



HAL
open science

Tolérance et résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.: caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques

Cécile Garnaud

► To cite this version:

Cécile Garnaud. Tolérance et résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.: caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT: 2017GREAS004 . tel-02092298

HAL Id: tel-02092298

<https://theses.hal.science/tel-02092298v1>

Submitted on 8 Apr 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithmes en biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Cécile GARNAUD

Thèse dirigée par **Muriel CORNET** et
codirigée par **Jérôme GOVIN**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG**, équipe **TheREx**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et
l' Environnement (EDISCE)**

Tolérance et résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. : caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques.

Thèse soutenue publiquement le **07 avril 2017**,
devant le jury composé de :

Mme Muriel CORNET

PU-PH, Université Grenoble Alpes, Directrice de thèse

Mr Jérôme GOVIN

Chargé de recherche, INSERM, Directeur de thèse

Mr Frédéric DALLE

PU-PH, Université de Bourgogne, Rapporteur

Mr Nicolas PAPON

Professeur, Université d'Angers, Président

Mme Alix COSTE

Associée de recherche, CHUV Lausanne, Membre



REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les Professeurs Frédéric Dalle et Nicolas Papon pour avoir accepté de juger cette thèse et d'en être les rapporteurs, ainsi que le Docteur Alix Coste et le Professeur Thierry Noël pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie ensuite le Professeur Muriel Cornet et le Docteur Jérôme Govin pour avoir co-dirigé cette thèse. Muriel, un immense merci pour votre encadrement, votre disponibilité, votre confiance, votre soutien et tout ce que vous m'avez appris et m'apprenez encore. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble encore longtemps. Jérôme, merci pour ton encadrement, ton dynamisme, ton exigence et tout ce que tu m'as appris. Merci également à toi et au Docteur Carlo Petosa pour m'avoir donné l'opportunité de participer au projet FungiBET.

Je remercie ensuite le Professeur Hervé Pelloux et l'ensemble des biologistes du laboratoire de Parasitologie-Mycoologie du CHU Grenoble Alpes, Muriel, Danièle, Hélène, Odile, Marie-Pierre et Céline, pour m'avoir permis de m'organiser au mieux pour mener en parallèle cette thèse, mes activités hospitalières et l'enseignement.

Je remercie aussi l'ensemble des membres de l'équipe TheREx pour leur accueil, leur disponibilité, leurs conseils et leur aide, et en particulier les Professeurs Benoit Polack et Bertrand Toussaint, Hélène et Marie-Claire pour les aspects logistiques, et les membres, permanents ou de passage, du groupe CandiSTORE : Danièle, Delphine, Rose, Mandranto, Sandrine, Mathilde, Louise, Quentin et Yan. Danièle, un merci particulier pour tes encouragements et ton soutien tout au long de cette thèse, sans oublier ta disponibilité, ta bonne humeur, ton enthousiasme, ta patience, tes conseils et ta sagacité.

Un grand merci également à toutes les personnes rencontrées dans le cadre du projet FungiBET : ceux déjà cités ci-dessus, Encar, Flore, Ninon, Marie(s), Sandrine, Kaiyao et bien sûr Morgane. Morgane, merci pour ta bonne humeur, ta sympathie, ta disponibilité et tout ce que tu m'as appris en biologie moléculaire.

Je remercie également le Docteur André Verdel, pour son avis et ses conseils à mi-parcours sur ce travail de thèse, le Professeur Christophe d'Enfert et Murielle Chauvel pour avoir mis à notre disposition différentes souches et plasmides, les UFR de Médecine et de Pharmacie de l'Université

Grenoble Alpes pour avoir permis le financement partiel de ce travail de thèse par l'intermédiaire d'une bourse Vivier de la recherche en 2013, Sébastien, pour les analyses statistiques.

Enfin, je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue et accompagnée pendant cette thèse et qui se reconnaîtront, et, en particulier :

- Mes amis, de Dijon, Grenoble ou d'ailleurs, pour votre soutien et tous les moments passés ensemble.
- Laurence et Guy, Timothée, Morgane et Agathe, pour votre gentillesse et votre soutien.
- Mes parents, Xavier et Silvia, Delphine et Jean-Christophe, pour tous les bons moments passés ensemble et ceux à venir. Merci pour votre soutien précieux et vos encouragements.
- Benjamin : merci pour tout.

TABLE DES MATIERES

PARTIE 1 : INTRODUCTION	7
1. <i>Candida</i> spp.	7
1.1. Généralités	7
1.2. <i>Candida albicans</i>	8
1.2.1. Caractéristiques génétiques.....	8
1.2.2. Caractéristiques morphologiques	9
1.3. <i>Candida glabrata</i>	11
1.3.1. Caractéristiques génétiques.....	12
1.3.2. Caractéristiques morphologiques	12
1.4. Pouvoir pathogène/facteurs de pathogénicité de <i>Candida</i> spp.	12
1.4.1. <i>C. albicans</i>	12
1.4.2. <i>C. glabrata</i>	14
2. Candidoses invasives	15
2.1. Définition.....	15
2.2. Epidémiologie.....	16
2.3. Facteurs de risque	17
3. Antifongiques	18
3.1. Antifongiques azolés	18
3.1.1. Molécules	18
3.1.2. Mécanisme d'action	20
3.2. Echinocandines.....	21
3.2.1. Molécules	21
3.2.2. Mécanisme d'action	22
3.3. Autres antifongiques	22
3.4. Traitement et prophylaxie des candidoses invasives.....	23
4. Résistance aux antifongiques	25
4.1. Mécanismes de résistance aux antifongiques azolés.....	26
4.1.1. Diminution de la concentration intracellulaire en antifongique.....	26
4.1.2. Modification de la cible	28
4.1.3. Surproduction de la cible.....	28
4.1.4. Contournement métabolique.....	28
4.1.5. Instabilité génétique.....	29
4.1.5.1. Altérations chromosomiques.....	29
4.1.5.2. Altération des mécanismes de réparation de l'ADN	29
4.1.6. Dysfonction mitochondriale	30

4.2.	Mécanismes de résistance aux échinocandines.....	30
4.3.	Détection des souches résistantes ou de sensibilité diminuée aux antifongiques.....	32
4.4.	Relevance clinique de la résistance aux antifongiques et de la détection des mutations	33
4.5.	Epidémiologie de la résistance aux antifongiques	33
5.	Tolérance aux antifongiques	35
5.1.	Définition	35
5.2.	Effet paradoxal	35
5.3.	Mécanismes impliqués dans la tolérance aux antifongiques.....	37
5.3.1.	Voie de la calcineurine	37
5.3.2.	HSP90.....	38
5.3.3.	Voie médiée par la protéine kinase C.....	38
5.3.4.	Voie HOG	40
5.3.5.	Voie des sphingolipides	41
5.3.6.	Les histone acetyltransférases (HAT) et histone déacétylases (HDAC/KDAC)	42
5.3.6.1.	Histone acétyl transférases	42
5.3.6.2.	Histone déacétylases.....	43
5.3.7.	Biofilms	43
6.	Voie de signalisation du pH : voie Rim	44
7.	Protéines BET fongiques.....	48
PARTIE 2 : OBJECTIFS ET TRAVAIL DE THESE		50
1.	Identification de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques chez <i>Candida</i> spp.....	51
2.	Implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez <i>C. albicans</i>	51
3.	Identification d'une nouvelle cible antifongique potentielle chez <i>C. glabrata</i> : la protéine Bdf1.	51
PARTIE 3 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE		53
1.	Résistance aux antifongiques chez <i>Candida</i> spp. en réanimation	53
1.1.	Résumé.....	53
1.2.	Revue.....	54
2.	Histone déacétylases (HDACs) et leur inhibition chez <i>Candida</i> spp.....	75
2.1.	Résumé.....	75
2.2.	Revue.....	76
PARTIE 4 : RESULTATS		95
1.	Identification de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques chez <i>Candida</i> spp.....	95
1.1.	Résumé.....	95
1.2.	Article	96

2.	Implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez <i>C. albicans</i>	120
2.1.	Résumé	120
2.2.	Manuscrit.....	121
3.	Bdf1, nouvelle cible antifongique ?.....	154
3.1.	Inhibition de la protéine BET Bdf1 chez <i>C. albicans</i>	154
3.1.1.	Contexte	154
3.1.2.	Article	154
3.2.	Inhibition de la protéine BET Bdf1 chez <i>C. glabrata</i>	204
3.2.1.	Contexte et objectifs	204
3.2.2.	Résultats	204
3.2.2.1.	<i>BDF1</i> est essentiel chez <i>C. glabrata</i>	204
3.2.2.2.	Les bromodomaines BD1 et BD2 de <i>BDF1</i> sont essentiels chez <i>C. glabrata</i>	207
3.2.2.3.	Conclusion	209
3.2.3.	Matériel et méthodes.....	209
3.2.3.1.	Souches et plasmides	209
3.2.3.2.	Conditions de culture	211
3.2.3.3.	Test de croissance en milieu solide.....	211
3.2.3.4.	Extraction des protéines totales, SDS-page et <i>western-blot</i>	211
PARTIE 5 : DISCUSSION		212
1.	Identification de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques chez <i>Candida</i> spp.....	212
1.1.	Mutations associées à la résistance aux échinocandines	213
1.2.	Mutations associées à la résistance aux antifongiques azolés.....	213
1.3.	Intérêt d'une approche multigénique pour l'étude de la résistance aux antifongiques.	214
1.4.	Conclusion	215
2.	Implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez <i>C. albicans</i>	216
2.1.	La voie Rim est impliquée dans la tolérance aux antifongiques chez <i>C. albicans</i>	216
2.2.	Plusieurs gènes impliqués dans la tolérance aux antifongiques sont Rim-dépendants .	217
2.3.	L'inhibition de la voie Rim est une nouvelle stratégie antifongique d'intérêt	218
2.4.	Conclusion	219
3.	Bdf1 : nouvelle cible antifongique ?.....	219
3.1.	Bdf1 et <i>Candida albicans</i>	220
3.2.	Bdf1 et <i>Candida glabrata</i>	220
3.2.1.	Etude de l'implication de <i>BDF1</i> et des bromodomaines BD1 et BD2 dans la virulence in vivo	220
3.2.2.	Recherche d'inhibiteurs des bromodomaines de Bdf1	221
3.3.	Bdf1 et résistance aux antifongiques	222

3.4. Conclusion : inhibition des protéines BET chez d'autres espèces fongiques	222
PARTIE 6 : CONCLUSION.....	224
PARTIE 7 : BIBLIOGRAPHIE.....	226

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABC : *ATP-binding cassette*

BD : bromodomaine

BET : *bromodomain extra-terminal*

CBP : *Clinical Breakpoints*

CLSI : *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CMI : concentration minimale inhibitrice

ECV : *Epidemiological cutoff values*

ESCMID : *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*

ESCRT : *endosomal-sorting complex required for transport*

EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

ET : extra-terminal

GOF : *gain of function*

GPI : glycosylphosphatidylinositol

IDSA : *Infectious Diseases Society of America*

HAT : histone acetyltransférases

HDAC : histone déacétylases

HOG : high osmolarity glycerol

HSP : heat shock protein

HSCT : *hematopoietic stem cell transplant*

LOH : *loss-of-heterozygoty*

MAP : *mitogen-activated protein*

MFS : *major facilitator superfamily*

MTL : *mating-type like*

NGS : séquençage nouvelle génération

pb : paire(s) de bases

PKC : protéine kinase C

RNA-SEQ : *RNA-sequencing*

SNP : *single nucleotide polymorphisms*

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés par efflux.....	27
Tableau 2 : pH physiologiques de différents sites anatomiques ou fluides biologiques	45
Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés pour le projet Bdf1 <i>C. glabrata</i>	210
Tableau 4 : Liste des souches utilisées pour le projet Bdf1 <i>C. glabrata</i>	210

Liste des figures

Figure 1 : Phylogénie des principales espèces pathogènes du genre <i>Candida</i> spp.	8
Figure 2 : <i>C. albicans</i> : reproductions asexuée et parasexuée	10
Figure 3 : Morphologie de <i>C. albicans</i>	11
Figure 4 : Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la morphogénèse chez <i>C. albicans</i>	14
Figure 5 : Structure des antifongiques triazolés.....	19
Figure 6 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol et mécanisme d'action des antifongiques azolés.....	21
Figure 7 : Définition des différents types de traitements en réanimation	24
Figure 8 : Principaux mécanismes de résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines	32
Figure 9 : Concepts de résistance et tolérance aux antifongiques.....	36
Figure 10 : Interactions entre Hsp90, la voie de la calcineurine et la voie des MAP kinases médiée par la PKC dans la tolérance aux antifongiques.....	40
Figure 11 : Voies de signalisation impliquées dans le remodelage de la paroi fongique.....	41
Figure 12 : Voie de signalisation du pH ou voie Rim (<i>C. albicans</i>).....	47
Figure 13 : Pourcentages d'homologies entre les séquences des bromodomains BD1 et BD2 des protéines BET fongiques (<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i>) et humaines.....	49
Figure 14 : Caractérisation de la souche <i>C. glabrata</i> pMET-BDF1.....	205
Figure 15 : Restauration de l'expression de BDF1.....	206
Figure 16 : Impact de la délétion ou de la mutation des bromodomains BD1 et/ou BD2 de Bdf1 sur la croissance en milieu solide et la production de la protéine.	208

PARTIE 1 : INTRODUCTION

1. *Candida* spp.

1.1. Généralités

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes, uni- ou pluri-cellulaires, thallophytes, non chlorophylliens. Ces organismes sont immobiles et hétérotrophes : incapables de photosynthèse, ils se développent à partir d'une source extérieure de carbone en tant que saprophytes, parasites ou par symbiose.

La structure du thalle ou appareil végétatif permet de distinguer deux types de micromycètes : les champignons filamenteux (thalle pluricellulaire, sous forme de filament ou hyphe) regroupant les moisissures et les dermatophytes, et les levures (thalle unicellulaire, circulaire ou ovoïde). Certains champignons dits dimorphiques possèdent des morphologies différentes à l'état saprophytique (forme filamenteuse) et à l'état pathogène (forme levure) (1).

La cellule fongique est caractérisée par la présence d'une paroi en contact direct avec l'environnement, indispensable à la croissance et à la survie des champignons (2). La paroi fongique est une structure tridimensionnelle dynamique, dont la composition varie en fonction de l'espèce, et, pour chaque espèce, en fonction des conditions environnementales. Elle est constituée majoritairement de polysaccharides (>90%), parmi lesquels glucanes (β -1,3-glucanes, β -1,6-glucanes +/- α -1,3-glucanes), chitine (polymère de N-acétylglucosamine) et mannanes (mannoprotéines) (3). La paroi fongique entoure la membrane plasmique, riche en lipides : stérols, sphingolipides et glycérophospholipides. Le principal constituant membranaire est l'ergostérol, à l'instar du cholestérol pour les cellules mammifères. Des protéines d'intérêt majeur sont également retrouvées au niveau de la membrane plasmique, dont des protéines à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) impliquées dans la transduction de signaux ou la synthèse de la paroi fongique.

Le genre *Candida* spp. appartient au phylum des ascomycètes (Ascomycota) et au sous-phylum Saccharomycotina regroupant les "levures vraies" (4). Il comprend plus de 350 espèces de levures ubiquitaires. La plupart d'entre elles n'ont pas la capacité de croissance à 37°C, et seule une minorité d'espèces (environ 10%) est impliquée en pathologie humaine (voir plus loin) (5).

Le genre *Candida* spp. est un groupe polyphylétique (Figure 1). La plupart des espèces de *Candida* spp. impliquées en pathologie humaine appartiennent à un même clade, le clade CTG, caractérisé par un code génétique alternatif : le codon CUG est traduit en sérine et non en leucine. Ce clade

Candida peut être divisé en deux sous-clades : l'un contenant des espèces diploïdes fréquentes en pathologie humaine comme *Candida albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, l'autre contenant des espèces haploïdes plus rares parmi lesquelles *C. lusitaniae*. L'espèce *C. glabrata* appartient au Saccharomycetaceae, et plus précisément au clade WGD (*whole-genome duplication*) : cette levure haploïde est génétiquement plus proche de *Saccharomyces cerevisiae*, que des autres espèces du genre *Candida* spp. (6–8).

