and, for instance, to alterations of the targeting to the plasma membrane of enzymes involved in cell wall polysaccharide synthesis (i.e., β -glucan synthase) or degradation (i.e., glucanase). However, the increased susceptibility of cells of isolate 21229 to calcofluor white may also arise from an increase in the chitin content in response to cell wall stress.

In conclusion, we describe here a clinical isolate of *C. glabrata* in which a unique molecular event was responsible for several phenotypic changes. Indeed, the missense mutation that we detected in the *CgERG6* gene lead, by the inactivation of C-24 sterol methyltransferase, to the interruption of the ergosterol biosynthesis pathway and, therefore, to polyene resistance. As confirmed by complementation studies, the changes in sterol composition of the plasma membrane induced by this mutation are also responsible for the

pseudohyphal growth, probably through alterations of the targeting of some proteins required for daughter cell liberation to the plasma membrane. Two other observations confirming this putative mistargeting to the plasma membrane are the high susceptibility of the clinical isolate to azole drugs and to calcofluor white, which might be related to changes in the trafficking of the efflux pumps (whenever overexpressed) and β -glucan synthase and/or chitin synthase to the plasma membrane, respectively. Determination of the subcellular localization of these enzymes, by construction of fusion proteins with green fluorescent protein, would confirm this last hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

P.V. is a recipient of a grant from Angers Loire Metropole. This study was supported in part by a grant from the Institut de Parasitologie de l'Ouest, Rennes, France. We thank Pascal Reynier (EMI-U00.18, Angers, France) and Alain Morel (INSERM U564, Angers, France) for their help in gene sequencing and in quantitative PCR analysis of gene expression.

REFERENCES

1. **Arthington, B. A., L. G. Bennett, P. L. Skatrud, C. J. Guynn, R. J. Barbuch, C. E. Ulbright, and M. Bard.** 1991. Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene* **102**:39–44.
2. **Ashman, W. H., R. J. Barbuch, C. E. Ulbright, H. W. Jarrett, and M. Bard.** 1991. Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. *Lipids* **26**:628–632.
3. **Barker, K. S., S. Crisp, N. Wiederhold, R. E. Lewis, B. Bareither, J. Eckstein, R. Barbuch, M. Bard, and P. D. Rogers.** 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:376–385.
4. **Brun, S., C. Aubry, O. Lima, R. Filmon, T. Bergès, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2003. Relationships between respiration and susceptibility to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:847–853.
5. **Brun, S., T. Bergès, P. Poupard, C. Vauzelle-Moreau, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2004. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1788–1796.
6. **Calcagno, A. M., E. Bignell, P. Warn, M. D. Jones, D. W. Denning, F. A. Muhlschlegel, T. R. Rogers, and K. Haynes.** 2003. *Candida glabrata* *STE12* is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Mol. Microbiol.* **50**:1309–1318.
7. **Casey, W. M., J. P. Burgess, and L. W. Parks.** 1991. Effect of sterol sidechain structure on the feed-back control of sterol biosynthesis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1081**:279–284.
8. **Csank, C., and K. Haynes.** 2000. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**:115–120.
9. **Defontaine, A., J. P. Bouchara, P. Declerk, C. Planchenault, D. Chabasse, and J. N. Hallet.** 1999. In-vitro resistance to azoles associated with mitochondrial DNA deficiency in *Candida glabrata*. *J. Med. Microbiol.* **48**:663–670.
10. **Ellis, D.** 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**(Suppl. 1):7–10.
11. **Gaber, R. F., D. M. Copple, B. K. Kennedy, M. Vidal, and M. Bard.** 1989. The yeast gene *ERG6* is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol. Cell. Biol.* **9**:3447–3456.

12. **Graham, T. R., P. A. Scott, and S. D. Emr.** 1993. Brefeldin A reversibly blocks early but not late protein transport steps in the yeast secretory pathway. *EMBO J.* **12**:869–877.
13. **Hemmi, K., C. Julmanop, D. Hirata, E. Tsuchiya, J. Y. Takemoto, and T. Miyakawa.** 1995. The physiological roles of membrane ergosterol as revealed by the phenotypes of *syr1/erg3* null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **3**:482–486.
14. **Jensen-Pergakes, K. L., M. A. Kennedy, N. D. Lees, R. Barbuch, C. Koegel, and M. Bard.** 1998. Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1160–1167.
15. **Kelly, S. L., D. C. Lamb, D. E. Kelly, N. J. Manning, J. Loeffler, H. Hebart, U. Schumacher, and H. Einsele.** 1997. Resistance to fluconazole and crossresistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective $\Delta^5,6$ -desaturation. *FEBS Lett.* **400**:80–82.
16. **Krcmery, V., and A. J. Barnes.** 2002. Non-*albicans* *Candida* spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hosp. Infect.* **50**:243–260.
17. **Lachke, S. A., S. Joly, K. Daniels, and D. R. Soll.** 2002. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology* **148**:2661–2664.
18. **Lees, N. D., B. Skaggs, D. R. Kirsch, and M. Bard.** 1995. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*—a review. *Lipids* **30**:221–2266.
19. **Lorenz, R. T., and L. W. Parks.** 1992. Cloning, sequencing, and disruption of the gene encoding sterol C-14 reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol.* **11**:685–692.
20. **Niimi, M., K. Niimi, Y. Takano, A. R. Holmes, F. J. Fischer, Y. Uehara, and R. D. Cannon.** 2004. Regulated overexpression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **6**:999–1006.
21. **Nissapatorn, V., C. Lee, Q. K. Fatt, and K. A. Abdullah.** 2003. AIDS-related opportunistic infections in Hospital Kuala Lumpur. *Jpn. J. Infect. Dis.* **56**:187–192.
22. **Nolte, F. S., T. Parkinson, D. J. Falconer, S. Dix, J. Williams, C. Gilmore, R. Geller, and J. R. Wingard.** 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:196–199.
23. **Odds, F. C., M. G. Rinaldi, C. R. Cooper, Jr., A. Fothergill, L. Pasarell, and M. R. McGinnis.** 1997. *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **35**:313–316.
24. **Paltauf, F., S. Kohlwein, and S. A. Henry.** 1992. Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast, p. 415–500. *In* E. W. Jones, J. R. Pringle, and J. R. Broach (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
25. **Parks, L. W., and W. M. Casey.** 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:95–116.
26. **Perea, S., and T. F. Patterson.** 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin. Infect. Dis.* **35**:1073–1080.
27. **Prendergast, J. A., R. A. Singer, N. Rowley, A. Rowley, G. C. Johnston, M. Danos, B. Kennedy, and R. F. Gaber.** 1995. Mutations sensitizing yeast cells to the start inhibitor nalidixic acid. *Yeast* **6**:537–547.
28. **Sanglard, D., F. Ischer, T. Parkinson, D. Falconer, and J. Bille.** 2003. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2404–2412.
29. **Sanglard, D., and F. C. Odds.** 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2**:73–85.
30. **Servouse, M., and F. Karst.** 1986. Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **240**:541–547.
31. **Singh, A., I. Bairy, and P. G. Shivananda.** 2003. Spectrum of opportunistic infections in AIDS cases. *Indian J. Med. Sci.* **57**:16–21.
32. **Smith, S. J., and L. W. Parks.** 1993. The *ERG3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* is required for the utilization of respiratory substrates and in heme-deficient cells. *Yeast* **11**:1177–1187.
33. **Smith, S. J., J. H. Crowley, and L. W. Parks.** 1996. Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **16**:5427–5432.

34. **Taguchi, N., Y. Takano, C. Julmanop, Y. Wang, S. Stock, J. Takemoto, and T. Miyakawa.** 1994. Identification and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *SYR1* gene reveals that ergosterol is involved in the action of syringomycin. *Microbiology* **2**:353–359.
35. **Tronchin, G., J. P. Bouchara, R. Robert, and J. M. Senet.** 1988. Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infect. Immun.* **56**:1987–1993.
36. **Tsai, H. F., M. Bard, K. Izumikawa, A. A. Krol, A. M. Sturm, N. T. Culbertson, C. A. Pierson, and J. E. Bennett.** 2004. *Candida glabrata* *erg1* mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2483–2489.
37. **Umebayashi, K., and A. Nakano.** 2003. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* **161**:1117–1131.
38. **Vandeputte, P., G. Larcher, T. Bergès, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:4608–4615.
39. **Vermitsky, J. P., K. D. Earhart, W. L. Smith, R. Homayouni, T. D. Edlind, and P. D. Rogers.** 2006. *Pdr1* regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol. Microbiol.* **61**:704–722.
40. **Watson, P. F., M. E. Rose, and S. L. Kelly.** 1998. Isolation and analysis of ketoconazole resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Med. Vet. Mycol.* **3**:153–162.
41. **White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382–402.
42. **Young, L. Y., C. M. Hull, and J. Heitman.** 2003. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2717–2724.

**ETUDE N°2 PUBLIEE DANS LA REVUE ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY
2008, 52:3701-3709.**

Une mutation non-sens dans le gène *ERG6* induit une diminution de la sensibilité aux polyènes chez un isolat clinique de *Candida glabrata*

Patrick Vandeputte^{1,2}, Guy Tronchin¹, Gérald Larcher¹, Emilie Ernoult¹, Thierry Bergès³, Dominique Chabasse^{1,2} et Jean-Philippe Bouchara^{1,2}

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Université d'Angers Angers, France¹; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France²; et Physiologie Moléculaire des Transporteurs de Sucre, FRE 3091, Faculté des Sciences, 86022 Poitiers Cedex³

Contrairement aux azolés, les mécanismes moléculaires à l'origine d'une résistance aux polyènes demeurent peu étudiés, en particulier chez les levures pathogènes. Nous avons étudié les mécanismes moléculaires à l'origine de la diminution de la sensibilité aux polyènes chez un isolat clinique de *Candida glabrata*. Le contenu en stéroïdes a été analysé par chromatographie en phase gazeuse et nous avons déterminé les séquences ainsi que les niveaux d'expression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Nous avons également étudié les effets de la mutation portée par cet isolat sur la morphologie et l'ultrastructure des cellules, leur viabilité, leur vitalité et leur sensibilité aux agents ayant pour cible la paroi. Cet isolat présentait une quantité d'ergostérol membranaire diminuée par rapport à une souche sauvage, en rapport avec une mutation non-sens un niveau du gène *ERG6* et une induction de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Des modifications de la paroi cellulaire ont également été observées, accompagnées par une augmentation de la sensibilité des cellules aux agents ayant pour cible la paroi. Enfin, cette mutation, qui induit un important coût de fitness, était associée à un taux de mortalité élevé chez cet isolat. Un phénotype sauvage a été restauré chez cet isolat par complémentation de la fonction d'*ERG6* en transformant l'isolat avec un plasmide contenant une copie fonctionnelle du gène *ERG6*. En conclusion, nous avons identifié le mécanisme moléculaire à l'origine de la diminution de la sensibilité aux polyènes chez un isolat clinique de *C. glabrata*. La mutation non-sens détectée au niveau du gène *ERG6* aboutit à une diminution du contenu en ergostérol. Cet isolat constitue un outil intéressant pour étudier l'importance de l'adressage des protéines, aussi bien sur la résistance aux azolés que sur la croissance pseudohyphale.

A Nonsense Mutation in the *ERG6* Gene Leads to Reduced Susceptibility to Polyenes in a Clinical Isolate of *Candida glabrata*^σ

Patrick Vandeputte^{1,2*}, Guy Tronchin¹, Gérald Larcher¹, Emilie Ernoult^{1†}, Thierry Bergès³, Dominique Chabasse^{1,2} and Jean-Philippe Bouchara^{1,2}

Received 31 March 2008/Returned for modification 15 May 2008/Accepted 28 July 2008

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Université d'Angers Angers, France¹; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France²; and Physiologie Moléculaire des Transporteurs de Sucre, FRE 3091, Faculté des Sciences, 86022 Poitiers Cedex³

Unlike the molecular mechanisms that lead to azole drug resistance, the molecular mechanisms that lead to polyene resistance are poorly documented, especially in pathogenic yeasts. We investigated the molecular mechanisms responsible for the reduced susceptibility to polyenes of a clinical isolate of *Candida glabrata*. Sterol content was analyzed by gas-phase chromatography, and we determined the sequences and levels of expression of several genes involved in ergosterol biosynthesis. We also investigated the effects of the mutation harbored by this isolate on the morphology and ultrastructure of the cell, cell viability, and vitality and susceptibility to cell wall-perturbing agents. The isolate had a lower ergosterol content in its membranes than the wild type, and the lower ergosterol content was found to be associated with a nonsense mutation in the *ERG6* gene and induction of the ergosterol biosynthesis pathway. Modifications of the cell wall were also seen, accompanied by increased susceptibility to cell wall-perturbing agents. Finally, this mutation, which resulted in a marked fitness cost, was associated with a higher rate of cell mortality. Wild-type properties were restored by complementation of the isolate with a centromeric plasmid containing a wild-type copy of the *ERG6* gene. In conclusion, we have identified the molecular event responsible for decreased susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *C. glabrata*. The nonsense mutation detected in the *ERG6* gene of this isolate led to a decrease in ergosterol content. This isolate may constitute a useful tool for analysis of the relevance of protein trafficking in the phenomena of azole resistance and pseudohyphal growth.

*Corresponding author. Mailing address : Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France. Phone : 33 02 41 35 34 72. Fax : 33 02 41 35 36 16. E-mail : patrick.vandeputte@etud.univ-angers.fr.

†Current address : Centre de Recherche contre le Cancer Angers-Nantes, Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Papin, INSERM U892, Angers, France.

^σPublished ahead of print on 11 August 2008.

Despite extensive efforts to identify new cellular targets, only a few antifungal drugs are currently available for the treatment or prophylaxis of invasive candidiasis. These drugs belong to only four chemical families targeting three cellular mechanisms (28). Azole drugs, such as fluconazole and voriconazole, inhibit 14- α -sterol demethylase, a key enzyme of the ergosterol biosynthesis pathway. Polyene drugs, mainly amphotericin B, bind to ergosterol, which induces the formation of pores in the plasma membrane (8). Pyrimidine analogs, represented exclusively by flucytosine, interfere with DNA and protein synthesis, whereas echinocandins, such as the recently developed drugs caspofungin, micafungin, and anidulafungin, inhibit the synthesis of cell wall β -glucans.

The prevalence of invasive candidiasis has increased markedly since the 1970s, mostly due to the development of intensive care procedures and the increasing number of immunocompromised patients. However, the emergence of antifungal resistance in yeast clinical isolates may also have contributed to this increase in prevalence (26). In addition to the intensive use of antifungals for prophylaxis and treatment, there has been a shift in the nature of the causal agents. Some species formerly rarely seen in medical mycology have become major pathogenic agents (26). For example, among the species of the genus *Candida*, *Candida glabrata* now ranks second as the cause of all clinical forms of candidiasis (13). Usually a commensal of the digestive tract, this opportunistic pathogen belongs to the phylum Ascomycetes and has the particularity of being genetically closer to *Saccharomyces cerevisiae* than to other *Candida* species. For example, this yeast species has a haploid genome and is unable to produce filaments under normal culture conditions (13). One major trait of *C. glabrata* is its relatively low susceptibility to azole antifungals, which has been suggested to be the cause of its increased incidence (9).

Given the constitutively low level of susceptibility of *C. glabrata* to azoles, polyene drugs may constitute a useful alternative for the treatment of infections with this fungus. Although resistance to polyenes is less common than that to azoles, it is also increasingly reported in pathogenic yeasts and filamentous fungi (12). However, the molecular mechanisms underlying this resistance remain largely unknown. We previously characterized a clinical isolate of *C. glabrata* and demonstrated the role of an *ERG6* gene mutation in its decreased susceptibility to polyenes (32). We recently isolated a second clinical isolate of this species with decreased susceptibility to polyenes. In this study, we aimed to determine the molecular mechanisms responsible for this phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Yeasts strains and culture conditions. This study was performed with a clinical isolate, designated 40407061, recovered in the Laboratory of Parasitology and Mycology of Angers University Hospital in 2004 from a 76-year-old woman admitted to the hospital for convalescence after undergoing hip surgery. In 2004, the patient was treated orally with amphotericin B (4.5 g/day) from 8 to 26 August for a nondocumented case of bronchopneumopathy. On 26 August, mycological examination of a urine sample on CHROMagar Candida (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ.) revealed the profuse and exclusive growth of a yeast, which was identified as *Candida glabrata* by using ID32C test strips (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). Additionally, antifungal susceptibility, determined using Fungitest strips (Bio-Rad, Marne la Vallée, France), revealed a low level of susceptibility to amphotericin B.

The isolate was deposited at the Mycology section of the Institute of Hygiene and Epidemiology (IHEM, Brussels, Belgium) and is publicly available under accession number 21230. As no matching susceptible isolate was available, wild-type isolate IHEM 21231, which is susceptible to polyenes, was used as a control throughout this study. Isolate IHEM 21229, which also displays decreased susceptibility to polyene drugs (32), was used for comparison in some experiments.

The isolates were maintained by regular passages on yeast-extract peptone dextrose (YEPD) agar plates containing yeast-extract at 5 g/liter, peptone at 10 g/liter, dextrose at 20 g/liter, agar at 20 g/liter, and chloramphenicol at 0.5 g/liter. They were both cryopreserved at - 80°C in 20% (wt/vol) glycerol and lyophilized.

Susceptibility testing. The susceptibility of *C. glabrata* isolate 21230 to polyenes (amphotericin B and nystatin) and azoles (econazole, miconazole, ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole) was determined by the disk diffusion method using Neosensitabs tablets from Rosco Diagnostica (Taastrup, Denmark) as described previously (31). Susceptibility testing was carried out on Casitone agar plates (Bacto Casitone, 9 g/liter; glucose, 20 g/liter; yeast extract, 5 g/liter; chloramphenicol, 0.5 g/liter; agar, 18 g/liter; pH 7.2).

The MICs of amphotericin B, ketoconazole and fluconazole were also determined on Casitone agar plates by the Etest procedure (AB Biodisk, Solna, Sweden), according to the manufacturer's recommendations.

Sterol analysis. Sterols were analyzed from 50 mg lyophilized cells grown to stationary phase in YEPD broth, as described previously (31). Briefly, after extraction by saponification, the amount of ergosterol was determined from maximum absorbance at 281.5 nm (29), and the sterol species were identified on the basis on their relative retention times on a gas chromatograph.

TABLE 1. Oligonucleotides used for gene sequencing, evaluation of gene expression and fitness cost determination.

<i>C. glabrata</i> gene name (gene product) or plasmid	Genbank accession no.	Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Nucleotide coordinates ^a
<i>ERG4</i> (C-24(28) sterol reductase)	NC005967	ERG4-1F	CAACACAATAATCGGTGGGGT	44666 to 44686
		ERG4-1R	CAAGGATGTTACAATAATGCA	44082 to 44102
		ERG4-2F	CTCCAGTGATAAACATAAACG	44228 to 44248
		ERG4-2R	AAACACCTGGCAGAGTGTA	43654 to 43673
		ERG4-3F ^b	TCATCGGCAAACCTTTACCA	43794 to 43812
		ERG4-3R ^b	AGCCATATGTTTCATATTGCT	43333 to 43353
		ERG4-4F	TTGACTTGAAGATGTTCTTCG	43380 to 43400
		ERG4-4R	TGATCCATTGGAAGTGACCA	42895 to 42914
		ERG4-5F	TGTCTGGCGATAAGACTGTCA	42945 to 42965
		ERG4-5R	CCCATGAACCGTTTTTCCTT	42414 to 42433
<i>ERG5</i> (C-22 sterol desaturase)	NC006036	ERG5-1F	TTGACTACCGTATCGGGGATT	765352 to 765372
		ERG5-1R	TGGCATTTCATGCTCATATGC	765995 to 765814
		ERG5-2F ^b	TGCAATTGGGATACCCGATT	765699 to 765718
		ERG5-2R ^b	CCATCAATTCTTCAAAGGAG	766301 to 766321
		ERG5-3F	AAAGCCCACACCGACTATAGA	766231 to 766251
		ERG5-3R	GCATCTTGAGAAGCGAACAA	766762 to 766781
		ERG5-4F	AACCGTACCGACGATGACTCT	766684 to 766704
		ERG5-4R	ACCGATCAAAGCAGTCATGGT	767215 to 767235
		ERG5-5F	TCCACACGTTTGTCTAGGTCA	767178 to 767198
		ERG5-5R	CTGGGAAAGATTTGCAATAGG	767510 to 767530
<i>ERG6</i> (D(24) sterol C-methyltransferase)	NC006031	ERG6-1F	CGGCATTTGGATTTTCTCGT	444995 to 445014
		ERG6-1R	TCGGGAGAATTTCAATTCC	445490 to 445508
		ERG6-2F	CAGTTTATTGTGCTCTTGACG	445443 to 445463
		ERG6-2R	TGAATCTGGCGATGGTACG	445932 to 445949
		ERG6-3F ^{b,c}	GCATACATGGCCGGTATCAA	445862 to 445881
		ERG6-3R ^b	ACTTCCATTACCCGGTCAAT	446395 to 446414
		ERG6-4F	TTTGAAGAACGTCGGTTCG	446317 to 446336
		ERG6-4R	CATGTGGAATGAATTCAGTG	446821 to 446841
		ERG6-4R2 ^c	TGGCTTCTTAGCGACGAATA	446613 to 446632
		<i>ERG1</i> (squalene epoxidase)	AF006033	ERG1-F ^b
ERG1-R ^b	ATACCACCACAGTTAGAGGG			589 to 609
<i>ERG2</i> (C-8 sterol isomerase)	NC006035	ERG2-F ^b	TGTAATGCCAAACACAACG	1142387 to 1142406
		ERG2-R ^b	ACAAATCCAAAGTGGAGGAGA	1142840 to 1142860
<i>ERG3</i> (C-5 sterol desaturase)	L40390	ERG3-F ^b	AAGATTGCGCCTGTTGAGTT	615 to 634
		ERG3-R ^b	TACCACAGTCGGTGAAGAAGA	1129 to 1149
<i>ACT</i> (β-actin)	AF069746	ACT-F ^b	TATTGACAACGGTTCCGG	949 to 966
		ACT-R ^b	TAGAAAGTGTGATGCCAG	1177 to 1194
pRS416 (yeast centromeric vector)	U03450	pRS416-F ^c	ATCCACTAGTTCTAGAGCGGC	2072 to 2092
		pRS416-R ^c	AAAGGGAACAAAAGCTGGAG	2109 to 2128

^aNucleotide coordinates refer to the corresponding gene sequence in the GenBank database.

^bPrimers used for evaluation of gene expression.

^cPrimers used for determination of fitness cost.

Nucleic acid isolation. Blastoconidia from mid-exponential-phase cultures in 10 ml of YEPD broth were harvested by centrifugation and ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle. Total genomic DNA was then recovered by processing the sample with the DNeasy Plant minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was recovered by phenol-chloroform extraction from blastoconidia

isolated from early-exponential-phase cultures in 50 ml of YEPD broth, as described previously (31).

Gene sequencing. The *ERG4*, *ERG5* and *ERG6* genes were sequenced with the specific primers listed in Table 1. Sequencing was performed as described previously (31) by using the dideoxynucleoside triphosphate method on a CEQ8000 automatic sequencer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) and the PCR products were purified with a High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and used as the template. The sequences were compared by alignment by using the ALIGNn program (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/alignn_in.pl).

Bioinformatic analysis of the *ERG6* gene sequence was carried out with the Multiple Translation program (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/traduc_in.pl) and the Conserved Domain Database (CDD) search program (17, 18) available from the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Real-time RT-PCR. The levels of expression of the ergosterol biosynthesis genes *ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG5* and *ERG6* in isolate 21230 were determined by reverse transcription (RT)-PCR and were compared with those of the genes in wild-type isolate 21231. Total RNA (1 µg) was used as the template for RT by using a Protoscript first-strand cDNA synthesis kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) with random nonanucleotides. The cDNA obtained was diluted 10-fold, and a 4-µl aliquot was used as the template to perform real-time PCR in a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics) by using the QuantiTect SYBR green kit (Qiagen) and the gene-specific primers (final concentration, 0.5 µM each) described in Table 1. The PCR conditions were as follows: 15 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 94°C for denaturation, 20 s at 55°C for annealing and 30 s at 72°C for elongation. After amplification, the PCR products were slowly denatured with continuous fluorescence acquisition to determine their melting temperature and thus to ensure the specificity of the reaction. Three independent experiments were performed, and the data presented are mean values (± standard deviations) of the change in the level of expression relative to the level of expression of the same gene in wild-type isolate 21231. The data were normalized to β-actin expression, and the change in the level of expression was calculated by use of the following formula : $2^{\exp[(Ct \text{ gene} - Ct \text{ actin})_{\text{isolate 21230}} - (Ct \text{ gene} - Ct \text{ actin})_{\text{isolate 21231}}]}$, where Ct is the cycle threshold, defined as the number of cycles for which the curve representing the fluorescence intensity according to the number of cycles crosses an arbitrarily defined baseline at 0.1 fluorescence units.

Morphological studies. The morphologies of the *C. glabrata* isolates 21230 and 21231 cells were studied microscopically by the observation of lactic blue suspensions from cultures grown for 48 h at 37°C on YEPD agar plates. The ultrastructure of blastoconidia grown on YEPD broth was also determined by transmission electron microscopy, as described previously (4), by using a JEM-2010 transmission electron microscope (Jeol, Paris, France).

Growth kinetics, viability and vitality. The growth capabilities of the isolate 21230 were investigated, as were its viability and fitness. Growth curves were drawn by monitoring the absorbance at 600 nm of three independent cultures incubated at 37°C with constant shaking (150 rpm) until stationary phase. The generation time and latency period were determined and compared to those calculated for wild-type isolate 21231. The percentage of dead cells was determined by staining of the cultures with methylene blue, which leaves the living cells unlabelled. Finally, the fitness of the isolate 21230 was investigated by culturing this isolate together with wild-type isolate 21231. Briefly, 50 ml of YEPD broth was inoculated with the same quantity of cells of the two isolates (i.e., 1 ml of a suspension in water with an optical density at 600 nm of 0.1) and incubated at 37°C for 48 h with constant shaking (150 rpm). Subsequently, the mixed culture was diluted 10⁶-fold and 100- μ l aliquots were plated on YEPD agar plates, which were incubated at 37°C for 24 h. The susceptibility of 100 randomly selected colonies to amphotericin B was determined by the disk diffusion method as described above, and for colonies with decreased susceptibility, the presence of the *ERG6* mutation was verified by PCR using the primer pair ERG6-3F and ERG6-4R2 (Table 1) after RNA extraction and cDNA synthesis. As the reverse primer hybridized to a nucleotide sequence located after the nonsense mutation detected in the 3' end of the *ERG6* gene in isolate 21230, a negative PCR signal was observed with the mutated allele, whereas a 771-pb fragment was amplified with the wild-type allele.

Cell wall stress resistance studies. The susceptibilities of cells of isolate 21230 to cell wall-perturbing agents (i. e., calcofluor white, Congo red, sorbitol and caffeine) in comparison with those of cells of wild-type isolate 21231 was determined. These compounds were incorporated in the YEPD agar medium at concentrations of 1 mg/ml for calcofluor white and Congo red (two markers of the cell wall polysaccharides), 2 M for sorbitol (which increases the osmolarity of the medium, thereby inducing cell wall stress), and 2 mM for caffeine (a nucleotide that modifies the expression of cell wall integrity-related genes) (15). Afterward, 10 μ l of fungal suspensions containing 10³ to 10⁷ cells per ml was spotted on the agar surface. The plates were then allowed to dry, and finally incubated for 48 h at 37°C.

Complementation study. The function of the C24 sterol methyltransferase, the enzyme encoded by the *ERG6* gene, was epigenetically restored in a *ura3* derivative of isolate 21230 by transformation with a centromeric plasmid containing a wild-type copy of the *ERG6* gene, as described previously (32). The complementation of C24 sterol methyltransferase function was checked by determining the susceptibility of the transformed clone to amphotericin B and to cell wall-perturbing agents and by determining the growth capacity, viability and fitness of the isolate. We also studied these phenotypic traits in a complemented clone of the *C. glabrata* clinical isolate 21229. All these experiments were performed as described above, except for fitness determinations in complemented clones. For these latter experiments, the fitness of each complemented clone was investigated by the analysis of 20

colonies originated from cocultures with the wild-type isolate. To do this, the presence of the *ERG6*-harboring plasmid was detected by plasmid extraction with the EZNA yeast plasmid kit (Omega Bio-Tek, Doraville, GA), followed by PCR using pRS416-specific primers flanking the cloning site (Table 1). The selected primers therefore amplified a 1,552-bp fragment within the *ERG6*-harboring pRS416-derived plasmid, whereas they gave a negative PCR signal with pRS416 or with a nontransformed colony.

Nucleotide sequence accession number. The sequences of the *ERG4*, *ERG5* and *ERG6* genes of *C. glabrata* isolate 21230 were deposited in the GenBank database and are available under accession numbers EU490411, EU490412 and EU310475, respectively.

RESULTS

Antifungal susceptibility. Isolate 21230 was less susceptible to both amphotericin B and nystatin than wild-type isolate 21231, as shown by the disk diffusion method on Casitone agar, with the sizes of the growth inhibition zones being just over half the sizes of those for the wild type (Table 2). Isolate 21230 was also more susceptible than the wild type to all azole drugs tested (Table 2). This finding was confirmed by determining the MICs of amphotericin B, ketoconazole and fluconazole (Table 3). The MIC of amphotericin B for isolate 21230 was more than twice that for the wild-type isolate, whereas the MICs of ketoconazole and fluconazole were lower by factors of 3 and 6, respectively.

Sterol content. Gas chromatography analysis of the sterol content of isolate 21230 revealed marked differences from wild-type isolate 21231. Indeed, ergosterol, which corresponded to the major peak in the chromatogram of the wild-type isolate, was not detectable for the poorly susceptible isolate (Fig. 1 and Table 4). Conversely, several peaks corresponding to sterol intermediates increased markedly, and some supplemental peaks were also detected for isolate 21230. However, these sterol intermediates were considered to be $\Delta^{5,7}$ dienols, which, like ergosterol, have two conjugated double bonds at C5 and C7, as the absorbance at 281.5 nm (the maximum absorption wavelength of the conjugation) was identical for the two isolates (data not shown).

TABLE 2. Susceptibility of *C. glabrata* isolates 21231 and 21230 to antifungal agents^a.

Antifungal	Inhibition zone diam (mm)	
	21231	21230
Polyenes		
Amphotericin B	27	13
Nystatin	31	19
Azoles		
Econazole	25	35
Miconazole	21	29
Ketoconazole	33	43
Fluconazole	21	29
Voriconazole	30	39

^aSusceptibility was determined by the disk diffusion method with Neosensitabs tablets. The results are the mean values of three independent experiments, for which the standard deviation did not exceed 10%. By using the Wilcoxon Mann-Whitney test at the unilateral risk of α equal to 0.05, significant differences were found between isolates 21230 and 21231 (i.e. larger inhibition zones with azoles and smaller inhibition zones with polyenes for isolate 21230).

TABLE 3. MICs of polyene and azole drugs for *C. glabrata* isolates 21231 and 21230^a.

Antifungals	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	21231	21230
Amphotericin B	0.047	0.125
Ketoconazole	0.19	0.064
Fluconazole	6	1

^aMICs were determined by the Etest procedure with AB Biodisk antifungal strips on Casitone agar plates. The results are expressed as the mean values of three independent experiments, and significant differences were found between isolates 21231 and 21230 using the Wilcoxon Mann-Whitney test at the unilateral risk of α equal to 0.05.

***ERG4*, *ERG5* and *ERG6* gene sequences.** The open reading frames (ORFs) of the corresponding to the *ERG4*, *ERG5* and *ERG6* genes of *C. glabrata* isolate 21230 were compared with the corresponding ORFs of strain CBS138, the genome of which has been fully sequenced (the sequence is available from the GenBank database). Only silent mutations were seen in the sequences of the *ERG4* and *ERG5* genes for isolate 21230, and a single point mutation corresponding to the substitution of a cytosine by a thymine at position +994 relative to the start (position +1) of the ORF was identified in the *ERG6* gene. Analysis of the *ERG6* gene sequence by use of the Multiple Translation program revealed that this point mutation leads to a stop codon and therefore to the shortening of the primary sequence of the C24 sterol methyltransferase by 41 aminoacids at the C terminus.