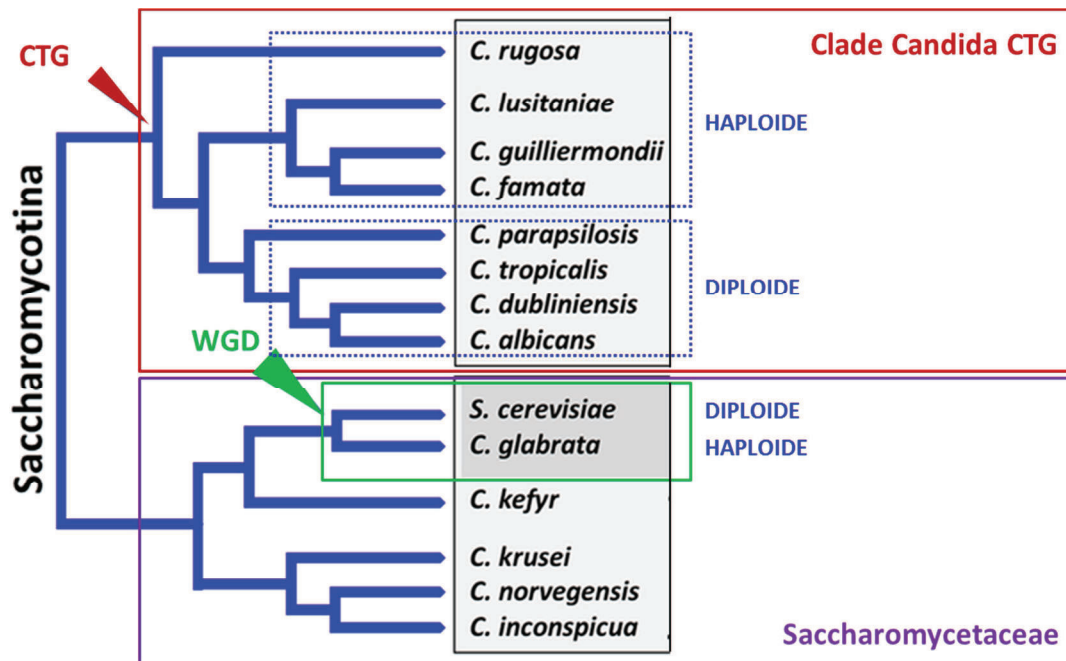


Figure 1 : Phylogénie des principales espèces pathogènes du genre *Candida* spp. (Adapté de Papon, 2013 (8))

1.2. *Candida albicans*

C. albicans est un agent commensal des muqueuses digestives, respiratoires et uro-génitales de l'homme, très rarement retrouvé dans l'environnement. Il s'agit de l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine (9,10).

1.2.1. Caractéristiques génétiques

C. albicans est une espèce diploïde. Son génome est constitué de 28 605 418 paires de bases (pb) (génome haploïde : 15 473 750 pb), réparties en 8 chromosomes (1 à 7 et R) et 6218 gènes. Seule une minorité (26,33%) de ces gènes a été vérifiée, la plupart (71,23%) reste non caractérisée.

La séquence complète du génome de *C. albicans* (souche de référence SC5314) a été publiée pour la première fois en 2004. Elle est depuis régulièrement complétée et mise à jour, et est disponible dans la base de données *Candida genome database* (<http://www.candidagenome.org>) (11,12).

Le polymorphisme allélique est fréquent chez *C. albicans* : plus de 60 000 *single nucleotide polymorphisms* (SNP) ont été détectés lors de la comparaison des séquences des deux allèles de la souche SC5314, soit environ un SNP toutes les 237 bases (11). Par comparaison, environ un SNP toutes les 1300 bases est décrit pour le génome humain (13). Ces mutations ne sont pas réparties de manière homogène au sein du génome : onze régions hautement polymorphes ont été identifiées chez *C. albicans*, parmi lesquelles la région MTL (*mating-type like*) qui comprend les gènes nécessaires à la reproduction (11).

Plusieurs modes de reproduction ont été décrits chez *C. albicans* : asexué (le plus fréquent) et parasexué (Figure 2). Ce dernier consiste en la fusion de deux cellules diploïdes pour donner une cellule tétraploïde, qui, par perte concertée de chromosomes, retourne à l'état diploïde. Ce mode de reproduction est contrôlé par la transition morphologique *white-opaque* (voir plus loin) et le locus MTL, pour lequel deux allèles ont été décrits chez *C. albicans* : a et α . Seules les cellules *opaque* homozygotes pour le locus MTL, a/a ou α/α , sont capables de reproduction parasexuée (14). Ce mode de reproduction est peu fréquent chez *C. albicans* : plus de 90% des isolats cliniques de cette espèce sont en effet hétérozygotes pour le locus MTL (14,15). Ce mode de reproduction contribue toutefois à la diversité génétique et phénotypique de *C. albicans* : il favorise la formation de cellules aneuploïdes, génétiquement plus instables, et les recombinaisons génétiques (16). Il participe également à l'adaptation de la levure à diverses situations de stress, comme par exemple le stress oxydatif ou la présence de molécules antifongiques.

1.2.2. Caractéristiques morphologiques

C. albicans peut se présenter sous trois formes principales : levure, pseudo-filament et filament (Figure 3). La forme levure est une cellule ronde à ovale de 4-6 x 6-10 μm , ayant la capacité de se multiplier par bourgeonnement. La forme filament (ou hyphe) se développe à partir d'une levure non bourgeonnante (ou blastospore) : aucune constriction n'est observée au niveau de la jonction avec la cellule-mère. Le filament possède des bords parallèles sur toute sa longueur. A l'inverse, la forme pseudo-filament est caractérisée par la présence d'une constriction au niveau de la jonction avec la cellule-mère, ainsi qu'à chaque jonction secondaire. De plus, la largeur et la longueur des pseudo-filaments sont très variables (15,17,18). La transition morphologique levure-filament est associée à la capacité d'invasion et à la virulence de *C. albicans* (voir plus loin) (17,19).

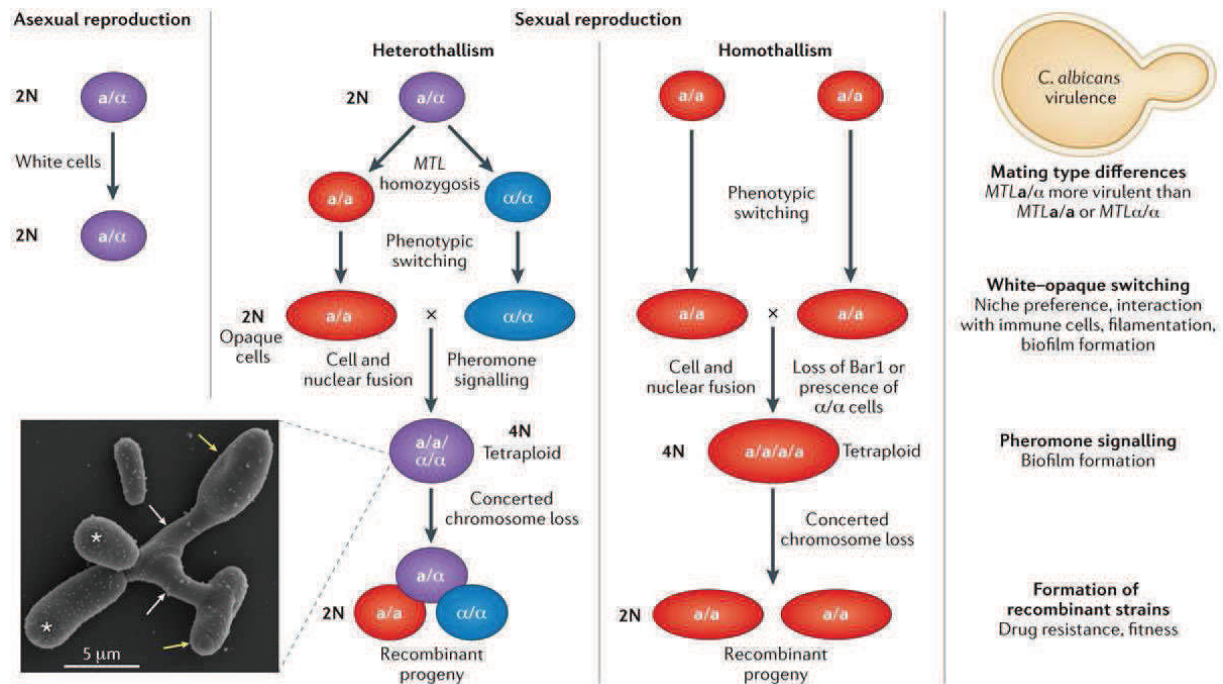


Figure 2 : *C. albicans* : reproductions asexuée et parasexuée (D'après Ene, 2014 (14))

Une autre transition morphologique a été décrite chez *C. albicans* : la transition *white-opaque*. La forme levure la plus fréquente, dite *white*, peut évoluer en une forme levure dite *opaque*, allongée, possédant une paroi rugueuse et également capable de se multiplier par bourgeonnement. Cette transition, nommée ainsi en raison de l'aspect des colonies des deux formes sur milieu solide, est notamment associée à la capacité de reproduction parasexuée de *C. albicans*. La transition *white-opaque* est majoritairement décrite pour les cellules homozygotes a/a ou α/α pour le locus *MTL*, et la capacité de reproduction des cellules *opaque* a/a ou α/α est plus d'un million de fois supérieure à celle des cellules *white*. Des cellules *opaque* hétérozygotes pour le locus *MTL* ont également été mises en évidence, mais celles-ci sont incapables de reproduction parasexuée (20). D'autres différences existent entre les cellules *white* et *opaque*, en particulier en ce qui concerne l'interaction avec les cellules du système immunitaire de l'hôte, ou encore la virulence (15,21). Les cellules *white* possèdent une virulence supérieure dans différents modèles de candidoses systémiques (modèles murin ou vertébré poisson zèbre). A l'inverse, les cellules *opaque* sont plus adaptées à la colonisation de certaines niches spécifiques, comme la peau (20–22). Un phénotype *gray*, qui représenterait un intermédiaire entre les formes *white* et *opaque*, a récemment été identifié (15,23). Les cellules *gray* sont de petite taille et possèdent une paroi lisse. Comme les cellules *opaque*, elles possèdent un *fitness* supérieur à celui des cellules *white* dans des modèles de colonisation ou d'infection de surfaces épithéliales (peau et langue) (15).

Un phénotype GUT (*gastrointestinally induced transition*) a également été mis en évidence récemment. Morphologiquement, les levures ressemblent à la forme *opaque*, mais possèdent une paroi lisse. Ce phénotype non virulent est associé à la persistance des levures à l'état commensal au sein du tractus gastro-intestinal de l'hôte (15,24,25).

Enfin, en conditions hostiles comme l'hypoxie ou la privation de nutriments, *C. albicans* peut produire des chlamydozoïdes, cellules sphériques caractérisées par la présence d'une paroi épaisse. Ces formes n'ont toutefois jamais été observées *in vivo*.

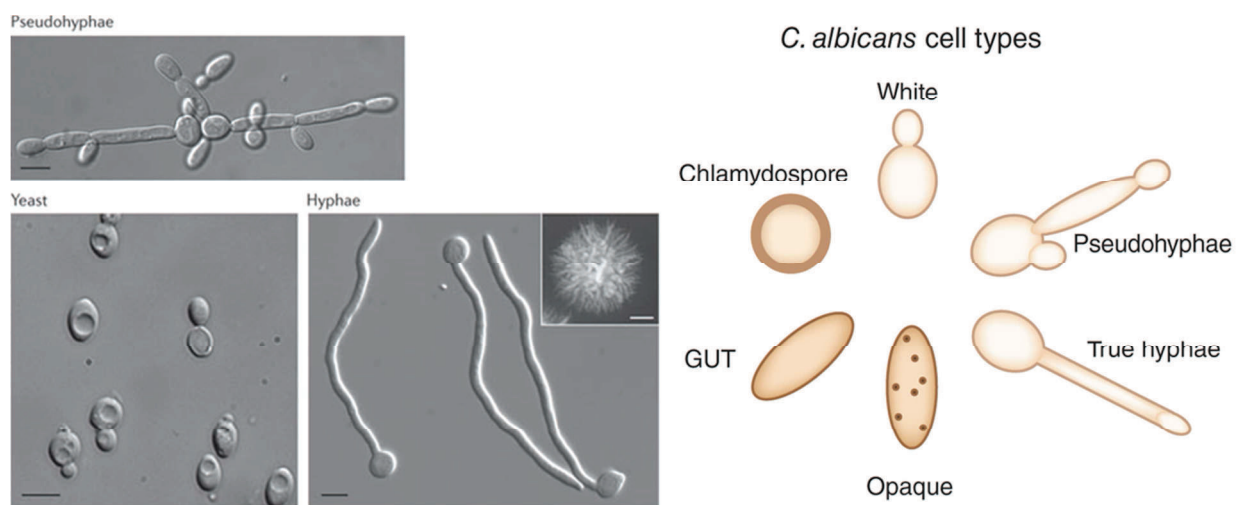


Figure 3 : Morphologie de *C. albicans* (D'après Sudbery, 2011 et Gow, 2013 (17,25))

1.3. *Candida glabrata*

C. glabrata est une levure commensale de la peau et des muqueuses de l'homme, également présente dans l'environnement (végétaux, sol, eau, oiseaux, ...) (26). Il s'agit de l'espèce non-*albicans* la plus fréquemment isolée en Europe et en Amérique du Nord dans les candidoses invasives (9,27,28).

C. glabrata est en réalité un complexe d'espèces regroupant *C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* et *C. bracarensis*. Bien que présentant des caractéristiques phénotypiques proches, des différences importantes existent entre ces trois espèces, en particulier en termes de sensibilité aux antifongiques. *C. nivariensis* est par exemple moins sensible aux antifongiques azolés (fluconazole, itraconazole et voriconazole) que *C. glabrata sensu stricto* (29,30). Par simplicité, *C. glabrata sensu stricto* sera désigné par *C. glabrata* dans ce travail.

1.3.1. Caractéristiques génétiques

Comme vu plus haut, *C. glabrata* est génétiquement plus proche de *S. cerevisiae* que de *C. albicans*. Il s'agit d'une espèce haploïde, dont la séquence complète du génome a été initialement publiée en 2003 (31). Son génome est constitué de 12 338 305 pb réparties en 13 chromosomes (A à M). Au total, 5293 gènes ont été identifiés à ce jour pour cette espèce : seuls 4,25% d'entre eux ont été vérifiés (données *Candida genome database*, souche *C. glabrata* CBS138) (32,33). A noter que 1557 (29,5%) gènes codant pour des protéines chez *C. glabrata* n'ont pas d'orthologues chez *C. albicans* : de même, 2257 (36,3%) gènes de *C. albicans* n'ont pas d'orthologues chez *C. glabrata* (34). Le mode de reproduction de *C. glabrata* est exclusivement asexué.

1.3.2. Caractéristiques morphologiques

C. glabrata présente deux particularités morphologiques par rapport à *C. albicans* : la forme levure est caractérisée par une petite taille, 1-4 µm, et cette espèce ne possède pas de capacité de filamentation. Une forme pseudo-filament a toutefois été décrite dans des conditions de culture particulières : milieu SLAD (*solid nitrogen starvation media*), et, *ex vivo*, après 6 mois de co-incubation en présence de macrophages murins (35,36). Cette forme serait associée à une virulence augmentée (36).

1.4. Pouvoir pathogène/facteurs de pathogénicité de *Candida* spp.

Les levures du genre *Candida* spp. sont des pathogènes opportunistes, capables de passer du commensalisme à la pathogénicité sous l'influence de facteurs liés à l'hôte et aux levures elles-mêmes (19,37,38).

1.4.1. *C. albicans*

De nombreux mécanismes de pathogénicité ont été décrits pour *C. albicans*.

Un des principaux est son polymorphisme, et en particulier le dimorphisme levure-filament. La forme levure de *C. albicans* est impliquée dans la colonisation et la dissémination, tandis que la forme filament est caractérisée par une importante capacité d'invasion. De nombreux facteurs environnementaux influent sur la morphologie de *C. albicans*. La filamentation est notamment induite par la température physiologique (37°C), la présence de sérum, de N-acétylglucosamine ou de CO₂ ainsi qu'une faible concentration en azote. Ces différents signaux entraînent l'activation de la

voie médiée par la protéine kinase A et de son facteur de transcription terminal Efg1 (*enhanced filamentous growth 1*), à l'origine de l'activation de la filamentation. La filamentation est également induite par un pH élevé (>7) via l'activation de la voie Rim et de son facteur de transcription terminal Rim101 (voir plus loin). Le *quorum sensing*, médié majoritairement par le farnésol, le tyrosol et le dodécanol, intervient aussi dans le contrôle de la morphologie, favorisant la croissance sous forme levure en présence d'une densité cellulaire élevée et sous forme filament en présence d'une plus faible densité cellulaire. Le contact avec une surface influence également la morphologie de *C. albicans*. Par exemple, le thigmotropisme, croissance dirigée des filaments suite au contact avec certaines surfaces, est un facteur de virulence de *C. albicans*. De même, la formation de biofilms, constitués de cellules sous forme levure et filament enchâssées dans une matrice extracellulaire, contribue à la pathogénicité de cette espèce. Les cellules en biofilm sont en effet peu accessibles aux mécanismes de défense immunitaires de l'hôte ainsi qu'aux traitements antifongiques, et les levures dispersées à partir des biofilms ont une virulence élevée. D'autres voies de signalisation interviennent dans la régulation de la transition levure-filament chez *C. albicans*, parmi lesquelles la voie des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases Cek1, activée par exemple en réponse à un dommage pariétal ou un stress osmotique et qui agit via le facteur de transcription Cph1, la voie des MAP kinases Hog1 (*high osmolarity glycerol*), activée en réponse à un stress osmotique ou oxydatif, et les voies Ofd1 et Tor1 (Figure 4) (15).

Plusieurs protéines sont également associées à la pathogénicité de *C. albicans*, dont :

- Les adhésines (ex : Als3, Hwp1), protéines responsables de l'adhésion de *C. albicans* à d'autres levures ou microorganismes, aux cellules de l'hôte ou aux surfaces abiotiques.
- Les invasives (ex : Als3, Ssa1), protéines permettant l'invasion des cellules hôtes par endocytose. A noter qu'un autre mécanisme d'invasion est décrit chez *C. albicans*, la pénétration active, qui pourrait être facilitée par les protéines Sap (*Secreted aspartyl proteases*).
- Les hydrolases : protéases (ex : protéines Sap), phospholipases (ex : Plb1 et Plb5) et lipases (ex : Lip8). Ces protéines faciliteraient l'invasion des cellules hôtes par pénétration active, et potentialiseraient l'acquisition des nutriments extracellulaires.

Un grand nombre de ces protéines sont spécifiques de la forme filament.

Enfin, les capacités d'adaptation métabolique (nutriments, métaux, ...) et d'adaptation aux différents stress environnementaux (pH, température, osmolarité, stress oxydatif, ...) sont cruciales pour la pathogénicité de *C. albicans*. Celles-ci sont notamment médiées par des voies de signalisation, parmi lesquelles la voie de signalisation du pH ou voie Rim (voir plus loin) et les voies

des MAP kinases, et par les protéines de choc thermique de la famille HSP (*heat shock protein*) dont Hsp90 (voir plus loin) (39,40).

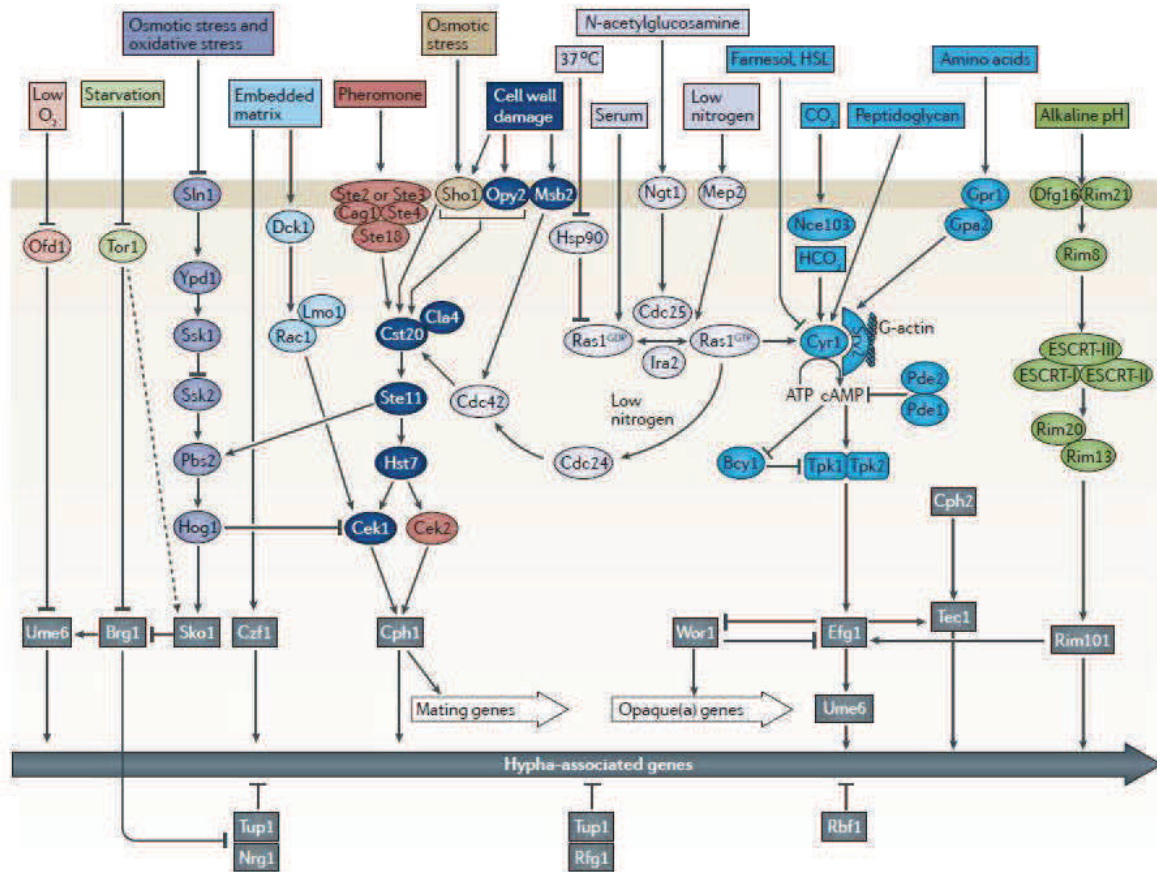


Figure 4 : Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la morphogénèse chez *C. albicans* (d'après Noble, 2017 (15))

1.4.2. *C. glabrata*

Peu de données sont disponibles sur les mécanismes de pathogénicité chez *C. glabrata*. Les mécanismes décrits pour *C. albicans* ne sont pas tous transposables à *C. glabrata*, compte-tenu d'importantes différences entre les deux espèces.

L'adhérence jouerait un rôle important dans la virulence de *C. glabrata* qui possède une capacité d'adhésion supérieure à celle de *S. cerevisiae*, espèce génétiquement proche mais peu pathogène. Vingt-trois adhésines impliquées dans l'adhérence aux cellules épithéliales humaines et dans la formation de biofilms ont été décrites chez *C. glabrata*, dont un groupe majeur : les protéines Epa (*epithelial adhesin*).

C. glabrata possède aussi une grande capacité d'adaptation aux stress environnementaux. De plus, cette espèce est capable de résister à l'absence de nutriments, ce qui lui permet notamment de survivre et de persister à l'intérieur des macrophages, contrairement à *C. albicans*. Enfin, cette espèce est intrinsèquement peu sensible au fluconazole (34).

2. Candidoses invasives

Candida spp. est le premier agent responsable d'infections fongiques invasives dans les pays développés et le second au niveau mondial, derrière *Cryptococcus* spp. Il est à l'origine d'infections superficielles fréquentes et généralement bénignes (atteintes de la peau, des muqueuses ou des phanères), mais également d'infections invasives au pronostic plus sévère. Seules ces dernières seront développées par la suite.

L'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine est *C. albicans*, responsable de 70 à 80% des candidoses superficielles et profondes, et de plus de 50% des candidémies. Cependant, depuis quelques années, la proportion d'infections invasives dues à des espèces non-*albicans* augmente (5,41). Les espèces non-*albicans* les plus fréquentes sont *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*. Les espèces *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr* représentent elles 1 à 5% des isolats issus de candidémies (41). Cette évolution pourrait être liée au changement des pratiques médicales (prescriptions d'antifongiques, gestion des cathéters), au vieillissement de la population, mais également à l'amélioration des techniques diagnostiques d'identification. Ces modifications conduisent également à l'émergence de nouvelles espèces pathogènes, à l'exemple de *C. auris*, dont certains isolats présentent une résistance croisée aux antifongiques azolés, échinocandines et amphotéricine B (42).

2.1. Définition

Le terme « candidoses invasives » regroupe les candidémies (isolement de *Candida* spp. à partir d'hémocultures) et les candidoses systémiques ou candidoses disséminées ou candidoses profondes (isolement ou observation de *Candida* spp. à partir d'un site normalement stérile) : endophtalmies, infections sur cathéter, thrombophlébites, endocardites, arthrites, ostéomyélites, spondylodiscites, méningites, pyélonéphrites, candidoses hépato-spléniques et péritonites.(43) Ces candidoses ont une origine le plus souvent endogène (à partir d'un tissu colonisé), et parfois exogène (cathéter, contacts entre patients ou avec le personnel soignant). Les candidoses profondes peuvent faire suite à une candidémie, diagnostiquée ou non, ou résulter de l'inoculation directe de levures au site de l'infection (cas des candidoses péritonéales après chirurgie digestive).

2.2. Epidémiologie

L'incidence des candidoses invasives a nettement augmenté au cours des trois dernières décennies, en lien avec le progrès médical et l'augmentation du nombre de patients à risque : patients immunodéprimés, patients ayant subi des procédures invasives ou des traumatismes sévères. Cependant, depuis les années 2000, l'augmentation de l'incidence des candidoses est plus faible : une stabilisation, voire une diminution, du nombre de ces infections est même observée dans certaines régions, à l'exemple des Etats-unis (27,41,44,45). Celle-ci s'expliquerait par le développement et le renforcement des mesures d'hygiène et de prévention, ainsi que par l'arrivée de nouveaux antifongiques plus efficaces : triazolés et échinocandines. A ce jour, selon les estimations, 250000 à 750000 candidoses invasives seraient diagnostiquées chaque année dans le monde, responsables de plus de 50000 décès par an (10,46). L'incidence des candidémies est, elle, estimée entre 2 à 14 cas/100000 personnes/an au niveau mondial, et entre 2,5 et 3,6 cas/100000 personnes/an en France (10,19,46–49).

Les infections invasives à *Candida* spp. sont décrites essentiellement dans les pays développés, probablement en raison des facteurs de risque liés au progrès médical. La disponibilité des moyens diagnostiques et de surveillance explique également en partie cette répartition inégale. Ces infections sont considérées comme des *healthcare-associated diseases*, autrement dit des pathologies liées aux soins (50). D'après l'étude SCOPE, les levures du genre *Candida* spp. représenteraient le 4^{ème} agent responsable de septicémies nosocomiales en réanimation (51). D'autres études suggèrent que *Candida* spp. se situerait plutôt entre le 7^{ème} et le 10^{ème} agent le plus fréquemment responsable de septicémies dans la population générale (46).

Les candidoses invasives peuvent survenir à tout âge, mais sont plus fréquentes chez les enfants et les sujets âgés. L'incidence de ces pathologies serait également supérieure chez les hommes, probablement en raison de facteurs favorisants plus fréquents (voir plus loin), parmi lesquels hémopathies et traumatismes sévères (41).

C. albicans, *C. glabrata* et *C. parapsilosis* sont les principales espèces responsables de candidoses invasives, représentant à elles trois 80 à 90% des souches isolées chez les patients non neutropéniques (9,28). La distribution des espèces varie selon la géographie. L'étude SENTRY a mis en évidence une proportion nettement plus importante de *C. glabrata* dans les candidémies en Europe (15,7%) ou en Amérique du Nord (23,5%) par rapport à l'Amérique latine (5,2%), alors que l'inverse était observé pour *C. parapsilosis* (13,7% et 17,1% contre 25,6% respectivement) (52). Cette dernière espèce est également plus fréquemment isolée que *C. glabrata* en Asie ainsi que dans le

Sud de l'Europe (46). Certains facteurs liés à l'hôte influencent également la fréquence des espèces (pathologie sous-jacente, âge, présence éventuelle de cathéter). L'espèce *C. albicans* prédomine en réanimation et en chirurgie, tandis qu'en onco-hématologie, les espèces non-*albicans*, notamment *C. glabrata*, *C. krusei* et *C. tropicalis*, sont plus fréquemment isolées (41,53). Les infections invasives à *C. glabrata* sont plus fréquentes chez les adultes et sujets âgés, alors que *C. parapsilosis* est souvent retrouvé chez les nouveaux-nés et enfants de moins de deux ans (54,55). Cette espèce est également fréquemment isolée dans les candidémies sur cathéter, en raison de sa capacité accrue à former des biofilms et à se développer sur ces matériaux (5,41).

Les infections fongiques invasives dues à *Candida* spp. sont associées à des taux de mortalité élevés, supérieurs à ceux observés dans les infections bactériennes ou virales : mortalité globale de 42% et mortalité attribuable de 27% (10). Aucune amélioration significative du pronostic n'a été mise en évidence ces dernières années, malgré l'apparition de nouveaux antifongiques et le développement de recommandations sur la prise en charge des candidoses invasives (41). Leur diagnostic difficile et souvent tardif, lié à des signes peu spécifiques et à un manque de sensibilité des techniques diagnostiques, explique en partie ce sombre pronostic (56). L'absence ou le retard de traitement antifongique sont significativement associés à la mortalité (41,57). La mortalité globale varie également selon la population et l'espèce isolée. Elle est supérieure chez les patients de réanimation, de l'ordre de 46 à 47% (études AmarCand et SCOPE) et les sujets âgés (28,51,58,59). Le taux de mortalité des candidoses invasives à *C. parapsilosis* (23 à 36,6%) est plus faible que celui observé avec les autres espèces, notamment *C. albicans* et *C. glabrata* (5,41,46)

2.3. Facteurs de risque

De nombreux paramètres ont été identifiés comme facteurs de risque d'infections invasives à *Candida* spp. Certains sont liés au patient : âge extrême, diabète, insuffisance rénale, immunodépression, neutropénie, pathologie sous-jacente (hémopathie, tumeur solide, pancréatite aiguë, déficit immunitaire), et colonisation (multi-sites) par *Candida* spp. Les candidoses invasives se développent en effet le plus souvent suite au passage systémique et à la dissémination de souches jusqu'alors responsables d'une colonisation (43). Certaines procédures liées aux soins sont également des facteurs prédisposants : présence de cathéter ou de matériel invasif, nutrition parentérale, ventilation mécanique, hémodialyse, chirurgie abdominale (en particulier si lâchage d'anastomose ou laparotomies multiples), transplantation d'organe solide, hospitalisation en service de réanimation (notamment réanimation médicale et réanimation néonatale) et durée du séjour. Enfin, certains traitements favorisent aussi le développement de candidoses invasives :

antibiothérapie large spectre, corticothérapie, chimiothérapie anticancéreuse, immunosuppresseurs et antagonistes des récepteurs à l'histamine de type 2 (41,46,53,58,60–62).

3. Antifongiques

3.1. Antifongiques azolés

Seuls les antifongiques systémiques utilisés dans le traitement des candidoses invasives seront abordés dans cette partie.

3.1.1. Molécules

Les antifongiques azolés peuvent être divisés en deux classes en fonction du nombre d'atomes d'azote sur le noyau azole : les imidazolés (noyau imidazole : deux atomes d'azote) et les triazolés (noyau triazole : trois atomes d'azote) (Figure 5). Le remplacement du noyau imidazole par un noyau triazole a permis d'améliorer la spécificité de liaison des antifongiques azolés à leur cible, la lanostérol 14 α -déméthylase (voir plus loin). De ce fait, les triazolés possèdent une activité antifongique plus importante, une toxicité moindre et des interactions médicamenteuses moins nombreuses que les imidazolés, qui ne sont donc plus utilisés pour le traitement et la prévention des candidoses invasives.

Cinq triazolés sont actuellement disponibles pour le traitement des infections fongiques systémiques: le fluconazole (TRIFLUCAN[®], Pfizer), l'itraconazole (SPORANOX[®], Janssen-Cilag), le voriconazole (VFEND[®], Pfizer), le posaconazole (NOXAFIL[®], MSD) et depuis peu, l'isavuconazole (CRESEMBA[®], Basilea Pharmaceutica). Une autre molécule est en cours d'évaluation : l'albaconazole (en essai de phase II, Actavis) (56,63).

Le fluconazole et l'itraconazole sont des antifongiques triazolés de 1^{ère} génération, actifs sur la plupart des espèces pathogènes du genre *Candida* spp. Les espèces *C. krusei* et *C. glabrata* sont respectivement intrinsèquement résistantes et intrinsèquement peu sensibles au fluconazole. Parmi ces deux antifongiques, seul le fluconazole est aujourd'hui utilisé pour le traitement des candidoses invasives (voir plus haut). Il présente des propriétés pharmacocinétiques intéressantes : bonne biodisponibilité par voie orale (composé hydrosoluble), peu de variabilité inter- et intra-individuelle d'absorption, élimination urinaire sous forme inchangée, bonne diffusion intra-tissulaire et notamment au niveau du système nerveux central.

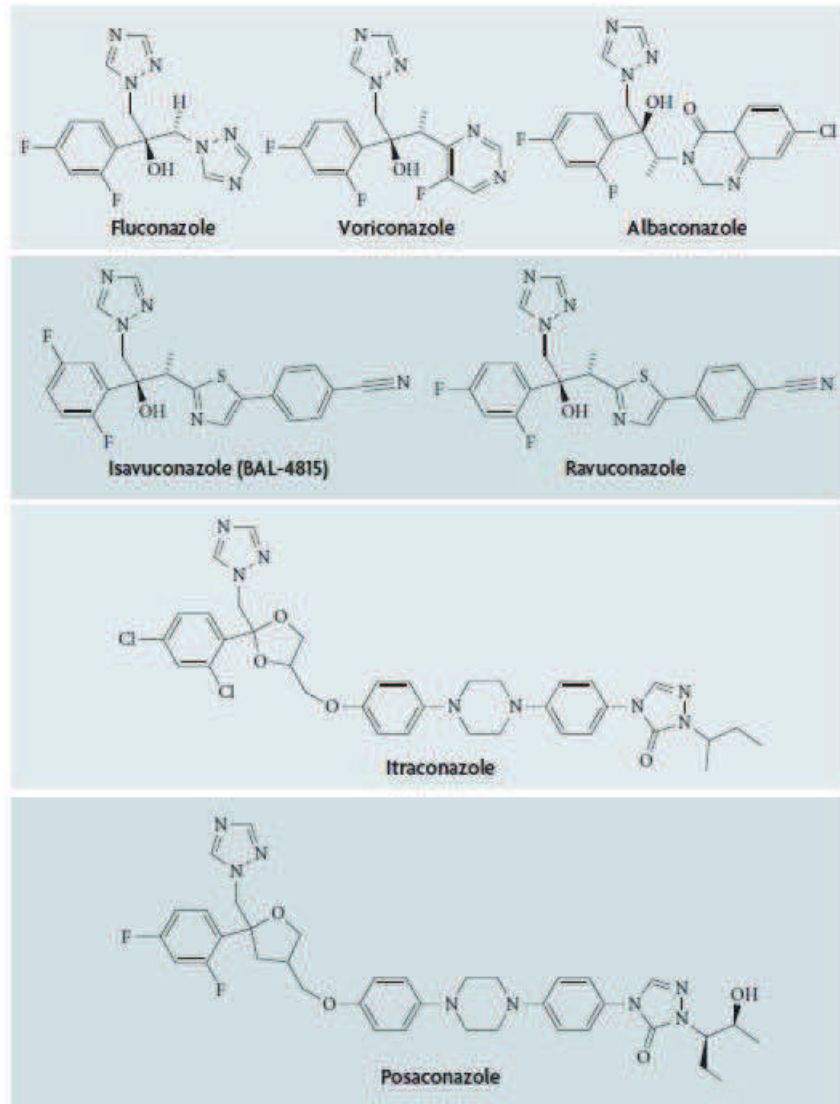


Figure 5 : Structure des antifongiques triazolés (d'après Ostrosky-Zeichner, 2010 (64))

Le voriconazole et le posaconazole sont des antifongiques triazolés de deuxième génération : ils dérivent respectivement du fluconazole et de l'itraconazole. Le remplacement d'un atome d'hydrogène par un groupement méthyl est à l'origine de l'activité du voriconazole sur *Aspergillus* spp. et d'autres champignons filamenteux comme *Fusarium* spp. et *Scedosporium* spp. (Figure 4). Ces triazolés de deuxième génération possèdent un spectre d'activité élargi et une efficacité comparable ou supérieure sur *Candida* spp. et *Aspergillus* spp. par rapport au fluconazole et à l'itraconazole. En revanche, ils entraînent plus d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses que le fluconazole (65,66).