Levels of expression of ergosterol biosynthesis genes. RT-PCR experiments revealed for the isolate 21230 an increased expression of most of the ergosterol biosynthesis genes tested compared to the levels of expression by wild-type isolate 21231 (Fig. 2). Indeed, with the exception of the *ERG4* gene, the expression of which was unaffected (relative expression level, 1.8), all genes tested were overexpressed, with relative levels of expression of 2.3, 13.1, 17.6, 3.5, and 7.7 for the *ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG5* and *ERG6* genes, respectively.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 1. Gas-phase sterol chromatograms of *Candida glabrata* isolates 21231 (A) and 21230 (B). As illustrated by the dashed line, ergosterol was the main sterol species in wild-type isolate 21231 and accounted for 52.2% of all sterols, whereas it was not detectable on the chromatogram of isolate 21230.

TABLE 4. Percentages of sterol intermediates in *C. glabrata* isolates 21231 and 21230

Peak no. ^a	% Sterol intermediate	
	21231	21230
1	18.2	1.9
2	1.1	1.2
3	ND ^b	35.5
4	ND	18.1
5	52.2	ND
6	ND	15.2
7	5.3	26
8	3.8	ND
9	10.4	ND
10	1.7	1.1
11	8.4	2.2

^a Peak number in Fig. 1A and B.

^b ND, not detected.

FIG. 2. Relative levels of expression of ergosterol biosynthesis genes in *Candida glabrata* isolate 21230 compared to those in wild-type isolate 21231. RT-PCR experiments showed stronger expression of most of the ergosterol biosynthesis genes in isolate 21230. The results are expressed as the mean values of three independent experiments (\pm SD) normalized to β -actin mRNA level.

Cell morphology. The colonies of isolate 21230 and the wild-type isolate were similar in appearance. Similarly, light microscopy revealed that the isolate with decreased susceptibility to polyenes had a morphology typical of that of *C. glabrata*, with solitary, sometimes budding blastoconidia (data not shown). However, transmission electron microscopy revealed modifications of the cell wall ultrastructure for isolate 21230 that consisted of a thinner inner layer of the cell wall, accompanied by retractions of the underlying cytoplasm (Fig. 3).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 3. Ultrastructures of *Candida glabrata* wild-type isolate 21231 (A) and isolate 21230 (B) cells. Transmission electron microscopy revealed important changes in the cell wall in isolate 21230, with a thinner inner layer (see insets in panels A and B) accompanied by retractions of the underlying cytoplasm (arrowheads). N, nucleus; mt, mitochondrion. Bars in panels A and B, 0.5 μm ; bars in insets, 0.1 μm .

Growth kinetic parameters and cell viability and vitality. The growth capabilities of isolate 21230 were also markedly affected since the latency period was about 6 h, whereas it was 2 h for wild-type isolate 21231. Moreover, the generation time calculated during the exponential growth phase was about 8 h for the isolate 21230 whereas it was only 6 h for the wild-type isolate (Fig. 4A). Similarly, the first dead cells were detected by methylene blue staining after only 6 h of incubation in YEPD broth for isolate 21230, and almost half the cells were dead after 120 h of incubation. By contrast, for the wild-type isolate, the first dead cells appeared after 48 h of incubation and almost 80% of the cells were still alive after 120 h of incubation (Fig. 4B). Furthermore, after the coculture of isolate 21230 with the wild-type isolate and subculture, only 7% of the colonies obtained displayed decreased susceptibility to amphotericin B and harbored the stop mutation in the *ERG6* gene.

Susceptibility to cell wall-perturbing agents. The susceptibilities to calcofluor white (1 mg/ml), Congo red (1 mg/ml), sorbitol (2 M), and caffeine (2 mM) were determined by culturing the cells in the presence of these drugs incorporated into solid medium. The growth of the two clinical isolates with low levels of susceptibility to the polyene drugs was inhibited by the four cell wall-disrupting agents tested, although some differences between the two isolates were observed, with the growth of isolate 21229 being more strongly inhibited by 2 mM caffeine than that of isolate 21230 (Fig. 5).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 4. Growth capacity and cell viability of the isolates with reduced susceptibilities to polyenes and their complemented counterparts compared to those of the wild-type isolate. (A and C) Growth curves were drawn by monitoring the absorbance at 600 nm of three independent cultures in YEPD broth. The 21230 (solid triangles) and 21229 (solid squares) isolates had longer latency periods and longer generation times than wild-type isolate 21231 (solid circles) and their complemented counterparts, isolates 21230C (open triangles) and 21229C (open squares). (B and D) Curves representing the percentage of dead cells according to the duration of cultures. The number of dead cells began to increase after only 6 h of incubation for isolate 21230 (solid triangles) and almost half the cells were dead after 120 h of incubation. Similarly, more than 60% of the cells of the isolate 21229 (solid squares) were dead after 120 h of culture. By contrast, the first dead cells appeared after only 48 h of incubation for the wild-type isolate (solid circles) and complemented clones 21230C (open triangles) and 21229C (open squares), and more than 80% of the cells remained alive after a 120-h incubation.

Complementation study. One clone that was able to grow on minimum medium and that was therefore efficiently transformed with the plasmid containing a wild-type copy of the *ERG6* gene was subcultured, and its susceptibility to amphotericin B was determined by the disk diffusion method. The complemented clone, 21230C, had wild-type susceptibility to amphotericin B (diameters of growth inhibition zones, 29 mm for the wild type and 13 mm for clinical isolate 21230). Wild-type levels of susceptibility to calcofluor white, Congo red, sorbitol and caffeine were also observed for this complemented clone and for complemented clone 21229C derived from isolate 21229 (Fig. 5). Similarly, complementation of the two isolates with decreased susceptibility also restored (i) wild-type growth, with latency periods

of about 2 h and generation times of about 7 h for both complemented clones; (ii) cell viability, with less than 15% dead cells after 120 h of incubation for both complemented clones (Fig. 4); and (iii) fitness, as almost half the colonies obtained after coculture with the wild-type isolate contained the plasmid.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 5. Susceptibility to cell wall-perturbing agents of *Candida glabrata* wild-type isolate 21231 or clinical isolates 21229 and 21230 and their complemented counterparts, isolates 21229C and 21230C, respectively. Calcofluor white (1 mg/ml), Congo red (1 mg/ml), sorbitol (2 M) and caffeine (2 mM) were incorporated into the agar medium. Afterward, 10 μ l of fungal suspensions containing from 10^7 to 10^3 cells per ml (from left to right) was spotted on the agar surface. The plates were dried and incubated at 37°C for 48 h. The two clinical isolates were more susceptible than the wild-type isolate to all the cell wall-perturbing agents tested, and complementation of the two clinical isolates restored cell wall integrity. A growth control was performed by spotting the suspensions onto YEPD agar plates containing no inhibitor.

DISCUSSION

Resistance to polyene drugs in yeast clinical isolates is increasingly reported, but the molecular mechanisms, unlike those involved in azole resistance, largely remain unclear. We previously investigated the molecular mechanisms responsible for decreased susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *C. glabrata* with pseudohyphal growth (32). We describe here another clinical isolate of the same yeast species that was also recovered from an elderly patient treated with amphotericin B and which displayed low levels of susceptibility to polyenes on first isolation.

Antifungal susceptibility testing performed by a disk diffusion method as well as MIC determination following the E-test procedure revealed for the isolate a low level of susceptibility to polyenes compared to that for a wild-type isolate. The isolate was also found to be more susceptible than the wild-type to azole drugs, consistent with our previous observations (32), although resistance to polyenes may also be associated with azole resistance (1, 10, 14, 23, 27, 33). For example, cross-resistance to polyenes and azoles has been observed in a petite mutant of the yeast *C. albicans* (10). However, azole resistance due to overexpression of the *CDR1* gene encoding an ATP binding cassette transporter

associated with an increase in susceptibility to polyenes has been reported in most of the petite mutants studied (2, 4, 6, 7, 22).

As ergosterol is the target of polyene drugs (8), the sterol content of the isolate with decreased susceptibility to polyenes was investigated both quantitatively and qualitatively and compared with that of a wild-type isolate. No quantitative differences were observed between the two isolates. Conversely, gas-phase chromatography revealed important changes in the sterol profile for the isolate with decreased susceptibility to polyenes. Consistent with the reduced susceptibility to amphotericin B, ergosterol was not detectable on the chromatogram for isolate 21230 and as a consequence, several peaks corresponding to sterols intermediates were observed. Because of the unavailability of reference standards, these intermediates were not identified precisely, but they were considered to be non-ergosterol $\Delta 5,7$ dienols, based on the results of spectrophotometric assays.

These results led us to sequence genes encoding enzymes catalyzing reactions occurring late in the ergosterol biosynthesis pathway. Only silent mutations were seen in the sequences of the *ERG4* and *ERG5* genes, which encode the C24 sterol reductase and the C22 sterol desaturase, respectively. By contrast, a nonsense mutation (C994T) was observed in the sequence of the *ERG6* gene of isolate 21230. This mutation introduced a stop codon 41 amino acids before the C terminus of the C24 sterol methyltransferase encoded by the *ERG6* gene. The truncation of this enzyme, which catalyzes the conversion of zymosterol into fecosterol by C24 methylation (16), may have important consequences for its function, as suggested by the search for conserved domains. Interestingly, two conserved domains may be found in the sequence of the C24 sterol methyltransferase: the first, located between positions 134 and 222, is found in all *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases (11), whereas the second, located between positions 231 and 331, is a conserved domain found at the C terminus of plant and fungal sterol methyltransferases (3). This second domain (Conserved Domain Database accession number pfam 08498), which usually comprises 137 amino acids, was 37 amino acids shorter in our clinical isolate. This shortening may have modified C24 sterol methyltransferase activity, thereby accounting for the observed defect in ergosterol biosynthesis. Genetic evidence for the involvement of the *ERG6* mutation in the reduced susceptibility of this clinical isolate to polyenes was provided by complementing *ERG6* function, as a *ura3* derivative of the clinical isolate transformed with a centromeric plasmid containing a wild-type copy of the *ERG6* gene was susceptible to polyenes.

The *ERG6* mutation also resulted in the overexpression of almost all the genes catalyzing late steps in the ergosterol biosynthesis pathway, consistent with the hypothesis that this metabolic pathway is blocked. Ergosterol is known to exert negative feedback on its own biosynthesis in *S. cerevisiae* (5, 29), particularly at the C24 methylation step, and this feature seems to be common to all sterol methyltransferases (19). A similar phenomenon may

occur in *C. glabrata*, a species phylogenetically closely related to *S. cerevisiae* (24), and the absence of ergosterol in our clinical isolate may relieve the inhibition exerted by this compound on its biosynthesis pathway.

The absence of ergosterol may have major consequences for the organization of the fungal cell wall or plasma membrane, due to the impairment of protein targeting. Such disturbances have been demonstrated for *S. cerevisiae*, in which a defect in the C24-methylation of sterols (Δ *erg6* background) prevents the targeting of the tryptophan transporter to the plasma membrane (30). It has recently been shown that ergosterol is essential for the targeting of Cdr1p to the plasma membrane in *C. albicans* (25). Moreover, Pasrija et al. (25) demonstrated that the deletion of the *ERG6* gene increases susceptibility to azoles, probably due to the mistargeting of Cdr1p to the plasma membrane, resulting in a loss of the efflux function of this protein. Thus, although it is offset by the accumulation of other Δ 5,7 dienols, the absence of ergosterol may account for the greater susceptibility of our isolate to azole drugs, as non-ergosterol Δ 5,7 dienols are probably not as efficient as ergosterol at ensuring the normal fluidity of the membrane, which is more readily destabilized by exposure to azoles. Moreover, as in *C. albicans* and *S. cerevisiae*, the absence of ergosterol in *C. glabrata* may have an indirect effect on susceptibility to azoles, by preventing the targeting of efflux pumps to the plasma membrane, thereby favoring the accumulation of these drugs within the cell.

However, different mutational events affecting the same gene may have different consequences for the residual activity of the encoded protein. For example, site-directed mutagenesis experiments on the *ERG6* gene of *S. cerevisiae* have demonstrated the critical importance of certain highly conserved amino acids. Aromatic residues at positions 82, 83, 85, 87, 91 and 93, which constitute region 1 of sterol methyltransferases, are essential for the catalytic activity of the enzyme (21). Similarly, three aspartic acid residues at positions 125, 152 and 276 and a glutamic acid at position 195 are required for binding of the *S. cerevisiae* sterol methyltransferase substrates, *S*-adenosyl-L-methionine and zymosterol (20). Substitutions affecting such important residues have different consequences, depending on the nature of the amino acid replacing the original residue. The replacement of these residues by a leucine residue leads to a total loss of enzyme activity, whereas isoleucine has a weaker effect on the sterol methyltransferase. By contrast, the replacement of the tyrosine at position 83 by a phenylalanine increases the activity of Erg6p.

Two different mutational events were identified in the *ERG6* gene of clinical isolates 21230 and 21229: a nonsense mutation in isolate 21230 and a missense mutation in isolate 21229 (32). This may account for the morphological differences observed between the two isolates. We previously characterized isolate 21229, which has decreased susceptibility to polyenes and pseudohyphal growth, and demonstrated that both these features were linked to mutation of the *ERG6* gene. We also suggested that the absence of ergosterol in the

membranes of this isolate prevented the targeting to the plasma membrane of certain enzymes required for the release of daughter cells after budding and septation. Surprisingly, clinical isolate 21230 had a normal morphology, consisting of round cells generally solitary but sometimes budding, and the MIC of amphotericin B for this isolate was 1/10 that of isolate 21229. However, the examination of ultrathin sections of blastoconidia by transmission electron microscopy revealed changes in the structure of the cell wall for this isolate, with a thinning of the inner layer associated with retraction of the underlying cytoplasm. Moreover, these cell wall modifications were accompanied by an increase in susceptibility to cell wall-perturbing agents, as reported for isolate 21229. These results suggest that cell wall organization strongly depends on the sterol composition of the membranes. The C24 sterol methyltransferase may not be fully inactivated by the nonsense mutation, probably because the C terminus of the enzyme plays a less important role than the rest of the molecule in the activity of the enzyme. As a consequence, ergosterol is probably not entirely absent but may be masked by sterol intermediates accumulating in mutant cells and therefore not detectable on sterol chromatograms. Thus, the amount of ergosterol synthesized, although too low for wild-type levels of susceptibility to polyenes, may be sufficient to ensure the normal trafficking of proteins to the plasma membrane and to allow the cells to separate after budding and septation. It would be interesting to introduce the mutated *ERG6* allele of 21230 isolate into an *ERG6* null background to determine whether this allele is actually nonfunctional or whether the nonsense mutation leads, as suggested here, to a partial loss of C24 sterol methyltransferase activity.

Consistent with these changes in the ultrastructure of the cell wall, the isolates with decreased susceptibility to polyenes had higher mortality rates, grew less well, and displayed a marked fitness cost in antifungal drug-free medium. These observations suggest that the *ERG6* mutations constitute a selective disadvantage in the absence of selection pressure. However, given the haploidy of the *C. glabrata* genome (13) and the resulting higher probability of expression of a mutated allele, such mutations may be clinically relevant in the current therapeutic context, which is dominated by prophylaxis. Together with the constitutively low level of susceptibility to azoles of *C. glabrata* and the frequent acquisition of azole resistance, these mutations may account at least in part for the increasing incidence of this yeast species (9).

In conclusion, we determined the molecular mechanism responsible for the decreased susceptibility to polyenes observed in a clinical isolate of *C. glabrata*. This decrease in susceptibility was due to a nonsense mutation in the *ERG6* gene, which encodes an enzyme involved in late steps of the ergosterol biosynthesis pathway. As this is the second isolate of this species with a low level of susceptibility to polyenes to be characterized in our laboratory, it seems that *ERG6* mutants of *C. glabrata*, which are obtained more easily in this species than in diploid *Candida* species, may be selected by the prophylactic or therapeutic use of

amphotericin B. Proteomic studies are under way to characterize the differences between clinical isolates with decreased susceptibility to polyenes in protein trafficking to the plasma membrane for identification of the enzymes involved in the release of daughter cells after budding and septation. Directed mutagenesis experiments will also be carried out to determine the functions of the different domains of Erg6p.

ACKNOWLEDGEMENTS

During the course of this work, P. V. was the recipient of a grant from Angers Loire Métropole. This study was supported in part by a grant from Institut de Parasitologie de l'Ouest, Rennes, France. We thank Angers University Hospital, France, for financial support.

REFERENCES

1. **Barker, K. S., S. Crisp, N. Wiederhold, R. E. Lewis, B. Bareither, J. Eckstein, R. Barbuch, M. Bard, and P. D. Rogers.** 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:376-385.
2. **Bouchara, J. P., R. Zouhair, S. Le Boudouil, G. Renier, R. Filmon, D. Chabasse, J. N. Hallet, and A. Defontaine.** 2000. In-vivo selection of an azole-resistant petite mutant of *Candida glabrata*. *J. Med. Microbiol.* **49**:977-984.
3. **Bouvier-Navé, P., T. Husselstein, and P. Benveniste.** 1998. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **256**:88-96.
4. **Brun, S., T. Bergès, P. Poupard, C. Vauzelle-Moreau, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2004. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1788-1796.
5. **Casey, W. M., J. P. Burgess, and L. W. Parks.** 1991. Effect of sterol side-chain structure on the feed-back control of sterol biosynthesis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1081**:279-284.
6. **Cheng, S., C. J. Clancy, K. T. Nguyen, W. Clapp, and M. H. Nguyen.** 2007. A *Candida albicans* petite mutant strain with uncoupled oxidative phosphorylation overexpresses *MDR1* and has diminished susceptibility to fluconazole and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1855-1858.
7. **Defontaine, A., J. P. Bouchara, P. Declerk, C. Planchenault, D. Chabasse, and J. N. Hallet.** 1999. In-vitro resistance to azoles associated with mitochondrial DNA deficiency in *Candida glabrata*. *J. Med. Microbiol.* **48**:663-670.
8. **Ellis, D.** 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **1**:7-10.
9. **Fidel, P. L. Jr, J. A. Vazquez, and J. D. Sobel.** 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:80-96.
10. **Geraghty, P., and K. Kavanagh.** 2003. Disruption of mitochondrial function in *Candida albicans* leads to reduced cellular ergosterol levels and elevated growth in the presence of amphotericin B. *Arch. Microbiol.* **179**:295-300.
11. **Jensen-Pergakes, K. L., M. A. Kennedy, N. D. Lees, R. Barbuch, C. Koegel, and M. Bard.** 1998. Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (*ERG6*) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1160-1167.
12. **Kanafani, Z. A., and J. R. Perfect.** 2008. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**:120-128.

13. **Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupancic, and B. P. Cormack.** 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:378-384.
14. **Kelly, S. L., D. C. Lamb, D. E. Kelly, N. J. Manning, J. Loeffler, H. Hebart, U. Schumacher, and H. Einsele.** 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective delta 5,6-desaturation. *FEBS Lett.* **400**:80-82.
15. **Kuranda, K., V. Leberre, S. Sokol, G. Palamarczyk, and J. François.** 2006. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol. Microbiol.* **61**:1147-1166.
16. **Lees, N. D., B. Skaggs, D. R. Kirsch, and M. Bard.** 1995. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*-a review. *Lipids* **30**:221-226.
17. **Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, N. R. Gonzales, M. Gwadz, L. Hao, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, D. Krylov, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. Zhang, and S. H. Bryant.** 2007. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* **35**: 237-240.
18. **Marchler-Bauer, A., and S. H. Bryant.** 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* **32**:327-331.
19. **Nes, W. D.** 2003. Enzyme mechanisms for sterol C-methylations. *Phytochemistry* **64**:75-95.
20. **Nes, W. D., P. Jayasimha, W. Zhou, R. Kanagasabai, C. Jin, T. T. Jaradat, R. W. Shaw, and J. M. Bujnicki.** 2004. Sterol methyltransferase: functional analysis of highly conserved residues by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **43**:569-576.
21. **Nes, W. D., A. Sinha, P. Jayasimha, W. Zhou, Z. Song, and A. L. Dennis.** 2006. Probing the sterol binding site of soybean sterol methyltransferase by site-directed mutagenesis: functional analysis of conserved aromatic amino acids in Region 1. *Arch. Biochem. Biophys.* **448**:23-30.
22. **Niimi, M., K. Niimi, Y. Takano, A. R. Holmes, F. J. Fischer, Y. Uehara, and R. D. Cannon.** 2004. Regulated overexpression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **6**:999-1006.
23. **Nolte, F. S., T. Parkinson, D. J. Falconer, S. Dix, J. Williams, C. Gilmore, R. Geller, and J. R. Wingard.** 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:196-199.
24. **Odds, F. C., M. G. Rinaldi, C. R. Jr. Cooper, A. Fothergill, L. Pasarell, and M. R. McGinnis.** 1997. *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **35**:313-316.
25. **Pasrija, R., S. L. Panwar, and R. Prasad.** 2008. Multidrug transporters CaCdr1p and CaMdr1p of *Candida albicans* display different lipid specificities: both ergosterol and sphingolipids are essential for targeting of CaCdr1p to membrane rafts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:694-704.
26. **Richardson, M. D.** 2005. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:i5-i11.
27. **Sanglard, D., F. Ischer, T. Parkinson, D. Falconer, and J. Bille.** 2003. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2404-2412.
28. **Sanglard, D., and F. C. Odds.** 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2**:73-85.
29. **Servouse, M., and F. Karst.** 1986. Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **240**:541-547.
30. **Umebayashi, K., and A. Nakano.** 2003. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* **161**:1117-1131.
31. **Vandeputte, P., G. Larcher, T. Bergès, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4608-4615.

- 32. Vandeputte, P., G. Tronchin, T. Bergès, C. Hennequin, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2007. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:982-990.
- 33. Watson, P. F., M. E. Rose, and S. L. Kelly.** 1998. Isolation and analysis of ketoconazole resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Med. Vet. Mycol.* **3**:153-162.

La résistance à la 5-fluorocytosine (5-FC) est un phénomène relativement fréquent chez les isolats cliniques de levures exposées à cet antifongique. La principale raison expliquant cette fréquence élevée est certainement la complexité du mode d'action de la 5-FC. Pour exercer son activité antifongique, la 5-FC doit en effet être convertie par une dizaine d'enzymes, dont cinq majeures, dédiées normalement à l'utilisation de la cytosine exogène présente dans l'environnement de la levure. Ainsi, de nombreux évènements mutationnels peuvent aboutir à une résistance à la 5-FC, d'où sa fréquence élevée. Cependant, ces mécanismes moléculaires n'ont que peu été étudiés chez la levure *C. glabrata*. Nous avons donc tenté de déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance à la 5-FC chez *C. glabrata* à l'aide de mutants induits au laboratoire par exposition d'une souche sauvage à cet analogue pyrimidique.

Afin de déterminer si l'acquisition de la résistance à la 5-FC était plus fréquente chez *C. glabrata* comparativement à deux autres espèces de première importance en clinique, *C. albicans* et *C. tropicalis*, la sensibilité à la 5-FC a été évaluée par une technique de diffusion en gélose pour cinq isolats cliniques de chacune de ces espèces, ainsi que le nombre de colonies à l'intérieur des zones d'inhibition de croissance. 80% des isolats de *C. tropicalis* testés étaient résistants à la 5-FC. En revanche, tous les isolats de *C. glabrata* et de *C. albicans* étaient sensibles. En outre, le nombre de colonies à l'intérieur des zones d'inhibition a semblé plus élevé pour *C. glabrata*, ce qui a été confirmé par détermination du taux d'acquisition de résistance à la 5-FC.

Six mutants de *C. glabrata* ont été obtenus par exposition d'une souche sauvage à la 5-FC. Après avoir déterminé leur sensibilité à la 5-FC et aux antifongiques azolés par la technique de diffusion en gélose ainsi qu'au 5-fluorouracile par incorporation de ce composé dans la gélose, deux mutants représentant les deux phénotypes ainsi identifiés ont été sélectionnés afin de déterminer les mécanismes moléculaires en cause. Le premier mutant présentait une résistance totale à la 5-FC et au 5-FU, alors qu'une réduction marquée de la sensibilité à ces deux fluoropyrimidines était observée pour le second.

La séquence et le niveau d'expression des principaux gènes classiquement impliqués dans les résistances à la 5-FC ont été déterminés. Le premier mutant, totalement résistant à la 5-FC et au 5-FU, était porteur d'une mutation faux sens sur le gène *FCY1*, codant la cytosine désaminase, l'enzyme responsable de la conversion de la 5-FC en 5-FU. L'expression du gène *FUR1*, codant l'uridine monophosphate pyrophosphorylase, était diminuée d'un facteur 2 chez ce mutant par rapport à la souche parentale. Le deuxième mutant présentait quant à lui une surexpression des gènes *FCY2* et *CDC21*, codant respectivement une cytosine perméase et la thymidylate synthétase. De plus, le gène *FCY2* de ce mutant portait une mutation faux sens, suggérant une diminution de l'activité du transporteur.

Enfin, les conséquences de ces mutations sur la vitalité de ces mutants ont été étudiées en établissant des courbes de croissance et en réalisant des expériences de

croissance compétitive avec la souche parentale, ou expériences de *fitness*. Si la capacité de croissance des mutants n'était pas modifiée aussi bien au niveau du temps de latence qu'au niveau du temps de génération, leur *fitness* était largement diminué. En effet, seuls 5% des colonies ré-isolées à partir des co-cultures, pour le mutant de sensibilité réduite aux fluoropyrimidines, présentaient une très faible sensibilité à la 5-FC et étaient porteuses de la mutation sur le gène *FCY2*. De même, pour le mutant totalement résistant à la 5-FC et au 5-FU, toutes les colonies ré-isolées à partir des co-cultures présentaient un phénotype sauvage concernant la sensibilité aux fluoropyrimidines.

En conclusion, nous avons identifié les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance à la 5-FC chez deux mutants induits de *C. glabrata*. Ainsi, si le mécanisme le plus fréquemment retrouvé chez les isolats cliniques du genre *Candida* est une mutation du gène *FUR1*, il semble que chez *C. glabrata* d'autres mécanismes puissent intervenir. De plus, il semble que la fréquence d'acquisition de la résistance à la 5-FC soit, au moins *in vitro*, plus élevée chez *C. glabrata* que chez *C. albicans*, probablement en raison de son caractère haploïde, qui augmente la probabilité qu'un événement mutationnel touchant un gène impliqué dans le métabolisme de la 5-FC conduise à une résistance. Chez la plupart des autres espèces du genre *Candida*, la mutation doit en effet être présente à l'état homozygote pour s'exprimer.

**ÉTUDE N°3 : MANUSCRIT SOUMIS POUR PUBLICATION DANS LA REVUE
ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**

Mécanismes moléculaires de la résistance à la 5-fluorocytosine
chez des mutants induits de *Candida glabrata*

Patrick Vandeputte^{1,2*}, Laurent Pineau^{1†}, Gérald Larcher¹, Thierry Noel³, Daniel Brèthes⁴, Dominique Chabasse^{1,2} and Jean-Philippe Bouchara^{1,2}

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Université d'Angers, France¹; Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France²; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, CNRS, UMR-5234, Bordeaux, France³; and Université Victor Segalen Bordeaux 2, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS, UMR-5095, Bordeaux, France⁴.

[†]Current address : Cytokines : structure, signalisation et prolifération tumorale, INSERM U564, Université d'Angers, France.

La résistance à la 5-fluorocytosine (5-FC), qui peut résulter de nombreux évènements génétiques en raison de son mode d'action complexe, a été peu étudiée chez *Candida glabrata*, la deuxième espèce responsable de candidose. Cette étude a donc été menée chez des mutants résistants obtenus par exposition d'une souche sauvage à la 5-FC. La détermination de la sensibilité par la technique de diffusion en gélose a démontré une fréquence élevée de résistance acquise à la 5-FC chez *C. glabrata*. De plus, l'étude de la sensibilité au 5-fluorouracile, la forme désaminée de la 5-FC, a permis de distinguer deux groupes parmi les mutants résistants à la 5-FC. Deux de ces mutants ont été sélectionnés afin d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance à la 5-FC, ce qui fut réalisé par séquençage et évaluation du niveau d'expression des principaux gènes impliqués dans le métabolisme de la 5-FC. Un de ces mutants, résistant à la 5-FC et au 5-FU, avait une mutation faux-sens dans le gène *FCY1*, codant la cytosine désaminase, et une sous-expression d'un facteur 2 du gène *FUR1*, codant l'uridine monophosphate pyrophosphorylase. L'autre mutant, de sensibilité très réduite aux fluoropyrimidines, surexprimait les gènes *CDC21* et *FCY2*, codant respectivement la thymidylate synthétase et une cytosine perméase, et présentait une mutation faux-sens au niveau du gène *FCY2*, suggérant un dysfonctionnement de FCY2p. Ainsi, outre les mutations du gène *FUR1*, qui sont décrites pour être la principale cause de la résistance à la 5-FC, d'autres mécanismes peuvent survenir chez *C. glabrata* qui, tout au moins *in vitro*, peut facilement acquérir une résistance à la 5-FC, probablement en raison de son caractère haploïde.

Molecular Mechanisms of Resistance to 5-fluorocytosine in Laboratory Mutants of *Candida glabrata*

Patrick Vandeputte^{1,2*}, Laurent Pineau^{1†}, Gérald Larcher¹, Thierry Noel³, Daniel Brèthes⁴, Dominique Chabasse^{1,2} and Jean-Philippe Bouchara^{1,2}

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Université d'Angers, France¹; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France²; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, CNRS, UMR-5234, Bordeaux, France³; and Université Victor Segalen Bordeaux 2, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS, UMR-5095, Bordeaux, France⁴.

†Current address : Cytokines : structure, signalisation et prolifération tumorale, INSERM U564, Université d'Angers, France.

Resistance to 5-fluorocytosine (5-FC), which may result from multiple genetic events, has been poorly investigated in *Candida glabrata*, the second causative agent of candidiasis. This study was therefore conducted on laboratory mutants obtained by exposure of a wild-type isolate of *C. glabrata* to 5-FC. Antifungal susceptibility testing performed by a disk diffusion method demonstrated the high frequency of the acquired resistance to 5-FC in *C. glabrata*. Moreover, study of the susceptibility to its deaminated form, 5-fluorouracil (5-FU), allowed us to distinguish two groups among the obtained 5-FC resistant mutants. Two of these mutants were selected for further analysis of the molecular mechanisms of 5-FC resistance which was conducted by sequencing of the main genes involved in 5-FC metabolism and quantifying their expression level. One mutant, resistant to both 5-FC and 5-FU, exhibited a missense mutation in the *FCY1* gene, coding the cytosine deaminase, and a 2-fold decrease in the expression level of the *FUR1* gene, coding the uridine monophosphate pyrophosphorylase. The other mutant, which showed a reduced susceptibility to 5-FC and 5-FU, exhibited an overexpression of the *CDC21* and *FCY2* genes, coding the thymidylate synthase and a cytosine permease, respectively, associated with a missense mutation in the last gene, which suggested an altered function of FCY2p. Thus, beside mutations in the *FUR1* gene which represent the most common cause of resistance to 5-FC, other mechanisms may also occur in *C. glabrata* which, at least *in vitro*, may easily acquire resistance, probably in relation with its haploid genome.

*Corresponding author. Mailing address : Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Bâtiment Montéclair, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France. Phone : 33 (0)2 41 35 34 72. Fax : 33 (0)2 41 35 36 16. E-mail : patrick.vandeputte@etud.univ-angers.fr.

The incidence of systemic infections due to non-*albicans* *Candida* species has increased markedly since the 1970s (13), mainly because of the intensive use of antifungals in prophylaxis or therapy and of the primary low susceptibility of some of these yeast species to azoles which are the most widely used antifungals (1). For instance, *Candida glabrata* has become today the second yeast species in frequency in all clinical forms of candidiasis (14, 19, 29). This could be due to its usually low susceptibility to azoles and to the high frequency of acquired resistance. These observations may be related to the particular genomics of this species. Indeed, contrary to other *Candida* species, no sexual reproduction has been described in *C. glabrata*, even if sexual loci, similar to those identified in *Saccharomyces cerevisiae*, were detected (11). Likewise, *C. glabrata* possesses a haploid genome and therefore a single mutation in the appropriate gene would be sufficient to determine an acquired resistance to antifungals.

Four classes of antifungals are used today for treatment or prophylaxis of systemic candidiasis. The newly developed echinocandins are represented by caspofungin, micafungin and anidulafungin which inhibit the β 1,3-glucan synthase (28). Polyenes and azole drugs act respectively on ergosterol, the main component of the yeast plasma membrane, and its biosynthesis (24). Pyrimidine analogs constitute the last class of systemic antifungals which comprises a unique representative, 5-fluorocytosine (5-FC) (32). Due to its elevated toxicity and to the high occurrence of resistance to this antifungal (26), 5-FC cannot be used in monotherapy and should always be combined with another antifungal, usually an azole or polyene drug (32).

5-FC acts in the yeast cell by two different ways (30). These two modes of action share common early metabolism steps (35). First, 5-FC must penetrate the cells through more or less specific transporters, such as cytosine permeases or pyrimidine transporters. Then, 5-FC is converted within fungal cells into 5-fluorouracil (5-FU) by the cytosine deaminase, coded by the *FCY1* gene. Thereafter, 5-FU is in its turn converted into 5-fluorouridine monophosphate (5-FUMP) by the uridine phosphoribosyl transferase (UPRT) coded by the *FUR1* gene. Finally, through successive steps of phosphorylation, 5-FUMP is converted into 5-fluorouridine triphosphate which incorporates into RNA in place of UTP and disturbs protein synthesis. Additionally, 5-FUMP is converted into 5-deoxyuridine monophosphate which inhibits the activity of the product of the *CDC21* gene, the thymidylate synthase, and therefore blocks DNA synthesis (32).

If resistance to 5-FC can be an innate character, like in a subpopulation of *C. albicans* (22) or in *C. krusei* (20), the acquired resistance to this drug is also common in other pathogenic fungi, due to mutations in one of the genes involved in 5-FC metabolism or to deregulation of the expression of these genes (7, 18). The most frequent molecular events described to be responsible for 5-FC resistance are mutations in the *FUR1* gene, coding the UPRT (5, 9). An increased expression of the *CDC21* gene has also been reported, correlated

with an increased overall activity of the pyrimidine synthesis pathway, which therefore compensates the effects of the fluorinated analogs (21). Finally, a missense mutation in the cytosine deaminase coding gene was evidenced to be responsible for 5-FC resistance in a clinical isolate of *C. albicans* (10).

Regarding *C. glabrata*, only few studies deal with the mechanisms of fluoropyrimidine resistance. Normark and Schönebeck (16) analysed pyrimidine incorporation and UPRT activity of five *C. glabrata* clinical isolates and demonstrated a decreased UPRT activity for one of them. Likewise, the metabolism of fluoropyrimidines in selected mutants of *C. glabrata* was investigated by nuclear magnetic resonance which revealed a partial loss of cytosine permease activity (8). However, to our knowledge, mechanisms responsible for the acquired resistance to 5-FC have never been investigated in *C. glabrata* at the gene level.

Considering the growing incidence of *C. glabrata* in systemic candidiasis and the little information available concerning the mechanisms of 5-FC resistance in this yeast species, laboratory resistant mutants were produced and characterized at the molecular level.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and culture conditions. This study was conducted using *C. glabrata* clinical isolate 1085S, previously characterized in our laboratory in the course of studies on azole and polyene resistance (2, 30, 31) and deposited at the Institute of Hygiene and Epidemiology – Mycology section (IHEM; Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium) culture collection under the accession number 21231. Four other clinical isolates of *C. glabrata*, as well as clinical isolates of *C. albicans* and *C. tropicalis* (five for each species), were also used for some experiments. Laboratory mutants of *C. glabrata* resistant to 5-fluorocytosine (5-FC) were obtained by exposure of isolate 1085S to this pyrimidin analog and were designated as M1 to M6.

All isolates were maintained by regular passages on yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) agar plates containing yeast extract (5 g/L), peptone (10 g/L), glucose (20 g/L) chloramphenicol (0.5 g/L) and agar (20 g/L) and were preserved by lyophilization and by freezing at -80°C in 20% glycerol. For some experiments, blastoconidia were obtained by culture in YEPD broth at 37°C with constant agitation.

Antifungal susceptibility testing. Susceptibility to azoles was determined as previously described (30) on Casitone agar plates containing Bacto-casitone (9 g/L), glucose (20 g/L), yeast extract (5 g/L), chloramphenicol (0.5 g/L) and agar (18 g/L), using fluconazole (15 µg), ketoconazole (15 µg), miconazole (10 µg), clotrimazole (10 µg) and itraconazole (8 µg) Neosensitabs tablets (Rosco Diagnostic, Taastrup, Denmark).

Susceptibility to 5-FC was also determined by the disk diffusion method which was performed on Shadomy agar plates containing yeast nitrogen base (6.7 g/L), glucose (10

g/L), L-asparagine (1.5 g/L), NaH₂PO₄ (0.3 g/L), K₂HPO₄ (0.92 g/L), chloramphenicol (0.1 g/L) and agar (15 g/L) using 5-FC (10 mg) Neosensitabs tablets.

Minimum inhibitory concentration (MIC) of 5-FC was determined on Shadomy agar plates by the E-test procedure (AB Biodisk, Solna, Sweden).

As Neosensitabs tablets and E-test strips were not available for 5-fluorouracil (5-FU), susceptibility to this drug was determined by incorporation of the fluorinated analog (1 mg/ml solution in dimethylsulfoxide) in Shadomy agar medium. Fungal suspensions from 10⁶ to 10⁸ blastoconidia per ml were prepared for each isolate and 20 ml-drops were deposited on Shadomy agar plates supplemented with 1, 10 or 50 mg/ml of 5-FU. After a 48 h-incubation at 37°C, susceptibility to 5-FU was evaluated according to growth inhibition for each inoculum size and concentration of the antifungal.

Determination of the frequency of the acquired resistance to 5-FC. The frequency of the acquired resistance to 5-FC was determined for *C. glabrata* 1085S and *C. albicans* 1310 isolates using blastoconidia from 48-h-old cultures on YEPD plates. After washing in sterile distilled water, fungal suspensions were adjusted to 10⁹ blastoconidia per ml and serial ten-fold dilutions were prepared, ranging from 10⁹ to 10⁵ cells per ml. One hundred microliters of each suspension was poured and spread on a Shadomy agar plate containing 1 mg/ml of 5-FC. After a 48- to 72-h incubation at 37°C, colonies were counted and frequency of 5-FC resistance was determined as the ratio between the number of colonies and the density of the inoculum.

Oxygraphy. Oxygen consumption rates were determined by oxygraphy using stationary growth-phase blastoconidia (48 h at 37°C) from YEPD agar plates. After washing in sterile distilled water and enumeration by haemocytometer count, cells (10⁹ per ml) were suspended in 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 containing 20 mM glucose. Oxygen consumption was measured at 37°C with an Oxytherm oxygraph (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, England) on 10⁸ cells. Respiration activities are expressed as nanomoles of oxygen consumed per milliliter and per minute.

DNA extraction and sequencing of *FCY1*, *FCY2*, *FCY21*, *FUR1* and *CDC21* genes. Primers used for *FCY1*, *FCY2*, *FCY21*, *FUR1* and *CDC21* gene sequencing are presented in Table 1. They were designed with the WebPrimer program (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) from *C. glabrata* CBS138 *FCY1*, *FCY2*, *FCY21*, *FUR1* and *CDC21* gene sequences (GenBank accession numbers XM445483, XM447832, XM448803, XM447193 and XM448463, respectively) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium).

TABLE 1. Oligonucleotides used for gene sequencing and evaluation of gene expression.

Gene name (gene product)	Genbank accession no.	Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Hybridation temperature (°C)
<i>FCY1</i> (cytosine deaminase)	XM445483	FCY1 1F	TTGGTTGACACGCGGTATTA	54
		FCY1 1R†	ATGGTACTGTTCTGGGCCG	
		FCY1 2F†	AGTCTACCACAGTTCTCCAAA	50
		FCY1 2R	GATGCGATGAGCTTGCAATA	
<i>FCY2</i> (cytosine permease)	XM447832	FCY2 1F	CATCCCCATATACACATACAC	50
		FCY2 1R	AGATTCTGGCAGTGATGTTCC	
		FCY2 2F†	CGTGGCGTTCTTCTCTGTGTT	56
		FCY2 2R†	AATGGGAAGGCCAAGCCTG	
		FCY2 3F	TGTTTGGTTTCGCCTCCG	50
		FCY2 3R	TGTCTGTAGATCAAATGCTCA	
<i>FCY21</i> (cytosine permease)	XM448803	FCY21 1F	AAATCTGCAATGGAGTTGAA	50
		FCY21 1R	AGAACGCAACGGAAACCAAA	
		FCY21 2F†	TATGCTCTTGGTGCTTTGGGT	50
		FCY21 2R†	CCAGACTTATGTAGTCTTGCG	
		FCY21 3F	CGCTTATGAAAGATGGTCCTG	52
		FCY21 3R	TGTTAGGAATATTGTTGGCGA	
<i>FUR1</i> (uridine phosphoribosyl transferase)	XM447193	FUR1 1F	GTAACGTTGGACTTAATGGA	48
		FUR1 1R	TCGCTGACAGATACGTTTTTC	
		FUR1 2F†	TTCTTTCTGGCTTGACACCTC	52
		FUR1 2R†	AAACCACTGCCTGTTGAGA	
<i>CDC21</i> (thymidylate synthase)	XM448463	CDC21 1F	AAGAAACAAATGTAACGCTGA	49
		CDC21 1R	TCTTGCCTGTTATACCAGAGA	
		CDC21 2F†	CCTGGTTCCATATCACAACA	52
		CDC21 2R†	TCCCGTGAATACTTGGACAA	
<i>ACT</i> (β actin)	AF069746	ACT F†	TATTGACAACGGTCCCGG	52
		ACT R†	TAGAAAGTGTGATGCCAG	

† Primers used for evaluation of gene expression.

Genomic DNA was extracted from each isolate using the DNeasy Plant minikit (Qiagen Inc., Valencia, Calif.) and used as template for PCR amplification. The thermocycling conditions were the following : 5 min of denaturation at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C for denaturation, 40 s at hybridation temperature of each couple of primers for annealing and 50 s at 72°C for elongation, with a final elongation step of 10 min at 72°C. PCR products were purified with the High Pure PCR Products Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) following the recommendations of the manufacturer. The amplified products were then purified through G50 Sepharose columns (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany), and used as template for sequencing which was

performed with the Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, Calif.) using the aforementioned forward and reverse primers. The sequencing products were resolved and analysed on a CEQ8000 DNA analysis system (Beckman Coulter).

mRNA extraction and real-time reverse transcription-PCR analysis of gene expression. Total RNA were extracted from exponential growth-phase cultures (24 h at 37°C) in YEPD broth as previously described (30) and used to quantify the expression of genes potentially involved in 5-FC resistance (*FCY1*, *FCY2*, *FCY21*, *FUR1* and *CDC21*).

Reverse transcription (RT) was performed on 1 µg of total RNA incubated for 1 h at 37°C in a thermalcycler in the presence of 2.65 µg random hexanucleotides (Amersham Biosciences), 2 µl 10 mM each dNTP, 40 U RNAsIn ribonuclease inhibitor and 200 U M-MLV reverse transcriptase (Promega, Charbonnières, France) in a final volume of 50 µl. The obtained cDNAs were purified with the Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) following the recommendations of the manufacturer and diluted 10 fold in distilled water. Quantitative PCR was performed on a capillary real-time thermalcycler (LightCycler; Roche Diagnostics), and the results were normalized to b-actin mRNA. Amplification was done in a 10-µl final volume containing 1 µl of the LightCycler Fastart DNA Master SYBR Green Kit (Roche Diagnostics), 1 µl of primer mix (5 nM each), 1.2 µl MgCl₂ (4 mM final concentration), 1.8 µl H₂O and 5 µl cDNA. The following run protocol was used: denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles consisting of 15 s at 95°C for denaturation, 11 s at 54°C for annealing and 22 s at 72°C for elongation. Primers used to perform real-time RT-PCR experiments are described in Table 1.

Uptake measurements. Uptake measurements were made as previously described (15) by using [2-¹⁴C]5-FC (1.92 GBq mmol⁻¹) from Moravek Biochemicals (Brea, Calif.). Briefly, after growing in YEPD medium at 37°C until exponential growth phase, cells were harvested by centrifugation and resuspended at a density of 4 x 10⁶ to 5 x 10⁶ cells per ml in 50 mM sodium citrate (pH 5.0) containing 2% glucose at 30°C. The reaction was started by addition of the radioactive ligand at concentrations ranging from 1 to 50 µM. As a function of time, aliquots (0.3 ml) were filtered through 0.8-µm-pore-size cellulose acetate filters from Sartorius (Goettingen, Germany), washed twice with 3 ml of cold water, dried, and assayed for radioactivity. The maximal rate of uptake (V_{max}) and the apparent Michaelis constant of transport [$K_t(app)$] were calculated by nonlinear regression analysis of the initial rates of uptake versus the solute concentrations.

Growth rate and fitness cost experiments. Growth rates were investigated by inoculating 50 ml of YEPD with an appropriate number of cells to reach an absorbance of 0.1 unit at 595 nm. Cultures were incubated at 37°C with constant shaking until stationary phase and absorbance at 595 nm was monitored all along the duration of incubation. Experiments were performed in triplicate and results correspond to mean values obtained from three independent cultures.

Fitness cost experiments were performed by cultivating each mutant M1 or M6 together with its parent wild-type isolate in YEPD broth. To do this, suspensions of blastoconidia were prepared for each isolate in sterile distilled water to reach an absorbance at 595 nm of 0.5 unit for a 1:10 dilution. Thereafter, the culture medium (50 ml) was inoculated with a mix of the parent and mutant M1 or M6 suspensions (1 ml each). After a 48-h incubation at 37°C with constant shaking, mixed cultures were 10⁶-fold diluted and a 100-ml aliquot of these dilutions was poured and spread on YEPD agar plates, which were incubated for 48 h at 37°C. Twenty colonies were then isolated and their susceptibility to 5-FC was determined by the disk diffusion method as mentioned above. Gene mutated in mutant M6 was then sequenced as described above for colonies originated from co-culture of this mutant and its parent wild-type isolate and exhibiting a reduced susceptibility to 5-FC.

Nucleotide sequences accession numbers. Sequences determined for *FCY1*, *FCY2*, *FCY21*, *FUR1* and *CDC1* genes for *C. glabrata* isolate 1085S and mutants M1 and M6 were deposited in the GenBank database and are available under the accession numbers DQ657226, DQ657227, DQ657228, DQ657229 and DQ657230 for isolate 1085S, DQ657231, DQ657232, DQ657233, DQ657234 and DQ657235 for mutant M1, and DQ657236, DQ657237, DQ657238, DQ657239, and DQ657240, for mutant M6 (see Table 3).

RESULTS

Frequency of the acquired resistance to 5-FC in *C. glabrata*. Clinical isolates of the three main pathogenic *Candida* species, i. e. *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*, were tested for their susceptibility to 5-FC using a disk diffusion method on Shadomy agar plates. Four of the five *C. tropicalis* isolates were totally resistant to this drug, as it usually occurs for this yeast species (13). Strikingly a unique *C. tropicalis* isolate, already described for its resistance to azoles (30), was found to be susceptible to 5-FC (diameter of the growth inhibition zone : 70 mm), but no resistant colonies were seen within the inhibition zone.

In contrast, all isolates of *C. albicans* and *C. glabrata* were susceptible to 5-FC with diameters of the growth inhibition zones ranging from 40 to 55 mm and from 54 to 72 mm for *C. albicans* and *C. glabrata* isolates, respectively. Interestingly, numerous colonies were seen within the growth inhibition zones for *C. glabrata* isolates (> 50 colonies for two of them, and from 8 to 30 colonies for the three others) whereas only few colonies were observed within the inhibition zones for *C. albicans* (from 1 to 15 colonies) and only for four out of the five isolates studied.

These results suggested a higher frequency for the acquired resistance to 5-FC in *C. glabrata* which was confirmed by determination of the acquisition rates for *C. glabrata* isolate 1085S and *C. albicans* isolate 1310. On Shadomy agar plates supplemented with 1 µg/ml 5-FC (a concentration corresponding to 50 or 100 fold the MIC of 5-FC for these isolates),

resistance to 5-FC was found to be more frequent in *C. glabrata* compared with *C. albicans*, with acquisition rates of resistance of 10^{-8} and 10^{-9} , respectively.

Selection of *Candida glabrata* mutants and their susceptibility to pyrimidine analogs. Six mutants growing within the inhibition zone of *C. glabrata* isolate 1085S with 5-FC were tested for respiratory activity and susceptibility to azoles to determine if they were petite mutants since they are known to appear at a high frequency in *C. glabrata* when exposed to azole drugs. However, all mutants exhibited a normal respiratory activity, with slight variations between isolates in the oxygen consumption rates (Table 2) as well as a wild-type susceptibility to azole antifungals (Table 3). Their susceptibility to 5-FC was also investigated by the disk diffusion method on Shadomy agar plates. As described in Table 3, they showed various degrees of susceptibility, from a total resistance to a markedly reduced susceptibility. Additionally, all mutants resistant to 5-FC were also resistant to its deaminated form, 5-FU, whatever the concentration of this fluoropyrimidine and the size of the inoculum. Likewise, mutants with a reduced susceptibility to 5-FC also exhibited a reduced susceptibility to 5-FU. Two mutants were therefore selected for further investigation of the molecular mechanisms leading to 5-FC resistance, one mutant (M1) resistant to both 5-FC (MIC > 32 µg/ml) and 5-FU and the other (M6) exhibiting a reduced susceptibility to 5-FC (MIC 0.125 µg/ml) and 5-FU.

TABLE 2. Respiratory activity of the *Candida glabrata* wild-type isolate 1085S and its derived mutants M1 to M6.

Strain	Oxygen consumption rate ^a (nmol/min)
1085S	57.1
Mutant M1	49.1
Mutant M2	40.1
Mutant M3	24.5
Mutant M4	34.6
Mutant M5	25.1
Mutant M6	80.4

^aOxygen consumption was measured with an oxygraph on 10^8 cells in glucose-phosphate buffer at 37°C with constant shaking. Data represent respiration rates in nmol of O₂ consumed per min by 10^8 cells and were determined from the curves representing oxygen concentration in the oxygraph chamber according to the duration of incubation.

Molecular mechanisms involved in 5-FC resistance of selected mutants.

The sequence and expression levels of five of the main genes which could be involved in 5-FC resistance of *C. glabrata* mutants M1 and M6 were determined.

All nucleotide differences observed when comparing the gene sequences of isolate 1085S and of mutants M1 and M6 with the CBS138 strain are reported in Table 4. Silent mutations, corresponding to strain variability, were detected in the sequence of the *FCY2*, *FUR1* and *CDC21* genes for the parent isolate and its derived 5-FC resistant mutants.

TABLE 3. Susceptibility of *Candida glabrata* mutants M1 to M6 and of their parent isolate 1085S to azole drugs and pyrimidin analogs.

Strain	Azoles ^a					Pyrimidin analogs			
	Mico	Clotri	Keto	Fluco	Eco	5-FC ^a	5-FU ^b		
							1	10	50
1085S	22	32	30	30+M	26	55	-	-	-
Mutant M1	23	34	28	32+M	26	TR	+	+	+
Mutant M2	22	31	26	29+M	24	TR	+	+	+
Mutant M3	24	28	34	28+M	26	TR	+	+	+
Mutant M4	24	26+M	32	20+M	26	TR	+	+	+
Mutant M5	21	26	32	28	24	18	+	-	-
Mutant M6	23	25	29	28+M	24	31	+	-	-

^aSusceptibility to azoles and 5-FC was determined by the disk diffusion method on Casitone agar plates for azoles or Shadomy agar plates for 5-FC. Results correspond to the diameter (in mm) of the growth inhibition zone after 48 h of incubation at 37°C. TR : total resistance (no inhibition zone).

^bSusceptibility to 5-FU was evaluated by incubating a defined quantity of cells on Shadomy agar plates supplemented with 1, 10 or 50 µg of the drug per ml. + : growth even at the lowest density of the inoculum, - : no growth even at the highest density of the inoculum. +M : presence of colonies growing within the inhibition zone.

TABLE 4. Point mutations detected in the coding sequences of *FCY1*, *FCY2*, *FCY21*, *CDC21* and *FUR1* genes in *Candida glabrata* wild-type isolate 1085S and its derived mutants M1 and M6.

Strain	Point mutations ^a				
	<i>FCY1</i>	<i>FCY2</i>	<i>FCY21</i>	<i>CDC21</i>	<i>FUR1</i>
1085S	<i>DQ657226</i> none	<i>DQ657227</i> C261G A678G C1416T	<i>DQ657228</i> none	<i>DQ657229</i> C99T T324C A528G	<i>DQ657230</i> A355G G370A
Mutant M1	<i>DQ657231</i> A445T	<i>DQ657232</i> C261G A678G C1416T	<i>DQ657233</i> none	<i>DQ657234</i> C99T T324C A528G	<i>DQ657235</i> A355G G370A
Mutant M6	<i>DQ657236</i> none	<i>DQ657237</i> C261G A678G G736A C1416T	<i>DQ657238</i> none	<i>DQ657239</i> C99T T324C A528G	<i>DQ657240</i> A355G G370A

^aPoint mutations are described as follow : the first letter indicates the nucleotide found in the corresponding gene sequence for strain CBS138 available at Genbank database, the number indicates the position relative to the start of the ORF and the second letter indicates the nucleotide found in the sequence of the gene of the corresponding isolate.

Mutations in bold are missense, all other mutations are silent.

In italic are indicated the Genbank accession numbers of the corresponding genes.

However, a missense mutation was also detected in the sequence of the *FCY1* gene, coding the cytosine deaminase, for mutant M1, whereas a missense mutation was found in the sequence of the cytosine permease coding gene (*FCY2*) for mutant M6.

The expression level of the *FCY1*, *FCY2*, *FCY21*, *FUR1* and *CDC21* genes in cells of mutants M1 or M6 was evaluated by quantitative reverse transcription PCR by comparison with their expression in the parent strain 1085S. The only differences observed were a 5-fold overexpression of the *CDC21* gene and a 3-fold overexpression of the *FCY2* gene in cells of mutant M6, and a 2-fold decrease in the expression of the *FUR1* gene for mutant M1 (Figure 1).

Uptake transport of 5-FC. No difference was seen between the mutants M1 or M6 and their parent wild-type isolate regarding the kinetic parameters of 5-FC uptake (Figure 2). Indeed, the values observed for both V_{max} and K_t were not significantly different for the three strains.

Growth capability and fitness cost. The consequences of the genetic changes identified for mutants M1 and M6 on their growth capability were studied by establishing their growth curves and comparing them with that of the parent isolate 1085S (Figure 3). No differences were seen, neither in the latency periods, nor the generation times. Moreover, the fitness cost of these genetic changes was determined by co-cultivating each mutant with its parent isolate 1085S, searching for the recovery of resistant colonies after re-isolation. All colonies originated from co-culture of 1085S and M1 were susceptible to 5-FC, and only 5% of the colonies re-isolated from co-culture of 1085S and M6 exhibited a decreased susceptibility to 5-FC. The presence of the G736A mutation in the sequence of the *FCY2* gene of these colonies was verified by sequencing to ensure that they were really M6 resting cells, and not new mutants randomly selected during these experiments.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 1. Relative variations in expression levels of genes involved in 5-FC metabolism in *C. glabrata* mutants M1 (black bars) and M6 (white bars) as compared with their expression levels in the parent isolate 1085S. Relative increases or decreases were determined by real-time RT-PCR using the following formula : $\text{relative variation} = 2^{\text{exp}[(\text{Ct gene} - \text{Ct actin})_{\text{mutant strain}} - (\text{Ct gene} - \text{Ct actine})_{\text{parent strain}}]}$, with Ct : cycle threshold, defined as the number of cycles for which the curve representing the fluorescence intensity in function of cycle number cuts a baseline arbitrarily defined at one unit of fluorescence. Data were normalized to the expression level of the bactin gene.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 2. Uptake kinetic of radioactive 5-FC by *C. glabrata* 5-FC resistant mutants M1 (B) and M6 (C) and their parent wild-type isolate (A). No significant differences were seen between the three strains concerning the kinetic parameters of incorporation of 5-FC (D), suggesting that the mutation detected in the cytosine permease gene of the mutant M6 had no consequence on its ability to incorporate 5-FC.

DISCUSSION

Whether it is innate in some fungal species or acquired in others, resistance to 5-FC is a frequent phenomenon in pathogenic fungi. However, due to its complex mode of action, the molecular mechanisms leading to 5-FC resistance have been poorly investigated. This is particularly true in the pathogenic yeast *C. glabrata*, since the mechanisms of 5-FC resistance in this yeast species have never been investigated extensively at the gene level.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 3. Growth curves of *C. glabrata* mutants M1 and M6 and of their parent isolate 1085S. For each isolate, data presented are mean values of the absorbance at 595 nm of three independent cultures in 50 ml of YEPD broth at 37°C with constant shaking. No differences were seen between the parent isolate (open squares) and the mutants M1 (filled circles) and M6 (filled triangles).

Behind *C. albicans*, *C. glabrata* has become the second most frequent *Candida* species in all clinical forms of candidiasis. Within the *Candida* genus, *C. glabrata* possesses the particularity to have a haploid genome, therefore facilitating the expression of a mutation which might lead, for instance, to antifungal resistance. Indeed, in addition to its primary low susceptibility to azole drugs, an acquired resistance to azoles is frequently observed in this species. Likewise, even though it remains relatively uncommon in clinical isolates, polyene resistance is increasingly reported in *C. glabrata* (23, 31).

While testing by a disk diffusion method the susceptibility to 5-FC of clinical isolates belonging to the three major *Candida* species (*i.e.* *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*), we were surprised by the high frequency of the acquired resistance to 5-FC in *C. glabrata* compared with the other species studied. This relatively high frequency was confirmed by determination of the mutation rate for isolates *C. glabrata* 1085S and *C. albicans* 1310. As expected, the mutation rate was ten fold higher for *C. glabrata*.

The frequency of 10^{-8} observed for *C. glabrata* isolate 1085S was in agreement with that reported by Normark and Schönebeck (16), who found in *C. glabrata* a spontaneous mutation rate of 4×10^{-9} to switch *in vitro* to a 5-FC resistant phenotype. Nevertheless, it remains strikingly much lower than the frequency of 4×10^{-4} observed for *C. glabrata* to switch to an azole resistant phenotype following exposure to fluconazole (2). However, mechanisms leading to azole resistance are quite different. For instance, it has been demonstrated that azole drugs (and particularly fluconazole) are potent inducers of *petite* mutations which result in an acquired resistance to azoles through deregulation of the expression of nuclear genes coding some ATP binding cassette efflux pumps (17). These *petite* mutations which are due to the partial or total loss of mitochondrial DNA (mtDNA) are particularly frequent since, in contrast to the nuclear genome, there is no repair machinery in the mtDNA. However, six mutants were selected within the growth inhibition zone for isolate 1085S and all of them exhibited a normal respiratory activity as well as a wild-type susceptibility to azoles, thus attesting that they were not *petite* mutants. Two distinct phenotypes were seen among these mutants, some of them being completely resistant to 5-FC and 5-FU, whereas the others exhibited a reduced susceptibility to 5-FC and 5-FU.

Two of these mutants, one for each group, were therefore selected for further characterization of the molecular mechanisms responsible for these phenotypes which were determined by sequencing and analysis of the expression level of the main genes involved in 5-FC metabolism. The mutant M1 exhibited a missense mutation in the *FCY1* gene and a two-fold decrease in the expression of *FUR1*. The replacement of a thymidine by an adenine at position 445 relative to the start of the *FCY1* gene results in the replacement of a tryptophan by an arginine at position 148 in the protein sequence of the cytosine deaminase. Such an amino acid change, from a large aromatic amino acid to a dibasic one, may have dramatic consequences on the structure and function of the enzyme. Besides, the crystal structure of

cytosine deaminase has been elucidated in *Saccharomyces cerevisiae* and a tryptophan residue, located at position 152 in this non pathogenic model organism, plays a key role in cytosine binding (12). Likewise, the two-fold decrease in the expression level of the *FUR1* gene that we observed by quantitative RT-PCR, may obviously decrease the overall UPRT activity in fungal cells and subsequently the conversion level of 5-FUMP to 5-FdUMP and 5-FUTP which are responsible for the fungistatic effects of 5-FC. Together, the underexpression of the *FUR1* gene and the probable inactivation of the cytosine deaminase may lead to resistance of the mutant M1 to 5-FC. However, this mutant was also resistant to 5-FU, which suggests that the mutation on the cytosine deaminase gene is not the major cause of this phenotype. One may speculate that, although we found only a two-fold decrease in the expression of the *FUR1* gene, resistance to both 5-FC and 5-FU is mainly due to the decrease in UPRT activity. Indeed, according to Normark and Schönebeck (16) a 4-fold decrease in the UPRT activity was sufficient to lead to total resistance to both 5-FC and 5-FU in a clinical isolate of *C. glabrata* (16).

A missense mutation in the *FCY2* gene was identified for mutant M6, selected as an example of the second group of mutants, together with a 5-fold increase in the expression of the *CDC21* gene. The replacement of a guanine by an adenine at position 736 relative to the start of the *FCY2* gene results in the replacement of a glycine by a serine in the corresponding permease, probably modifying here again the transporter activity. As a consequence, the import of 5-FC into mutant cells M6 should be lower than in cells of the wild-type isolate. However, determination of the incorporation of radiolabeled 5-FC revealed an equivalent intracellular accumulation of the drug for the wild-type isolate and laboratory mutants. Actually, 5-FC is incorporated into the cells not only by the cytosine permease coded by the *FCY2* gene, but also by other less specific transporters such as pyrimidine transporters (34). Likewise, it has been suggested in *Candida lusitanae*, a common transporter for both 5-FC and the azole drugs (15). Moreover, several genes coding cytosine transporters have been identified in *S. cerevisiae* (4, 25, 36). Given the close phylogenetic relationship between *S. cerevisiae* and *C. glabrata*, one may speculate that several genes coding cytosine permease analogs are also present in the *C. glabrata* genome. Indeed, two of them (the *FCY2* and *FCY21* genes that we sequenced) have already been directly evidenced or identified by search for homology with the *S. cerevisiae* genome (6, 8, 27). In addition, even if it remains possible that, like in *S. cerevisiae* and *C. lusitanae* (3, 34), some of these genes are inactive pseudogenes, the 3-fold increase in the expression of *FCY2* that we observed in cells of mutant M6 suggests that this gene is active in *C. glabrata*. Therefore, it seems that the decreased susceptibility of mutant M6 to both 5-FC and 5-FU was mainly caused by the overexpression of the *CDC21* gene, which codes the thymidylate synthase. Indeed, as previously described, a reduced susceptibility to both 5-FC and 5-FU may occur

when thymidylate synthase is synthesized in excess, thus allowing the DNA synthesis to be achieved despite the presence of fluorinated analogs (21, 33).

Although the molecular events detected in mutants M1 and M6 have no consequences on their growth capacities, they represent a selective disadvantage in the absence of selection pressure since competitive experiments revealed a decreased fitness for the two mutants as compared with the parent isolate. Thus, without selection pressure, these mutations would have limited clinical consequences. However, clinicians should be cautious when administering 5-FC for treatment of a *C. glabrata* infection. Given that *C. glabrata* has a low susceptibility to azole drugs and that 5-FC is more and more frequently combined with azoles instead of amphotericin B, the frequent acquisition of 5-FC resistance in this species should always be taken into consideration.