Le dernier antifongique triazolé commercialisé, l'isavuconazole, possède une structure dérivée du fluconazole. Il est commercialisé sous forme d'une prodrogue hydrosoluble, le sulfate d'isavuconazonium, métabolisé en forme active, l'isavuconazole, par des estérases plasmatiques ou

intestinales après administration parentérale ou orale. Ce composé est actif sur les levures du genre *Candida* spp., avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) plus élevées pour *C. glabrata*, *C. krusei* et *C. guilliermondii* (67,68). Cependant, la non-infériorité de l'isavuconazole par voie intraveineuse par rapport à la caspofungine n'a pas pu être démontrée dans l'étude pré-clinique ACTIVE, étude de phase III visant à évaluer l'efficacité et la tolérance de cet antifongique dans le traitement des candidémies et candidoses invasives chez l'adulte (données non publiées). Son activité *in vitro* sur *Aspergillus* spp. et les zygomycètes, ainsi que les résultats des études cliniques, justifient son indication dans le traitement des aspergilloses et des mucormycoses (69,70).

3.1.2. Mécanisme d'action

Les antifongiques azolés agissent par liaison et inhibition de la lanostérol 14 α -déméthylase : Erg11 ou CYP51, enzyme responsable de la conversion du lanostérol en ergostérol, composé indispensable de la membrane des cellules fongiques (Figure 5). Il en résulte une altération membranaire, ainsi qu'une accumulation de stérols méthylés toxiques pour la cellule fongique parmi lesquels le 14 α -méthylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol.

Ils inhiberaient également un autre cytochrome P450 impliqué dans la biosynthèse de l'ergostérol : Erg5. Toutefois, il s'agirait d'une cible mineure puisque située en aval de Erg11 dans cette voie biosynthétique (Figure 6) (71).

Ces antifongiques sont fongostatiques sur *Candida* spp. : ils permettent d'inhiber la croissance des levures, sans les supprimer.

La cible des antifongiques azolés est une protéine de la famille des cytochromes P450, possédant une certaine similarité avec des cytochromes P450 humains. Ceci explique certains effets indésirables de ces antifongiques, comme l'hépatotoxicité, et leurs nombreuses interactions médicamenteuses.

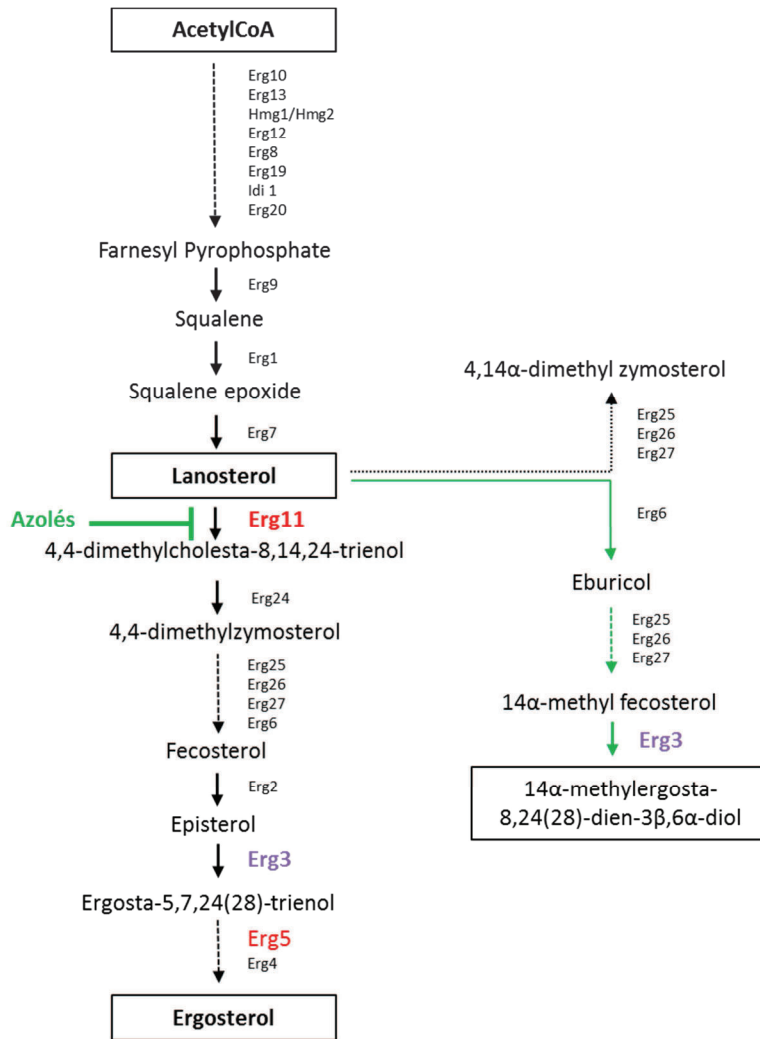


Figure 6 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol et mécanisme d'action des antifongiques azolés (adapté de Hull, 2012 (72))

3.2. Echinocandines

3.2.1. Molécules

Trois molécules sont commercialisées et indiquées dans le traitement des candidoses invasives : la caspofungine (CANCIDAS®, MSD), l'anidulafungine (ECALTA®, Pfizer) et la micafungine (MYCAMINE®, Astellas).

3.2.2. Mécanisme d'action

Les échinocandines sont les seuls antifongiques ciblant la synthèse de la paroi fongique, structure polysaccharidique indispensable à la croissance et à la survie des champignons. Ces lipopeptides cycliques agissent par inhibition non compétitive de la β -1,3-glucane synthase, entraînant une altération de la paroi fongique par diminution de la synthèse d'un de ses constituants majeurs : les β -1,3-glucanes. La β -1,3-glucane synthase est un complexe enzymatique membranaire composé d'au moins deux sous-unités : une sous-unité régulatrice Rho, et une sous-unité catalytique Fks, dont il existe plusieurs isoformes : Fks1, Fks2, voire Fks3 selon les espèces. La sous-unité régulatrice Rho est une GTPase, qui régule également la protéine kinase C (PKC). La sous-unité catalytique Fks est responsable de la synthèse de chaînes linéaires de β -1,3-glucanes à partir d'UDP-glucose (73). Chez *C. albicans*, l'activité β -1,3-glucane synthase est majoritairement attribuée à Fks1, tandis que chez *C. glabrata*, les deux isoformes Fks1 et Fks2 sont exprimées (74). L'inhibition de la synthèse des β -1,3-glucanes par les échinocandines est majoritairement due à l'inhibition des sous-unités Fks (75). Toutefois, le mécanisme d'interaction précis entre les échinocandines et la β -1,3-glucane synthase reste inconnu.

Les échinocandines ont une activité dite fongicide et concentration-dépendante sur la majorité des espèces de *Candida* (dont *C. albicans* et *C. glabrata*). En revanche, les CMI de ces antifongiques vis-à-vis des espèces *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* sont élevées.

3.3. Autres antifongiques

D'autres antifongiques sont utilisés dans le traitement des candidoses invasives (voir plus loin) : les polyènes (amphotéricine B) et les pyrimidines (5-fluorocytosine).

L'amphotéricine B est un antifongique fongicide, agissant par liaison à l'ergostérol et formation de pores membranaires, à l'origine d'une fuite ionique. Ce mécanisme d'action est aujourd'hui remis en cause et il semblerait que l'amphotéricine B agisse plutôt par formation d'agrégats extra-membranaires agissant comme des éponges capables d'extraire l'ergostérol des bicouches lipidiques (76).

La 5-fluorocytosine est un analogue pyrimidique agissant, après métabolisation en 5-fluorouracil, par inhibition de la synthèse des acides nucléiques.

3.4. Traitement et prophylaxie des candidoses invasives

Comme vu plus haut, les infections invasives à *Candida* spp. sont associées à une mortalité élevée. Ce pronostic peut être amélioré par l'instauration précoce d'un traitement antifongique adapté (77–79). Ce constat, ainsi que la commercialisation de nouveaux antifongiques plus efficaces et relativement bien tolérés, antifongiques triazolés et échinocandines, a conduit à l'utilisation massive de ces molécules dans la prévention et le traitement des candidoses invasives ces deux dernières décennies. Toutefois, en raison du coût élevé de ces traitements, de l'émergence de souches résistantes sous pression antifongique (voir plus loin) et d'un bénéfice clinique non démontré, des mesures de rationalisation de l'utilisation de ces molécules ont été mises en place.

Différentes stratégies thérapeutiques ont été établies pour la prise en charge des candidoses invasives : traitement prophylactique, préemptif, empirique ou ciblé. Ces stratégies, présentées dans la Figure 7, sont définies en fonction du niveau de preuve microbiologique et de la probabilité clinique de l'infection à *Candida* spp., et visent à limiter le nombre de patients recevant des molécules antifongiques. Elles sont notamment largement utilisées en hématologie et réanimation, leurs définitions pouvant différer légèrement selon le type de patient. Le traitement ciblé s'adresse à des patients pour lesquels une infection invasive à *Candida* spp. a été diagnostiquée avec certitude. Cependant, du fait des difficultés diagnostiques de ces infections, ce type de traitement reste minoritaire en pratique clinique, et la plupart des traitements antifongiques consistent en réalité en des traitements prophylactiques, préemptifs ou empiriques, chez des patients à risque. Le traitement prophylactique peut être proposé chez des patients à haut risque de développer une candidose invasive, en l'absence de documentation microbiologique ou clinique d'infection. La prophylaxie antifongique a démontré son intérêt en hématologie : elle est associée à une diminution de l'incidence des infections invasives à *Candida* spp. quelle que soit la molécule utilisée : fluconazole, voriconazole ou micafungine. Cependant, malgré un traitement prophylactique, le risque de développer une infection fongique invasive reste non négligeable chez ces patients, de l'ordre de 5% (80,81). Les traitements préemptifs ou empiriques s'adressent à des patients présentant des facteurs de risques de candidose invasive, ainsi que des signes cliniques et biologiques possiblement compatibles avec une infection invasive à *Candida* spp., comme par exemple une colonisation candidosique importante. Toutefois, une étude récente réalisée chez des patients non neutropéniques en réanimation et visant à évaluer l'impact d'un traitement préemptif ou empirique par micafungine sur la mortalité sans infection fongique à J28, n'a pas retrouvé de bénéfice de ce type de traitement par rapport au placebo (82).

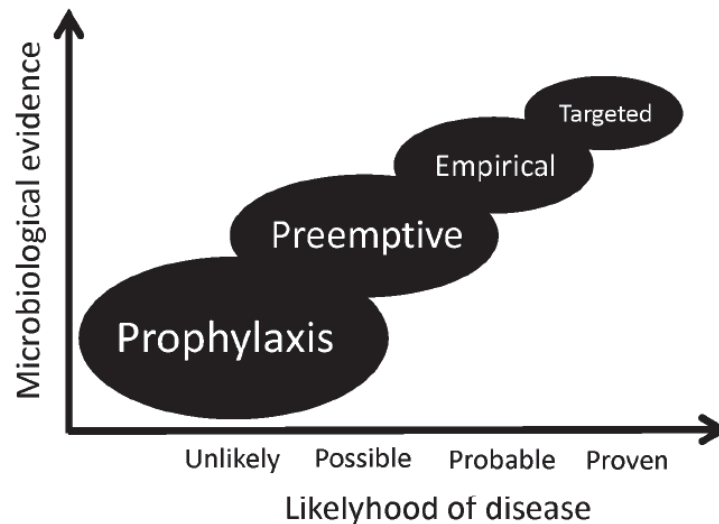


Figure 7 : Définition des traitements prophylactiques, préemptifs, empiriques et ciblés en réanimation (d'après Eggimann, 2011 (78))

Différents schémas thérapeutiques ont également été établis pour la prise en charge des candidoses invasives, en fonction du terrain, du type de traitement et du type de candidose invasive. Sont présentées ci-après, à titre d'exemple, les recommandations établies par l'IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) et l'ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) pour la prise en charge des candidémies et la prophylaxie des infections fongiques à *Candida* spp. chez le patient adulte, par classe d'antifongiques (83–85).

En raison de leur activité fongicide sur *Candida* spp, et de leurs propriétés pharmacocinétiques et profil d'effets indésirables favorables, les échinocandines sont recommandées en 1^{ère} intention pour le traitement des candidémies par ces deux sociétés (83–85). L'ESCMID recommande également la micafungine en prophylaxie des infections à *Candida* spp. chez les patients ayant bénéficié d'une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) (84). Chez les patients de réanimation, les échinocandines peuvent également être utilisées en prophylaxie, mais avec un faible niveau de preuve (83,85).

Les antifongiques azolés, et en particulier le fluconazole, ont également une place importante dans la prévention et le traitement des candidoses invasives chez l'adulte. L'IDSA recommande le fluconazole en traitement de 1^{ère} intention, en alternative aux échinocandines, chez les patients non-neutropéniques, non critiques et pour lesquels l'isolement d'une espèce résistante au fluconazole est peu probable, ainsi que chez les patients neutropéniques, non critiques, n'ayant pas d'antécédent de traitement par antifongiques azolés. Elle préconise également un relais échinocandines-fluconazole après 5 à 7 jours de traitement chez les patients non-neutropéniques en présence d'une souche sensible au fluconazole. Du fait de la moindre sensibilité au fluconazole de *C. glabrata*, ce relais peut être effectué par le voriconazole pour cette espèce. Le voriconazole peut également être utilisé dans

le traitement des candidoses invasives chez le patient non neutropénique, mais sans supériorité au fluconazole. Il peut toutefois présenter un intérêt chez les patients neutropéniques si une couverture des champignons filamenteux est également souhaitée (85). Les recommandations de l'ESCMID concernant les antifongiques azolés diffèrent de celles de l'IDSA : le fluconazole n'est pas recommandé dans le traitement des candidoses invasives chez le patient non neutropénique. Un relais par fluconazole est toutefois préconisé après 10 jours de traitement par échinocandines pour des patients stables et en présence d'une souche sensible à cet antifongique. Concernant la prophylaxie des candidoses invasives, le fluconazole est recommandé chez les patients de réanimation à haut risque d'infection à *Candida* spp. Tous les azolés peuvent être utilisés en prophylaxie chez les patients ayant bénéficié d'une HSCT (83,84).

Enfin, en plus des échinocandines et des antifongiques azolés, l'amphotéricine B liposomale est recommandée par l'IDSA en 1^{ère} intention pour le traitement des candidoses invasives chez les patients neutropéniques (85). Du fait d'effets indésirables plus fréquents qu'avec les échinocandines, l'ESCMID ne recommande l'amphotéricine B liposomale qu'en traitement de 2^{ème} intention chez les patients avec une pathologie hématologique ou ayant bénéficié d'une HSCT. L'amphotéricine B liposomale peut également être utilisée en prévention des infections à *Candida* spp chez ces patients (84).

Du fait de la capacité de *Candida* spp. à coloniser les matériaux inertes, la prise en charge des candidémies doit également associer au traitement antifongique le retrait des éventuels cathéters lorsque celui-ci est possible (83,85).

4. Résistance aux antifongiques

Seules les résistances aux antifongiques azolés et aux échinocandines seront abordées dans ce travail. En effet, très peu de mécanismes de résistance aux polyènes ont été décrits à ce jour (voir article de revue, Partie 3 1.2) et l'impact clinique de ces résistances reste limité (65,86). Les résistances aux pyrimidines sont, elles, fréquentes (voir article de revue, Partie 3 1.2), ce qui conduit à utiliser ces molécules dans le traitement des candidoses invasives uniquement en association avec un antifongique azolé, une échinocandine ou l'amphotéricine B. De plus, leur utilisation est réservée à de rares situations cliniques en raison d'une mauvaise tolérance, notamment sur le plan hématologique (65,87).

La résistance microbiologique aux antifongiques peut être définie comme une augmentation de la CMI d'un antifongique vis-à-vis d'un organisme donné, indépendamment de sa capacité à survivre

à des concentrations supérieures à la CMI (Figure 9) (88). Elle est médiée par des anomalies génétiques (mutations, aneuploïdie).

4.1. Mécanismes de résistance aux antifongiques azolés

Plusieurs mécanismes de résistance aux antifongiques azolés peuvent coexister au sein d'un même isolat chez *Candida* spp. (Figure 8) (89). Les principaux sont : diminution de la concentration intracellulaire en antifongique, modification ou surproduction de la cible, contournement (*by-pass*) métabolique et instabilité génétique.