In conclusion, mechanisms leading to 5-FC resistance were investigated at the molecular level in two laboratory mutants of *C. glabrata*. One of these mutants exhibited a missense mutation in the *FCY1* gene, coding the cytosine deaminase and a 2-fold decrease in the expression level of the *FUR1* gene, coding the uridine monophosphate pyrophosphorylase. However its resistance to both 5-FC and 5-FU suggests that this phenotype is mainly caused by the reduction in the expression level of the *FUR1* gene and, as a consequence, in the UPRT activity. The second one, with a reduced susceptibility to pyrimidin analogs, exhibited a missense mutation in the *FCY2* gene, suggesting an altered function of the corresponding membrane transporter which seems to be compensated by an overexpression of this gene or by other membrane transporters. This mutant also showed an overexpression of the *CDC21* gene which was thought to be responsible for this particular phenotype. Thus, although mutations in the *FUR1* gene are the most common cause of resistance to 5-FC, other mechanisms may contribute to 5-FC resistance which may be easily acquired in *C. glabrata*, probably due to its haploid genome.

ACKNOWLEDGEMENTS

P. V. was a recipient of a grant from Angers Loire Metropole. The authors want to thank the Institut de Parasitologie de l'Ouest, Rennes, France, for supporting in part the cost of this work.

REFERENCES

1. **Brion, L. P., S. E. Uko, and D. L. Goldman.** 2007. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: systematic review. *J. Infect.* **54**:521-529.
2. **Brun, S., T. Bergès, P. Poupard, C. Vauzelle-Moreau, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2004. Mechanisms of azole resistance in *petite* mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1788-1796.

3. **Chapeland-Leclerc, F., J. Bouchoux, A. Goumar, C. Chastin, J. Villard, and T. Noël.** 2005. Inactivation of the *FCY2* gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3101-3108.
4. **Chevallier, M. R., R. Jund, and F. Lacroute.** 1975. Characterization of cytosine permeation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **122**:629-641.
5. **Dodgson, A. R., K. J. Dodgson, C. Pujol, M. A. Pfaller, and D. R. Soll.** 2004. Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2223-2227.
6. **Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neuvéglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisramé, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confaniolero, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaia, M. Wésolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J. L. Souciet.** 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**:35-44.
7. **Fasoli, M., and D. Kerridge.** 1988. Isolation and characterization of fluoropyrimidine-resistant mutants in two *Candida* species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **544**:260-263.
8. **Fasoli, M., and D. Kerridge.** 1990. Uptake of pyrimidines and their derivatives into *Candida glabrata* and *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:1475-1481.
9. **Francis, P., and T. J. Walsh.** 1992. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin. Infect. Dis.* **15**:1003-1018.
10. **Hope, W. W., L. Taberbero, D. W. Denning, and M. J. Anderson.** 2004. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4377-4386.
11. **Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupancic, and B. P. Cormack.** 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:378-384.
12. **Ko, T. P., J. J. Lin, C. Y. Hu, Y. H. Hsu, A. H. Wang, and S. H. Liaw.** 2003. Crystal structure of yeast cytosine deaminase. Insights into enzyme mechanism and evolution. *J. Biol. Chem.* **278**:19111-19117.
13. **Krcmery, V., and A. J. Barnes.** 2002. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hosp. Infect.* **50**:243-260.
14. **Li, L., S. Redding, and A. Dongari-Bagtzoglou.** 2007. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J. Dent. Res.* **86**:204-215.
15. **Noël, T., F. François, P. Paumard, C. Chastin, D. Brèthes, and J. Villard.** 2003. Flucytosine-fluconazole cross-resistance in purine-cytosine permease-deficient *Candida lusitanae* clinical isolates: indirect evidence of a fluconazole uptake transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1275-1284.
16. **Normark, S., and J. Schönebeck.** 1972. In vitro studies of 5-fluorocytosine resistance in *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**:114-121.
17. **O'Connor, R. M., C. R. McArthur, and G. D. Clark-Walker.** 1976. Respiratory-deficient mutants of *Torulopsis glabrata*, a yeast with circular mitochondrial deoxyribonucleic acid of 6 μ m. *J. Bacteriol.* **126**:959-968.
18. **Papon, N., T. Noël, M. Florent, S. Gibot-Leclerc, D. Jean, C. Chastin, J. Villard, and F. Chapeland-Leclerc.** 2007. Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the *FCY2*, *FCY1*, and *FUR1* genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:369-371.

19. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, M. G. Rinaldi, R. Barnes, B. Hu, A. V. Veselov, N. Tiraboschi, E. Nagy, D. L. Gibbs, and the Global Antifungal Surveillance Group.** 2005. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5848–5859.
20. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, H. Huynh, R. J. Hollis, and D. J. Diekema.** 2002. In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3518-3521.
21. **Polak, A.** 1977. 5-fluorocytosine – current status with special references to mode of action and drug resistance. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **4**:158-167.
22. **Pujol, C., M. A. Pfaller, and D. R. Soll.** 2004. Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:262-266.
23. **Rezusta, A., C. Aspiroz, T. Boekhout, J. F. Cano, B. Theelen, J. Guarro, and M. C. Rubio.** 2008. Cholesterol dependent and amphotericin B resistant isolates of a *Candida glabrata* strain from an intensive care unit patient. *Med. Mycol.* **46**:265-268.
24. **Sanglard, D., and F. C. Odds.** 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2**:73-85.
25. **Schmidt, R., M. F. Manolson, and M. R. Chevallier.** 1984. Photoaffinity labeling and characterization of the cloned purine-cytosine transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6276-6280.
26. **Schönebeck, J., and S. Anséhn.** 1973. 5-Fluorocytosine resistance in *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*. *Sabouraudia.* **11**:10-20.
27. **Sen Gupta, S., D. Kerridge, and M. R. Chevallier.** 1995. A purine permease in *Candida glabrata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**:93-96.
28. **Stone, E. A., H. B. Fung, and H. L. Kirschenbaum.** 2002. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin. Ther.* **24**:351-377.
29. **Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, R. P. Gaynes, and the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals.** 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin. Infect. Dis.* **35**:622–630.
30. **Vandeputte, P., G. Larcher, T. Bergès, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:4608-4615.
31. **Vandeputte, P., G. Tronchin, T. Bergès, C. Hennequin, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2007. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:982-990.
32. **Vermes, A., H. J. Guchelaar, and J. Dankert.** 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:171-179.
33. **Vialaneix, J. P., N. Chouini, M. C. Malet-Martino, R. Martino, G. Michel, and J. P. Lepargneur.** 1986. Noninvasive and quantitative ¹⁹F nuclear magnetic resonance study of flucytosine metabolism in *Candida* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**:756-762.
34. **Wagner, R., M. L. Straub, J. L. Souciet, S. Potier, and J. de Montigny.** 2001. New plasmid system to select for *Saccharomyces cerevisiae* purine-cytosine permease affinity mutants. *J. Bacteriol.* **183**:4386-4388.
35. **Waldorf, A. R., and A. Polak.** 1983. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**:79-85.
36. **Weber, E., C. Rodriguez, M. R. Chevallier, and R. Jund.** 1990. The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the *FCY2* gene product. *Mol. Microbiol.* **4**:585-596.

Si la mutation *petite*, qui se caractérise par une déficience respiratoire, a été largement étudiée chez la levure *Candida glabrata*, la totalité des mutants *petite* analysés jusqu'à présent pour cette espèce présentaient une résistance aux antifongiques les plus couramment utilisés en clinique que sont les azolés. L'association entre un phénotype *petite* et une sensibilité accrue aux azolés chez un isolat clinique de *C. glabrata* nous a conduit à caractériser cet isolat et à tenter de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués.

Cet isolat déficient respiratoire et hypersensible aux azolés a été obtenu à partir d'un prélèvement d'urine chez une patiente âgée de 28 ans atteinte de mucoviscidose, parallèlement à un autre isolat de *C. glabrata* de phénotype respiratoire normal et présentant une faible sensibilité aux antifongiques azolés. La sensibilité des deux isolats aux antifongiques azolés ou polyéniques a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose par comparaison avec une souche de référence, puis confirmée par détermination des CMI.

L'activité respiratoire des deux isolats cliniques a été étudiée selon quatre méthodes. La capacité de croissance des levures sur un milieu non fermentescible a d'abord été vérifiée. Les deux isolats, comme la souche de référence, étaient capables de pousser sur un tel milieu, mais l'isolat hypersensible aux azolés donnait de petites colonies au bout de 48 h d'incubation seulement tandis que les deux autres formaient des colonies de taille normale en 24 h. La déficience respiratoire a été confirmée par oxygraphie puisque l'isolat hypersensible aux azolés consommait très peu d'oxygène comparativement aux deux autres isolats. Néanmoins, l'évaluation par cytométrie en flux de la fluorescence des levures incubées en présence de rhodamine 123, révélatrice du potentiel transmembranaire et donc de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, n'a pas montré de différence entre les isolats. De même, l'observation en microscopie électronique à transmission des blastospores de cet isolat a révélé la présence de nombreuses mitochondries d'aspect normal. L'ensemble des résultats obtenus suggérait que la mutation *petite* portée par l'isolat hypersensible aux azolés était d'origine nucléaire.

Concernant l'origine des profils de sensibilité aux azolés de ces deux isolats cliniques, la voie de biosynthèse de l'ergostérol étant la cible des antifongiques azolés, nous avons tout d'abord étudié quantitativement et qualitativement le contenu en ergostérol, en squalène et en lanostérol (respectivement le produit final et deux intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'ergostérol) de ces deux isolats par chromatographie haute performance en phase liquide. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas fourni d'indication quant au mécanisme à l'origine du phénotype de sensibilité des deux isolats vis-à-vis des azolés. En effet, la seule différence significative a été une diminution du contenu en squalène et en lanostérol chez les deux isolats cliniques.

Les mécanismes moléculaires en cause ont été précisés par l'analyse des séquences des gènes classiquement impliqués dans la résistance aux azolés, et par l'étude des niveaux d'expression de ces mêmes gènes par PCR quantitative en temps réel. Une surexpression du gène *PDR1*, codant un facteur de transcription lui-même activateur de l'expression des gènes codant les protéines d'efflux, a été retrouvée chez les deux isolats. Cette surexpression s'accompagnait logiquement d'une surexpression du gène *CDR1*, une des cibles de PDR1p.

Par ailleurs, le séquençage des gènes *ERG11* et *PDR1* qui a produit des séquences totalement identiques pour les deux isolats cliniques, avec exclusivement des mutations silencieuses pour *ERG11* et des mutation silencieuses associées à une mutation non-sens pour *PDR1*, a démontré la parenté entre les deux isolats. En outre, la mutation non-sens détectée dans le gène *PDR1* pourrait être à l'origine de son hyperactivité et ainsi de la résistance aux azolés observée pour l'isolat compétent-respiratoire.

Si la résistance aux antifongiques azolés demeure une caractéristique des mutants *petite* d'origine mitochondriale chez *C. glabrata*, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude suggère qu'une mutation *petite* d'origine nucléaire puisse s'accompagner d'une augmentation de la sensibilité aux antifongiques azolés chez cette espèce. Cependant, les mécanismes moléculaires déterminant cette hypersensibilité aux azolés restent à définir.

**ETUDE N°4: MANUSCRIT EN COURS DE PREPARATION POUR PUBLICATION
DANS LA REVUE ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**

Hypersensibilité aux antifongiques azolés chez un isolat clinique de *Candida glabrata* porteur d'une mutation *petite*

Patrick Vandeputte^{1,2*}, Guy Tronchin¹, Françoise Rocher³, Gilles Renier^{1,4}, Thierry Bergès⁵, Dominique Chabasse^{1,2} et Jean-Philippe Bouchara^{1,2}.

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Université d'Angers Angers, France¹; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie², and Laboratoire d'Immunologie⁴, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; Laboratoire "Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles", UMR 6514, Université de Poitiers, France³; et Physiologie Moléculaire des Transporteurs de Sucre, FRE 3091, Faculté des Sciences, 86022 Poitiers Cedex⁵

La mutation *petite* est un évènement bien connu chez *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que chez certaines levures pathogène. Les études précédentes décrivant les caractères phénotypiques de ces mutants *petite* reportent une résistance aux azolés. Nous décrivons ici un isolat clinique de *Candida glabrata* présentant une association entre sensibilité aux azolés augmentée et déficience respiratoire. Ce mutant *petite* a été retrouvé dans un échantillon d'urine de façon concomitante à un autre isolat de *C. glabrata* de phénotype respiratoire normal et résistant aux azolés. Les capacités respiratoires des deux isolats ont été confirmées par culture sur milieu glycérolé et par oxygraphie. Cependant, l'étude de l'incorporation de rhodamine 123 par cytométrie en flux ainsi que les données de microscopie électronique à transmission ont montré que l'isolat hypersensible aux azolés conservait une chaîne respiratoire mitochondriale fonctionnelle, suggérant une origine nucléaire pour la mutation *petite* dont il était porteur. Aucune différence significative n'a été observée après comparaison du contenu en stérols des deux isolats cliniques avec celui d'une souche de référence. Le séquençage des gènes *ERG11* et *PDR1* a montré des séquences identiques pour les deux isolats, prouvant leur lien de parenté. Une mutation non-sens dans le gène *PDR1*, aboutissant à la délétion de la partie C-terminale du facteur de transcription Pdr1p, et pouvant jouer un rôle dans la sensibilité aux azolés des deux isolats, a été identifiée. De plus, une surexpression de ce gène et d'une de ses cibles, le gène *CDR1*, a été observée et est vraisemblablement à l'origine de la résistance aux azolés de l'isolat capable de respirer. En conclusion, aux côtés de la résistance aux azolés qui est une caractéristique des mutants *petite* d'origine mitochondriale chez *C. glabrata*, la mutation *petite* d'origine nucléaire peut aboutir à une augmentation de la sensibilité aux azolés, dont les mécanismes restent à définir.

Hypersusceptibility to Azole Antifungals in a Clinical Isolate of *Candida glabrata* with *petite* Mutation

Patrick Vandeputte^{1,2*}, Guy Tronchin¹, Françoise Rocher³, Gilles Renier^{1,4}, Thierry Bergès⁵, Dominique Chabasse^{1,2} and Jean-Philippe Bouchara^{1,2}.

*Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Université d'Angers Angers, France*¹; *Laboratoire de Parasitologie-Mycologie*², and *Laboratoire d'Immunologie*⁴, *Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France*; *Laboratoire "Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles", UMR 6514, Université de Poitiers, France*³; and *Physiologie Moléculaire des Transporteurs de Sucre, FRE 3091, Faculté des Sciences, 86022 Poitiers Cedex*⁵

***Petite* mutation is a well-known phenomenon in *Saccharomyces cerevisiae* as in pathogenic yeasts. However, all previous studies regarding phenotypic traits of these *petite* mutants reported an azole resistance. Here we described a clinical isolate of *Candida glabrata* with a striking association between increased susceptibility to azoles and respiratory deficiency. This *petite* mutant was obtained from a urine sample together with a respiratory-competent *C. glabrata* isolate which exhibited an azole resistance. The respiratory status of the two isolates was confirmed by cultivation on glycerol-containing agar and oxygraphy. However, the azole-susceptible isolate conserved a functional mitochondrial respiratory chain, attested by flow cytometry evaluation of the incorporation of rhodamine 123 and transmission electron microscopy, which suggested a nuclear origin for its *petite* mutation. No significant differences were seen in the sterol content when comparing these isolates with a reference strain. Moreover, sequencing of *ERG11* and *PDR1* genes revealed identical sequences for both isolates, demonstrating their parent relationship. Besides silent mutations, a nonsense mutation was identified in *PDR1* leading to the truncation of transcription factor Pdr1p. Additionally, an overexpression of this gene and of one of its target, *CDR1*, was seen which could explain the azole resistance of the respiratory-competent isolate. In conclusion, along with azole resistance which is a common feature of *C. glabrata* mitochondrial *petite* mutants, *petite* mutations of nuclear origin may lead to azole hypersusceptibility of which the inner mechanisms remain to be defined.**

*Corresponding author. Mailing address : Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France. Phone : 33 02 41 35 34 72. Fax : 33 02 41 35 36 16. E-mail : patrick.vandeputte@etud.univ-angers.fr.

Petite mutation was described for the first time in the 1950's by Ephrussi in the budding yeast (11). These *petite* mutants produced small-sized colonies on fermentative culture media, but are unable to grow on non-fermentative ones. Since then, *petite* mutations have been described in other yeast species, which are called *petite* positive, whereas they are lethal in species called *petite* negative. *Petite* mutants shared the particularity to be unable to respire, but this phenomenon may have two distinct origins. Indeed, *petite* mutations usually result from a partial (*petite* mutants ρ^-) or total (*petite* mutants ρ^0) loss of mitochondrial DNA, but mutations in the nuclear genome affecting some subunits of the mitochondrial respiratory chain, may also impair the respiratory activity.

Unlike *Candida albicans* in which *petite* mutations occur in extremely precise conditions (2, 7), *C. glabrata* produces *petite* mutants with a high frequency *in vitro* (5, 19). Moreover, as it occurs in *Saccharomyces cerevisiae* (15) and *C. albicans* (7), *petite* mutants of *C. glabrata* which may also occur *in vivo* (3), exhibit a decreased susceptibility to azole antifungals (5, 19). Several works demonstrated that this azole resistance was due to an increased expression of some ATP binding cassette (ABC) efflux pumps (5, 19), linked to the upregulation of the Pdr1p transcription factor (24).

Azole drugs, one of the four classes of antifungals used in clinical practice, act in the fungal cell by inhibition of a key-enzyme of the ergosterol biosynthesis pathway, the lanosterol 14 alpha demethylase (6). These drugs represent today the gold-standard for treatment of fungal infections. Unfortunately, their intensive use in prophylaxis or therapy has led to an increased occurrence of resistant isolates. Four main mechanisms are reported for azole resistance (18) : (i) a mutation in the lanosterol 14 alpha demethylase gene, *ERG11*, leading to a modification of the target which decreases the affinity of azoles without modification of the enzyme activity; (ii) an increase in the copy number of the azole target resulting from genic amplification or increase in mRNA half-life; (iii) a blockage of the ergosterol biosynthesis pathway which permits the viability of the fungal cell despite the presence of the drug; and (iv) an increased efflux of the azole drugs due to the overexpression of genes coding some ABC or major facilitator superfamily (MFS) efflux pumps.

Although the overexpression of genes coding the efflux pumps is illustrated by several studies, the cause of deregulation of their expression is poorly understood. In *C. glabrata*, like in *S. cerevisiae* and *C. albicans*, the ABC coding genes are controlled by a pleiotropic drug resistance (PDR) transcription factor, but the mechanisms leading to the increased activity of this transcription factor remain largely unknown (4, 8). In *C. albicans*, the expression of the PDR transcription factor Tac1p may be increased by duplication of the entire chromosome harboring the *TAC1* gene as illustrated for some fluconazole-resistant isolates (9). Moreover, the increased activity of Tac1p may be due to a gain-of-function

mutation in the *TAC1* gene (10). Likewise, Brun *et al.* (5) suggested that, given the tight communication existing between the nuclear and mitochondrial genomes (16, 23), the deregulation of the expression of the gene coding the ABC membrane transporter Cdr1p, and subsequently the azole resistance, could be linked in *C. glabrata petite* mutants to the absence of mitochondrial DNA. Therefore, the recent isolation in our hospital laboratory of a respiratory-deficient isolate with an increased susceptibility to azoles led us to investigate the molecular mechanisms involved in this unusual phenotypic association.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions. Two *Candida glabrata* isolates were used throughout this study. They were recovered in the Parasitology-Mycology Laboratory of Angers University Hospital (Angers, France) in January 2008 from a urine sample collected from a 28 year-old female patient with cystic fibrosis diagnosed in 1992 and previously treated with voriconazole (V-Fend, Pfizer, NY) for an *Aspergillus* infection. The patient had a bronchopulmonary aspergillosis complicated by a pyocyanic infection since 1994 and she was hospitalized at the end of November 2007 because of repeated infections since August 2007. Since December the fifth, she received orally 800 mg of voriconazole per day. Mycological examination of a urine sample collected five weeks later (on January 14, 2008) revealed the growth of two types of colonies on CHROMagar *Candida* medium (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) which were both identified as *C. glabrata* using ID32C test strips (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). *In vitro* susceptibility testing using ATB Fungus 3 strips (bioMérieux) revealed that the two isolates had distinct phenotypes, one of them being hypersusceptible to fluconazole and voriconazole, and the other totally resistant to these triazoles. Both isolates were deposited at the Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology (IHEM) – Mycology section (Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium) and are publicly available under the accession numbers 22852 and 22853 for the hypersusceptible and the resistant isolates, respectively. Since no matched susceptible isolate was available, a wild-type clinical isolate, carrying IHEM number 21231 and already described by our group (5, 26), was used as control.

All isolates were maintained by regular passages on yeast-extract peptone glucose (YEPD) agar plates containing yeast extract, 5 g/L; peptone, 10 g/L; glucose, 20 g/L; chloramphenicol, 0.5 g/L and agar, 20 g/L. They were preserved by lyophilization and by freezing at -80°C in glycerol 20% (wt/vol).

Susceptibility testing. Susceptibility to polyene and azole drugs was determined by a disk diffusion method on Casitone agar plates (Bacto-casitone, 9 g/L; glucose, 20 g/L; yeast extract, 5 g/L; chloramphenicol, 0.5 g/L; agar, 18 g/L; pH 7.2) using Neosensitabs tablets (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark) as previously described (25).

MICs of amphotericin B, fluconazole and voriconazole were determined by the E-test procedure (AB Biodisk, Solna, Sweden) on Casitone agar plates following the manufacturer's recommendations.

Characterization of respiratory activity. The respiratory status of the two clinical isolates 22852 and 22853 was investigated on Yeast extract-Peptone-Glycerol (YEPG) agar medium, which contains glycerol, a non fermentescible carbohydrate, as sole carbon source. Thus, cells unable to respire are negatively selected on this medium.

The respiratory status was then confirmed by oxygraphy with an Oxytherm oxygraph (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, England) as previously described (25). Respiration activities are expressed as mean rates of oxygen consumption (in nanomoles of oxygen consumed per ml and per minute), determined from the curves representing oxygen concentration in the oxygraph chamber according to the duration of incubation.

Moreover, activity of the mitochondrial respiratory chain was investigated by flow cytometry with rhodamine 123. This fluorochrome incorporates into mitochondrion in a manner dependent of the difference of potential existing between the intermembrane space and the mitochondrion lumen, thus reflecting the activity of the respiratory chain (20). Briefly, blastoconidia from YEPD agar plates were washed twice in sterile distilled water, and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) 0.15 M pH 7.2. Cells (2×10^6) were incubated for 30 min at 37°C with 250 μ l of a 10 μ g/ml rhodamine 123 solution. To inhibit the respiratory chain, aliquots of the cell suspensions were first incubated for 2 h at 37°C with 1 mM sodium azide before the addition of rhodamine 123. Additionally, samples of cells were also incubated in the absence of the fluorescent dye to ascertain the lack of autofluorescence. After washing with cold PBS, the fluorescence of 10,000 cells was quantified with a FACS CantoII flow cytometer (Beckton-Dickinson) and the data were analyzed with the FACSDiva software from Beckton-Dickinson.

Sterol analysis. Total sterols were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). To do this, 50 mg of lyophilized yeasts obtained from stationary growth phase cultures in 50 ml of YEPD broth were resuspended in 250 μ l HPLC-grade methanol and, after a brief incubation (40 s at 47°C with shaking), 50 μ l were injected into the HPLC system. The reverse phase elution was conducted with 100% acetonitrile (1.2 ml/min) at 37°C with a Chromolith Performance RP-18 encapped column (100 mm x 4,6 mm, Merck, Darmstadt, Germany). Solutions of known concentrations of squalene, lanosterol and ergosterol were also injected in the column following the same procedure, thus permitting the qualitative and quantitative analysis of each sample. Data collected which corresponded to concentrations in mg of sterol species per ml of sample, were determined from two independent cultures which were analyzed in duplicate.

Transmission electron microscopy. Samples for electron microscopy were processed according to the method of Aoki *et al.* (2) with slight modifications as previously described (3). Cells grown on YPDA plates were washed in PBS, fixed with glutaraldehyde in cacodylate buffer, washed in the same buffer, fixed once again with KMnO₄ 1.5%, and finally postfixed in osmium tetroxide. After dehydration and embedding in Epon, ultrathin sections were prepared, stained with uranyl acetate and examined with a JEM-2010 transmission electron microscope (Jeol, Paris, France).

Nucleic acids extraction and purification. DNA was recovered from 10 ml of YEPD broth cultures with the DNeasy plant minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA) following the manufacturer's recommendations. Total RNA were recovered from early exponential growth phase cultures in 50 ml of YEPD broth following a phenol:chloroform protocol as previously described (26).

ERG11 and PDR1 gene sequencing. The sequences of the *ERG11* gene of *C. glabrata* isolates 22852 and 22853 were obtained as previously described (26). Briefly, after amplification using primers described in Table 1, the PCR products were purified with the High pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), then quantified by Nanodrop technology (Nanodrop, Wilmington, DE) and used as template for sequencing PCR which was performed with the Dye terminator cycle sequencing quick start kit from Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Thereafter, sequencing products were purified with the Illustra AutoSeq G50 column from GE Healthcare (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) and resolved on a CEQ8000 sequencer (Beckman Coulter). Sequences were compared by alignment with that of the *ERG11* gene of the wild-type isolate 21231 (GenBank accession number DQ060157) using the ALIGNn program (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseseq/cgi-bin/alignn_in.pl).

The sequences of the *PDR1* gene of *C. glabrata* isolates 22852 and 22853 were resolved by Qiagen society from PCR products covering the entire *PDR1* ORF. These PCR products were obtained with primers defined with the WebPrimer program (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) from the *PDR1* sequence of the *C. glabrata* strain CBS138, available at the GenBank database under the accession number AY700584.

Gene expression study. The expression levels of *ERG11*, *PDR1*, *CDR1*, *CDR2* and *HSP12* genes in *C. glabrata* clinical isolates 22852 and 22853 were evaluated by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) using their expression level in the wild-type isolate 21231 as reference. The RT-PCR experiments were performed as previously described (26), using primers specified in Table 1.

Nucleotide sequences accession numbers. The nucleotide sequences of *PDR1* and *ERG11* genes of *C. glabrata* isolates 22852 and 22853 are available at GenBank database under the respective accession numbers FJ167406, FJ167407, FJ167408 and FJ167409.

TABLE 1. Oligonucleotides used for gene sequencing and evaluation of gene expression.

Gene name (gene product)	Genbank accession no.	Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Nucleotide coordinates ^a
<i>ERG11</i> (lanosterol 14- α demethylase)	L40389	ERG11-1F	CTACAATCGAGTGAGCTTG	17 to 35
		ERG11-1R	GTAGAACACAAGTGGTGG	729 to 746
		ERG11-2F	GGTCGTTGAACTATTGGAG	584 to 602
		ERG11-2R	GGACCCAAGTAGACAGTC	863 to 880
		ERG11-3F ^b	CCATCACATGGCAATTGC	688 to 705
		ERG11-3R ^b	GGTCATCTTAGTACCATCC	1445 to 1463
		ERG11-4F	CGTGAGAAGAACGATATCC	1380 to 1398
		ERG11-4R	CACCTTCAGTTGGGTAAC	2047 to 2064
		ERG11-5F	CGCTTACTGTCAATTGGG	1991 to 2008
		ERG11-5R	GTCATATGCTTGCACTGC	2397 to 2414
<i>PDR1</i> (transcription factor)	AY700584	PDR1-F ^b	TGGAAAAGCTTGTGATAGCTG	81 to 101
		PDR1-R ^b	TCTGATGACTGTAGTAGCCGA	498 to 518
	NC005967	PDR1-SF	CGTTATTGAGAGAATATGCAA	47542 to 47562
		PDR1-SR	AGGCTATGCACACTGTCTAA	50891 to 50910
<i>CDR1</i> (ABC transporter)	AF109723	CDR1-F ^b	GAAGTCTATGGAAGGTGC	1084 to 1101
		CDR1-R ^b	GTCTAGCGTAAGTCTCTC	1383 to 1400
<i>CDR2</i> (ABC transporter)	AF251023	CDR2-F ^b	GTTGAGTACTGGCACAAC	362 to 379
		CDR2-R ^b	GATGGCAAAGAACATGGC	695 to 712
<i>ACT</i> (β actin)	AF069746	ACT-F ^b	TATTGACAACGGTCCGG	949 to 966
		ACT-R ^b	TAGAAAGTGTGATGCCAG	1177 to 1194
<i>HSP12</i> (Heat shock protein)	NC006033	HSP12-F ^b	ACTTGGAGACGTATTCGACGG	391031 to 391051
		HSP12-R ^b	TGTCTGACGCTGGTAGAAAGA	391299 to 391308

^aNucleotide coordinates refer to the corresponding gene sequence in the GenBank database.

^bPrimers used for evaluation of gene expression.

RESULTS

Susceptibility to azole and polyene drugs. The disk diffusion method on Casitone agar plates revealed for the clinical isolate 22852 an increased susceptibility to all the azole drugs tested (Table 2). Indeed, diameters of the growth inhibition zones were on average two-fold larger than for control isolate 21231. Likewise, this isolate presented a higher susceptibility to amphotericin B with a diameter of the growth inhibition zone of 40 mm versus 27 mm for the wild-type isolate 21231. Conversely, isolate 22853 exhibited a decreased susceptibility to azoles and even a total resistance to fluconazole and miconazole whereas its susceptibility to amphotericin B was equivalent to that of the control isolate (see Table 2). These observations were confirmed by determination of the MICs of fluconazole, voriconazole and amphotericin B (Table 3).

TABLE 2. Susceptibility of *Candida glabrata* isolates 21231, 22852 and 22853 to antifungals^a.

Antifungal	Diameter in mm of growth inhibition zones for isolate:		
	21231	22852	22853
Amphotericin B	27	40	31
Fluconazole	21 (M)	50	TR
Clotrimazole	25 (M)	50	12
Miconazole	21 (M)	35	TR
Ketoconazole	33 (M)	50	16
Econazole	25 (M)	50	13

^a*In vitro* susceptibility testing was performed by the disk diffusion method on Casitone agar plates with Neosensitabs tablets containing 10 µg of drug for amphotericin B, econazole, miconazole and clotrimazole, and 15 µg for fluconazole and ketoconazole. Results correspond to diameters of the growth inhibition zones after 48 h of incubation at 37°C.

TR : total resistance, no inhibition zone.

(M) : presence of resistant colonies randomly distributed in the growth inhibition zone.

Compared to the wild-type isolate 21231, the MICs of fluconazole and voriconazole for clinical isolate 22852 were 6 and 16-fold lower, respectively, thus confirming its hypersusceptibility to azole drugs. Likewise, the decreased susceptibility to azoles of the clinical isolate 22853 was confirmed by the Etest procedure which revealed a total resistance to fluconazole (MIC > 256 µg/ml) and a MIC of voriconazole one hundred-fold higher than for the control isolate.

Respiratory capabilities. All three isolates were able to grow on YEPG agar plates, but the azole-susceptible clinical isolate 22852 produced very small colonies after only 48 h of incubation, whereas the two others produced standard sized colonies after 24 h of incubation only, suggesting a diminished respiratory activity for clinical isolate 22852 (data not shown).

This was confirmed by oxygraphy experiments. Indeed, the oxygen concentration in the oxygraph chamber remained almost unchanged even after 7 min of incubation with 10⁸ cells of isolate 22852, whereas cells of isolate 22853 or of control isolate 21231 consumed almost all the oxygen in less than 3 min (Fig. 1). Accordingly, the respiratory rates determined from the curves representing the concentration of oxygen according to the duration of incubation were 75.8, 6.6 and 68.9 nmol of O₂ consumed per ml and per min for wild-type isolate 21231 and clinical isolates 22852 and 22853, respectively.

TABLE 3. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of amphotericin B, fluconazole and voriconazole for *Candida glabrata* isolates IHEM 21231, 22852 and 22853^a.

Antifungal	MIC in µg/ml for isolate:		
	21231	22852	22853
Amphotericin B	0.047	0.032	0.047
Fluconazole	6	0.94	>256
Voriconazole	0.047	0.003	4

^aResults were obtained using Etest antifungal strips on Casitone agar plates.

>256 : no inhibition zone.

In contrast, flow cytometry experiments with rhodamine 123 revealed a higher incorporation of the fluorochrome for isolate 22852 than for isolate 22853, with mean fluorescence values of 33,671 and 24,980 arbitrary units, respectively, whereas equivalent fluorescence intensities were observed for the two isolates (mean values of 10,529 and 10,207) for cells incubated with sodium azide prior to the addition of rhodamine 123 (Fig. 2). Similar results were obtained in two independent experiments and incubation of the cells without rhodamine 123 attested the absence of autofluorescence.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 1. Oxygen consumption by cells of *C. glabrata* isolates 21231 (continuous black line), 22852 (continuous gray line), and 22853 (dashed black line). Almost all the oxygen in the oxygraph chamber was consumed by the cells after three minutes of incubation for the wild-type isolate and the azole-resistant isolate 22853, whereas oxygen concentration remained almost unchanged within 7 min of incubation for the hypersusceptible isolate 22852.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 2. Flow cytometry analysis of rhodamine 123-stained cells of *C. glabrata* isolates 22852 (A, C and E) and 22853 (B, D and F). Yeast cells were preincubated (E and F) or not (C and D) for 2 h at 37°C in the presence of sodium azide 1 mM before the addition of rhodamine 123. The fluorescence of cells incubated without the fluorescent probe (A and B) is presented as a control.

Sterol content. The sterol content of *C. glabrata* isolates 22852 and 22853 was qualitatively and quantitatively compared with that of the control isolate 21231. The peak profiles obtained by HPLC were identical for the three isolates (data not shown). The use of standards permitted the quantification of ergosterol and sterol intermediates (squalene and lanosterol) in the three isolates (Fig. 3). No significant difference was seen regarding the

ergosterol content, with respective amounts of 1,528, 1,359 and 951 mg per ml of sample for isolates 21231, 22852 and 22853, respectively. However, the squalene and lanosterol amounts were greatly diminished (4- to 10-fold) in the isolates 22852 and 22853 as compared to the wild-type isolate.

Cell ultrastructure. TEM revealed a classical morphology for the three *C. glabrata* isolates studied, presenting as solitary, ovoid blastoconidia of 1-5 μm in diameter, sometimes budding (Fig. 4). Moreover, functional mitochondria with visible cristae were seen in all three isolates, including the respiratory-deficient isolate 22852.

ERG11 and PDR1 genes sequence analysis. Interestingly, all nucleotide differences observed in *ERG11* and *PDR1* sequences compared with sequences of the same genes in strain CBS138 were shared by the two clinical isolates (Table 4). Besides silent mutations detected in the nucleotide sequences of *PDR1* and *ERG11* genes, a nonsense mutation was also seen in *PDR1* for both isolates, which introduces a stop codon at the position 728 in the transcription factor protein sequence, as determined by Multiple Translation tool (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/traduc_in.pl).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

FIG. 3. HPLC analysis of the squalene, lanosterol and ergosterol content of *C. glabrata* isolates 21231 (black bars), 22852 (white bars) and 22853 (gray bars). No significant differences were seen between the three isolates regarding the ergosterol content. Conversely, very low amounts of sterol intermediates were found in both clinical isolates compared with the wild-type isolate.

FIG. 4. Transmission electron micrographs of cells of the two *C. glabrata* isolates 22852 (A) and 22853 (B). Numerous mitochondrial sections with visible cristae (arrowheads) were seen for both isolates, thus reinforcing the hypothesis of a nuclear origin for the respiratory deficiency of the hypersusceptible isolate 22852. N : nucleus, Bars 1 μm .

Expression levels of genes potentially involved in resistance or hypersusceptibility to azoles. RT-PCR experiments revealed an increased expression of *PDR1* gene in both clinical isolates as compared to the wild-type isolate, with induction factor of 3.5 and 10.2 in isolates 22852 and 22853, respectively (Fig. 5). Accordingly, an overexpression of *CDR1* gene was also seen with a relative increase of 10.9 for isolate 22853, but it was curiously greater for isolate 22852 (Fig. 5). In contrast, the expression levels of *CDR2* and *ERG11* genes were not modified whereas the *HSP12* gene was underexpressed in both clinical isolates, with change values in expression of 0.15 and 0.54 for isolates 22852 and 22853, respectively (Figure 5).

TABLE 4. Mutations detected in *ERG11* and *PDR1* genes for *C. glabrata* isolates 22852 and 22853.

Gene	Point mutations in genes of isolate ^a	
	22852	22853
<i>ERG11</i>	(FJ167408)	(FJ167409)
	T834C	T834C
	T846C	T846C
	T1275C	T1275C
<i>PDR1</i>	(FJ167406)	(FJ167407)
	G307A	G307A
	T329C	T329C
	G763A	G763A
	G1699A	G1699A
	C1892T	C1892T
	<u>G2219A</u>	<u>G2219A</u>

QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image.

^aMutations are described as follow: first letter corresponds to the nucleotide present in the GenBank database sequence for the corresponding gene (accession numbers: AY700584 and L40389 for *CgPDR1* and *CgERG11*, respectively), number represents the relative position from the start of the ORF, and the second letter represents the nucleotide found in the gene sequence of isolates 22852 or 22853. The nonsense mutation found in *PDR1* gene sequence is underlined. Other mutations correspond to silent mutations. In parentheses are indicated GenBank accession numbers of the corresponding sequences.

Figure 5 : Relative variations in expression of *ERG11*, *PDR12*, *CDR1* and *CDR2* genes in *C. glabrata* clinical isolates 22852 (black bars) and 22853 (gray bars) as compared to their expression level in the wild-type isolate 21231. Relative increases or decreases were determined by RT-PCR which revealed an overexpression of *PDR1* and *CDR1* for the two clinical isolates and a decrease in expression level of *CDR2* for the hypersusceptible isolate 22852 or of *HSP12* for the azole-resistant isolate 22853. Conversely, the expression level of *ERG11* remained almost unchanged.

DISCUSSION

In all yeast species that have been studied, i. e. *S. cerevisiae*, *C. albicans* and *C. glabrata*, *petite* mutations are associated to azole resistance. This statement is challenged by the isolation of a *C. glabrata petite* mutant with an increased susceptibility to azole drugs.

This isolate was recovered together with an azole-resistant *C. glabrata* isolate from a 28-year old woman undergoing antifungal therapy with voriconazole. The selection of this susceptible isolate despite the antifungal treatment may appear conflicting. However, one cannot disregard the possibility that this patient, suffering from a cystic fibrosis for several years, with many complications such as diabetes and aspergillosis, did not take her treatment. Moreover, patients with cystic fibrosis often suffer from a defective digestive absorption. Indeed, determination of plasma concentration of voriconazole, a few days before the recovery of these isolates, revealed that it was not sufficient, and the daily dose of the drug was therefore increased.

Antifungal susceptibility pattern of these isolates was determined by a disk diffusion method on Casitone agar and confirmed by determination of the MICs of amphotericin B, fluconazole and voriconazole using Etest strips. Compared with a wild-type isolate, one of the clinical isolates exhibited a markedly reduced susceptibility to azole drugs and even a complete resistance to fluconazole and miconazole, whereas its susceptibility to polyenes was not modified. In contrast, the other clinical isolate exhibited an increased susceptibility to azoles and polyene drugs.

As azole resistance can be the result of *petite* mutations, the respiratory status of the two isolates was investigated. Surprisingly, the azole-resistant isolate displayed a wild-type respiratory status, whereas growth of the hypersusceptible isolate was impaired on a medium containing glycerol 2% as sole carbon source. As anaerobic growth in *C. glabrata* is possible exclusively in the presence of glucose (13), this isolate was therefore considered as a *petite* mutant. Consistent with the defective growth on glycerol-agar, the cells of the azole-susceptible isolate were unable to consume oxygen as demonstrated by oxygraphy. However, contrasting with previous observations in *C. glabrata petite* mutants (5, 19), this isolate accumulated rhodamine 123 (even more than the respiratory-competent azole-resistant isolate) and examination of blastoconidia by TEM revealed the presence of numerous mitochondrial sections. Together these results suggested a nuclear origin for the *petite* phenotype of this isolate. Indeed, respiratory deficiency can be the result of a partial or total loss of mitochondrial DNA. However, enzymes of the mitochondrial respiratory chain are coded by about 40 genes, but only 7 of them are coded by mitochondrial genes (1). Denaturing-HPLC experiments performed on PCR products of the nuclear genes coding the different subunits of the mitochondrial respiratory chain would allow us confirm the nuclear origin of this *petite* phenotype by the identification of the mutated gene.

Considering the close relationship between ergosterol biosynthesis pathway and susceptibility to azole and polyene drugs, we analyzed qualitatively and quantitatively the sterol content of the two isolates by comparison with a wild-type isolate. Although the amount of sterol intermediates (squalene and lanosterol) was markedly diminished in the two clinical isolates, suggesting an increased activity of the ergosterol biosynthesis pathway, no

significant differences were found regarding the ergosterol content. Additionally, RT-PCR experiments did not reveal any change in *ERG11* gene expression. These results suggested for the azole susceptibility pattern of these isolates a mechanism other than a change in the production level of the azole target. In addition, they may appear conflicting with the increased susceptibility to polyenes observed for one of these isolates. We have therefore to consider another mechanism like a decreased tolerance or fitness.

The molecular mechanisms involved in the antifungal susceptibility pattern of the two isolates were further investigated by quantifying the expression level of genes coding some ABC efflux pumps, Cdr1p and Cdr2p, and the transcription factor Pdr1p, but also by sequencing the corresponding gene *PDR1*. These experiments demonstrated a parent relationship between the two isolates. Indeed they shared a total identity in *ERG11* and *PDR1* gene sequences (more than 5,200 bp). The most probable hypothesis is that the *petite* mutant derived from the resistant isolate, even if this could not be proven since the two isolates were recovered simultaneously from the same clinical sample.

Besides silent mutations in *ERG11* and *PDR1* genes, the two isolates also shared a nonsense mutation in *PDR1*. This mutation consisted in the replacement of a guanine by an adenine at position 2219 leading to a stop codon and therefore to a truncation of 380 aminoacids in the C terminus of the transcription factor. Recent studies in *C. glabrata* and *S. cerevisiae* demonstrated that the C terminus of Pdr1p contains a domain capable to induce the expression of PDR genes in the presence of azoles (22), suggesting a decreased activity of the truncated transcription factor in the presence of azole drugs. Additionally, RT-PCR experiments revealed for the azole-resistant isolate an overexpression of *PDR1* gene and of one of its target, *CDR1*, which was thought to be responsible for the azole resistance. Surprisingly, another ABC efflux pumps coding gene, *CDR2*, was not overexpressed in the resistant isolate, although this gene contains one pleiotropic drug responsive element in its promoter and is described to be regulated by Pdr1p (27). Likewise, a decrease in the expression level of *HSP12* gene, coding a heat shock protein which plays a crucial role in stress response (17), was seen for the resistant isolate although its expression is induced in a *C. glabrata* isolate with a constitutively hyperactive Pdr1p (27). One may speculate that the nonsense mutation detected in *PDR1* gene of the azole-resistant isolate leads in Pdr1p to the deletion of domains mandatory to activate the expression of *HSP12* and *CDR2* genes.

However, although two pleiotropic drug responsive elements (PDRE) sequences are described in the promoter region of *CDR1* gene, bioinformatic analysis revealed the presence of a unique PDRE sequence in the promoter region of *CDR2* gene. Likewise, conversely to *HSP12* gene of *S. cerevisiae* and *C. albicans*, no PDRE sequence was detected within 2,000 bp upstream the start codon of *HSP12* gene in *C. glabrata*.

Whereas azole resistance of isolate 22853 may be easily explained by the increased expression of *PDR1* gene, results obtained for the azole-susceptible isolate were quite

surprising. Indeed, this isolate overexpressed *PDR1* as compared to the wild-type, even if this overexpression remained 3-fold lower than in the resistant isolate. Moreover, a 17.4-fold overexpression of *CDR1* gene was seen as compared to the wild-type isolate, whereas a 10.9-fold increase only was seen in the expression of this gene for the azole-resistant isolate. Conversely, a 5-fold reduction in the expression level of *CDR2* gene was seen for the hypersusceptible petite mutant whereas the expression of *HSP12* gene was not modified.

Previous observations about *petite* mutants of *C. glabrata* suggested a direct relationship between respiratory status and expression of PDR genes. Expression of these genes seems to be controlled by the intracellular concentration of carbon dioxide, which results from the activity of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. Indeed, CO₂ concentration is diminished in mitochondrial *petite* mutant and it has been demonstrated that : (i) CO₂ is a potent activator of the adenylate cyclase enzyme (14), and (ii) susceptibility to azole drugs, through regulation of *CDR1* gene expression, is decreased when adenylate cyclase activity is impaired (12). Moreover, it has been demonstrated that *HSP12* is under the control of intracellular level of CO₂ in *C. albicans* (21). The rationale would be that in mitochondrial *petite* mutants, the diminished concentration of carbon dioxide decreases the adenylate cyclase activity which down-regulates *PDR1* gene expression in normal conditions, therefore increasing the expression of PDR genes and rendering these *petite* mutants resistant to azole drugs. In contrast, *petite* mutations of nuclear origin may result in an increased activity of the tricarboxylic acid cycle and therefore in an increased production of CO₂.

The recovery of this *petite* mutant with an azole hypersusceptibility complicates the understanding of the mechanisms governing the deregulation of Pdr1p expression. Additional experiments are required to understand in particular how a yeast overexpressing genes coding ABC proteins could be susceptible to azole drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by a grant from Institut de Parasitologie de l'Ouest, Rennes, France. We thank Angers University Hospital, France, for financial support and Service Commun de Microscopie Electronique of Angers University for their help in transmission electron microscopy.

REFERENCES

1. **Andreoli, C., H. Prokisch, K. Hortnagel, J. C. Mueller, M. Munsterkotter, C. Scharfe, and T. Meitinger.** 2004. MitoP2, an integrated database on mitochondrial proteins in yeast and man. *Nucleic Acids Res.* **32**:459-462.
2. **Aoki, S., and S. Ito-Kuwa.** 1987. Induction of petite mutation with acriflavine and elevated temperature in *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**:269-277.

3. **Bouchara, J. P., R. Zouhair, S. Le Boudouil, G. Renier, R. Filmon, D. Chabasse, J. N. Hallet, and A. Defontaine.** 2000. In-vivo selection of an azole-resistant *petite* mutant of *Candida glabrata*. J. Med. Microbiol. **49**:977-984.
4. **Balzi, E., W. Chen, S. Ulaszewski, E. Capieaux, and A. Goffeau.** 1987. The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **262**:16871-16879.
5. **Brun, S., T. Bergès, P. Poupard, C. Vauzelle-Moreau, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2004. Mechanisms of azole resistance in *petite* mutants of *Candida glabrata*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:1788-1796.
6. **Carrillo-Muñoz, A. J., G. Giusiano, P. A. Ezkurra, and G. Quindós.** 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. Rev. Esp. Quimioter. **19**:130-139.
7. **Cheng, S., C. J. Clancy, K. T. Nguyen, W. Clapp, and M. H. Nguyen.** 2007. A *Candida albicans petite* mutant strain with uncoupled oxidative phosphorylation overexpresses *MDR1* and has diminished susceptibility to fluconazole and voriconazole. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:1855-1858.
8. **Coste, A. T., M. Karababa, F. Ischer, J. Bille, and D. Sanglard.** 2004. *TAC1*, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. Eukaryot. Cell. **3**:1639-1652.
9. **Coste, A., A. Selmecki, A. Forche, D. Diogo, M. E. Bounoux, C. d'Enfert, J. Berman, and D. Sanglard.** 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. Eukaryot. Cell **6**:1889-1904.
10. **Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhäuser, A. Forche, A. Selmecki, J. Berman, J. Bille, and D. Sanglard D.** 2006. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. Genetics **172**:2139-2156.
11. **Ephrussi, B., H. Hottinguer, and J. Tavlitzi.** 1949. Action de l'acri flavine sur les levures. II. Etude génétique du mutant "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur **76**:419-450.
12. **Jain, P., I. Akula, and T. Edlind.** 2003. Cyclic AMP signaling pathway modulates susceptibility of *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae* to antifungal azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3195-3201.
13. **Hazen, K. C.** 1995. New and emerging yeast pathogens. Clin. Microbiol. Rev. **8**:462-478.
14. **Klengel, T., W. J. Liang, J. Chaloupka, C. Ruoff, K. Schröppel, J. R. Naglik, S. E. Eckert, E. G. Mogensen, K. Haynes, M. F. Tuite, L. R. Levin, J. Buck, and F. A. Mühlischlegel.** 2005. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. Curr. Biol. **15**:2021-2026.
15. **Kontoyiannis, D. P.** 2000. Modulation of fluconazole sensitivity by the interaction of mitochondria and *erg3p* in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antimicrob. Chemother. **46**:191-197.
16. **Parikh, V. S., M. M. Morgan, R. Scott, L. S. Clements, and R. A. Butow.** 1987. The mitochondrial genome can influence nuclear gene expression in yeast. Science **235**:576-580.
17. **Praekelt, U. M., and P. A. Meacock.** 1990. *HSP12*, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. Mol. Gen. Genet. **223**:97-106.
18. **Sanglard, D.** 2002. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. **20**:462-469.
19. **Sanglard, D., F. Ischer, and J. Bille.** 2001. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1174-1183.
20. **Skowronek, P., G. Krummeck, O. Haferkamp, and G. Rödel.** 1990. Flow cytometry as a tool to discriminate respiratory-competent and respiratory-deficient yeast cells. Curr. Genet. **18**:265-267.
21. **Sheth, C. C., E. G. Mogensen, M. S. Fu, I. C. Blomfield, and F. A. Mühlischlegel.** 2008. *Candida albicans HSP12* is co-regulated by physiological CO₂ and pH. Fungal Genet. Biol. **45**:1075-1080.

22. **Thakur, J. K., H. Arthanari, F. Yang, S. J. Pan, X. Fan, J. Breger, D. P. Frueh, K. Gulshan, D. K. Li, E. Mylonakis, K. Struhl, W. S. Moye-Rowley, B. P. Cormack, G. Wagner, and A. M. Näär.** 2008. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **452**:604-609.
23. **Traven, A., J. M. S. Wong, D. Xu, M. Sopta, and C. J. Ingles.** 2001. Interorganellar communication: altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial mutant. *J. Biol. Chem.* **276**:4020-4027.
24. **Tsai, H. F., A. A. Krol, K. E. Sarti, and J. E. Bennett.** 2006. *Candida glabrata* *PDR1*, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1384-1392.
25. **Vandeputte, P., G. Larcher, T. Bergès, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4608-4615.
26. **Vandeputte, P., G. Tronchin, T. Bergès, C. Hennequin, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2007. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:982-990.
27. **Vermitsky, J. P., K. D. Earhart, W. L. Smith, R. Homayouni, T. D. Edlind, and P. D. Rogers.** 2006. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol. Microbiol.* **61**:704-722.

L'augmentation du nombre des situations d'immunodéficience au cours de ces dernières décennies a créé un terrain favorable au développement des infections fongiques. Parmi les agents responsables de ces infections, les levures du genre *Candida* occupent une place prépondérante. En outre, l'utilisation croissante des antifongiques a modifié le profil des espèces rencontrées en clinique, en favorisant les espèces qui leurs sont le moins sensibles. C'est le cas de *C. glabrata* qui se place aujourd'hui au deuxième rang parmi les espèces responsables de candidoses, toutes formes cliniques confondues, alors qu'elle était considérée il y a 20 ou 30 ans comme non pathogène. On sait aujourd'hui que cette espèce possède des facteurs de virulence qui lui sont propres (adhésines, hémolysine, protéases, ...) et qu'elle détermine un taux de mortalité élevé chez les patients atteints de candidose profonde ou systémique. De plus, *C. glabrata* présente une sensibilité aux antifongiques azolés plus faible que la plupart des autres espèces du genre *Candida*. Enfin, la survenue d'isolats cliniques de *C. glabrata* résistants aux antifongiques est de plus en plus souvent rapportée, suggérant une plus grande propension à développer une résistance aux antifongiques.

L'ensemble de ces données nous a amené à conduire cette étude, visant à déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux antifongiques polyéniques, aux analogues des pyrimidines ou aux azolés chez des isolats cliniques ou des mutants induits de *C. glabrata*.

I. Mécanismes de résistance aux polyènes

Malgré une augmentation du nombre d'isolements de levures résistantes aux antifongiques polyéniques (Hazen *et al.*, 2005; Krogh-Madsen *et al.*, 2006; Rezusta *et al.*, 2008), la résistance aux polyènes reste un évènement rare (Kanafani et Perfect, 2008). Cette faible occurrence réside dans le fait que la sensibilité aux antifongiques n'est pas déterminée de façon systématique chez les isolats cliniques et dans l'absence, dans la plupart des cas, de contrôles mycologiques au cours du traitement. Cependant, elle est également la conséquence directe du mode d'action de ces antifongiques. Les polyènes ont en effet pour cible un des constituants majeurs des membranes fongiques, l'ergostérol. Or les membranes ont un rôle crucial dans la survie cellulaire. Ainsi, la résistance aux polyènes ne peut survenir que lorsque le champignon possède un moyen de remplacer l'ergostérol par un composé capable de substituer sa fonction (Lemke *et al.*, 2005). Peu fréquente, la résistance aux polyènes reste par conséquent peu étudiée et notamment en ce qui concerne les mécanismes moléculaires impliqués. Nous avons donc étudié deux isolats cliniques de *C. glabrata* qui présentaient d'emblée à l'isolement une moindre sensibilité aux polyènes, et déterminé les mécanismes moléculaires à l'origine de cette diminution de sensibilité aux polyènes.

Les deux isolats, provenant de deux patients distincts, présentaient une moindre sensibilité aux polyènes associée à une augmentation de leur sensibilité aux antifongiques

azolés. Une analyse bibliographique a montré que la majorité des souches résistantes aux polyènes précédemment étudiées étaient également résistantes aux antifongiques azolés. C'est notamment le cas des mutants *ERG3* chez *S. cerevisiae* (Watson *et al.*, 1998) ou des mutants *ERG11* chez *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 2003). Cependant, tous les cas de figure sont possibles, puisqu'une résistance aux azolés n'est pas forcément associée à la résistance aux polyènes. Comme pour nos deux isolats cliniques, une résistance aux polyènes associée à une augmentation de la sensibilité aux azolés a été décrite chez des mutants *ERG1* de *C. glabrata* (Tsai *et al.*, 2004).

L'analyse du contenu en stérols a montré un profil similaire chez les deux isolats cliniques, très différent de celui d'une souche sauvage. En effet, l'ergostérol représentait le stérol majoritaire des membranes d'une souche de référence, mais semblait absent chez les deux isolats cliniques qui présentaient au contraire une accumulation d'intermédiaires stéroliques. Si la technique utilisée, la chromatographie en phase gazeuse, n'a pas permis d'identifier précisément ces intermédiaires stéroliques par manque de standards, les résultats de l'analyse quantitative des stérols par spectrophotométrie ont permis d'affirmer que les composés détectés sont des $\Delta 5,7$ -diénols. En effet, cette dernière technique est basée sur l'absorbance à 281 nm d'une conjugaison de double liaisons sur les carbones C-5 et C-7 (Smith *et al.*, 1996). Cette conjugaison, catalysée par le produit du gène *ERG3*, est présente sur les deux derniers intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'ergostérol et sur l'ergostérol lui-même (Figure 15). Ceci nous a conduit à envisager tout d'abord un blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol chez ces deux isolats cliniques dans l'une des deux dernières étapes de la voie. Nous avons donc séquencé les gènes codant les deux dernières enzymes de la voie, *ERG4* et *ERG5*, mais les séquences de ces gènes ne présentaient pas de variation par rapport à une souche sauvage. Cependant, la voie de biosynthèse telle qu'elle est décrite n'est pas une voie métabolique figée, une même enzyme pouvant prendre en charge des substrats différents (Sanglard *et al.*, 2003). De plus, les modifications enzymatiques des intermédiaires stéroliques, dont le but ultime est la synthèse d'ergostérol, touchent des sites relativement éloignés sur ces intermédiaires et si une enzyme agit sur un groupement qui ne sera plus modifié au cours de la synthèse de l'ergostérol, son inactivation n'empêchera pas systématiquement la voie de se poursuivre. Enfin, une résistance aux polyènes par absence d'ergostérol, liée à l'inactivation du gène *ERG6*, a été rapportée chez *S. cerevisiae* (Gaber *et al.*, 1989). Le gène *ERG6* a donc été séquencé chez les deux isolats cliniques et une mutation faux sens a été identifiée chez l'un des isolats. Cette mutation se traduit par la substitution d'une cystéine par une phénylalanine au niveau de la C-24 stérol méthyltransférase, l'enzyme codée par le gène *ERG6*. Chez le second isolat, une mutation non sens a été retrouvée au niveau du gène *ERG6*, à l'origine de l'introduction d'un codon stop qui tronque l'enzyme de 41 acides aminés.

Le rôle de ces mutations dans la résistance aux polyènes des deux isolats cliniques étudiés a été démontré en introduisant une copie fonctionnelle du gène *ERG6* chez les deux isolats. En adaptant un protocole de transformation décrit pour des mutants Δ *ERG6* de *S. cerevisiae* (Gaber *et al.*, 1989), nous avons transformé des mutants auxotrophes pour l'uracile, obtenus par exposition des deux isolats cliniques à l'acide 5-fluoroorotique, par un plasmide dérivé de pRS416 dans lequel a été introduit par clonage une copie fonctionnelle du gène *ERG6*. Les transformants capables de croître sur milieu minimum étaient sensibles à l'AmB, prouvant que la mutation d'*ERG6* était effectivement à l'origine de la moindre sensibilité aux polyènes de ces deux isolats.

Les relations structure/activité ont été précisées dans différents modèles de stérol méthyltransférases (Nes, 2003; Nes *et al.*, 2004 et 2006). Selon ces données, les mutations que nous avons détectées ont un effet non négligeable sur l'activité de l'enzyme. Ces deux mutations interviennent effectivement dans un domaine conservé chez les C-24 stérol méthyltransférases du règne des champignons et des végétaux (Bouvier-Navé *et al.*, 1998). Cependant, des mutations différentes peuvent avoir des conséquences différentes sur l'activité d'une enzyme. Cette observation est particulièrement vraie pour les stérol méthyltransférases puisque leur activité peut être diminuée (et même totalement inhibée) ou au contraire augmentée en fonction de la nature de l'acide aminé substituant une position donnée (Nes *et al.*, 2004). Chez les deux isolats étudiés, le même phénomène semble se reproduire puisqu'ils partagent des phénotypes communs, mais présentent toutefois des différences. Selon notre hypothèse, ces différences phénotypiques auraient toutes la même origine, une différence dans le niveau d'activité de la protéine Erg6p mutée.

Ainsi, les deux isolats présentaient une induction de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Cette induction est probablement consécutive au blocage de la voie de biosynthèse, par levée de l'inhibition exercée dans des conditions normales par l'ergostérol (Servouse et Karst, 1986). Ce phénomène de rétrocontrôle négatif exercé par l'ergostérol sur sa propre biosynthèse a été démontré chez *S. cerevisiae* (Casey *et al.*, 1991) et, étant donnée la proximité phylogénétique entre *C. glabrata* et *S. cerevisiae*, il est probable que le même phénomène existe chez *C. glabrata*.

De même, les deux isolats présentaient des capacités de croissance diminuées par rapport à une souche sauvage, illustrées par une augmentation du temps de latence et du temps de génération des cellules en culture. De plus, la mutation du gène *ERG6* chez les deux isolats se traduisait par un désavantage sélectif en l'absence de pression de sélection puisque les expériences de croissance compétitive par co-culture entre les isolats cliniques et une souche sauvage ont montré une disparition quasi-totale des cellules résistantes à l'AmB pour l'un des isolats (illustré par la figure 17) et leur disparition au profit des cellules de phénotype sauvage pour l'autre. Enfin, les deux isolats présentaient une sensibilité accrue aux agents ayant pour cible la paroi, accompagnée d'une modification de l'architecture

pariétale sous la forme d'un amincissement de la couche interne de la paroi avec une rétraction du cytoplasme sous-jacent pour un des deux isolats.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 17 : Fitness de l'isolat résistant aux polyènes de morphologie normale. La présence de la mutation non-sens dans le gène *ERG6* de dix colonies issues d'une co-culture entre l'isolat résistant aux polyènes et une souche sauvage (pistes 5 à 14) a été déterminée par PCR après extraction des ARN et transcription réverse. Les amorces choisies produisent un amplifiat de 771 pb avec pour matrice l'ADN génomique des deux isolats (pistes 1 et 2) ainsi qu'avec l'ADNc de la souche sauvage (piste 3). En revanche, aucun produit PCR n'est visualisé avec l'ADNc de l'isolat résistant aux polyènes (piste 4) puisque l'amorce anti-sens s'hybride sur une région du gène située après la mutation non-sens chez cet isolat. Seules 2 colonies sur 10 portent la mutation non-sens, en accord avec les 7% de colonies de sensibilité diminuée à l'AmB retrouvés après co-culture.

De façon surprenante, un des isolats surexprimait les gènes *CDR1* et *CDR2*, codant des protéines d'efflux de type ABC, alors que la surexpression de ces protéines est un des mécanismes majeurs à l'origine de la résistance aux antifongiques azolés (Sanglard *et al.*, 2001) et que cet isolat présentait une sensibilité accrue aux antifongiques azolés. Il est toutefois connu que l'adressage des protéines membranaires est un phénomène hautement dépendant de la composition en stérols des membranes. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, l'adressage du transporteur du tryptophane à la membrane est bloqué chez des mutants Δ *ERG6* (Umebayashi et Nakano, 2003). De même, des travaux récents ont montré que les protéines d'efflux Cdr1p et Cdr2p n'étaient pas adressées à la membrane chez des mutants Δ *ERG6* de *S. cerevisiae* (Pasrija *et al.*, 2008). Il est donc probable que chez *C. glabrata*, l'adressage des protéines d'efflux de type ABC soit également dépendant de la présence d'ergostérol dans les membranes. Dans ces conditions et en dépit de la surexpression des gènes qui les codent, les protéines d'efflux ne seraient pas fonctionnelles, ce qui provoquerait l'accumulation intracellulaire des azolés.

Cet isolat présentait également une croissance pseudohyphale. *C. glabrata* est pourtant décrit pour ne jamais produire de filaments mycéliens, excepté dans des conditions de culture très particulières comme une carence en azote (Csank *et al.*, 2000) ou la présence de sulfate de cuivre (Lachke *et al.*, 2002). Nous avons montré que la croissance de cet isolat sous forme de courtes chaînes de cellules ovoïdes, caractéristiques des pseudohyphes, était indépendante du milieu de culture. La complémentation du gène *ERG6* chez cet isolat a démontré que la mutation détectée dans ce gène était également à l'origine de la croissance pseudohyphale puisque les colonies transformées par un plasmide contenant une copie fonctionnelle d'*ERG6* présentaient une morphologie normale pour *C. glabrata*, sous forme de cellules isolées, parfois bourgeonnantes. Cette observation est également en accord avec l'hypothèse précédemment énoncée : l'absence d'ergostérol perturberait l'adressage des protéines normalement présentes à la membrane, notamment des enzymes indispensables à la libération des cellules filles après bourgeonnement et cloisonnement. Ainsi, la mutation non sens détectée chez l'isolat à croissance pseudohyphale aboutit vraisemblablement à une inactivation totale de la C-24 stérol méthyltransférase et donc à une absence totale d'ergostérol, qui perturbe l'adressage à la membrane des protéines responsables de la libération des cellules filles. En revanche, la perte de 40 acides aminés à l'extrémité de la protéine Erg6p, par suite de la mutation non-sens détectée dans le gène *ERG6* pour le second isolat étudié, n'aurait pas un effet aussi drastique sur l'activité enzymatique. L'enzyme ne serait que partiellement inactivée, ce qui permettrait la synthèse d'une petite quantité d'ergostérol (non détectée par la technique utilisée pour l'analyse des stérols car masquée par les intermédiaires stéroliques majoritaires). Ainsi le taux d'ergostérol synthétisé ne serait pas suffisant pour rendre les cellules parfaitement sensibles à l'AmB, mais il permettrait à l'adressage des protéines membranaires de se réaliser. Les différences observées entre les deux isolats dans les CMI de l'AmB viennent à l'appui de cette hypothèse. En effet, la CMI de l'AmB est 10 fois plus élevée pour l'isolat à croissance pseudohyphale, chez lequel l'ergostérol serait totalement absent, que pour le second isolat étudié.