4.1.1. Diminution de la concentration intracellulaire en antifongique

Le mécanisme majeur de résistance aux antifongiques azolés chez *Candida* spp. est la diminution de la concentration intracellulaire en antifongique, par surproduction des transporteurs de la superfamille ABC (*ATP-binding cassette*) et, dans une moindre proportion, des transporteurs de la superfamille MFS (*Major Facilitator Superfamily*).

Le niveau d'expression des gènes des transporteurs de la superfamille ABC Cdr1 (*Candida* Drug Resistance) et Cdr2 chez *C. albicans*, et CgCdr1, Pdh1 (CgCdr2) et CgSnq2 chez *C. glabrata*, est régulé respectivement par les facteurs de transcription Tac1 (Transcriptional Activator of *CDR* genes - *C. albicans*) et CgPdr1 (*C. glabrata*) (65,71) (Tableau 1). Ces facteurs de transcription appartiennent à la famille des *zinc cluster proteins*, caractérisée par la présence d'un motif de liaison à l'ADN conservé de type Zn₂Cys₆.

Des mutations gain de fonction (*gain of function* (GOF)) ont été décrites au sein des gènes *TAC1* et *CgPDR1*. Elles sont responsables d'une surexpression de (*Cg*)*CDR1*, *CDR2*, *PDH1* et, dans une moindre mesure de *CgSNQ2*, qui entraîne une résistance croisée aux différents antifongiques azolés (71,90–92). Le gène *CgPDR1* est également capable d'auto-régulation.

Une vingtaine de mutations GOF ont déjà été décrites au sein de *TAC1*. La plupart de ces mutations sont localisées au niveau de l'extrémité C-terminale du facteur de transcription, au niveau du putatif domaine activateur de la transcription. Les mutations GOF de *TAC1* n'ont pas d'effet significatif sur la virulence ou le *fitness* de *C. albicans* (71,90,93,94). Deux autres facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation du niveau d'expression de *CDR1* chez *C. albicans*, mais dans une moindre mesure que Tac1 : Ndt80 et Mrr2. Des mutations de *MRR2*, associées à une surexpression de *CDR1* et une augmentation de la résistance au fluconazole, ont été récemment identifiées au sein d'isolats cliniques : le facteur de transcription Mrr2 serait donc également impliqué dans la résistance aux antifongiques azolés pour cette espèce (95).

Chez *C. glabrata*, les mutations GOF du gène *CgPDR1* sont plus nombreuses, et peuvent être regroupées au sein de trois régions prédominantes ou régions *hot spot*. Ces mutations n'entraînent pas toutes une surexpression coordonnée des gènes *CgCDR1*, *PDH1* et *CgSNQ2*. La plupart des mutations GOF de *CgPDR1* induisent des variations du niveau d'expression de *CgCDR1* et *PDH1* plus importantes que pour *CgSNQ2*. A l'inverse, la substitution P822L de *CgPdr1* entraîne une surexpression de *CgSNQ2*, mais n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de *CgCDR1* et *PDH1* (71,92). Contrairement aux mutations GOF de *TAC1* chez *C. albicans*, les mutations GOF du gène *CgPDR1* sont associées à un *fitness* et une virulence augmentés (92).

Les protéines CgMed15 (CgGal11) et CgMed2 du complexe Médiateur de la RNA polymérase II (co-activateur de la transcription de différents gènes régulés par des protéines, assurant la liaison entre ces protéines régulatrices et la RNA polymérase II), sont indispensables à l'activation et la surexpression de *CgPDR1* et *CgCDR1* induite par les antifongiques azolés et diverses mutations GOF de *CgPDR1* (96,97). La protéine CgMed15 se lie à CgPdr1 via le domaine KIX, et l'inhibition pharmacologique de KIX est associée à une diminution de la résistance aux azolés *in vitro* et *in vivo* (96,98). Le mécanisme exact de l'implication de CgMed2 dans la résistance aux antifongiques reste lui à élucider.

Chez *C. albicans*, la surexpression du gène codant pour le transporteur Mdr1 (MultiDrug Resistance 1) de la superfamille MFS est associée à une résistance au fluconazole, voire au voriconazole (NB: les autres antifongiques triazolés ne seraient pas des substrats des transporteurs MFS) (99,100). Le niveau d'expression de ce transporteur est régulé par le gène codant pour le facteur de transcription Mrr1, pour lequel une quinzaine de mutations GOF ont été caractérisées à ce jour (65,71,101). Ces mutations n'ont pas d'effet significatif sur le *fitness* ou la virulence de *C. albicans* (94). Chez *C. glabrata*, un homologue de MDR1, CgFLR1, est contrôlé par le facteur de transcription Yap1. Cependant, l'implication de ces gènes dans la résistance de *C. glabrata* aux antifongiques azolés n'a pas été démontrée (71).

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés par efflux

Type de transporteur	Antifongiques concernés	Espèce	Facteur de transcription	Gènes régulés
Superfamille ABC	Antifongiques triazolés	CA	<i>TAC1</i> <i>MRR2</i>	<i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> <i>CDR1</i>
		CG	<i>CgPDR1</i>	<i>CgCDR1</i> , <i>PDH1</i> , <i>SNQ2</i>
Superfamille MFS	Fluconazole, voriconazole	CA	<i>MRR1</i>	<i>MDR1</i>
		CG	<i>YAP1</i> *	<i>CgFLR1</i> *

CA : *C. albicans*, CG : *C. glabrata*; *Implication dans la résistance aux antifongiques azolés non démontrée

4.1.2. Modification de la cible

Des mutations du gène *ERG11*, codant pour l'enzyme cible des azolés, la lanostérol 14 α -déméthylase, sont également à l'origine de résistance aux azolés chez *Candida* spp. Plus d'une centaine de SNP ont été décrits au sein du gène *ERG11* chez *C. albicans*. La plupart de ces mutations sont localisées au sein de trois régions *hot spot* : acides aminés 105-165, 266-287 et 405-488. Toutefois, l'implication de ces mutations dans la résistance aux azolés n'a été démontrée que pour un faible nombre d'entre elles. En effet, la contribution individuelle de chaque mutation à la résistance est difficile à évaluer, car d'une part plusieurs mutations sont souvent associées au sein d'un même allèle, et d'autre part différents mécanismes de résistance sont souvent combinés chez *C. albicans* (71,102,103).

Chez *C. glabrata*, des mutations de *CgERG11* ont été décrites, mais aucune n'a été associée à la résistance aux antifongiques azolés à ce jour (104,105).

4.1.3. Surproduction de la cible

Le niveau d'expression du gène *ERG11* est régulé par le facteur de transcription Upc2 chez *C. albicans*. Une dizaine de mutations GOF de *UPC2* induisant une surexpression de *ERG11* et une diminution de la sensibilité de *C. albicans* au fluconazole ont été décrites à ce jour (71,106). Cependant, la surexpression de *ERG11* reste faible (d'un facteur 3 à 5) et ne semble avoir qu'un effet modeste dans la résistance aux azolés (71,107).

Chez *C. glabrata*, deux homologues du gène *UPC2* ont été décrits : *UPC2A* et *UPC2B* (108). *UPC2A* est impliqué dans la régulation de la biosynthèse de l'ergostérol. La disruption de ce gène dans des isolats cliniques sensibles dose-dépendant ou résistants aux azolés est associée à une diminution des CMI des azolés, dont le fluconazole et le voriconazole (109). A ce jour, aucune mutation GOF de *UPC2A* n'a été décrite pour cette espèce.

4.1.4. Contournement métabolique

Des mutations au sein du gène *ERG3*, codant pour la stérol $\Delta^{5,6}$ -désaturase, autre enzyme de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Figure 6), ont également été associées à une résistance croisée aux différents antifongiques azolés chez *C. albicans*. Ces mutations permettent de protéger la cellule fongique par accumulation de 14 α -méthylfecostérol (dérivé non toxique dont la biosynthèse fait intervenir Erg3p), au lieu du produit toxique 14 α -méthylergosta-8,24-dien-3 β ,6 α -diol résultant de l'inhibition de Erg11 par les antifongiques azolés (Figure 6) (110).

4.1.5. Instabilité génétique

4.1.5.1. Altérations chromosomiques

Les pertes d'hétérozygotie (*loss-of-heterozygoty*, LOH) sont relativement fréquentes chez *C. albicans*, et liées à des recombinaisons mitotiques et/ou à des conversions géniques. Les LOH les plus fréquemment observées au sein d'isolats résistants aux antifongiques azolés sont localisées au niveau du bras droit du chromosome 3 (qui comprend notamment les gènes *CDR1*, *CDR2* et *MRR1*) et du bras gauche du chromosome 5 (qui comprend notamment les gènes *ERG11* et *TAC1*). Par ce mécanisme, les mutations GOF des gènes des facteurs de transcription impliquées dans la résistance aux antifongiques peuvent s'exprimer complètement, et non plus à l'état de codominance. Il en est de même pour les mutations de *ERG11*. Les LOH entraînent donc une surexpression des gènes codant pour la cible ou des transporteurs impliqués dans l'efflux des antifongiques azolés, et participent ainsi au développement de la résistance (71,89,111).

D'autres altérations chromosomiques peuvent entraîner une augmentation du nombre de copies des gènes impliqués dans la résistance aux azolés chez *C. albicans* et *C. glabrata* :

- Formation d'isochromosome :

La formation d'un isochromosome i5L chez *C. albicans* (correspondant au bras gauche du chromosome 5) permet d'augmenter le nombre de copies des deux gènes *TAC1* et *ERG11*, et est associée à un haut niveau de résistance aux antifongiques azolés (71,89).

- Formation de mini-chromosome :

Une formation *de novo* de mini-chromosome par duplication de segments chromosomiques a été mise en évidence pour des isolats de *C. glabrata* résistants aux azolés. Dans un cas, le mini-chromosome incluait le gène *CgCDR2*, suggérant que cette espèce serait capable de s'adapter à la pression antifongique par plasticité chromosomique (71,112).

4.1.5.2. Altération des mécanismes de réparation de l'ADN

Le gène *MSH2* intervient dans la réparation des *mismatch* de l'ADN chez *C. glabrata*. Des mutations ou la disruption de ce gène entraînent un phénotype hyper-mutable, facilitant l'émergence de mutants résistants aux antifongiques azolés, aux échinocandines, ainsi qu'à l'amphotéricine B *in vitro*. De même, la colonisation par une souche disruptée pour le gène *MSH2* est associée à une augmentation de l'émergence de résistances dans un modèle murin de colonisation digestive.

Une étude récente a mis en évidence une prévalence élevée (55%) de mutations du gène *MSH2* lors de l'analyse d'isolats cliniques sensibles ou résistants aux antifongiques azolés et/ou aux échinocandines : cette prévalence était supérieure pour les isolats résistants au fluconazole (65%) et les isolats multi-résistants (fluconazole et échinocandines) (62%) (113). Ces mutations pourraient être générées ou sélectionnées sous pression antifongique ou par d'autres thérapeutiques : elles entraînent un défaut de réparation des *mismatch* de l'ADN, favorisant l'émergence de mutations de résistance aux antifongiques. La proportion de mutations du gène *MSH2* paraît toutefois être inférieure dans des cohortes avec une prévalence de résistance aux antifongiques plus faible (114). Ce mécanisme de résistance aux antifongiques pourrait être limité à *C. glabrata*, et expliquer la plus grande fréquence de souches résistantes aux antifongiques pour cette espèce. En effet, contrairement à *C. albicans* et à la plupart des espèces pathogènes du genre *Candida*, *C. glabrata* possède un génome haploïde pour lequel une mutation unique est suffisante pour entraîner une anomalie de réparation de l'ADN (113).

4.1.6. Dysfonction mitochondriale

Des pertes totales ou partielles du génome mitochondrial peuvent survenir chez *C. glabrata*, à l'origine d'un défaut de croissance des levures en milieu glucosé ou phénotype *petite*. Ce phénotype peut notamment être induit *in vitro* et *in vivo* par une pré-exposition au fluconazole. La perte de la fonction mitochondriale est associée à l'acquisition de résistance aux antifongiques azolés, par surexpression du gène *CgPDR1* et des gènes des transporteurs ABC *CgCdr1* et *Pdh1*, indépendamment de la présence de mutations GOF de *CgPDR1*. Elle entraîne également une augmentation du *fitness* et de la virulence des mutants *petite*.

Chez *C. albicans*, la dysfonction mitochondriale est le plus souvent létale (115–118).

4.2. Mécanismes de résistance aux échinocandines

Le principal mécanisme de résistance de *Candida* spp. aux échinocandines est l'altération de l'enzyme cible : la β -1,3-glucane synthase (Figure 8).

Diverses mutations de *FKS1* associées à la résistance aux échinocandines ont été décrites chez *C. albicans*. Elles se répartissent au sein de deux régions *hot spot* définies par les séquences d'acides aminés de la protéine : HS1 (acides aminés 641-649) et HS2 (acides aminés 1345-1365) (75). Il s'agit de mutations dominantes, homo- ou hétérozygotes, conférant une résistance à l'ensemble des échinocandines (119). Les substitutions des sérines en position 641 et 645 sont les modifications les plus fréquentes, et entraînent le phénotype de résistance le plus sévère (71,120).

Chez *C. glabrata*, des mutations conférant une sensibilité diminuée ou une résistance aux échinocandines ont été identifiées au sein des régions *hot spot* de *FKS1* et de *FKS2*. Dans la plupart des cas, ces mutations entraînent une augmentation des CMI plus importante pour la caspofungine que pour les deux autres molécules, anidulafungine et micafungine (121). Les substitutions de la sérine en position 629 (Fks1p), de la phénylalanine en position 659 (Fks2p) et de la sérine en position 663 (Fks2p) sont les plus fréquentes (120,122). Ces mutations peuvent être induites par des altérations des mécanismes de réparation de l'ADN chez *C. glabrata* (voir plus haut) (113).

L'analyse par *whole-genome-sequencing* d'isolats cliniques séquentiels de *C. glabrata* évoluant vers la résistance aux échinocandines a permis de mettre en évidence que la mutation T1987C (S663P) du gène *FKS2* est suffisante pour induire la résistance aux échinocandines, mais entraîne une diminution du *fitness* chez cette espèce. Cette perte de *fitness* est partiellement compensée par l'apparition d'une mutation C463T (P155S) du gène *CDC55*, codant pour la sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 2A impliquée dans de multiples fonctions cellulaires. Cette étude a également permis d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance aux échinocandines. La mutation A511G (K171E) du gène *CDC6*, codant pour une protéine dont la fonction n'a pas été caractérisée jusqu'ici mais possiblement impliquée dans la réplication de l'ADN, est associée à une diminution de la sensibilité à ces antifongiques. Enfin, des mutations accompagnant la mutation du gène *FKS2* ont été détectées dans trois autres gènes : *MOH1*, *GPH1* et *TCB1/2*. Plus qu'une implication dans la résistance aux échinocandines, ces gènes pourraient être impliqués dans la compensation de la perte de *fitness* liées aux mutations de la cible des échinocandines (123).

Contrairement aux antifongiques azolés, les échinocandines sont de mauvais substrats pour la plupart des transporteurs chez *Candida* spp. L'efflux est donc un mécanisme de résistance mineur pour cette classe d'antifongiques.

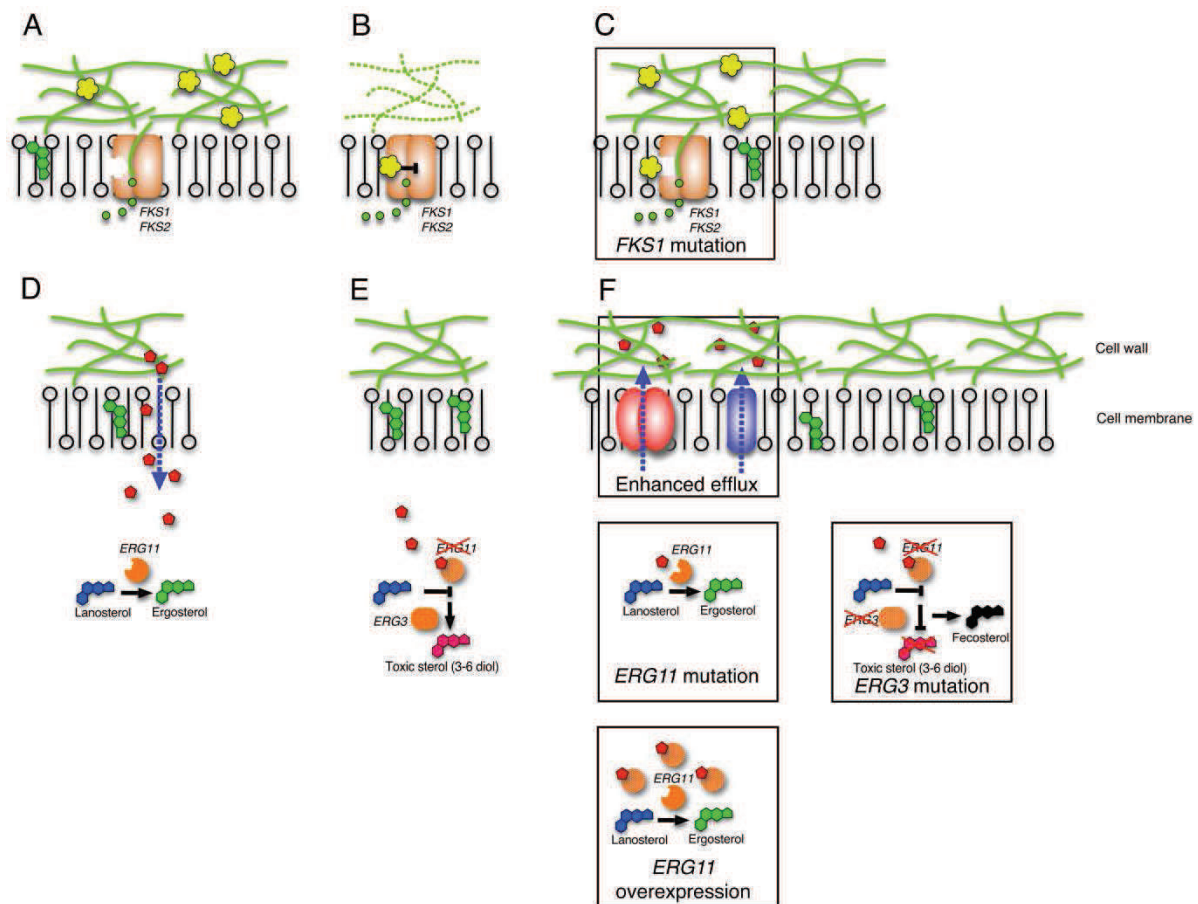


Figure 8 : *C. albicans* : principaux mécanismes de résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines (D'après Maubon, 2014 (79))

4.3. Détection des souches résistantes ou de sensibilité diminuée aux antifongiques

La détection des souches résistantes ou de sensibilité diminuée aux antifongiques est effectuée en routine à l'aide de tests phénotypiques (détermination des CMI). Des seuils épidémiologiques ou *Epidemiological cutoff values* (ECV) établis par le CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) et l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) permettent la discrimination entre les souches dites « sauvages » et les souches « non-sauvages » (ayant acquis des mutations ou des mécanismes de résistance aux antifongiques). Ces seuils sont spécifiques d'un couple levure/antifongique donné (124). Au moins 95% des souches « sauvages » ont une CMI inférieure à la valeur seuil de l'ECV. Ces seuils permettent de suspecter la présence de mutations associées à la résistance aux antifongiques, sans toutefois les confirmer et les caractériser (125). Des *Clinical Breakpoints* (CBP) ont également été définis pour les espèces les plus fréquentes et les antifongiques les plus utilisés. Ils ont pour but d'identifier les isolats susceptibles de répondre au traitement par un antifongique donné aux posologies habituelles ou, à l'inverse, de prédire un éventuel échec clinique (126). Ils permettent de discriminer les isolats sensibles, intermédiaires et résistants (127). Les ECV et

les CBP ont été révisés en 2012 dans le but d'augmenter la sensibilité de détection des souches résistantes (125,128–130).

4.4. Relevance clinique de la résistance aux antifongiques et de la détection des mutations

La principale conséquence de la résistance aux antifongiques est l'échec clinique. Toutefois, résistance microbiologique ne signifie pas résistance clinique. En effet, les tests et seuils utilisés pour la détermination des CMI répondent à la règle des 90/60 : les infections avec un isolat « sensible » répondent au traitement dans 90% des cas, tandis que les infections avec un isolat « résistant » sont traitées avec succès par cette molécule dans minimum 60% des cas (131–133). Chez des patients préalablement exposés aux échinocandines, les CMI à la caspofungine seraient corrélées à l'évolution sous traitement : toutefois, la sensibilité et la spécificité de prédiction d'un échec clinique en présence de CMI élevées dépendent des seuils et de la technique utilisés pour la détermination des CMI (132). La capacité des CMI à discriminer des souches de *C. glabrata* « sauvages » et des souches mutées pour le gène *FKS* et à prédire un échec du traitement varie également selon les études. Alexander *et coll.* ont rapporté que les nouveaux CBP établis par le CLSI étaient adaptés à l'identification de souches possédant des mutations de *FKS1* et *FKS2* avec un impact clinique (131). Shields *et coll.* ont montré de leur côté que ces seuils étaient certes sensibles (90%), mais non spécifiques (3%) : des CMI supérieures aux CBP n'étaient pas significativement associés à un échec clinique (132). Les CBP proposés par Arendrup *et coll.* permettent de réduire le défaut de spécificité des CBP du CLSI pour les échinocandines et *C. glabrata* (134).

La détermination des seules valeurs de CMI pourrait donc s'avérer insuffisante pour prédire l'évolution clinique lors d'un traitement par échinocandines dans les infections à *C. glabrata*. Il a été montré que la mise en évidence de mutations des gènes *FKS* chez *C. glabrata* permettait de prédire un échec clinique lors d'un traitement par échinocandines, avec une sensibilité de 60% et une spécificité de 97% (131,135). L'étude du génotype serait alors un meilleur prédicteur de l'échec clinique, à la fois plus sensible et plus spécifique (135). Cependant, il n'existe à ce jour aucune méthode standardisée et adaptée à la recherche de résistance génotypique chez *Candida* spp. en laboratoire de microbiologie clinique.

4.5. Epidémiologie de la résistance aux antifongiques

L'utilisation croissante et intensive des nouveaux antifongiques triazolés et des échinocandines dans la prévention et le traitement des infections invasives à *Candida* spp. au cours des deux dernières décennies a conduit à l'émergence de souches résistantes. Le lien entre utilisation des

antifongiques et apparition de résistance a été suggéré dans de nombreuses études. Une augmentation de la consommation d'échinocandines a par exemple pu être associée à une augmentation des CMI ou de l'isolement de souches résistantes à ces antifongiques dans différents hôpitaux (136,137). De même, un traitement antérieur par échinocandines a été identifié à plusieurs reprises comme facteur de risque de la présence de mutations des gènes *FKS*, voire d'une résistance à ces antifongiques, chez *C. glabrata* (131,135,138). La durée médiane d'exposition aux échinocandines avant l'isolement d'une souche porteuse d'une mutation du gène *FKS* est d'environ 100 jours : toutefois, des mutations ont pu être détectées dès 10 jours de traitement par ces antifongiques (139). Enfin, l'isolement de souches résistantes aux antifongiques azolés est plus fréquent chez des patients ayant déjà été préalablement exposés à ces antifongiques (79,140).

L'espèce *C. glabrata* est particulièrement sensible à la pression antifongique, probablement en raison de la nature haploïde de son génome. La résistance au fluconazole est fréquente chez cette espèce (de l'ordre de 9-12%), et d'autant plus préoccupante qu'elle est de plus en plus souvent associée à une résistance au voriconazole et/ou aux échinocandines (79,123,138,141–144). Environ 4-6% des isolats de *C. glabrata* responsables de candidoses invasives sont résistants aux échinocandines (131,138,139,141,145–147). Des disparités importantes existent toutefois entre sites hospitaliers (138,139,141) : une étude récente réalisée aux Etats-Unis a montré que la proportion de souches non sensibles aux échinocandines variait de 0 à plus de 20% selon le centre étudié. Ces disparités peuvent notamment s'expliquer par des différences de pratiques d'utilisation des antifongiques et le type de patients accueillis dans les différents centres. De manière plus préoccupante, cette étude a également montré que, malgré une diminution de l'incidence globale des candidoses invasives aux Etats-Unis entre 2008 et 2014, l'isolement de souches intermédiaires ou résistantes aux échinocandines a augmenté pendant cette même période, et ce, quel que soit le site (138). Cette tendance à l'augmentation de la prévalence d'isolats résistants aux échinocandines voire multi-résistants aux échinocandines et aux antifongiques azolés est confirmée dans une autre étude, qui, en parallèle, note une diminution de la prévalence de la résistance au fluconazole (45).

Les prévalences globales de souches de *C. albicans* responsables d'infections invasives résistantes aux antifongiques azolés ou aux échinocandines restent, elles, très faibles (<1 %) (139,141,147–149). Toutefois, comme pour la résistance aux échinocandines, des disparités géographiques sont à noter. Une proportion nettement plus élevée, 9,6%, de souches de *C. albicans* résistantes au fluconazole a par exemple été retrouvée dans l'étude China-SCAN en 2014 (150).

Une pré-exposition aux antifongiques n'est pas systématiquement retrouvée lors de l'isolement d'une souche résistante chez un patient donné. Selon les études, jusqu'à 40% des patients pour

lesquels une souche résistante est isolée n'ont pas d'antécédent de traitement antifongique. Ceci suggère la possibilité de transmission de souches résistantes entre patients ou entre personnel médical et patients (45,138).

5. Tolérance aux antifongiques

En plus de la résistance, l'efficacité des antifongiques est limitée par le phénomène de tolérance.

5.1. Définition

Les micromycètes ont la capacité de s'adapter à la présence d'un antifongique, pouvant ainsi survivre à des concentrations en antifongique supérieures à la CMI. Ce processus, appelé tolérance aux antifongiques, doit être distingué de la résistance aux antifongiques définie par une augmentation de la CMI vis-à-vis d'un organisme donné (voir plus haut) (Figure 9). Cette définition de la tolérance s'applique aisément aux antifongiques fongicides (échinocandines ou amphotéricine B). Elle doit toutefois être modulée pour les antifongiques fongostatiques : en effet, si l'on applique cette définition telle quelle, les levures du genre *Candida* spp. devraient toutes être considérées comme tolérantes aux antifongiques azolés. Or, le niveau de tolérance aux azolés est variable selon les souches au sein d'une même espèce : cela peut être mis en évidence par la présence et l'intensité d'un effet de traîne ou *trailing growth* lors de la détermination de la sensibilité aux antifongiques azolés *in vitro*. De même, cette définition doit être modulée pour les cellules en biofilm : leur faible sensibilité aux antifongiques (voir plus loin) peut être considérée comme un phénomène de tolérance aux antifongiques plutôt que de résistance vraie, malgré des augmentations de CMI (88).

5.2. Effet paradoxal

L'effet paradoxal est un mécanisme de tolérance dose-dépendante aux échinocandines. Il se définit par la croissance paradoxale de levures en présence de concentrations en antifongiques supérieures à la CMI, alors que celle-ci est inhibée par des concentrations en antifongiques plus faibles. (75,119,151–153) Il entraîne également des modifications morphologiques des levures : augmentation de taille, septation anormale, absence de filamentation. Le mécanisme précis expliquant ce phénomène n'est pas établi. Il serait médié par l'activation de voies de signalisation à l'origine du remaniement de la structure de la paroi fongique (mécanisme compensateur de la paroi) : accumulation de chitine et diminution de la concentration pariétale en β -1,3-glucanes. La croissance paradoxale est inhibée par les inhibiteurs de chitine synthases (nikkomycine Z), les inhibiteurs de

calcineurine ou l'altération de la voie des MAP kinases Mkc1 (voir plus loin) (75). Cet effet a été décrit pour *C. albicans* et d'autres espèces pathogènes, mais pas pour *C. glabrata*, et plus fréquemment avec la caspofungine qu'avec les deux autres échinocandines. La relevance clinique de ce phénomène observé uniquement *in vitro* n'est pas établie (l'effet paradoxal est inhibé en présence de sérum), et il n'y a aujourd'hui pas de preuves permettant d'associer cet effet paradoxal à un échec du traitement ou à la survenue d'infections perthérapeutiques (*breakthrough infections*) lors d'un traitement par échinocandines (154).

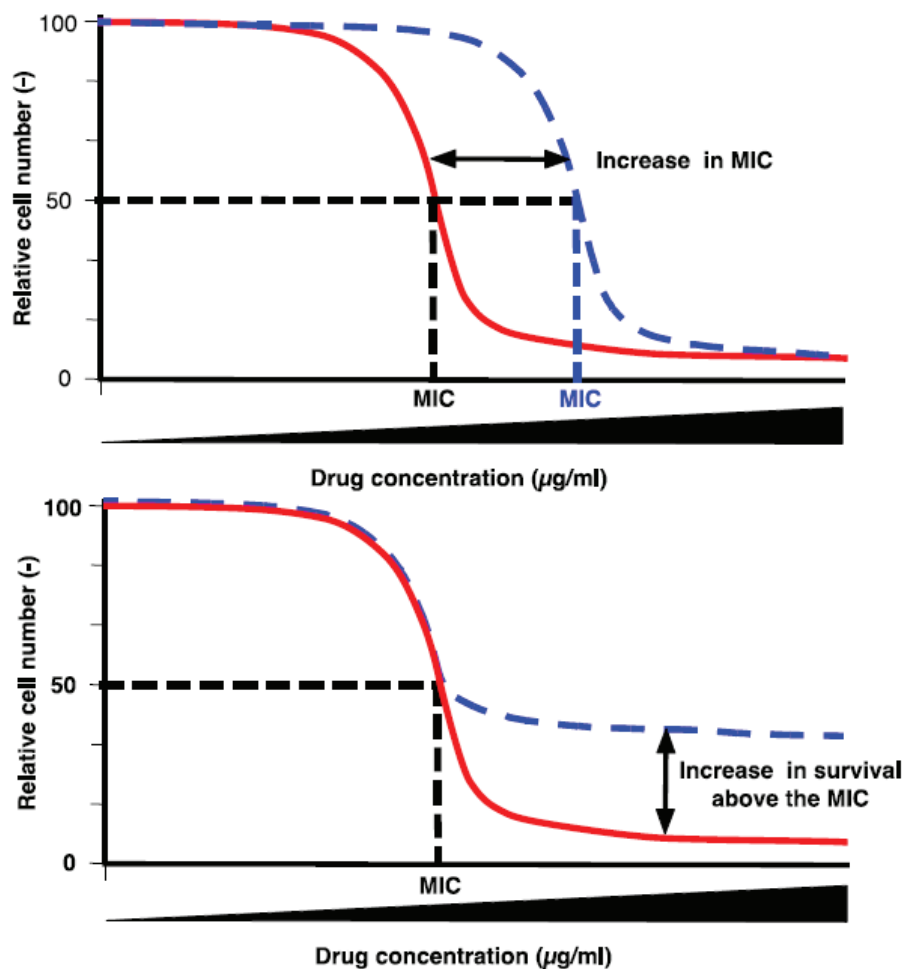


Figure 9 : Représentation schématique des concepts de résistance (haut) et tolérance aux antifongiques (bas). (D'après Delarze, 2015 (88)). Les courbes rouges représentent le comportement d'une souche sauvage, les courbes bleues en pointillés celui d'un isolat résistant (haut) ou tolérant (bas) aux antifongiques.

5.3. Mécanismes impliqués dans la tolérance aux antifongiques

Les mécanismes impliqués dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *Candida* spp. ne sont pas encore clairement établis. Plusieurs voies de signalisation, activées en réponse à des stress membranaires ou pariétaux, responsables du maintien de l'intégrité cellulaire, et interconnectées, interviennent dans la tolérance. La protéine chaperone Hsp90 joue également un rôle important dans la tolérance aux antifongiques. De plus, comme pour la tolérance aux antibiotiques décrite chez les bactéries, des mécanismes épigénétiques participent aussi à la tolérance.

5.3.1. Voie de la calcineurine

Une des voies de signalisation principales impliquée dans la tolérance aux antifongiques est la voie de la calcineurine. La calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline. Elle est constituée d'une sous-unité catalytique Cna1 et d'une sous-unité régulatrice Cnb1. En présence de calcium, la calmoduline s'associe à l'hétérodimère Cna1/Cnb1. Ceci entraîne l'activation de la calcineurine par clivage du domaine auto-inhibiteur de Cna1, et la déphosphorylation de protéines cibles dont le facteur de transcription Crz1, qui migre au niveau du noyau et permet la régulation de gènes cibles. La calcineurine est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques : cycle cellulaire, morphogénèse, virulence, homéostasie cationique (155) (Figure 11). Elle est aussi impliquée dans la tolérance aux antifongiques azolés (fluconazole, voriconazole, posaconazole) et aux échinocandines (caspofungine, micafungine et anidulafungine) chez *C. albicans* et *C. glabrata* (156–158). Les antifongiques azolés deviennent fongicides envers ces deux espèces en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de la calcineurine (159). La délétion des sous-unités *CNA1* ou *CNB1* entraîne une diminution complète de la tolérance aux antifongiques azolés et à la micafungine chez *C. albicans* (157,160,161). En revanche, la délétion de *CRZ1* entraîne seulement une diminution partielle de cette tolérance, ce qui suggère que ce facteur de transcription n'est pas le seul effecteur de la voie de la calcineurine impliqué dans la tolérance aux antifongiques (Figure 10). De façon surprenante, la délétion de *CRZ1* est sans effet sur la sensibilité de *C. albicans* à la caspofungine ou l'anidulafungine (157,158). Chez *C. glabrata*, contrairement à la calcineurine, Crz1 agit comme un régulateur négatif de la tolérance aux azolés. Enfin, la délétion de *CRZ1* chez cette espèce entraîne une diminution partielle de la tolérance aux échinocandines (158,161).

5.3.2. HSP90

Hsp90 est une protéine chaperone ATP-dépendante responsable de la régulation de la stabilité et de la fonction de multiples protéines-client, impliquées dans diverses voies de signalisation et en particulier dans la réponse au stress. Cette protéine majeure est conservée chez les eucaryotes. Elle est elle-même régulée à différents niveaux : régulation de la transcription de *HSP90* (ex : expression induite en réponse à un choc thermique via le facteur de transcription Hsf1), modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, nitrosylation) et interaction avec des co-chaperones. Hsp90 est impliquée dans la virulence et la morphogénèse de *C. albicans*. Elle joue également un rôle crucial dans la tolérance et le développement de la résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines pour cette espèce. L'inhibition pharmacologique ou génétique de Hsp90 potentialise l'efficacité des antifongiques azolés *in vitro* et *in vivo* (modèle murin de candidose disséminée et d'infection et modèle d'infection *Galleria mellonella*) (162). L'inhibition pharmacologique de Hsp90 permet de réduire la résistance aux antifongiques azolés médiée par Erg3 et Upc2 chez *C. albicans*, ce qui suggère que ces mécanismes de résistance sont Hsp90-dépendants. En revanche, la surexpression de *CDR1*, *CDR2* et *MDR1* médiée par des mutations GOF de *TAC1* et *MRR1* serait HSP90-indépendante (163). Hsp90 joue également un rôle majeur dans la tolérance aux échinocandines chez *C. glabrata*, mais ne serait pas impliquée dans la tolérance aux antifongiques azolés pour cette espèce (123). L'implication de Hsp90 dans la tolérance aux antifongiques est médiée par deux protéines-client : la calcineurine d'une part, et la protéine Mkc1 impliquée dans le mécanisme compensateur de la paroi fongique (*C. albicans*, voir plus loin) (Figure 10) (157,162,164). D'autres interacteurs génétiques de Hsp90 pourraient également y participer (165,166).