De nombreuses questions demeurent cependant sans réponse. L'isolement de ces deux isolats à quelques mois d'intervalle soulève la question de la fréquence exacte de ces résistances acquises. Une étude associant un suivi mycologique au cours du traitement (incluant une détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats successifs obtenus) et une surveillance clinique devrait être conduite pour préciser l'importance réelle de ces mutations.

Par ailleurs, pour confirmer notre hypothèse d'une inactivation plus ou moins complète de Erg6p et d'un défaut d'adressage des protéines membranaires chez l'isolat à croissance pseudohyphale, il faudrait introduire les allèles mutés du gène *ERG6* chez une souche sauvage et observer les modifications phénotypiques engendrées. Plusieurs approches peuvent être envisagées. L'inactivation du gène *ERG6* chez une souche sauvage, réalisée par

disruption selon une méthode par PCR décrite pour *C. glabrata* (Edlind *et al.*, 2005), devrait conduire à une absence totale d'ergostérol et donc à une croissance pseudohyphale. De même, la complémentation de l'isolat à croissance pseudohyphale par l'allèle *ERG6* du second isolat devrait se traduire par une diminution de la CMI de l'AmB et la restauration d'une morphologie normale, prouvant ainsi que Erg6p n'est pas totalement inactivée par la mutation non-sens. Enfin, la mutagenèse dirigée, reproduisant les mutations identifiées au niveau du gène *ERG6* des deux isolats, permettrait également de confirmer que ces mutations se traduisent par une inactivation totale de l'enzyme dans un cas et seulement partielle dans l'autre cas.

Une autre approche serait d'étudier l'adressage à la membrane des protéines d'efflux codées par les gènes *CDR1* et *CDR2*. Dans ce but, il faudrait disposer d'anticorps dirigés contre ces protéines et, par exemple, évaluer par cytométrie en flux l'intensité de fluorescence à la surface des levures après incubation en présence de ces anticorps. L'étude de l'adressage des protéines membranaires pourrait également être réalisée en fusionnant les gènes codant les protéines supposées ne pas être adressées correctement avec celui de la Green Fluorescent Protein (GFP). Par exemple une fusion du gène codant la chitinase, une enzyme indispensable à la lyse du septum et donc à la libération de la cellule fille, avec la GFP, permettrait par microscopie confocale de confirmer son absence d'adressage au site de bourgeonnement.

Cependant, l'étude comparative des protéomes des deux isolats cliniques nous permettrait d'identifier plus largement les protéines impliquées dans la croissance pseudohyphale. Pour se libérer des variations de composition en protéines liées à la perturbation de la synthèse d'ergostérol, il serait préférable de comparer les deux isolats cliniques entre eux plutôt que de comparer chacun d'eux à une souche de référence, les différences ainsi observées seraient en relation avec les différences de morphologie existant entre les deux isolats. Ces travaux ont déjà été initiés.

Après culture en milieu YDP et broyage des blastospores à l'aide de billes de verres, différentes fractions protéiques ont été obtenues pour chaque isolat par 3 centrifugations successives (5 min à 5000 g, 30 min à 12000 g, et 1 h à 70000 g). Les protéines solubles, contenues dans le dernier surnageant, ont seulement été dialysées contre de l'eau distillée pour éliminer les sels contenus dans le tampon de broyage. En revanche, les trois fractions de protéines liées, contenues dans les culots de centrifugation, ont été solubilisées par action des ultra-sons dans un tampon contenant de l'urée 6 M, de la thiourée 2 M, 4% de CHAPS et 1% de dithiothréitol. La première dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée avec des strips de 13 cm contenant un gradient de 3 à 10 unités de pH sur un générateur EttanIPGPhor (Amersham Biosciences; 12 h à 30 V, 1 h à 200 V, 1 h à 500 V, 1 h à 1000 V, gradient de 1000 à 8000 V sur 30 min et 3 h à 8000 V), en déposant 500 µg de protéines totales par strip. Après équilibration des strips, les protéines ont été séparées en

fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse sur gel à 10% de polyacrylamide en conditions réductrices. Après coloration au bleu de Coomassie, les gels ont été comparés et les différences analysées à l'aide du logiciel PDQuest (Bio-Rad). Les protéines différenciellement exprimées entre les deux isolats ont été excisées du gel et digérées par une solution de trypsine (New England Biolabs). L'analyse par Matrix-Assisted LASER Desorption/Ionization-Time of Flight/Time of Flight (MALDI-TOF/TOF) des peptides ainsi obtenus, réalisée à la plate-forme protéomique de l'Institut Jacques Monod, sous la direction du Professeur Jean-Michel Camadro, a permis l'établissement de cartes peptidiques. Ces cartes ont été comparées à une banque de données composée uniquement de protéines de *C. glabrata* à l'aide du logiciel Mascott.

Cependant, les techniques de solubilisation employées n'ont pas donné de résultats satisfaisants pour les fractions les plus intéressantes, celles contenant les protéines liées aux membranes cellulaires. En effet, l'analyse des peptides obtenus par MALDI-TOF/TOF n'a permis d'identifier avec certitude que 25 protéines liées sur les 156 différenciellement exprimées entre les deux isolats. En revanche, sur les 42 protéines solubles différenciellement exprimées, 23 ont déjà été identifiées (Figure 16).

De façon intéressante, les résultats préliminaires obtenus montrent des différences d'expression pour certaines protéines jouant un rôle dans l'adressage des protéines à la membrane ou dans la croissance pseudohyphale (Tableaux 2 et 3). Une observation intéressante est également le grand nombre de protéines liées absentes chez l'isolat pseudohyphal (13 sur les 25 identifiées et 75 sur les 156 différenciellement exprimées), appuyant l'hypothèse d'un défaut d'adressage. Ainsi les protéines Egd2p, Ssa2p, Ssb2p, Ssa1p, Sec14p et Vps35p qui sont impliquées dans l'adressage des protéines, sont sous-représentées, voire totalement absentes, dans la fraction liée pour l'isolat à croissance pseudohyphale. A l'inverse, certaines de ces protéines, comme Ssa2p, ne sont détectées dans la fraction soluble que pour cet isolat.

De plus, plusieurs observations constituent des pistes d'investigation intéressantes. Ainsi, trois protéines impliquées dans la croissance pseudohyphale chez *S. cerevisiae*, Tpm1p, Smy1p et Bmh1p, sont surexprimées chez l'isolat à croissance pseudohyphale. On peut également noter la sous-expression de deux protéines jouant un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydatif, la superoxyde dismutase (Sod1p) et la catalase (Cta1p), peut-être compensée par la surexpression de la peroxyrédoxine (Ahp1p). Enfin, l'absence de la protéine Mvd1p dans la fraction liée de l'isolat à croissance pseudohyphale peut paraître surprenante puisque c'est une enzyme indispensable à la synthèse de l'ergostérol (Figure 15). On peut cependant supposer que cette protéine soit par contre présente dans la fraction soluble (mais malheureusement non identifiée) et que ce défaut d'adressage contribue au blocage de la synthèse d'ergostérol observé chez l'isolat à croissance pseudohyphale.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 16 : Analyse électrophorétique des protéines de la fraction soluble (A et B) ou des différentes fractions liées (C, D, E, F, G et H) des deux isolats cliniques à croissance pseudohyphale (A, C, E et G) ou de morphologie normale (B, D, F et H). Les protéines différentiellement exprimées et impliquées dans la croissance pseudohyphale ou l'adressage sont indiquées par une flèche rouge (surexprimées ou uniquement présentes chez l'isolat à croissance pseudohyphale) ou verte (surexprimées ou uniquement présentes chez l'isolat de morphologie normale). Les autres protéines différentiellement exprimées et identifiées par MALDI-TOF/TOF sont indiquées par une flèche bleue.

Tableau 2 : Protéines solubles différentiellement exprimées entre les deux isolats cliniques présentant une moindre sensibilité aux polyènes. En gras sont indiqués les gènes codant des protéines jouant un rôle dans les phénomènes d'adressage; les gènes codant des protéines impliquées dans la croissance pseudohyphale sont soulignés.

Gène*	Protéine (nom et fonction)	Ratio**
SSA2	Protéine chaperonne de la famille HSP70 Adressage des protéines	ON
<i>ADE1</i>	SAICAR synthétase Synthèse des purines	ON
<u><i>TPM1</i></u>	Tropomyosine isomérase Stabilisation du cytosquelette, croissance pseudohyphale	25
<u><i>SMY1</i></u>	Protéine similaire aux kinésines Exocytose, formation du bourgeon	25
<i>PDI1</i>	Disulfide isomérase Synthèse des ponts disulfure	16,7
<i>PDC1</i>	Pyruvate décarboxylase Cycle de Krebs, production d'énergie	8
<i>GMP1</i>	Phosphoglycérate mutase Glycolyse, néoglucogénèse, fermentation	5,8
<i>TPI1</i>	Triose phosphate isomérase Glycolyse	3,8
<i>IPP1</i>	Pyrophosphatase Métabolisme cellulaire	3,3
<i>AHP1</i>	Péroxyrédoxine Stress oxydatif	2,9
<u><i>BMH1</i></u>	Isoforme majeur des protéines 14-3-3 Contrôle des protéines, croissance pseudohyphale	2,8
<i>HSC82</i>	Protéine chaperonne de la famille HSP90 Structure tertiaire des protéines	2,4
<i>SEC53</i>	Phosphomannomutase Structure tertiaire et glycosylation des protéines secrétées	2,2
<i>OYE2</i>	NADPH deshydrogénase Métabolisme cellulaire (dont stéroïdes)	2,2
<i>ENO1</i>	Enolase Glycolyse, néoglucogénèse	2,1
<i>XPB1</i>	Facteur de transcription Cycle cellulaire (répression des gènes des cyclines)	2
<i>SOD1</i>	Superoxyde dismutase Stress oxydatif	-2,2
<i>HSP31</i>	Protéine chaperonne Cystéine protéase	-3,6

Tableau 2 (suite)

Gène*	Protéine (nom et fonction)	Ratio**
<i>FBA1</i>	Fructose bisphosphate isomérase Glycolyse, néoglucogénèse	-4,7
<i>CTA1</i>	Catalase Stress oxydatif	-7,4
<i>ADH1</i>	Alcool déshydrogénase Fermentation alcoolique	OFF
<i>HXT6</i>	Transporteur des hexoses de la famille MFS Transport membranaire des hexoses	OFF
<i>ALK1</i>	Kinase Cycle cellulaire, réparation de l'ADN	OFF

*Dénomination du gène de *S. cerevisiae*, dont l'homologue a été identifié chez *C. glabrata*.

**Ratio : quantité relative de la protéine chez l'isolat à croissance pseudohyphale (1 chez l'isolat de morphologie normale). ON : présent uniquement chez l'isolat à croissance pseudohyphale; OFF : présent uniquement chez l'isolat de morphologie normale.

Tableau 3 : Protéines liées différentiellement exprimées entre les deux isolats cliniques présentant une moindre sensibilité aux polyènes. En gras sont indiqués les gènes codant des protéines jouant un rôle dans les phénomènes d'adressage; les gènes codant des protéines impliquées dans la croissance pseudohyphale sont soulignés.

Gène*	Protéine (nom et fonction)	Ratio**
<i>PDC1</i>	Pyruvate décarboxylase Cycle de Krebs, production d'énergie	50
<i>PSK1</i>	Protéine kinase Synthèse des protéines, métabolisme des sucres	5,6
<i>ARG5</i>	Cofacteur de l'acétylglutamate kinase Synthèse de l'arginine	5
<i>PPT2</i>	Phosphopanthétine protéine transférase Synthèse protéique	3,2
<u><i>TCO89</i></u>	Sous-unité du complexe TORC Régulation de la croissance cellulaire	2,9
<i>ENO1</i>	Enolase Glycolyse, néoglucogénèse	2,7
<i>EGD2</i>	Sous-unité du complexe lié aux polypeptides Adressage des protéines	-2,4
<i>DDP1</i>	Polyphosphate phosphatase Dégradation des polyphosphates, inositol et diadénosine	-3

Tableau 3 (suite)

Gène*	Protéine (nom et fonction)	Ratio**
SSA2	Protéine chaperonne de la famille HSP70 Adressage des protéines	-4
SSB2	Protéine chaperonne de la famille HSP70 Structure tertiaire des protéines	-4
<u>ELC1</u>	Facteur d'élongation de la transcription Sporulation	-4,5
<i>ATP1</i>	Sous-unité F1F0 ATPase Synthèse ATP	-4,6
<i>ATP2</i>	Sous-unité F1F0 ATPase Synthèse ATP	OFF
<i>KTI12</i>	Protéine régulatrice Dégénérescence du code génétique, régulation de la transcription	OFF
SFH5	Phosphatidyl inositol transfert protéine Transport des phospholipides	OFF
<i>MVD1</i>	Mévalonate pyrophosphate décarboxylase Synthèse du mévalonate	OFF
<u>DIA2</u>	Complexe ubiquitine ligase Réplication ADN, croissance pseudohyphale	OFF
SSC1	Protéine chaperonne de la famille HSP70 Adressage des protéines	OFF
<u>ARP2</u>	Sous-unité du complexe Arp2/3 Structure de l'actine, croissance membranaire, polarité cellulaire	OFF
<i>NUM1</i>	Protéine chaperonne Migration du noyau pendant la mitose	OFF
<i>MET1</i>	S adénosyl méthyltransférase Synthèse de la méthionine	OFF
SEC14	Phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfert protéine Régulation de l'adressage à la membrane des protéines	OFF
<i>MIH1</i>	Tyrosine phosphatase Cycle cellulaire	OFF
VPS35	Sous-unité du complexe rétromère associé aux membranes Transfert des protéines des endosomes au Golgi	OFF
<i>MGT1</i>	Méthyltransférase Réparation ADN	OFF

*Dénomination du gène de *S. cerevisiae*, dont l'homologue a été identifié chez *C. glabrata*.

**Ratio : quantité relative de la protéine chez l'isolat à croissance pseudohyphale (1 chez l'isolat de morphologie normale). ON : présent uniquement chez l'isolat à croissance pseudohyphale; OFF : présent uniquement chez l'isolat de morphologie normale.

En conclusion, même si les protéines que nous recherchions n'ont pas toutes été identifiées, comme les protéines Cdr1p et Cdr2p ou le facteur de transcription Ace1p (dont on pouvait légitimement attendre une dérégulation de l'expression puisqu'il active notamment la transcription du gène codant la chitinase, enzyme indispensable à la séparation des cellules filles après bourgeonnement [Kamran *et al.*, 2004]), la protéomique semble être la technique de choix pour appréhender l'ensemble des différences entre les deux isolats et ainsi définir les protéines impliquées dans la croissance pseudohyphale.

Les modifications phénotypiques observées et les mécanismes mis en jeu chez les deux isolats cliniques peuvent donc être résumés par le tableau suivant :

Tableau 4 : Principales modifications phénotypiques liées à la mutation du gène *ERG6* chez les deux isolats cliniques de *C. glabrata* présentant une moindre sensibilité aux polyènes et mécanismes mis en jeu.

Caractère	Isolat 1	Isolat 2
séquence du gène <i>ERG6</i>	G592T	C994T
séquence d'Erg6p	Cys198Phe	Gln332Stop
activité Erg6p*	nulle	résiduelle
chromatogramme des stérols taux de $\Delta 5,7$ -diénols taux d'ergostérol*	perturbé augmenté nul	perturbé augmenté fortement diminué
CMI AmB ($\mu\text{g/ml}$)	1,3	0,125
adressage des protéines*	perturbé	normal
morphologie	pseudohyphale	blastospores solitaires parfois bourgeonnantes

*Non démontré formellement

II. Mécanismes de résistance à la 5-fluorocytosine

La 5-FC n'est administrée qu'en association avec un autre antifongique en raison de la fréquence élevée de sélection d'isolats résistants à cet antifongique. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette résistance restent peu connus, probablement en raison de la complexité du mode d'action de la 5-FC. Chez *C. glabrata*, les mécanismes de résistance à la 5-FC n'ont d'ailleurs jamais été étudiés au niveau moléculaire. Ne disposant pas au laboratoire d'isolats cliniques de *C. glabrata* résistants à la 5-FC, nous avons induit des mutants par exposition d'une souche sauvage à cet antifongique.

Lors de l'induction de la résistance à la 5-FC, nous avons observé pour *C. glabrata* un plus grand nombre de colonies dans les zones d'inhibition de croissance comparativement aux deux autres espèces majeures du genre *Candida*, *C. albicans* et *C. tropicalis*. Les résultats obtenus pour *C. tropicalis* ne sont pas surprenants puisque cette espèce est décrite pour présenter une résistance constitutive à la 5-FC (Krcemry et Barnes, 2002). Ainsi, sur les 5 isolats testés, 4 étaient totalement résistants à la 5-FC et un présentait une zone d'inhibition de 70 mm de diamètre ne contenant pas de mutants résistants. De façon surprenante, cet isolat a déjà été étudié pour sa résistance aux antifongiques azolés (Vandeputte *et al.*, 2005). Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il existe une relation entre la sensibilité de cet isolat à la 5-FC et sa résistance aux azolés.

La comparaison des fréquences d'acquisition de la résistance à la 5-FC chez *C. glabrata* et *C. albicans* a mis en évidence une fréquence plus élevée chez *C. glabrata* (10^{-8} contre 10^{-9} chez *C. albicans*). La fréquence d'acquisition de la résistance à la 5-FC chez *C. glabrata* reste cependant bien inférieure à celle observée pour l'acquisition de la résistance aux antifongiques azolés (Brun *et al.*, 2004). Toutefois, on sait que la résistance aux azolés peut être le résultat d'une mutation *petite* d'origine mitochondriale chez *C. glabrata*. Or la mutation *petite* survient à une fréquence élevée ($4 \cdot 10^{-4}$) quand on expose *C. glabrata* au fluconazole (Brun *et al.*, 2004), probablement parce que le génome mitochondrial fait l'objet d'une maintenance beaucoup moins stricte que le génome nucléaire (Kang et Hamasaki, 2002). Ainsi, la fréquence d'acquisition de la résistance à la 5-FC que nous avons observée est en accord avec les $4 \cdot 10^{-9}$ obtenus pour des mutants de *C. glabrata* par Normark et Schönebeck (1972).

Deux profils distincts ont été observés parmi les six mutants isolés dans la zone d'inhibition de croissance d'une souche sauvage en présence de 5-FC. En effet, quatre présentaient une résistance totale à la 5-FC et son dérivé désaminé le 5-FU, alors que les deux autres montraient seulement une moindre sensibilité à ces deux analogues des pyrimidines. Un mutant représentatif de chacun de ces deux groupes a été sélectionné et les mécanismes moléculaires à l'origine de leur phénotype respectif ont été étudiés par séquençage et détermination du niveau d'expression des principaux gènes impliqués dans le métabolisme de la 5-FC.

Le premier mutant étudié, totalement résistant à la 5-FC et au 5-FU, était porteur d'une mutation faux sens sur le gène *FCY1*, codant la cytosine désaminase. Cette enzyme est responsable de la conversion de la 5-FC en 5-FU, une étape indispensable à l'action antifongique de la 5-FC. Les données structurales concernant cette enzyme chez *S. cerevisiae* suggèrent que la mutation portée par le gène *FCY1* chez ce mutant a des conséquences importantes sur la fonction de l'enzyme puisqu'elle touche un acide aminé proche d'un résidu responsable de la liaison du substrat (Ko *et al.*, 2003). Cependant il faudrait confirmer cette hypothèse en dosant l'activité cytosine désaminase des cellules de ce mutant, par exemple par la méthode spectrophotométrique décrite par Jund et Lacroute (1970). Ce mutant présentait également une diminution d'un facteur 2 de l'expression du gène *FUR1*, codant une enzyme au rôle central dans le métabolisme de la 5-FC, l'uridine phosphoribosyltransférase ou UPRT. Il semble d'ailleurs que cette diminution de l'expression du gène *FUR1* soit le mécanisme majeur à l'origine du phénotype de ce mutant. En effet, la mutation du gène *FCY1* ne peut pas expliquer la résistance totale au 5-FU retrouvée chez ce mutant. La diminution d'un facteur 2 de l'expression du gène pourrait sembler, cependant, trop faible pour provoquer une résistance totale aux fluoropyrimidines. Cependant, Normark et Schönebeck (1972) ont montré qu'une diminution d'un facteur 4 de l'activité de l'UPRT chez *C. glabrata* était suffisante pour induire une résistance totale à la 5-FC. Il faudrait également doser l'activité de cette enzyme chez notre mutant, selon la méthode décrite par Normark et Schönebeck (1972), et la comparer à celle d'une souche sauvage pour confirmer que la diminution de l'expression de *FUR1* se traduit par une diminution non négligeable de l'activité de l'UPRT.

Le second mutant, présentant une sensibilité intermédiaire à la 5-FC et au 5-FU, était porteur d'une mutation faux sens sur le gène *FCY2*. Une fois encore, l'absence de données structurales concernant la cytosine perméase chez *C. glabrata* ne permet pas d'affirmer avec certitude que cette mutation est à l'origine d'une diminution de l'activité du transporteur. La nature du résidu substitué (une glycine), bien différente de celle de l'acide aminé le substituant (une sérine), laisse toutefois supposer que cette mutation perturbe la fonction de la protéine. Cependant, la détermination des constantes cinétiques relatives à l'import de la 5-FC n'a pas montré de différence entre ce mutant et sa souche parentale. Toutefois, il faut signaler que la réduction présumée de l'activité de cette perméase pourrait être compensée par une synthèse accrue de la protéine, une surexpression du gène correspondant d'un facteur 3 ayant été observée pour ce mutant. De même, il est possible que d'autres transporteurs membranaires puissent assurer cette fonction. En effet, chez *S. cerevisiae*, plusieurs transporteurs peuvent assurer l'import de la 5-FC et certains d'entre eux ont des homologues chez *C. glabrata* tels que *FCY21p*, dont nous avons séquencé le gène. Par ailleurs, des transporteurs moins spécifiques peuvent également intervenir dans l'incorporation de la 5-FC. Des expériences de mutagénèse dirigée pourraient être réalisées

pour confirmer l'impact de la mutation du gène *FCY2* sur la fonction de la cytosine perméase. Néanmoins, le succès de telles expériences n'est pas assuré compte-tenu de la multiplicité des systèmes potentiellement impliqués dans l'incorporation de la 5-FC. La moindre sensibilité de ce mutant à la 5-FC et au 5-FU réside donc plus vraisemblablement dans la surexpression d'un facteur 5 que nous avons observé pour le gène *CDC21*. En effet, ce gène code une enzyme inhibée par un des produits de conversion de la 5-FC; sa surexpression va donc diminuer l'action de la 5-FC et engendrer une résistance partielle en diminuant l'effet de la 5-FC sur la synthèse d'ADN, l'impact de la 5-FC sur la synthèse protéique (via l'incorporation du 5-FUTP dans les ARNm à la place de l'UTP) n'étant pas modifié. Même si l'établissement des courbes de croissance n'a pas montré de différence entre ce mutant et sa souche parentale, ce qui peut s'expliquer par le fait que la synthèse de la thymidine soit loin d'être le seul facteur déterminant la vitesse de réplication de l'ADN et donc la vitesse de croissance, il est possible que la surexpression du gène *CDC21* s'accompagne effectivement d'une augmentation de l'activité de la thymidylate synthétase codée par ce gène. Cette hyperactivité de l'enzyme devra être confirmée par cytométrie en flux en marquant les blastospores à l'iodure de propidium, un marqueur des acides nucléiques qui permet d'estimer la proportion de cellules en phase de réplication de l'ADN, elle-même reflet de l'activité de synthèse de l'ADN (Achilles *et al.*, 2006)

Les expériences de croissance compétitive ont montré que les évènements moléculaires retrouvés chez les deux mutants et à l'origine de leur profil de sensibilité aux fluoropyrimidines ont un impact non négligeable sur leur vitalité. En effet, le mutant résistant à la 5-FC et au 5-FU disparaissait totalement au profit de la souche parentale en co-culture, alors que le second mutant de sensibilité amoindrie aux fluoropyrimidines ne représentait que 5% des colonies ré-isolées après co-culture avec la souche parentale.

Nous pouvons donc conclure qu'*in vitro*, ces évènements moléculaires ont un impact majeur sur la vitalité des cellules, ce qui laisse supposer qu'en l'absence de pression de sélection, la signification clinique de ces mutants pourrait être négligeable. Cependant, nous avons montré en parallèle que la résistance à la 5-FC était plus fréquemment acquise chez *C. glabrata*. Ainsi, pour les patients atteints de candidose systémique ou profonde à *C. glabrata*, l'association 5-FC/azolés devrait être accompagnée d'une surveillance mycologique comprenant une détermination de la sensibilité à ces antifongiques au cours du traitement pour éviter la sélection d'isolats résistants, compte-tenu de la faible sensibilité intrinsèque aux antifongiques azolés et de la fréquence des résistances acquises aux fluoropyrimidines.

III. Mécanismes de résistance aux azolés

La mutation *petite* est un évènement fréquemment décrit chez *C. glabrata*. Cependant, toutes les études antérieures relatent une résistance aux azolés chez ces mutants *petite*. Les azolés étant les antifongiques les plus couramment utilisés en clinique, leur mode d'action ainsi que les stratégies de résistance adoptées par les micro-organismes sont bien connus. Dans le cas des mutants *petite* de *C. glabrata*, la résistance aux azolés provient d'une surexpression des gènes codant des protéines responsables de l'efflux de l'antifongique en dehors de la cellule fongique. Si on sait que l'expression de ces gènes est sous la dépendance du facteur de transcription Pdr1p, les évènements à l'origine de la modification de son activité chez les mutants *petite* restent inconnus. L'étude d'un isolat clinique de *C. glabrata* présentant à la fois un phénotype *petite* et une sensibilité accrue aux azolés a permis de fournir un élément de réponse qui reste à confirmer.

Deux isolats cliniques ont été obtenus à partir d'un prélèvement d'urine provenant d'une patiente âgée de 28 ans et atteinte de mucoviscidose. Ces isolats, appartenant tous deux à l'espèce *C. glabrata*, présentaient des profils de sensibilité aux antifongiques azolés diamétralement opposés puisque l'un d'entre eux était hypersensible et l'autre très peu sensible à ces molécules. Si, de façon "classique", ce dernier présentait des caractères familiers, le premier en revanche était très singulier.

En effet, après avoir écarté l'hypothèse d'une dérégulation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol en étudiant qualitativement et quantitativement les stérols des deux isolats, leur phénotype respiratoire a été déterminé. De façon surprenante, l'isolat résistant présentait un phénotype respiratoire normal tandis que l'isolat hypersensible présentait une déficience respiratoire très marquée comme en témoignent les résultats d'oxygraphie. Cependant, cet isolat possédait des mitochondries et accumulait normalement la rhodamine 123, un fluorochrome qui s'incorpore dans les mitochondries uniquement si la chaîne respiratoire est fonctionnelle. L'hypothèse la plus vraisemblable est que la déficience respiratoire de ce mutant a pour origine une mutation d'un gène nucléaire codant une sous-unité de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les résultats obtenus suggèrent en effet que chez ce mutant *petite*, le blocage de la chaîne respiratoire se produit au niveau du complexe IV (Figure 18). Les expériences de cytométrie en flux ont montré qu'une différence de potentiel existe de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne, traduisant l'existence d'un gradient de protons qui ne peut être entretenu que si le complexe V, l'ATP synthétase, et le complexe III et/ou le complexe IV sont fonctionnels. Par ailleurs, d'après les données de l'oxygraphie, ce mutant *petite* ne consomme pas d'oxygène, qui est l'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire au niveau du complexe IV, la cytochrome oxydase. Nous nous proposons donc de vérifier la présence d'une mutation sur l'un des gènes nucléaires (*COX4*, *COX5*, *COX6*, *COX7*, *COX8*, *COX9*, *COX12* ou *COX13*) codant les sous-unités de cette enzyme. Après amplification de ces

gènes par PCR, la mutation sera recherchée par HPLC en conditions dénaturantes, en comparant les temps de rétention des amplifiats obtenus pour le mutant *petite* et l'isolat résistant que nous supposons être sa parente.

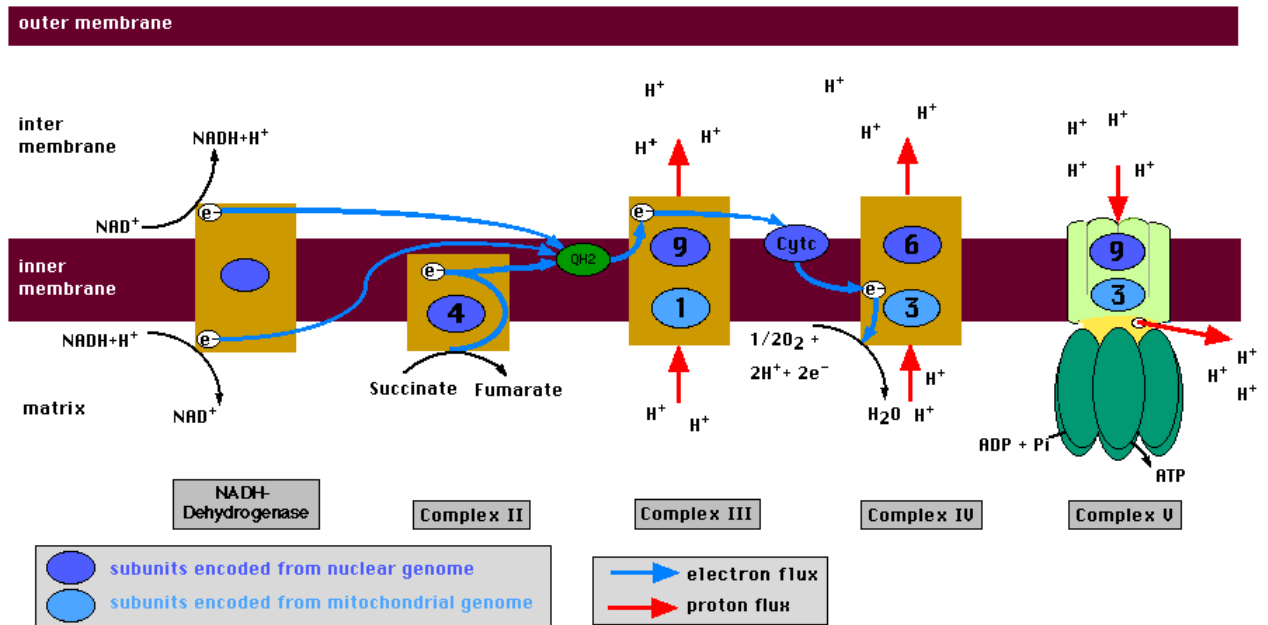


Figure 18 : Chaîne respiratoire mitochondriale chez *Saccharomyces cerevisiae*, d'après Andreaoli *et al.*, 2004.

Les résultats du séquençage des gènes *ERG11* et *PDR1* suggèrent en effet un lien de parenté entre les deux isolats cliniques. Ces deux isolats partagent plus de 5200 pb strictement identiques (1879 pb pour *ERG11* et 3368 pb pour *PDR1*), avec 9 événements mutationnels communs. Une des techniques permettant d'étudier les liens de parenté chez *C. glabrata*, le "multi loci sequence typing", basée sur le séquençage de 5 portions de gènes pour un total de 3345 pb, est autant discriminante que la technique de référence, l'amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphes (Dodgson *et al.*, 2003). Il est donc hautement probable que le mutant *petite* dérive de l'isolat résistant, bien que rien ne permette de le prouver puisque les deux isolats ont été identifiés en même temps, à partir d'un même prélèvement.