5.3.3. Voie médiée par la protéine kinase C

Une autre voie de signalisation impliquée dans la tolérance aux antifongiques est la voie de maintien de l'intégrité de la paroi fongique (*cell wall integrity pathway*) ou voie médiée par la protéine kinase C (PKC). Cette voie est activée pendant la croissance, la morphogénèse et en présence d'un stress pariétal, via des senseurs transmembranaires des familles de protéines Mid2 et Wsc. Le signal est ensuite transmis, par l'intermédiaire d'une GTPase (Rho1, NB : également sous-unité régulatrice de Fks1 et Fks2), à la protéine Pkc1 (non caractérisée chez *C. glabrata*) qui contrôle l'activation de la voie des MAP kinases Mkc1 chez *C. albicans*, et Slt2 chez *C. glabrata* (Figure 11). Ces dernières voies aboutissent à l'activation de divers facteurs de transcription, parmi lesquels *Ca/CgRLM1*, *Ca/CgSWI4*, *Ca/CgSWI6* et *CaCAS5*, qui régulent l'expression de gènes impliqués dans le

maintien de l'intégrité cellulaire et la synthèse de la paroi fongique, et, en particulier, dans la synthèse de la chitine (167–170).

Le fluconazole induit un stress membranaire, mais également un stress pariétal, à l'origine de l'activation de cette voie de signalisation (171). La délétion de la protéine kinase C chez *C. albicans* potentialise l'activité des antifongiques azolés qui deviennent fongicides et non plus fongistatiques et atténue la virulence dans un modèle murin de candidose invasive (164). La voie de la PKC intervient indépendamment de la voie de la calcineurine dans la tolérance aux antifongiques azolés : il existerait toutefois un effecteur commun à ces deux voies de signalisation (Figure 10) (155,164). La voie de la PKC est indispensable à l'activation de la transcription des transporteurs d'efflux en réponse à un traitement par fluconazole chez *C. glabrata* (172). Elle serait notamment impliquée dans la réponse aux antifongiques azolés médiée par *CgPDR1* : en effet, la délétion de *CgMED2* (voir plus haut) chez *C. glabrata* est associée à une activation constitutive de cette voie de signalisation (97).

La voie de la PKC est également impliquée dans la tolérance aux échinocandines chez *C. albicans* et *C. glabrata* (173). Le déficit en β -1,3- et β -1,6-glucanes pariétaux induit lors d'un traitement par échinocandines est compensé par une augmentation drastique de la concentration pariétale en chitine médiée en partie par la voie de la PKC, à l'origine d'une tolérance à ces antifongiques (170). Si ce phénomène compensatoire a été clairement établi chez *C. albicans*, des données contradictoires sont disponibles chez *C. glabrata* : Cota *et coll.* ont démontré que des concentrations de caspofungine supérieures à la CMI étaient associées à une augmentation de la concentration pariétale en chitine et une surexpression de *SLT2*, à l'origine d'une tolérance à cet antifongique, tandis que Munro *et coll.* n'ont pas retrouvé d'élévation de la concentration en chitine après traitement par la caspofungine. Des différences entre les souches, techniques et concentrations de caspofungine utilisées dans ces deux études peuvent expliquer ces données (119,153,174). La délétion de *MKC1* chez *C. albicans* ou *SLT2* chez *C. glabrata* est associée à une diminution de la virulence chez ces deux espèces (167,170,175)

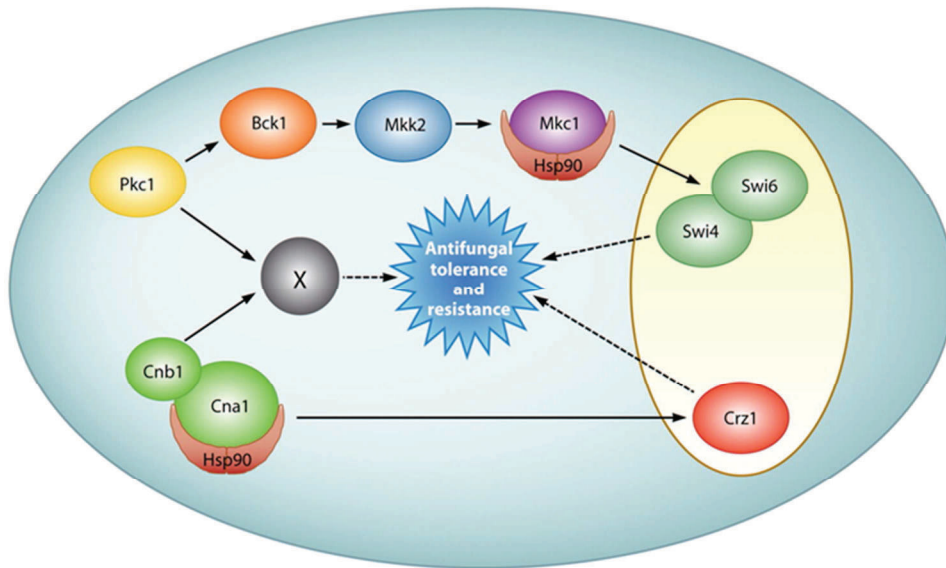


Figure 10 : Représentation schématique des interactions entre Hsp90, la voie de la calcineurine et la voie des MAP kinases médiée par la PKC dans la tolérance aux antifongiques (d'après Shapiro, 2011 (155))

5.3.4. Voie HOG

Une autre voie impliquée dans la tolérance aux échinocandines est la voie HOG ou *High Osmolarity Glycerol*. Il s'agit d'une autre voie des MAP kinases, activée en réponse à un stress hyperosmotique, qui régule la synthèse du glycérol et son maintien à l'intérieur de la cellule. Chez *C. glabrata*, cette voie est activée par les aquaglycéroporines Fps1 et Fps2. Le double mutant *FPS1/FPS2* présente un stress pariétal constitutivement élevé et est hypersensible à la caspofungine *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de candidose disséminée (176). Chez *C. albicans*, la voie HOG régule l'activation du facteur de transcription Sko1, qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans la réponse à la caspofungine et dans la biosynthèse de la paroi fongique, dont *CRH1* (codant pour une protéine à ancre GPI et putative transglycosidase), *MNN2* (codant pour une α -1,2-mannosyltransférase) et *SKN1* (codant pour une protéine participant à la synthèse des β -1,6-glucanes) (177) (Figure 11). Cette voie participe également à la régulation de la synthèse de chitine, conjointement avec les voies de la calcineurine et de la PKC (178).

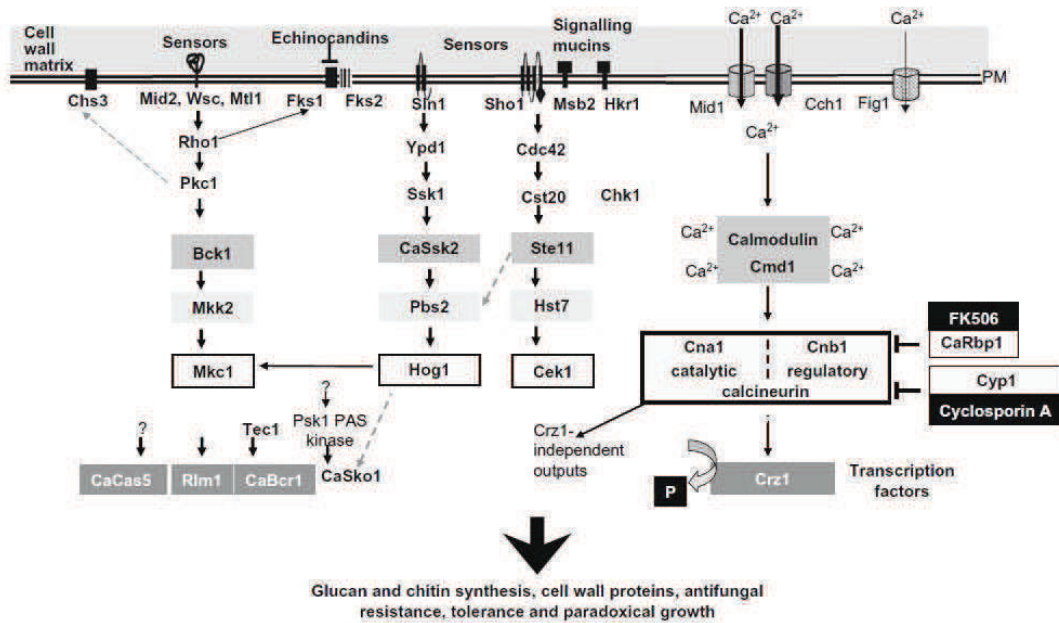


Figure 11 : Voies de signalisation impliquées dans le remodelage de la paroi fongique chez *C. albicans* (d'après Walker, 2010 (119))

5.3.5. Voie des sphingolipides

La voie de biosynthèse des sphingolipides ou *TOR complex 2 (TORC2)-activated Ypk1 signalling cascade* est régulée par la protéine Ypk1. Elle est activée en réponse à un stress membranaire. La délétion de *YPK1* chez *C. glabrata* entraîne une hypersensibilité aux antifongiques azolés, aux échinocandines et à l'amphotéricine B, suggérant un rôle de cette voie dans la tolérance aux antifongiques (179). La disruption d'un autre gène impliqué dans la biosynthèse des sphingolipides chez *C. albicans*, le gène *IPT1*, entraîne une hypersensibilité au fluconazole et à l'itraconazole. Ce phénotype serait dû à une modification de la localisation du transporteur Cdr1, en lien avec la modification de la composition membranaire en sphingolipides, à l'origine d'un efflux diminué des azolés (180). Les sphingolipides permettraient également de moduler l'activité des échinocandines chez *C. albicans* et *C. glabrata* (181,182). Cet effet serait variable selon la molécule, et lié à une modification de l'interaction entre ces antifongiques et la sous-unité Fks. Par exemple, l'exposition *in vitro* de souches de *C. glabrata* à des faibles concentrations de caspofungine entraîne l'apparition de mutants possédant une sensibilité diminuée à la caspofungine et une sensibilité augmentée à la micafungine. Ce phénomène s'expliquerait par la présence de mutations perte-de-fonction dans divers gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des sphingolipides dont *FEN1*, *SUR4*, *SUR2* et *IFA38*, qui entraîneraient une accumulation de sphingolipides à longue chaîne (sphingosine et dihydrosphingosine) dans la membrane fongique et influenceraient l'interaction entre les échinocandines et leur cible.

Le rôle des voies de signalisation dans la tolérance aux antifongiques est primordial. Leur activation en réponse aux stress membranaires et pariétaux générés par les antifongiques azolés ou les échinocandines permet à la cellule fongique de partiellement compenser les effets de ces molécules. D'autres voies de signalisation ont été impliquées dans la tolérance à ces antifongiques, dans une moindre mesure, parmi lesquelles la voie de signalisation du pH (voir plus loin). Parallèlement à ces voies de signalisation, des mécanismes épigénétiques interviennent aussi dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *Candida* spp.

5.3.6. Les histone acetyltransférases (HAT) et histone déacétylases (HDAC/KDAC)

Les histone acetyltransférases (HAT) et histone déacétylases (HDAC, ou KDAC, lysine déacétylases) sont des enzymes qui catalysent l'ajout ou le retrait d'un groupement acétyl sur les résidus lysine des histones, à l'origine de modifications structurales de la chromatine et de la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Les HDAC et HAT régulent également le degré d'acétylation d'autres protéines. HAT et HDAC sont impliquées dans la régulation des voies de réponse au stress, et dans la tolérance et résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *Candida* spp.

5.3.6.1. Histone acétyl transférases

L'implication des HAT dans la tolérance et la résistance aux antifongiques est variable selon l'enzyme, et les mécanismes à l'origine de cette implication ne sont pas complètement élucidés. La délétion des gènes codant pour les HAT non spécifiques Hat1 et/ou Hat2 chez *C. albicans* est associée à une augmentation de la tolérance au voriconazole et à l'itraconazole, tandis que la délétion du gène codant pour l'HAT Rtt109, responsable de l'acétylation H3K56ac, n'a, elle, pas d'influence sur la sensibilité aux antifongiques azolés (183). En revanche, cette dernière HAT est impliquée dans la tolérance à la micafungine et à la caspofungine (184). Le complexe coactivateur Spt-Ada-Gcn5-acétyltransférase (SAGA) permet la régulation de nombreux processus cellulaires par acétylation des histones. La délétion du gène *ADA2* chez *C. albicans* est associée à une hypersensibilité au fluconazole, liée à des anomalies de régulation des gènes *CDR1* et *MDR1*. Ada2 est également impliquée dans la régulation transcriptionnelle de *HSP90* (185).

5.3.6.2. Histone déacétylases

Une revue de la littérature sur les HDACs et le potentiel de l'inhibition de ces enzymes comme nouvelle stratégie antifongique chez *Candida* spp. est présentée dans la partie 3 (étude bibliographique). N'est développé ici que le rôle de ces enzymes dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines.

Chez *C. albicans*, l'expression de *HDA1* et *RPD3* est augmentée lors du développement de la résistance aux antifongiques azolés, puis diminue pour retrouver un niveau d'expression similaire à celui de la souche parentale sensible lorsque la résistance est établie (186). Les HDAC Rpd3, Rpd31, Hda1 et Hos2 sont fonctionnellement redondantes chez *C. albicans*. La délétion concomitante des gènes codant pour ces quatre HDACs est associée à une abrogation de la tolérance et de la résistance aux antifongiques azolés médiée par Hsp90, et à la restauration d'un effet fongicide du fluconazole *in vitro* (163). L'inhibition pharmacologique de ces HDACs par la trichostatine A (TSA) phénocopie l'inhibition pharmacologique de Hsp90 chez de nombreuses espèces de *Candida* spp., ce qui suggère que Hsp90 est régulée au niveau post-traductionnel par acétylation/déacétylation pour contrôler les réponses cellulaires au stress induit par les azolés (163,187). De plus, Hos2, membre du complexe HDAC Set3, interagit physiquement avec Hsp90. En revanche, comme Hsp90, les HDACs ne semblent pas être impliquées dans la résistance aux antifongiques azolés chez *C. glabrata* (163). Hos2 serait également impliquée dans la tolérance aux échinocandines chez *C. albicans* et *C. glabrata* (188).

5.3.7. Biofilms

Les levures en biofilm sont caractérisées par une faible sensibilité aux antifongiques azolés et à l'amphotéricine B. Les échinocandines restent, elles, actives sur les biofilms formés par *C. albicans* et *C. glabrata*, de même que les formulations lipidiques de l'amphotéricine B (189,190).

De nombreux mécanismes sont impliqués dans la moindre sensibilité des levures en biofilms aux antifongiques azolés. Comme évoqué plus haut, ils regroupent à la fois des mécanismes de résistance et des mécanismes de tolérance à ces molécules (88). Dans les stades précoces de la formation du biofilm, la résistance est principalement médiée par la surproduction transitoire des transporteurs impliqués dans l'efflux de ces antifongiques : Cdr1, Cdr2 voire Mdr1 chez *C. albicans*, CgCdr1 et Pdh1 chez *C. glabrata* (191,192). Dans les biofilms matures, le rôle des transporteurs d'efflux est minime, et la faible sensibilité aux antifongiques azolés est médiée par la matrice extracellulaire, l'activation de voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress, la faible concentration membranaire en ergostérol et par la présence de cellules persistantes (*persisters*). Les β -1,3-glucanes présents dans la matrice extracellulaire peuvent se lier aux antifongiques azolés, à l'origine de leur séquestration.

Les voies de la PKC, de la calcineurine et Hsp90 sont également impliquées dans la tolérance aux azolés dans les biofilms, par divers mécanismes dont le contrôle de la production de la matrice. Les levures en biofilm possèdent une concentration membranaire en ergostérol environ deux fois plus faible que celle des levures planctoniques, liée à des altérations de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (conversion du lanostérol en dérivés non-ergostérol par surexpression de *ERG25*), pouvant expliquer la moindre activité des antifongiques azolés. La présence de cellules *persisters*, capables de survivre en présence de concentrations d'antifongiques supérieures à la CMI, participe également à la tolérance aux antifongiques azolés en biofilms pour *C. albicans*. Ces cellules possèderaient des compositions membranaires et pariétales modifiées par rapport aux autres cellules. Il n'existerait pas de cellules *persisters* chez *C. glabrata* (191,193). Si la résistance aux antifongiques azolés des cellules en biofilm peut être jusqu'à 1000 fois supérieure à celle des cellules planctoniques, la résistance aux échinocandines en biofilm est moins importante (2-20 fois supérieure à celle des cellules planctoniques selon l'espèce). Ceci peut s'expliquer par leur mécanisme d'action : ces antifongiques inhibant la synthèse des β -1,3-glucanes, ils permettraient de diminuer la production d'un des principaux constituants de la matrice. La présence d'ADN extracellulaire au sein de la matrice participerait à la résistance aux échinocandines des levures en biofilm (194).