Le séquençage des gènes *ERG11* et *PDR1* a par ailleurs révélé la présence d'une mutation non-sens dans ce dernier. Cette mutation se traduit par la délétion de 380 acides aminés à l'extrémité C-terminale de Pdr1p. Or la région C-terminale (Figure 19) serait, d'après Takhur *et al.* (2008), indispensable à l'induction par Pdr1p de l'expression des gènes codant les protéines d'efflux, du moins en présence de kétoconazole. L'absence de cette région pourrait donc se traduire par une diminution de l'activité du facteur de transcription chez nos deux isolats cliniques. Cependant, il n'est pas prouvé que l'intégralité de cette

région soit aussi indispensable à l'induction par Pdr1p de l'expression des gènes codant les protéines d'efflux en l'absence d'azolés. Ainsi, il est possible que la liaison de Pdr1p (via son domaine de fixation à l'ADN) au niveau d'une séquence appelée "pleiotropic drug responsive element" (PDRE), contenue dans le promoteur de ses gènes cibles, soit suffisante pour induire un changement conformationnel de la chromatine et permettre la fixation du complexe d'initiation de la transcription.

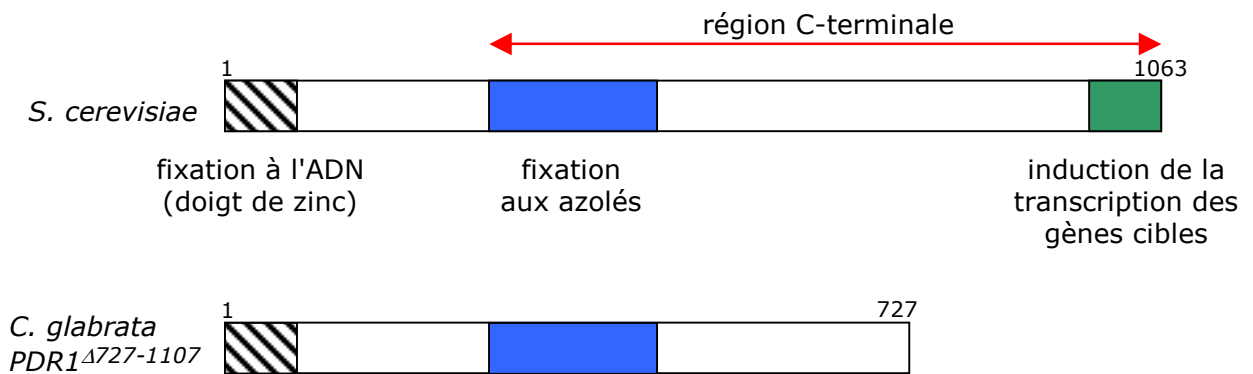


Figure 19 : Domaines du facteur de transcription Pdr1p chez *S. cerevisiae*, d'après Takhur *et al.*, 2008, et modèle proposé de Pdr1p chez les deux isolats de *C. glabrata* étudiés (*PDR1^{Δ727-1107}*).

De plus, les expériences de RT-PCR quantitative en temps réel ont montré une surexpression des gènes *PDR1* et *CDR1* chez les deux isolats. La surexpression de *CDR1* consécutive à la surexpression du gène codant le facteur de transcription Pdr1p est très probablement à l'origine de la résistance aux azolés observées pour l'isolat capable de respirer. Coste *et al.* (2006) ont rapporté que des mutations ponctuelles dans la région C-terminale de Tac1p pouvaient être à l'origine de son hyperactivité. Il est possible que la délétion que nous avons identifiée engendre une modification conformationnelle comparable à celle résultant de ces mutations ponctuelles. Il faut cependant noter que l'expression du gène *CDR2*, une autre cible de Pdr1p, n'est pas modifiée chez cet isolat et que l'expression du gène *HSP12*, qui code une protéine chaperonne impliquée dans la réponse au stress chez *S. cerevisiae* (Praekelt et Meacock, 1990), est même diminuée alors que Vermitsky *et al.* (2006) ont mis en évidence une surexpression de ce gène chez un isolat de *C. glabrata* porteur d'une mutation conférant une hyperactivité à Pdr1p. Toutefois, les analyses de séquence que nous avons réalisées ont montré la présence de deux séquences PDRE en amont du gène *CDR1* chez *C. glabrata* (positions -506 à -497 et -377 à -368) alors qu'il n'existerait qu'une seule séquence PDRE dans le promoteur du gène *CDR2* (position -524 à -515). De plus, contrairement au gène *HSP12* de *S. cerevisiae*, dont le promoteur contient une séquence PDRE, nous n'avons pas retrouvé de séquence PDRE dans les 2000 pb précédant l'ATG du

gène *HSP12* chez *C. glabrata*. En revanche, la surexpression des gènes *PDR1* et *CDR1* chez le mutant *petite* est difficilement conciliable avec sa sensibilité accrue aux antifongiques azolés. Nous proposons ci-dessous une hypothèse s'appuyant sur nos propres observations ainsi que sur les résultats obtenus par d'autres équipes travaillant sur la régulation de l'expression des protéines d'efflux.

Les résultats obtenus pour cet isolat suggèrent en effet que la résistance aux azolés des mutants *petite* d'origine mitochondriale, ou l'hypersensibilité des mutants *petite* d'origine nucléaire, est en relation directe avec l'activité des mitochondries. L'activité mitochondriale est capable d'influencer l'expression de nombreux gènes nucléaires (Parikh *et al.*, 1987; Traven *et al.*, 2001). Selon notre hypothèse, cette influence s'exerce par l'intermédiaire de la production de CO₂. Via l'adénylate cyclase et la production d'AMPc (Bahn *et al.*, 2005; Klengel *et al.*, 2005), la concentration intracellulaire en dioxyde de carbone régule une multitude d'activités cellulaires (Mitchell, 2005; Bahn et Mühlischlegel, 2006). L'adénylate cyclase synthétise l'AMPc, un nucléotide activant des voies de signalisation qui vont aboutir à l'induction ou la répression de certains gènes et il a été montré que l'activité de l'adénylate cyclase détermine, en modulant l'expression de *CDR1*, la sensibilité aux antifongiques azolés chez *S. cerevisiae* et plusieurs espèces du genre *Candida* (Kontoyiannis et Rupp, 2000; Jain *et al.*, 2003). Parmi ces gènes dont l'expression est modulée par le taux de CO₂, se trouveraient pour *C. glabrata* le gène *PDR1* et ses cibles, les gènes codant les protéines d'efflux.

Ainsi, chez les mutants *petite* d'origine mitochondriale (qui résultent de la perte totale, rho⁰, ou partielle, rho⁻, de l'ADN mitochondrial [Contamine et Picard, 2000]), la production de CO₂ est diminuée (6 moles de CO₂ sont produites lors de la dégradation d'une mole de glucose par voie respiratoire, mais seulement 2 par fermentation). L'adénylate cyclase produirait donc moins d'AMPc, et la voie qui réprime l'expression de *PDR1* dans des conditions normales ne serait plus (ou peu) activée, aboutissant à la surexpression des gènes codant les protéines d'efflux de type ABC et donc à la résistance aux antifongiques azolés (Figure 20).

D'ailleurs, l'incorporation de bicarbonate de sodium dans le milieu gélosé restaure une sensibilité normale au fluconazole (Tableau 5) et au voriconazole (Tableau 6) chez un mutant *petite* rho⁰ de *C. glabrata* ou des isolats cliniques résistants aux azolés par surexpression des protéines d'efflux. L'addition de bicarbonate de sodium, converti en CO₂ par l'anhydrase carbonique cellulaire, va augmenter la concentration intracellulaire en CO₂ et ainsi réactiver la voie réprimant l'expression de *PDR1* (Figure 20).

Tableau 5 : CMI du fluconazole chez une souche sauvage, son mutant *petite rho*⁰ (sélectionné par exposition au fluconazole) et trois isolats cliniques de *Candida glabrata* en fonction de la concentration en bicarbonate de sodium dans le milieu de culture.

souche	concentration en NaHCO ₃ (g/L)				
	0	0,1	0,5	1	2
sauvage	4	3	2	2	1
mutant petite	32	16	8	4	0,5
isolat 1	>256	64	48	16	12
isolat 2	128	96	48	16	6
isolat 3	32	32	21	16	8

La CMI (en µg/ml) a été déterminée par la méthode Etest sur milieu casitone en incorporant dans la gélose maintenue en surfusion un volume adéquat d'une solution mère de bicarbonate de sodium à 100 g/L en eau distillée.

Tableau 6 : CMI du voriconazole chez une souche sauvage, son mutant *petite rho*⁰ (sélectionné par exposition au fluconazole) et trois isolats cliniques de *Candida glabrata* en fonction de la concentration en bicarbonate de sodium dans le milieu de culture.

souche	concentration en NaHCO ₃ (g/L)				
	0	0,1	0,5	1	2
sauvage	0,38	0,125	0,094	0,047	0,032
mutant petite	>32	>32	>32	1,5	0,023
isolat 1	1,5	1,5	0,75	0,38	0,25
isolat 2	6	2	2	1	0,38
isolat 3	1,5	0,75	0,5	0,5	0,125

La CMI (en µg/ml) a été déterminée par la méthode Etest sur milieu casitone en incorporant dans la gélose maintenue en surfusion un volume adéquat d'une solution mère de bicarbonate de sodium à 100 g/L en eau distillée.

Inversement, chez le mutant *petite* hypersensible aux azolés, le blocage présumé de la chaîne respiratoire au niveau du complexe IV n'empêcherait pas la régénération du NAD par la chaîne respiratoire dont l'activité serait même augmentée pour compenser la faible production d'ATP liée à l'absence du complexe IV (nous avons d'ailleurs observé une plus grande incorporation de rhodamine 123 pour ce mutant comparativement à l'isolat capable de respirer). En conséquence, l'activité du cycle de Krebs serait elle-même augmentée et celui-ci produirait plus de CO₂. Ainsi, la concentration intracellulaire en dioxyde de carbone serait augmentée chez les mutants *petite* d'origine nucléaire, et les effets sur la sensibilité aux antifongiques azolés seraient totalement opposés.

Les expériences de RT-PCR quantitative en temps réel que nous avons réalisées pour étudier les variations induites par l'addition de bicarbonate dans le milieu de culture sur l'expression des gènes *CDR1* et *HSP12* chez une souche sauvage, un mutant *petite* d'origine mitochondriale et trois isolats cliniques de *C. glabrata* résistants aux azolés par surexpression des protéines d'efflux confirment ces observations. Pour toutes les souches étudiées, l'addition d'1 g/L de bicarbonate diminue d'un facteur 2 à 20 l'expression de *CDR1* et augmente d'un facteur 2 à 6 l'expression de *HSP12*. Rappelons que l'analyse informatique que nous avons réalisée a montré que, contrairement au gène *HSP12* de *C. glabrata*, le gène *HSP12* chez *S. cerevisiae* contient une séquence PDRE dans son promoteur, suggérant sa régulation par Pdr1p. De même, chez *C. albicans*, l'expression du gène *HSP12*, qui contient une séquence PDRE dans son promoteur, est augmentée en présence d'une forme hyperactive de Tac1p (Coste *et al.*, 2006), et il a été montré très récemment que l'expression du gène *HSP12* est diminuée en présence de 5,5% de CO₂ chez cette espèce (Sheth *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces observations soulève des interrogations, notamment quant au choix du milieu destiné à la détermination de la sensibilité aux antifongiques. En effet, le milieu de référence actuellement utilisé est le milieu RPMI 1640, dans lequel est ajouté du bicarbonate à 2 g/L, la concentration pour laquelle l'effet du bicarbonate est maximal (Tableaux 5 et 6). On peut donc supposer que l'utilisation de ce milieu génère un biais dans la détermination de la sensibilité aux azolés, et que ce biais peut être en partie responsable des échecs thérapeutiques. Une levure apparemment sensible *in vitro* pourrait en fait être résistante chez le patient. Il faut néanmoins noter qu'*in vivo*, la concentration en CO₂ est beaucoup plus élevée que dans l'air ambiant (5% contre 0,4‰ environ).

Nous avons donc testé la sensibilité aux antifongiques azolés de souches résistantes de *C. glabrata* dans une atmosphère composée de 80% de CO₂ et de 20% d'O₂, mais les résultats obtenus étaient diamétralement opposés à ceux attendus puisqu'en présence de 80% de CO₂, toutes les souches testées étaient totalement résistantes au fluconazole (Tableau 7). Toutefois, ce taux très élevé génère peut être dans la cellule fongique une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone beaucoup plus importante que celle

résultant de l'addition de 2 g/L de NaHCO₃, avec des conséquences différentes. Il faudrait confirmer cette observation en déterminant la sensibilité de ces souches aux azolés en présence de 5% de CO₂. Nous nous proposons également de déterminer la sensibilité de ces souches aux antifongiques azolés en présence d'inhibiteurs de l'adénylate cyclase, qui devraient induire une résistance chez les isolats sensibles, selon notre hypothèse.

Tableau 7 : CMI du fluconazole et du voriconazole chez une souche sauvage, son mutant *petite rho*⁰ (sélectionné par exposition au fluconazole) et trois isolats cliniques de *Candida glabrata* en fonction de la concentration en CO₂ dans l'enceinte de culture.

souche	CMI du fluconazole		CMI du voriconazole	
	air ambiant	80% CO ₂	air ambiant	80% CO ₂
sauvage	6	24	0,125	0,75
mutant petite	>256	>256	>32	>32
isolat 1	24	>256	1,5	4
isolat 2	48	>256	48	>256
isolat 3	128	>256	2	>32

Les CMI (en µg/ml) ont été déterminées par la méthode Etest sur milieu casitone, par incubation dans des conditions atmosphériques normales (la concentration en CO₂ est alors d'environ 0,4‰) ou dans une enceinte hermétique remplie d'un mélange composé de 80% de CO₂ et de 20% d'O₂.

Si des questions restent en suspens, les résultats que nous avons obtenus, joints aux travaux réalisés chez d'autres espèces, suggèrent que la sensibilité aux antifongiques est déterminée par le CO₂ environnant. Si nous parvenons à prouver l'effet du CO₂ sur la sensibilité aux azolés et à confirmer que l'inhibition de l'adénylate cyclase induit une résistance aux azolés, il restera à définir la voie de signalisation intracellulaire faisant le lien entre l'adénylate cyclase et le facteur de transcription Pdr1p. Nous aurions ainsi reconstitué l'intégralité d'une des voies de régulation de l'expression des protéines d'efflux, dont la surexpression constitue le mécanisme majeur des résistances acquises aux azolés. Cette voie de régulation pourrait s'avérer une cible intéressante pour le développement de nouvelles molécules antifongiques.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 20 : Mécanisme proposé de l'effet du bicarbonate sur la sensibilité aux antifongiques azolés des mutants *petite* d'origine mitochondriale chez *C. glabrata*.

A partir d'isolats cliniques ou de mutants de laboratoire, nous avons démontré que la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida glabrata* a une origine génétique. En effet, la résistance à la 5-fluorocytosine provenait chez deux mutants d'une dérégulation de l'expression ou d'une mutation d'un gène impliqué dans le métabolisme de cet antifongique. De même, la moindre sensibilité à l'amphotéricine B de deux isolats cliniques trouvait son explication dans une mutation du gène *ERG6*. Enfin, la résistance d'un isolat clinique aux antifongiques azolés provenait d'une dérégulation de l'expression des gènes codant des protéines d'efflux. Si les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la sensibilité aux antifongiques azolés chez un mutant petite de *C. glabrata* restent à déterminer, les résultats obtenus suggèrent que les voies de signalisation régulant l'expression des protéines d'efflux sont également mises en jeu.

Ainsi, l'augmentation de la représentation de cette espèce parmi les isolements de levures depuis le début des années 90 serait liée à la plus forte propension de *C. glabrata* à développer une résistance lorsqu'elle est exposée aux antifongiques. Cette sélection de mutants résistants, dont l'augmentation coïncide avec l'explosion de l'utilisation d'antifongiques à titre prophylactique, est en relation directe avec le caractère haploïde du génome de *C. glabrata*, qui facilite l'expression des allèles mutés.

La conclusion de ces travaux serait donc une mise en garde adressée aux praticiens prescripteurs d'antifongiques, notamment pour les patients immunodéficients auxquels sont prescrits des antifongiques à titre prophylactique. L'identification de *C. glabrata* lors d'un prélèvement devrait toujours être prise en compte avec une attention particulière compte-tenu de la forte probabilité de sélection d'un mutant résistant. De plus, le suivi de la sensibilité aux antifongiques au cours du traitement s'avèrerait une stratégie efficace contre les échecs de traitement et les issues parfois fatales, qui pourraient être évités en changeant de classe d'antifongique en cours de traitement si une résistance est détectée.

Même si l'importance clinique de *C. glabrata* n'est plus à démontrer, il est évident que tous les isolats cliniques de cette espèce ne vont pas pour autant devenir résistants à l'antifongique auxquels ils sont exposés. Toutefois, *C. glabrata* semble détenir une flexibilité phénotypique unique, sans doute liée à son habitat strictement commensal des mammifères, qui prédispose cette levure à s'adapter rapidement à son environnement et à survivre même en présence d'antifongiques. Ainsi, en dépit des progrès de la recherche pour élaborer l'antifongique le plus efficace, *C. glabrata* pourra toujours s'adapter par mutation dans une échelle de temps infiniment plus courte que celle consacrée à l'élaboration de ce nouvel antifongique. C'est un combat perdu d'avance : le feu contre la glace.

- Abu-Elteen, K. H.** Increased incidence of vulvovaginal candidiasis caused by *Candida glabrata* in Jordan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2001, **54**:103-107.
- Achilles, J., H. Harms, and S. Müller.** 2006. Analysis of living *S. cerevisiae* cell states--a three color approach. *Cytometry A*. **69**:173-177.
- Akins, R. A.** 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **42**:285-318.
- Albengres, E., H. Louet, and J. P. Tillement.** 1998. Drug interactions of systemic antifungal agents. *Drug Safety* **18**:83-97.
- Andreoli, C., H. Prokisch, K. Hortnagel, J. C. Mueller, M. Munsterkotter, C. Scharfe, and T. Meitinger.** 2004. MitoP2, an integrated database on mitochondrial proteins in yeast and man. *Nucleic Acids Res.* **32**:459-462.
- Arndt, C. A. S., T. J. Walsh, C. L. McCully, F. M. Balis, P. A. Pizzo, and D. G. Poplack.** 1988. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid: implications for treating fungal infections of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* **157**: 178-180.
- Arthington, B. A., L. G. Bennett, P. L. Skatrud, C. J. Guynn, R. J. Barbuch, C. E. Ulbright, and M. Bard.** 1991. Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene* **102**:39-44.
- Ashman, W. H., R. J. Barbuch, C. E. Ulbright, H. W. Jarrett, and M. Bard.** 1991. Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. *Lipids* **26**:628-632.
- Badenhorst, L., P. L. Botha, and M. N. Janse Van Rensburg.** 1991. The incidence of hospital fungal infections—yeast fungaemia. *S. Afr. Med. J.* **79**:302-303.
- Baginski, M., H. Resat, and J. A. McCammon.** 1997. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Mol. Pharmacol.* **52**:560-570.
- Bagnat, M., S. Keränen, A. Shevchenko, A. Shevchenko, and K. Simons.** 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:3254-3259.
- Bagnat, M., and K. Simons.** 2002. Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.* **383**:1475-1480.
- Bahn, Y. S., G. M. Cox, J. R. Perfect, and J. Heitman.** 2005. Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr. Biol.* **15**:2013-2020.
- Bahn, Y. S., and F. A. Mühlischlegel.** 2006. CO₂ sensing in fungi and beyond. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:572-578.
- Balashov, S., S. Park, and D. S. Perlin.** 2006. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKS1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 2058-2063.
- Balzi, E., W. Chen, S. Ulaszewski, E. Capiieux, and A. Goffeau.** 1987. The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **262**:16871-16879.
- Banerjee, S. N., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, T. Horan, J. R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, W. J. Marton, and the National Nosocomial Infections Surveillance System.** 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. *Am. J. Med.* **91**(Suppl. 3B):86S-89S.
- Bard, M., A. M. Sturm, C. A. Pierson, S. Brown, K. M. Rogers, S. Nabinger, J. Eckstein, R. Barbuch, N. D. Lees, S. A. Howell, and K. C. Hazen.** 2005. Sterol uptake in *Candida glabrata*: rescue of sterol auxotrophic strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **52**:285-293.
- Bard, M., N. D. Lees, T. Turi, D. Craft, L. Cofrin, R. Barbuch, C. Koegel, and J. C. Loper.** 1993. Sterol synthesis and viability of *erg11* (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids* **28**:963-967.
- Barnett, J. A.** 2004. A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast* **21**:1141-1193.
- Barns, S. M., D. J. Lane, M. L. Sogin, C. Bibeau, and W. G. Weisburg.** 1991. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bacteriol.* **173**:2250-2255.

- Barone, J. A., B. L. Moskovitz, L. Guarnieri, A. E. Hassell, J. L. Colaizzi, R. H. Bierman, and L. Jessen.** 1998. Enhanced bioavailability of itraconazole in hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution versus capsules in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1862–1865.
- Barrett, J. P., K. A. Vardulaki, C. Conlon, J. Cooke, P. Daza-Ramirez, E. G. Evans, P. M. Hawkey, R. Herbrecht, D. I. Marks, J. M. Moraleda, G. R. Park, S. J. Senn, C. Viscoli, and Amphotericin B Systematic Review Study Group.** 2003. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin. Ther.* **25**:1295–1320.
- Basson, M. E., M. Thorsness, and J. Rine.** 1986. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:5563–5567.
- Beck-Sague, C. M., and T. R. Jarvis.** 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. *J. Infect. Dis.* **167**:1247–1251.
- Bendel, C. M., and M. K. Hostetter.** 1991. Correlation of adhesion and pathogenic potential in yeast. *Pediatr. Res.* **29**:167A.
- Bennett, J. E.** 1996. Antifungal agents. In Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th edn, (Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., and Goodman Gilman, A., Eds), pp 1175–1190. McGraw-Hill, New York.
- Bennett, J. E.** 1997. Flucytosine. *Ann. Inter. Med.* **86**:319–321.
- Bennett, J. E., W. E. Dismukes, R. J. Duma, G. Medoff, M. A. Sande, H. Gallis, J. Leonard, B. T. Fields, M. Bradshaw, H. Haywood, Z. A. McGee, T. R. Cate, C. G. Cobbs, J. F. Warner, and D. W. Alling.** 1979. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* **301**:126–131.
- Benson, J. M., and M. C. Nahata.** 1988. Clinical use of systemic antifungal agents. *Clin. Pharm.* **7**:424–438.
- Bialkova, A., and J. Subik.** 2006. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiol.* **51**:3–20.
- Blot, S., K. Vandewoude, E. Hoste, J. Poelaert, and F. Colardin.** 2001. Outcome in critically ill patients with candidal fungaemia: *Candida albicans* vs *Candida glabrata*. *J. Hosp. Infect.* **47**:308–313.
- Boogaerts, M., J. Maertens, R. Van Der Geest, A. Bosly, J. M. Michaux, A. Van Hoof, M. Cleeren, R. Wostenborghs, and K. De Beule.** 2001. Pharmacokinetics and safety of a 7-day administration of intravenous itraconazole followed by a 14-day administration of itraconazole oral solution in patients with hematologic malignancy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:981–985.
- Borg von-Zepelin, M., H. Eiffert, M. Kann, and R. Röchel.** 1993. Changes in the spectrum of fungal isolates: results from clinical specimens gathered in 1987/1988 compared with those in 1991/1992 in the University Hospital, Göttingen, Germany. *Mycoses* **36**:247–253.
- Borst, P.** 1991. Genetic mechanisms of drug resistance. A review. *Acta Oncologica* **30**:87–105.
- Bouvier-Navé, P., T. Husselstein, and P. Benveniste.** 1998. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **256**:88–96.
- Brammer, K. W., P. R. Farrow, and J. K. Paulkner.** 1990. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev. Infect. Dis.* **12**:318–326.
- Brass, C., J. N. Galgiani, T. F. Blaschke, R. Defelice, R. A. O'Reilly, and D. A. Stevens.** 1982. Disposition of ketoconazole, an oral antifungal, in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21**:151–158.
- Brockert, P. J., S. A. Lachke, T. Srikantha, C. Pujol, R. Galask, and D. R. Soll.** 2003. Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. *Infect. Immun.* **71**:7109–7018.
- Brun, S., T. Bergès, P. Poupard, C. Vauzelle-Moreau, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2004. Mechanisms of azole resistance in *petite* mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1788–1796.

- Burgess, M. A., and G. P. Bodey.** 1972. Clotrimazole (Bay b 5097): in vitro and clinical pharmacological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**:423–426.
- Caffrey, P., S. Lynch, E. Flood, S. Finnan, and M. Oliynyk.** 2001. Amphotericin B biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem. Biol.* **8**:713–723.
- Calcagno, A. M., E. Bignell, T. R. Rogers, M. Cancedo, F. A. Muhlschlegel, and K. Haynes.** 2004. *Candida glabrata* *Ste20* is involved in maintaining cell wall integrity and adaptation to hypertonic stress, and is required for wild-type levels of virulence. *Yeast* **21**:557–568.
- Calcagno, A. M., E. Bignell, P. Warn, M. D. Jones, D. W. Denning, F. A. Muhlschlegel, T. R. Rogers, and K. Haynes.** 2003. *Candida glabrata* *STE12* is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Mol. Microbiol.* **50**:1309–1318.
- Cappelletty, D., and K. Eiselstein-McKittrick.** 2007. The echinocandins. *Pharmacotherapy* **27**:369–388.
- Carrillo-Muñoz, A. J., G. Giusiano, P. A. Ezkurra, and G. Quindós.** 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter.* **19**:130–139.
- Casey, W. M., J. P. Burgess, and L. W. Parks.** 1991. Effect of sterol side-chain structure on the feedback control of sterol biosynthesis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1081**:279–284.
- Castano, I., R. Kaur, S. Pan, R. Cregg, L. Penas Ade, N. Guo, M. C. Biery, N. L. Craig, and B. P. Cormack.** 2003. Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res.* **13**:905–915.
- Castano, I., S. J. Pan, M. Zupancic, C. Hennequin, B. Dujon, and B. P. Cormack.** 2005. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol.* **55**:1246–1258.
- Cauwenbergh, G.** 1990. Vaginal candidiasis: evolving trends in the incidence and treatment of non-*Candida albicans* infections. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.* **8**:241–245.
- Cevher, E., D. Sensoy, M. Zloh, and L. Mülazımoğlu.** 2008. Preparation and characterisation of natamycin: gamma-cyclodextrin inclusion complex and its evaluation in vaginal mucoadhesive formulations. *J. Pharm. Sci.* Epub ahead of print on 2008 Feb 20.
- Chakrabarti, A., N. Nayak, and P. Talwar.** 1991. In vitro proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia* **114**:163–168.
- Chamilos, G., R. E. Lewis, N. Albert, and D. P. Kontoyiannis.** 2007. Paradoxical effect of echinocandins across *Candida* species in vitro: evidence for echinocandin-specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2257–2259.
- Cherry, J. M., C. Adler, C. Ball, S. A. Chervitz, S. S. Dwight, E. T. Hester, Y. Jia, G. Juvik, T. Roe, M. Schroeder, S. Weng, and D. Botstein.** 1998. SGD: Saccharomyces Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **26**:73–79.
- Chiou, C. C., A. H. Groll, and T. J. Walsh.** 2000. New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer. *The Oncologist* **5**:120–135.
- Contamine, V., and M. Picard.** 2000. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:281–315.
- Cormack, B. P., and S. Falkow.** 1999. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics.* **151**:979–987.
- Coste, A. T., M. Karababa, F. Ischer, J. Bille, and D. Sanglard.** 2004. *TAC1*, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot. Cell.* **3**:1639–1652.
- Coste, A., A. Selmecki, A. Forche, D. Diogo, M. E. Bougnoux, C. d'Enfert, J. Berman, and D. Sanglard.** 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot. Cell* **6**:1889–1904.
- Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhäuser, A. Forche, A. Selmecki, J. Berman, J. Bille, and D. Sanglard.** 2006. A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* **172**:2139–2156.

- Cota, J. M., J. L. Grabinski, R. L. Talbert, D. S. Burgess, P. D. Rogers, T. D. Edlind, and N. P. Wiederhold.** 2007. Increases in *SLT2* expression and chitin content are associated with incomplete killing of *Candida glabrata* by caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1144-1146.
- Csank, C., and K. Haynes.** 2000. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**:115-120.
- Current, W. L.** 1997. Fungal cell wall biosynthesis: Penicillins for fungi. In: Program and abstracts of the 35th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; September 13-16, 1997; San Francisco, Calif.
- Dahl, C., H. P. Biemann, and J. Dahl.** 1987. A protein kinase antigenically related to pp60v-src possibly involved in yeast cell cycle control: positive in vivo regulation by sterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**:4012-4016.
- De Backer, M. D., T. Ilyina, X. J. Ma, S. Vandoninck, W. H. Luyten, and H. Vanden Bossche.** 2001. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1660-1670.
- Daneshmend, T. K., and D. W. Warnock.** 1983. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **8**:17-42.
- De Meeus, T., F. Renaud, E. Mouveroux, J. Reynes, G. Galeazzi, M. Mallie, and J. M. Bastide.** 2002. Genetic structure of *Candida glabrata* populations in AIDS and non-AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2199-2206.
- Denning, D. W.** 2002. Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:889-891.
- Denning, D. W., K. Venkateswarlu, L. Oakley, M. J. Anderson, N. J. Manning, D. A. Stevens, D. W. Warnock, and S. L. Kelly.** 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1364-1368.
- Devaux, F., P. Marc, C. Bouchoux, T. Delaveau, I. Hikkel, M. C. Potier, and C. Jacq.** 2001. An artificial transcription activator mimics the genome-wide properties of the yeast Pdr1 transcription factor. *EMBO Rep.* **2**:493-498.
- Diamond, R. D.** 1991. The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev. Infect. Dis.* **13**:480-486.
- Diasio, R. B., D. E. Lakings, and J. E. Bennett.** 1978. Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans: possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**:903-908.
- Dimster-Denk, D., and J. Rine.** 1996. Transcriptional regulation of a sterolbiosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3981-3989.
- Dimster-Denk, D., J. Rine, J. Phillips, S. Scherer, P. Cundiff, K. DeBord, D. Gilliland, S. Hickman, A. Jarvis, L. Tong, and M. Ashby.** 1999. Comprehensive evaluation of isoprenoid biosynthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing the Genome Reporter Matrix™. *J. Lipid Res.* **40**:850-860.
- Dodgson, A. R., C. Pujol, D. W. Denning, D. R. Soll, and A. J. Fox.** 2003. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5709-5717.
- Dodgson, A. R., C. Pujol, M. A. Pfaller, D. W. Denning, and D. R. Soll.** 2005. Evidence for recombination in *Candida glabrata*. *Fungal Genet. Biol.* **42**:233-243.
- Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Locketell, J. R. Hebel, D. Johnson, and B. P. Cormack.** 2005. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**:866-870.
- Douglas, L. J.** 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**:30-36.

- Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neuvéglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisramé, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaiia, M. Wésolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J. L. Souciet.** 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**:35-44.
- Duschinsky, R., E. Pleven, and C. Heidelberger.** 1957. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **79**:4559-4560.
- Dutcher, J. D., W. Gold, J. F. Pagano, and J. Vandepatte.** 1959. Amphotericin B, its production and its salts. US patent 2 908 611.
- Edlind, T. D., K. W. Henry, J. P. Vermitsky, M. P. Edlind, S. Raj, and S. K. Katiyar.** 2005. Promoter-dependent disruption of genes: simple, rapid, and specific PCR-based method with application to three different yeast. *Curr. Genet.* **48**:117-125.
- Ellis, D.** 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **49 Suppl 1**:7-10.
- Espinel-Ingroff, A.** 1998. Comparison of In vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2950-2956.
- Espinel-Ingroff, A.** 2003. In vitro antifungal activities of andilafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: Review of the literature. *Rev. Iberoam. Micol.* **20**:121-136.
- Espinel-Ingroff, A.** 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**:101-106.
- Espinel-Ingroff, A., S. Shadomy, and R. J. Gebhart.** 1984. In vitro studies with R 51211 (itraconazole). *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**: 5-9.
- Fasoli, M., and D. Kerridge.** 1988. Isolation and characterization of fluoropyrimidine-resistant mutants in two *Candida* species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **544**:260-263.
- Feldmesser, M., Y. Kress, A. Mednick, and A. Casadevall.** 2000. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.* **182**:1791-1795.
- Fidel, P. L. Jr, J. A. Vazquez, and J. D. Sobel.** 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:80-96.
- Francis, P., and T. J. Walsh.** 1992. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin Infect Dis.* **15**:1003-1018.
- Franzot, S. P., and A. Casadevall.** 1997. Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:331-336.
- Fromtling, R.** 1988. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**:187-217.
- Gaber, R. F., D. M. Cople, B. K. Kennedy, M. Vidal, and M. Bard.** 1989. The yeast gene *ERG6* is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol. Cell. Biol.* **9**:3447-3456.
- Gachotte, D., C. A. Pierson, N. D. Lees, R. Barbuch, C. Koegel, and M. Bard.** 1997. A yeast sterol auxotroph (*erg25*) is rescued by addition of azole antifungals and reduced levels of heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:11173-11178.
- Gardiner, R. E., P. Souteropoulos, S. Park, and D. S. Perlin.** 2005. Characterization of *Aspergillus fumigatus* mutants with reduced susceptibility to caspofungin. *Med. Mycol.* **43**: S299-S305.

- Gardner, R. G., H. Shan, S. P. T. Matsuda, and R. Y. Hampton.** 2001. An oxysterol-derived positive signal for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase degradation in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**:8681–8694.
- Gasic, G.** 1994. Basic-helix-loop-helix transcription factor and sterol sensor in a single membrane-bound molecule. *Cell* **77**:17–19.
- Georgopapadakou, N. H., and J. S. Tkacz.** 1995. The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol.* **3**:98–104.
- Ghannoum, M. A.** 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:122–143.
- Ghannoum, M.A., and L. Rice.** 1999. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Review* **12**:501–517.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Véronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. André, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Güldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kötter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis, and M. Johnston.** 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**:387–391.
- Gietz, D., A. St Jean, R. A. Woods, and R. H. Schiestl.** 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**:1425.
- Glick, C., G. R. Graves, and S. Feldman.** 1993. *Torulopsis glabrata* in a neonate: an emerging fungal pathogen. *South. Med. J.* **86**:969–970.
- Goldstein, J. L., and M. S. Brown.** 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* **343**:425–430.
- Grunberg, E., E. Titsworth, and M. Bennett.** 1963. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**:566–568.
- Hanic-Joyce, P. J., and P. B. Joyce.** 1998. A high-copy-number ADE2-bearing plasmid for transformation of *Candida glabrata*. *Gene* **211**:395–400.
- Harris, B. E., B. W. Manning, T. W. Federle, and R. B. Diasio.** 1986. Conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil by human intestinal microflora. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:44–48.
- Hashida-Okado, T., A. Ogawa, I. Kato, and K. Takesako.** 1998. Transformation system for prototrophic industrial yeasts using the *AUR1* gene as a dominant selection marker. *FEBS Lett.* **425**:117–122.
- Hazen, K. C.** 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:462–478.
- Hazen, K. C., J. Stei, C. Darracott, A. Breathnach, J. May, and S. A. Howell.** 2005. Isolation of cholesterol-dependent *Candida glabrata* from clinical specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **52**:35–37.
- Hector, R. F.** 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 1–21.
- Heel, R. C., R. N. Brogden, G. E. Parke, T. M. Speight, and G. S. Avery.** 1980. Miconazole: a preliminary review of its therapeutic efficacy in systemic fungal infections. *Drugs* **19**:7–30.
- Heeres, J., L. J. Backx, J. H. Mostmans, and J. Van Cutsem.** 1979. Antimycotic imidazoles. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active broad-spectrum antifungal agent. *J. Med. Chem.* **22**:1003–1005.
- Hemmi, K., C. Julmanop, D. Hirata, E. Tsuchiya, J. Y. Takemoto, and T. Miyakawa.** 1995. The physiological roles of membrane ergosterol as revealed by the phenotypes of *syr1/erg3* null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **3**:482–486.

- Holley, R. A.** 1981. Prevention of surface mold growth on Italian dry sausage by natamycin and potassium sorbate. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:422-429.
- Hull, C. M., R. M. Raisner, and A. D. Johnson.** 2000. Evidence for mating of the “asexual” yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**:307-310.
- Iraqi, I., S. Garcia-Sanchez, S. Aubert, F. Dromer, J. M. Ghigo, C. d’Enfert, and G. Janbon.** 2005. The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol. Microbiol.* **55**:1259-1271.
- Jain, P., I. Akula, and T. Edlind.** 2003. Cyclic AMP signaling pathway modulates susceptibility of *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae* to antifungal azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3195-3201.
- Jandrositz, A., F. Turnowsky, and G. Högenauer.** 1991. The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Gene* **107**:155-160.
- Jensen-Pergakes, K. L., M. A. Kennedy, N. D. Lees, R. Barbuch, C. Koegel, and M. Bard.** 1998. Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (*ERG6*) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1160-1167.
- Jund, R., and F. Lacroute.** 1970. Genetic and physiological aspects of resistance to 5-fluoropyrimidines in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **102**:607-615.
- Kahn, J. N., G. Garcia-Effron, M. J. Hsu, S. Park, K. A. Marr, and D. S. Perlin.** 2007. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1876-1878.
- Kalb, V. F., C. W. Woods, T. G. Turi, C. R. Dey, T. R. Sutter, and J. C. Loper.** 1987. Primary structure of the P450 lanosterol demethylase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA* **6**:529-537.
- Kamran, M., A. M. Calcagno, H. Findon, E. Bignell, M. D. Jones, P. Warn, P. Hopkins, D. W. Denning, G. Butler, T. Rogers, F. A. Mühlischlegel, and K. Haynes.** 2004. Inactivation of transcription factor gene *ACE2* in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryot. Cell* **3**:546-552.
- Kanafani, Z. A., and J. R. Perfect.** 2008. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**:120-128.
- Kang, D., and N. Hamasaki.** 2002. Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Curr. Genet.* **41**:311-322.
- Kantarcioglu, A. S., and A. Yucel.** 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* **45**:160-165.
- Katiyar, S., M. Pfaller, and T. Edlind.** 2006. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2892-2894.
- Karyotakis, N. C., and E. J. Anaissie.** 1994. Efficacy of escalating doses of liposomal amphotericin B (AmBisome) against hematogenous *Candida lusitanae* and *Candida krusei* infection in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2660-2662.
- Kauffman, C. A., and P. T. Frame.** 1997. Bone marrow toxicity associated with 5-fluorocytosine therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:244-247.
- Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupancic, and B. P. Cormack.** 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:378-384.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, B. C. Baldwin, A. J. Corran, and D. E. Kelly.** 1997. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J. Biol. Chem.* **272**:9986-9988.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, D. E. Kelly, N. J. Manning, J. Loeffler, H. Hebart, U. Schumacher, and H. Einsele.** 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective delta 5,6-desaturation. *FEBS Lett.* **400**:80-82.
- Klengel, T., W. J. Liang, J. Chaloupka, C. Ruoff, K. Schröppel, J. R. Naglik, S. E. Eckert, E. G. Mogensen, K. Haynes, M. F. Tuite, L. R. Levin, J. Buck, and F. A. Mühlischlegel.** 2005. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr. Biol.* **15**:2021-2026.

- Ko, T. P., J. J. Lin, C. Y. Hu, Y. H. Hsu, A. H. Wang, and S. H. Liaw.** 2003. Crystal structure of yeast cytosine deaminase. Insights into enzyme mechanism and evolution. *J. Biol. Chem.* **278**:19111-19117.
- Komshian, S. V., A. K. Uwaydah, J. D. Sobel, and L. R. Crane.** 1989. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev. Infect. Dis.* **11**:379-390.
- Kontoyiannis, D. P., and S. Rupp.** 2000. Cyclic AMP and fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1743-1744.
- Koszul, R., A. Malpertuy, L. Frangeul, C. Bouchier, P. Wincker, A. Thierry, S. Duthoy, S. Ferris, C. Hennequin, and B. Dujon.** 2003. The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (Torulopsis) glabrata*. *FEBS Lett.* **534**:39-48.
- Krogh-Madsen, M., M. C. Arendrup, L. Heslet, and J. D. Knudsen.** 2006. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin. Infect. Dis.* **42**:938-944.
- Kurtz, M. B., and C. M. Douglas.** 1997. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**:79-86.
- Lachke, S. A., S. Joly, K. Daniels, and D. R. Soll.** 2002. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology* **148**:2661-7264.
- Lachke, S. A., T. Srikantha, L. K. Tsai, K. Daniels, and D. R. Soll.** 2000. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene *MT-II* and the newly discovered hemolysin gene *HLP*. *Infect. Immun.* **68**:884-895.
- Lamb, D. C., A. Corran, B. C. Baldwin, J. Kwon-Chung, and S. L. Kelly.** 1995. Resistant P45051A1 activity in azole antifungal tolerant *Cryptococcus neoformans* from AIDS patients. *FEBS Lett.* **368**:326-330.
- Lees, N. D., M. Bard, M. D. Kemple, R. A. Haak, and F. W. Kleinhans.** 1979. ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **553**:469-475.
- Lees, N. D., F. W. Kleinhans, M. C. Broughton, D. E. Pennington, V. A. Ricker, and M. Bard.** 1989. Membrane fluidity alterations in a cytochrome P-450-deficient mutant of *Candida albicans*. *Steroids* **53**:567-578.
- Lees, N. D., B. Skaggs, D. R. Kirsch, and M. Bard.** 1995. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* - a review. *Lipids.* **30**:221-226.
- Lemke, A., Kiderlen, A.F., and O. Kayser.** 2005. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:151-162.
- Leon, E. M., S. J. Jacober, J. D. Sobel, and B. Foxman.** 2002. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC Infect. Dis.* **2**:1-6.
- Lewis, J. H., H. J. Zimmerman, G. D. Benson, and K. G. Ishak.** 1984. Hepatic injury associated with ketoconazole therapy. Analysis of 33 cases. *Gastroenterology* **86**:503-513.
- Liu, L., Y. Li, Y. Zhu, G. Du, and J. Chen.** 2007a. Redistribution of carbon flux in *Torulopsis glabrata* by altering vitamin and calcium level. *Metab. Eng.* **9**:21-29.
- Liu, L., Y. Li, H. Li, and J. Chen.** 2006. Significant increase of glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by inhibition of oxidative phosphorylation. *FEMS Yeast Res.* **6**:1117-1129.
- Liu, L., Q. Xu, Y. Li, Z. Shi, Y. Zhu, G. Du, and J. Chen.** 2007b. Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnol. Bioeng.* **97**:825-832.
- Lodder, J.** 1970. *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 2nd edn. North-Holland: Amsterdam.
- Lorenz, R. T., and L. W. Parks.** 1991. Physiological effects of fenpropimorph on wild-type *Saccharomyces cerevisiae* and fenpropimorph-resistant mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1532-1537.
- Lorenz, R. T., and L. W. Parks.** 1992. Cloning, sequencing, and disruption of the gene encoding sterol C-14 reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell. Biol.* **11**:685-692.

- Luo, G., L. P. Samaranayake, B. P. Cheung, and G. Tang.** 2004. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of *HLP* gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vitro haemolysin production. *APMIS* **112**:283-290.
- Maertens, J. A.** 2004. History of the development of azole derivatives. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:1-10.
- Maligie, M. A., and C. P. Selitrennikoff.** 2005. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3) β -glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2851-2856.
- Marcireau, C., D. Guyonnet, and F. Karst.** 1992. Construction and growth properties of a yeast strain defective in sterol 14-reductase. *Curr. Genet.* **22**:267-272.
- Marco, F., M. A. Pfaller, S. A. Messer, and R. N. Jones.** 1998. Activity of MK-0991 (L-743,872), a new echinocandin, compared with those of LY303366 and four other antifungal agents tested against blood stream isolates of *Candida* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **32**:33-37.
- Marger, M. D., and M. H. Saier, Jr.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**:13-20.
- Marichal, P., L. Koymans, S. Willemsens, D. Bellens, P. Verhasselt, W. Luyten, M. Borgers, F. C. Ramaekers, F. C. Odds, and H. Vanden Bossche.** 1999. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145**:2701-2713.
- Marichal, P., H. Vanden Bossche, F. C. Odds, G. Nobels, D. W. Warnock, V. Timmerman, C. Van Broeckhoven, S. Fay, and P. Mose-Larsen.** 1997. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2229-2237.
- Medoff, G., and G. S. Kobayashi.** 1980. Strategies in the treatment of systemic fungal infections. *N. Engl. J. Med.* **302**:145-155.
- Mehra, R. K., J. L. Thorvaldsen, I. G. Macreadie, and D. R. Winge.** 1992. Cloning system for *Candida glabrata* using elements from the metallothionein-IIa-encoding gene that confer autonomous replication. *Gene* **113**:119-124.
- Meyer, S. A., D. G. Ahearn, and D. Yarrow.** 1984. *Candida* Berkhout, p. 585-844. In N. J. W. Kreger-van Rij (ed.), *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Michaelis, S., and C. Berkower.** 1995. Sequence comparison of yeast ATP binding cassette (ABC) proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **60**:291-309.
- Milhaud, J., V. Ponsinet, M. Takashi, and B. Michels.** 2002. Interactions of the drug amphotericin b with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insights into the role of ergosterol. *Biochim. Biophys. Acta* **1558**:95-108.
- Mitchell, A. P.** 2005. Fungal CO₂ sensing: a breath of fresh air. *Curr. Biol.* **15**:R934-936.
- Miyazaki, Y., A. Geber, H. Miyazaki, D. Falconer, T. Parkinson, C. Hitchcock, B. Grimberg, K. Nyswaner, and J. E. Bennett.** 1999. Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of *ERG3* (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* **236**:43-51.
- Muller, H., C. Hennequin, J. Gallaud, B. Dujon, and C. Fairhead.** 2008. The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and α haploid mating types. *Eukaryot. Cell.* **7**:848-858.
- Nakayama, H., M. Izuta, S. Nagahashi, E. Y. Sihta, Y. Sato, T. Yamazaki, M. Arisawa, and K. Kitada.** 1998. A controllable gene-expression system for the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology* **144**:2407-2415.
- Nakayama, H., M. Izuta, N. Nakayama, M. Arisawa, and Y. Aoki.** 2000. Depletion of the squalene synthase (*ERG9*) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2411-2418.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group.** 1985. Treatment of blastomycosis and histoplasmosis with ketoconazole. Results of a prospective randomized clinical trial. *Ann. Intern. Med.* **103**:861-872.
- Nes, W. D.** 2003. Enzyme mechanisms for sterol C-methylations. *Phytochemistry* **64**:75-95.
- Nes, W. D., P. Jayasimha, W. Zhou, R. Kanagasabai, C. Jin, T. T. Jaradat, R. W. Shaw, and J. M. Bujnicki.** 2004. Sterol methyltransferase: functional analysis of highly conserved residues by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **43**:569-576.

- Nes, W. D., A. Sinha, P. Jayasimha, W. Zhou, Z. Song, and A. L. Dennis.** 2006. Probing the sterol binding site of soybean sterol methyltransferase by site-directed mutagenesis: functional analysis of conserved aromatic amino acids in Region 1. *Arch. Biochem. Biophys.* **448**:23-30.
- Nicolaou, K. C., R. A. Daines, Y. Ogawa, and T. K. Chakraborty.** 1988. Total synthesis of amphotericin B: 3 final stages. *J. Am. Chem. Soc.* **110**:4696–4705.
- Nolte, F. S., T. Parkinson, D. J. Falconer, S. Dix, J. Williams, C. Gilmore, R. Geller, and J. R. Wingard.** 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:196-199.
- Normark, S., and J. Schönebeck.** 1972. In vitro studies of 5-fluorocytosine resistance in *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**:114-121.
- Oakley, K. L., C. B. Moore, and D. W. Denning.** 1998. In vitro activity of the echinocandin antifungal agent LY303,366 in comparison with itraconazole and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2726-2730.
- Odds, F. C., M. G. Rinaldi, C. R. Jr. Cooper, A. Fothergill, L. Pasarell, and M. R. McGinnis.** 1997. *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **35**:313-316.
- Paltauf, F., S. D. Kohlwein, and S. A. Henry.** 1992. Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast, **2**:415-500. In E. W. Jones, J. R. Pringle and J. R. Broach (ed.), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Paquet, M. J., I. Fournier, J. Barwicz, P. Tancrede, and M. Auger.** 2002. The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol- containing dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers as viewed by 2H NMR. *Chem. Phys. Lipids* **119**:1–11.
- Paradise, E. M., J. Kirby, R. Chan, and J. D. Keasling.** 2008. Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulating squalene synthase. *Biotechnol. Bioeng.* **100**:371-378.
- Parikh, V. S., M. M. Morgan, R. Scott, L. S. Clements, and R. A. Butow.** 1987. The mitochondrial genome can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* **235**:576-580.
- Parks, L.W., and W. M. Casey.** 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:95-116.
- Park, S., R. Kelly, J. N. Kahn, J. Robles, M. J. Hsu, E. Register, W. Li, V. Vyas, H. Fan, G. Abruzzo, A. Flattery, C. Gill, G. Chrebet, S. A. Parent, M. Kurtz, H. Tepler, C. M. Douglas, and D. S. Perlin.** 2005. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3264-3273.
- Pasrija, R., S. L. Panwar, and R. Prasad.** 2008. Multidrug transporters CaCdr1p and CaMdr1p of *Candida albicans* display different lipid specificities: both ergosterol and sphingolipids are essential for targeting of CaCdr1p to membrane rafts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:694-704.
- Patel, R.** 1998. Antifungal agents. Part I. Amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo Clin. Proc.* **73**:1205-1225.
- Perea, S., and T. F. Patterson.** 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect. Dis.* **35**:1073-1080.
- Perfect, J. R., D. T. Durack, J. D. Hamilton, and H. A. Gallis.** 1982. Failure of ketoconazole in cryptococcal meningitis. *JAMA* **247**:3349–3351.
- Perlin, D. S.** 2007. Resistance to echinocandins class antifungal drugs. *Drug Res. Updates* **10**:121-130.
- Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema.** 2008. In vitro susceptibilities of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **46**:150-156.
- Pfaller, M. A., and D. J. Diekema.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133-63.

- Pfaller M. A., Diekema D. J., Jones R. N., Sader H. S., Fluit A. C., Hollis R. J., Messer S. A., the SENTRY participant group.** 2001. International surveillance of bloodstream infection due to *Candida* species : frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3254-3259.
- Pfaller, M. A., D. J. Diekema, M. G. Rinaldi, R. Barnes, B. Hu, A. V. Veselov, N. Tiraboschi, E. Nagy, D. L. Gibbs, and the Global Antifungal Surveillance Group.** 2005. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5848–5859.
- Pfaller, M. A., S. A. Messer, S. Gee, S. Joly, C. Pujol, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and D. R. Soll.** 1999. *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* **37**:870-872.
- Pfaller, M. A., and W. L. Yu.** 2001. Antifungal susceptibility testing: new technology and clinical applications. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **15**: 1227–1261.
- Piens, M. A., J. D. Perry, H. Raberin, F. Parant, and A. M. Freydière.** 2003. Routine use of a one minute trehalase and maltase test for the identification of *Candida glabrata* in four laboratories. *J. Clin. Pathol.* **56**:687-689.
- Podust, L. M., T. L. Poulos, and M. R. Waterman.** 2001. Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:3068-3073.
- Polak, A., and M. Grenson.** 1973. Evidence for a common transport system for cytosine, adenine and hypoxanthine in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.* **32**:276-282.
- Polak, A.** 1977. 5-fluorocytosine – current status with special references to mode of action and drug resistance. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **4**:158-167.
- Polak, A., and H. J. Scholer.** 1975. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy* **21**:113-130.
- Polak, A. and H. J. Scholer.** 1980. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon* **13**:233-244.
- Pons, V., D. Greenspan, and M. Debruin.** 1993. Therapy for oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients: A randomized prospective multicenter study of oral fluconazole versus clotrimazole troches. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **6**:1311–1316.
- Pont, A., P. L. Williams, D. S. Loose, D. Feldman, R. E. Reitz, C. Bochra, and D. A. Stevens.** 1982. Ketoconazole blocks adrenal steroid synthesis. *Ann. Intern. Med.* **97**:370–372.
- Potoski, B. A., and J. Brown.** 2002. The safety of voriconazole (correspondence). *Clin. Infect. Dis.* **35**:1373–1375.
- Powderly, W. G., G. S. Kobayashi, G. P. Herzig, and G. Medoff.** 1988. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. *Am. J. Med.* **84**:826–832.
- Praekelt, U. M., and P. A. Meacock.** 1990. *HSP12*, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol. Gen. Genet.* **223**:97-106.
- Price, M. F., M. T. LaRocco, and L. O. Gentry.** 1994. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1422–1424.
- Rezusta, A., C. Aspiroz, T. Boekhout, J. F. Cano, B. Theelen, J. Guarro, and M. C. Rubio.** 2008. Cholesterol dependent and Amphotericin B resistant isolates of a *Candida glabrata* strain from an Intensive Care Unit patient. *Med. Mycol.* **46**:265-268.
- Rex, J. H., M. G. Rinaldi, and M. A. Pfaller.** 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1–8.
- Rocha, E. M. F., G. Garcia-Effron, S. Park S, and D. S. Perlin.** 2007. A ser678pro substitution in Fks1p confers resistance to echinocandin drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4174-4176.
- Rusche, L. N., A. L. Kirchmaier, and J. Rine.** 2003. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* **72**:481-516.

- Sabo, J. A., and S. M. Abdel-Rahman.** 2000. Voriconazole: a new triazole antifungal. *Ann. Pharmacother.* **34**:1032-1043.
- Samonis, G., and D. Bafaloukos.** 1992. Fungal infections in cancer patients: an escalating problem. *In Vivo* **6**:183-194.
- Sanglard, D.** 2002. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* **20**:462-469.
- Sanglard, D., F. Ischer, and J. Bille.** 2001. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1174-1183.
- Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille.** 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:241-253.
- Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod, and J. Bille.** 1996. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2300-2305.
- Sanglard, D., F. Ischer, T. Parkinson, D. Falconer, and J. Bille.** 2003. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2404-2412.
- Sanglard, D., K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod, and J. Bille.** 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2378-2386.
- Scholer, H. J.** 1980. Flucytosine, p. 35-106. In D. C. E. Speller (ed.), *Antifungal Chemotherapy*. Wiley, Chichester.
- Servouse, M., and F. Karst.** 1986. Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **240**:541-547.
- Sheth, C. C., E. G. Mogensen, M. S. Fu, I. C. Blomfield, and F. A. Mühlischlegel.** 2008. *Candida albicans* HSP12 is co-regulated by physiological CO₂ and pH. *Fungal Genet. Biol.* **45**:1075-1080.
- Skaggs, B. A., J. F. Alexander, C. A. Pierson, K. S. Schweitzer, K. T. Chun, C. Koegel, R. Barbuch, and M. Bard.** 1996. Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene* **169**:105-109.
- Smith, S. J., J. H. Crowley, and L. W. Parks.** 1996. Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**:5427-5432.
- Smith, S. J., and L. W. Parks.** 1993. The *ERG3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* is required for the utilization of respiratory substrates and in heme-deficient cells. *Yeast* **11**:1177-1187.
- Sobel, J. D., S. Faro, R. Force, B. Foxman, W. J. Ledger, P. R. Nyirjesy, B. D. Reed, and P. R. Summers.** 1998. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **178**:203-211.
- Sobel, J. D., C. A. Kauffman, D. McKinsey, M. Zervos, J. A. Vazquez, A. W. Karchmer, J. Lee, C. Thomas, H. Panzer, and W. E. Dismukes.** 2000. Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **30**:19-24.
- Srikantha, T., S. A. Lachke, and D. R. Soll.** 2003. Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot. Cell* **2**:328-340.
- Stamm, A. M., R. B. Diasio, W. E. Dismukes, S. Shadomy, G. A. Cloud, C. A. Bowles, G. H. Karam, and A. Espinel-Ingroff.** 1987. Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *Am. J. Med.* **83**:236-242.
- Stevens, D. A., M. Ichinomiya, Y. Koshi, and H. Horiuchi.** 2006. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for β -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3160-3161.

- Stevens, D. A., T. C. White, D. S. Perlin, and C. P. Selitrennikoff.** 2005. Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **51**:173-178.
- Stone, E. A., H. B. Fung, and H. L. Kirschenbaum.** 2002. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin. Ther.* **24**:351-77; discussion 329.
- Suloff, E. C., J. E. Marcy, C. R. Hackney, S. S. Sumner, and J. R. Bishop.** 2003. Comparative study of a semisynthetic derivative of natamycin and the parent antibiotic on the spoilage of shredded cheddar cheese. *J. Food Prot.* **66**:1499-1502.
- Tassel, D., and M. A. Madoff.** 1968. Treatment of *Candida sepsis* and *Cryptococcus meningitis* with 5-fluorocytosine. A new antifungal agent. *JAMA* **206**:830-832.
- Terrell, C. L.** 1999. Antifungal agents. Part II. The azoles. *Mayo. Clin. Proc.* **74**:78-100.
- Tettenborn, D.** 1974. Toxicity of clotrimazole. *Postgrad. Med. J.* **50**:17-20.
- Thakur, J. K., H. Arthanari, F. Yang, S. J. Pan, X. Fan, J. Breger, D. P. Frueh, K. Gulshan, D. K. Li, E. Mylonakis, K. Struhl, W. S. Moye-Rowley, B. P. Cormack, G. Wagner, and A. M. Näär.** 2008. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **452**:604-609.
- Traven, A., J. M. S. Wong, D. Xu, M. Sopta, and C. J. Ingles.** 2001. Interorganellar communication: altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial mutant. *J. Biol. Chem.* **276**:4020-4027.
- Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, R. P. Gaynes, and the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals.** 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin. Infect. Dis.* **35**:622-630.
- Tsai, H. F., M. Bard, K. Izumikawa, A. A. Krol, A. M. Sturm, N. T. Culbertson, C. A. Pierson, and J. E. Bennett.** 2004. *Candida glabrata erg1* mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2483-2489.
- Tsai, H. F., A. A. Krol, K. E. Sarti, and J. E. Bennett.** 2006. *Candida glabrata PDR1*, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1384-1392.
- Umebayashi, K., and A. Nakano.** 2003. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* **161**:1117-1131.
- Vanden Bossche, H., P. Marichal, J. Gorrens, D. Bellens, H. Moereels, and P. A. Janssen.** 1990. Mutation in cytochrome P-450-dependent 14 alpha-demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:56-59.
- Vanden Bossche, H., P. Marichal, and F. C. Odds.** 1994. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.* **2**:393-400.
- Vanden Bossche, H., D. W. Warnock, B. Dupont, D. Kerridge, G. S. Sen, L. Improvisi, P. Marichal, F. C. Odds, F. Provost, and O. Ronin.** 1994. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:189-202.
- Vandeputte, P., G. Larcher, T. Bergès, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4608-4615.
- Van Der Meer, J. W. M., J. J. Keuning, H. W. Scheijgrond, J. Heykants, J. Van Cutsem, and J. Brugmans.** 1980. The influence of gastric acidity on the bioavailability of ketoconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **6**:552-554.
- Varma, A., J. C. Edman, and K. J. Kwon-Chung.** 1992. Molecular and genetic analysis of *URA5* transformants of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **60**:1101-1108.
- Vermes, A., H. van Der Sijs, and H. J. Guchelaar.** 2000. Flucytosine: correlation between toxicity and pharmacokinetic parameters. *Chemotherapy* **46**:86-94.
- Vermes, A., H. J. Guchelaar, and J. Dankert.** 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:171-179.

- Vermitsky, J. P., K. D. Earhart, W. L. Smith, R. Homayouni, T. D. Edlind, and P. D. Rogers.** 2006. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol. Microbiol.* **61**:704-722.
- Wachtler, V., and M. K. Balasubramanian.** 2006. Yeast lipid rafts?--an emerging view. *Trends Cell. Biol.* **16**:1-4.
- Waldorf, A. R., and A. Polak A.** 1983. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**:79-85.
- Warn, P. A., A. Sharp, J. Guinea, and D. W. Denning.** 2004. Effect of hypoxic conditions on in vitro susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and micafungin against *Aspergillus* and *Candida*. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:743-749.
- Watson, P. F., M. E. Rose, and S. L. Kelly.** 1998. Isolation and analysis of ketoconazole resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Med. Vet. Mycol.* **3**:153-162.
- White, T. C.** 1997. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from an HIV-infected patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1482-1487.
- White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382-402.
- Williams, K. M., A. M. Duffield, R. K. Christopher, and P. J. Finlayson.** 1981. Identification of minor metabolites of 5-fluorocytosine in man by chemical ionization gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass. Spectrom.* **8**:179-182.
- Wingard, J. R., W. G. Merz, M. G. Rinaldi, C. B. Miller, J. E. Karp, and R. Saral.** 1993. Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1847-1849.
- Woolley, D. W.** 1944. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *J. Biol. Chem.* **152**:225-232.
- Wong, S., M. A. Fares, W. Zimmermann, G. Butler, and K. H. Wolfe.** 2003. Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol.* **4**:R10.
- Yarrow, D., and S. A. Meyer.** 1978. Proposal for amendment of the diagnosis of the genus *Candida* Berkhout nom. cons. *Intern. J. System. Bacteriol.* **28**: 611-615.
- Yoon, S. A., J. A. Vazquez, P. E. Steffan, J. D. Sobel, and R. A. Akins.** 1999. High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:836-845.
- Young, L. Y., C. M. Hull, and J. Heitman.** 2003. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2717-2724.
- Zhou, P., M. S. Szczypka, R. Young, and D. J. Thiele.** 1994. A system for gene cloning and manipulation in the yeast *Candida glabrata*. *Gene* **142**:135-140.
- Zotchev, S. B.** 2003. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Curr. Med. Chem.* **10**:211-23.

Titre : Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*.

Résumé : L'espèce *Candida glabrata*, qui se situe au deuxième rang parmi les agents des candidoses toutes formes cliniques confondues, possède des caractéristiques singulières et engendre notamment une plus grande mortalité chez les patients atteints de candidoses profondes ou systémiques. Cette espèce présente notamment la particularité d'être peu sensible aux azolés, les antifongiques les plus couramment utilisés en clinique. De plus, il semble que le développement d'une résistance aux antifongiques aussi bien azolés, que polyéniques ou pyrimidiques, soit plus fréquent chez *C. glabrata*. Nous nous sommes donc proposé d'étudier des isolats cliniques ou des mutants induits de cette espèce résistants à ces trois classes d'antifongiques et de déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de leur résistance. Les outils de biologie moléculaire classique ont mis en évidence dans chaque cas une dérégulation de l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme de ces molécules antifongiques ou de leur cible, ainsi que des mutations sur ces mêmes gènes. Le génome haploïde de *C. glabrata*, et donc la plus forte probabilité d'exprimer un gène muté, ainsi que le contexte médical actuel, prônant la prophylaxie dans nombre de pathologies où l'immunité des patients est touchée, représentent un terrain favorable au développement d'une candidose et à la sélection simultanée d'isolats résistants.

Mots-clés : *Candida glabrata*; antifongiques; mécanismes moléculaires de résistance.

Title : Molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida glabrata*.

Abstract : *Candida glabrata*, which ranks the second among the causative agents of candidiasis in all clinical forms of the disease, possesses singular traits and determines a greater mortality rate in patients with systemic candidiasis. This species is also less susceptible to azoles, the most used class of antifungals. Moreover, it seems that an acquired resistance to azole, polyene and pyrimidin analog drugs is more frequent in *C. glabrata*. Thus, we studied clinical isolates as well as laboratory mutants with a resistance to these three classes of antifungal and aimed at determining the molecular mechanisms responsible for their resistance. Classical molecular biology tools revealed in each case a modification in the expression of some genes involved in the metabolism of these drugs or of their target, as well as the presence of a point mutation in these genes. The haploid genome of *C. glabrata*, with the subsequent higher probability to express a mutated gene, and the actual therapeutic context, which favors prophylactic use of antifungals in immunocompromised patients, represent a privileged environment for the development of a candidiasis and for the simultaneous selection of resistant isolates.

Keywords : *Candida glabrata*; antifungals; molecular mechanisms of resistance.