6. Voie de signalisation du pH : voie Rim

En plus des voies de signalisation préalablement citées, la voie de signalisation du pH est impliquée dans la tolérance aux antifongiques azolés chez *S. cerevisiae* (195). L'étude de l'implication de cette voie de signalisation dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans* a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse (voir plus loin).

C. albicans est une levure capable de coloniser ou infecter de nombreux sites anatomiques chez l'homme, pour lesquels de fortes variations de pH sont observées (Tableau 2). Cet organisme doit donc être capable de s'adapter à des pH acides (ex : estomac, vagin), mais également à des pH alcalins (ex : sang, liquide péritonéal, colon). En milieu neutre ou alcalin par exemple, l'acquisition de nutriments est perturbée du fait de l'altération du gradient de protons membranaire (196).

La voie de signalisation du pH est la voie Rim chez les levures (également appelée PacC pour les champignons filamenteux). Elle est spécifique du règne fongique (ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes), et relativement bien conservée entre les espèces. Cette voie est activée en réponse à un pH neutre ou alcalin, et participe à l'adaptation des mycètes à un tel environnement.

Tableau 2 : pH physiologiques de différents sites anatomiques ou fluides biologiques

Site anatomique/fluide biologique	pH physiologique
Intestin	8,3-8,4
Liquide pancréatique	7,6-8,4
Bile	7,4
Sang	7,35-7,45
Liquide céphalo-rachidien (LCR)	7,3
Salive	6,7-7,1
Urine	5,8
Duodénum	5,5
Vagin	4-5
Estomac	0,9-1,5

La voie Rim chez *C. albicans* est schématisée dans la figure 12. Brièvement, le pH extracellulaire est perçu par un complexe formé par deux protéines transmembranaires, Rim21/Dfg16 et Rim9, et la protéine *arrestin-like* Rim8. En présence d'un pH neutre ou alcalin, Rim8 se lie à Rim21 et Rim101, le facteur de transcription terminal de la voie, et devient hyperphosphorylé. Le complexe est ensuite endocyté, et interagit avec les complexes endosomaux ESCRT-I (*endosomal-sorting complex I required for transport*), II et III. Les facteurs Vps32 et Vps20 du complexe ESCRT-III permettent le recrutement de deux autres protéines de la voie Rim : Rim20 et Rim13 (protéase *calpain-like*). Rim20 se lie au domaine inhibiteur C-terminal de Rim101, permettant son recrutement, tandis que Rim13 permet l'activation du facteur de transcription Rim101 par clivage protéolytique du domaine inhibiteur. Rim101 sous sa forme active (74 KDa) migre alors au niveau du noyau et permet la régulation (activation ou répression) de l'expression de gènes dépendant du pH impliqués dans de multiples fonctions : croissance, transport et métabolisme du fer, morphogénèse, structure de la paroi, adhésion et formation de biofilms. Il existe un système de rétrocontrôle négatif de cette voie, médié par la dégradation vacuolaire de Rim8 et par Rim101 (197). Un homologue de la protéine Rim23 de *S. cerevisiae* pourrait exister chez *C. albicans* et permettrait de faire la jonction entre le complexe membranaire de perception du pH et le complexe endosomal. Le facteur de transcription Rim101 (85 KDa) pourrait également être clivé à pH acide par Rim13 pour donner une protéine de 65 KDa dont la fonction reste à ce jour inconnue (198).

Plusieurs études ont démontré le rôle clé de la voie Rim dans la virulence de *C. albicans*, en utilisant différents modèles expérimentaux : modèle murin de candidose disséminée par voie hématogène (NB: le pH sanguin des souris est 7,2 +/- 0,1, similaire au pH sanguin humain) (199), modèles murin et porcin de kératite (200), modèle murin de candidose oro-pharyngée (201) et modèle murin de candidose intra-abdominale (202).

L'implication de la voie Rim dans la virulence résulte principalement des mécanismes d'adaptation à la survie en milieu neutre ou alcalin. Dans ces conditions, la croissance sous forme

filament est favorisée, et la voie Rim induit l'expression de nombreux gènes spécifiques de la forme filament, dont *SAP5*, *HWP1* ou *ALS3* (Figure 4). La voie Rim est notamment indispensable à l'expression de plusieurs protéines Sap, dont la protéine Sap5, potentiellement impliquée dans les processus d'invasion. L'expression de l'adhésine Als3, exprimée par la forme filament, est aussi dépendante de Rim101 : cette protéine possède un rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte et la formation de biofilms, mais également dans l'adhésion à la ferritine, facilitant l'acquisition de fer. Le fer est un métal indispensable à la croissance fongique : en conditions neutres ou alcalines, la solubilité du fer sous forme Fe^{3+} est limitée et l'apport en fer réduit. La survie des cellules dans ces conditions de privation en fer est dépendante de la voie Rim (203), et Rim101 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'acquisition et le transport du fer (196,204). La voie Rim contrôle aussi l'expression de gènes impliqués dans la structure et le remodelage de la paroi fongique, dont *PHR1* et *PHR2*. Ces deux gènes, codant pour des β -(1,3)-glucanosyltransférases aux fonctions redondantes, sont différenciellement exprimés en fonction du pH : l'expression de *PHR1* est induite par *RIM101* en conditions neutres ou alcalines, tandis que *PHR2* est préférentiellement exprimé en conditions acides. Ces protéines sont indispensables à la virulence de *C. albicans* dans des sites anatomiques possédant un pH neutre ou alcalin pour Phr1 (infection systémique) et acide pour Phr2 (candidose vaginale) (205). Enfin, il a été récemment montré que la voie Rim est impliquée dans le contrôle de la transition *white-opaque* dépendante du pH : les protéines Rim101 et Phr2 joueraient un rôle dans l'induction de cette transition en conditions acides (206).

La voie Rim intervient dans la tolérance aux antifongiques azolés. L'effet de traîne observé avec les antifongiques est pH-dépendant, et inhibé à pH acide (207). Chez *S. cerevisiae*, les mutants des gènes codant pour les protéines de la voie Rim sont hypersensibles au fluconazole (195). De même, chez *C. albicans*, la délétion de *RIM101* ou des gènes codant pour les protéines Vps28 et Vps32 du complexe ESCRT confère une hypersensibilité aux antifongiques azolés, qui est restaurée lors de la complémentation par la forme active de Rim101, suggérant l'implication de la voie Rim dans la tolérance à ces antifongiques (208). Le phénotype d'hypersensibilité au fluconazole du mutant *rim101-/-* a été confirmé lors du screening phénotypique de régulateurs transcriptionnels chez *C. albicans* (209).

La voie Rim joue un rôle crucial dans l'adaptation à un pH neutre ou alcalin. Toutefois, d'autres protéines ou voies de signalisation interviendraient dans la réponse au pH chez *C. albicans*, à l'exemple de la protéine Mds3 (voie de signalisation TOR) ou de la voie de la calcineurine (196). L'AMPC joue également un rôle dans les réponses pH-dépendantes chez *C. albicans* (210).

Par son implication dans la pathogénicité et la virulence de *C. albicans*, son implication dans la tolérance aux antifongiques et le fait qu'elle soit spécifique du règne fongique, la voie Rim apparaît comme une cible antifongique prometteuse.

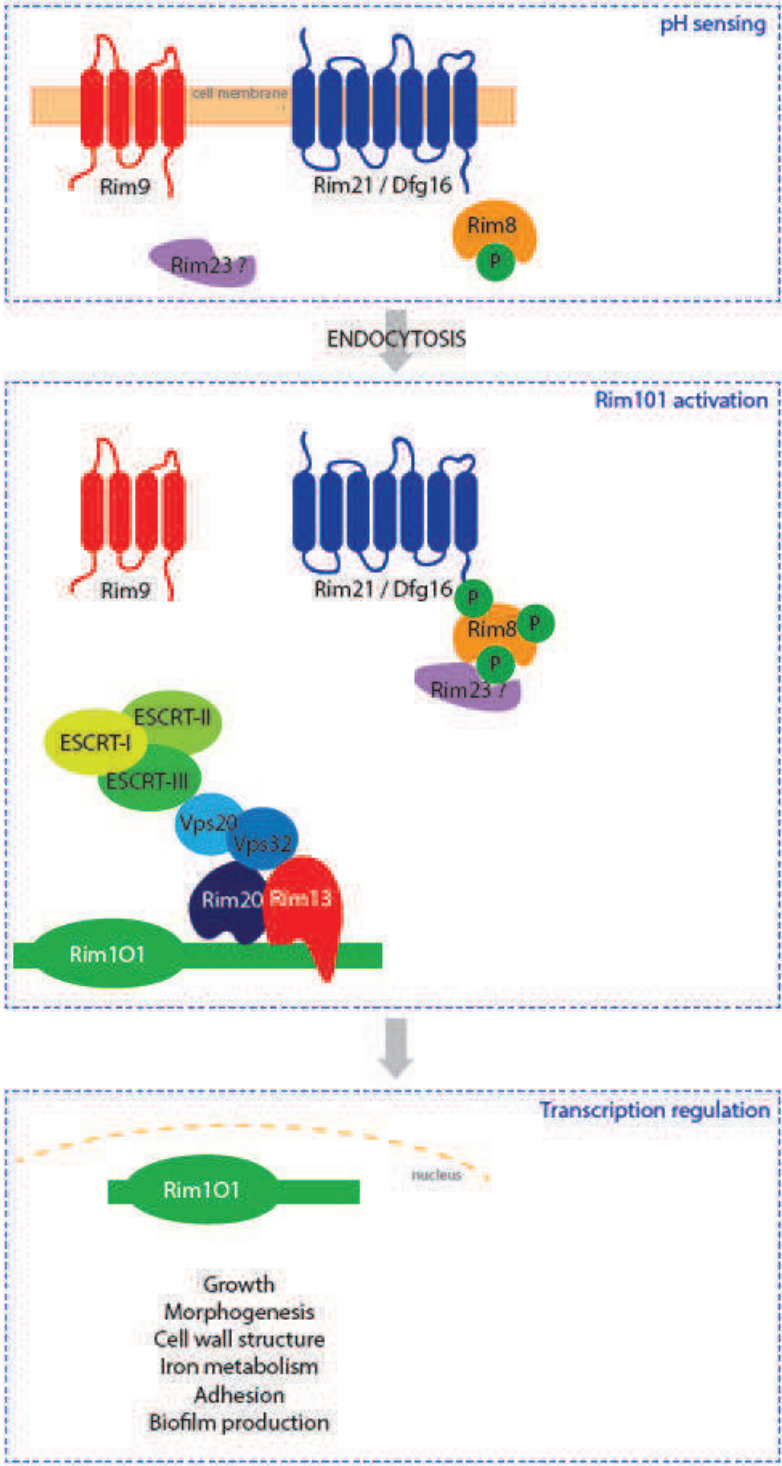


Figure 12 : Voie de signalisation du pH ou voie Rim (*C. albicans*)

7. Protéines BET fongiques

D'autres potentielles cibles antifongiques d'intérêt sont les protéines BET (*Bromodomain Extra-Terminal*) fongiques. Dans le cadre de mon projet de thèse et du partenariat de l'ANR FungiBET entre les équipes Infections virales et Cancer (C. Petosa, Institut de Biologie Structurale, Grenoble), Etude de la dynamique des protéines (EDyP, J. Govin, laboratoire Biologie à Grande Echelle (BGE), *Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble*, Grenoble), TheREx-CandiSTORE (M. Cornet, laboratoire TIMC-IMAG, Grenoble) et l'équipe de C. McKenna (*University of Southern California*, Los Angeles, Etats-unis), j'ai eu l'opportunité de m'intéresser à l'étude d'une protéine BET de *C. glabrata* : la protéine Bdf1 (voir plus loin).

Comme d'autres protéines à bromodomaines (ex : HDAC, HAT), les protéines BET sont impliquées dans la régulation de la transcription et le remodelage de la chromatine. Ces protéines sont localisées au niveau du noyau, et relativement conservées au sein des eucaryotes. Elles sont constituées de deux (voire trois) bromodomaines à l'extrémité N-terminale, et d'un domaine extra-terminal (ET) à l'extrémité C-terminale. Les protéines BET se lient à la chromatine par l'intermédiaire des bromodomaines BD1 et BD2, qui reconnaissent spécifiquement les histones (di)acétylées sur des résidus lysine. Le domaine ET est lui impliqué dans des interactions protéine-protéine. Des inhibiteurs sélectifs des bromodomaines des protéines BET humaines sont actuellement en développement en cancérologie et dans d'autres pathologies, à l'exemple de JQ1 et I-BET762 possédant des effets anti-prolifératifs.

Il existe deux protéines BET chez *S. cerevisiae* : Bdf1 et Bdf2. (NB : quatre protéines BET chez les eucaryotes supérieurs dont les mammifères : Brd2, Brd3, Brd4 et Brdt). Bdf1 se lie préférentiellement aux histones acétylées H3 et H4. Cette protéine est responsable de la transcription de plus de 500 gènes, et la délétion de *BDF1* chez *S. cerevisiae* est associée à des défauts de croissance, des défauts morphologiques, des anomalies de la mitose et de la méiose, une dysfonction mitochondriale et une altération des systèmes de réparation des dommages de l'ADN. Bdf1 est indispensable à la sporulation, et au compactage de la chromatine pendant la sporulation (211,212). Bdf1 s'associe au facteur de transcription TFIID par l'intermédiaire de son domaine ET. Elle fait également partie du complexe de remodelage de la chromatine SWR1, et participe au maintien de l'euchromatine. Elle participe également à la réponse au stress salé, par régulation de la fonction mitochondriale et de gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi fongique (213). Bdf2 se lie, elle, préférentiellement aux histones acétylées H2 et H3. Son implication dans la régulation de la transcription est plus faible que celle de Bdf1. Toutefois, Bdf1 et Bdf2 possèdent des fonctions

partiellement redondantes : lors de la délétion de *BDF1*, Bdf2 peut remplacer Bdf1 pour la régulation de l'expression de certains gènes. Contrairement à la délétion de *BDF1*, la délétion de *BDF2* n'est associée à aucun phénotype apparent (214). La double délétion de *BDF1* et *BDF2* est par contre létale (215).

Les bromodomaines BD1 et BD2 de Bdf1 possèdent des spécificités de liaison. Comme pour les protéines BET humaines, ils jouent un rôle important dans la régulation de la transcription. En effet, des mutations ponctuelles des bromodomaines BD1 (Y186F) et BD2 (Y353F) de Bdf1 chez *S. cerevisiae* sont responsables d'un défaut de liaison à la chromatine, à l'origine d'anomalies de croissance et de la transcription de gènes régulés par *BDF1* (216).

Chez *C. albicans* et *C. glabrata*, il n'existe qu'une seule protéine BET, Bdf1, codée respectivement par les gènes *BDF1* et *CAGLOC02541g*. Très peu de données sont disponibles à ce jour sur ces protéines. La séquence des bromodomaines BD1 et BD2 est relativement bien conservée entre *S. cerevisiae* et ces deux espèces (homologie > 58%). En revanche, les pourcentages d'homologie entre les séquences des bromodomaines des protéines BET fongiques et humaines sont plus faibles (Figure 13). Récemment, Mietton *et coll.* (voir partie 4, 3.1.2) ont montré que la délétion du gène *CaBDF1* est létale chez *C. albicans*. De plus, comme chez *S. cerevisiae*, des mutations ponctuelles des bromodomaines BD1 et BD2 de *BDF1* confèrent une perte de viabilité *in vitro*. En outre, ces mutations sont associées à une diminution de la virulence *in vivo*. La protéine Bdf1 est possiblement impliquée dans la tolérance ou la résistance aux antifongiques azolés : des données préliminaires ont en effet montré que le gène *BDF1* est surexprimé dans des isolats résistants au fluconazole chez *C. albicans* (217). A l'instar de l'inhibition sélective des bromodomaines des protéines BET humaines en cancérologie, l'inhibition pharmacologique des bromodomaines des protéines BET fongiques pourrait donc représenter une nouvelle stratégie thérapeutique chez *Candida* spp.

		% Identity within BD1							
		human				<i>S.cer</i>	<i>C.alb</i>	<i>C.gla</i>	
		Brd2	Brd3	Brd4	Brdt	Bdf1	Bdf1	Bdf1	
% Identity within BD2	human	Brd2	--	87	79	74	35	31	35
		Brd3	82	--	81	74	32	31	33
		Brd4	81	81	--	73	35	32	34
		Brdt	72	71	74	--	33	31	31
% Identity within BD2	<i>S.cer</i>	Bdf1	39	38	40	41	--	66	84
	<i>C.alb</i>	Bdf1	44	42	44	46	58	--	61
	<i>C.gla</i>	Bdf1	40	38	37	38	71	57	--

Figure 13 : Pourcentages d'homologies entre les séquences des bromodomaines BD1 et BD2 des protéines BET fongiques (*S. cerevisiae*, *C. albicans* et *C. glabrata*) et humaines

PARTIE 2 : OBJECTIFS ET TRAVAIL DE THESE

Comme vu précédemment, l'incidence des candidoses invasives a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, et ces pathologies sont associées à une morbi-mortalité élevée. Les deux espèces les plus fréquemment isolées en Europe et en Amérique du Nord sont *C. albicans* et *C. glabrata*. Seules quatre classes de molécules antifongiques sont aujourd'hui disponibles pour la prévention et le traitement des candidoses invasives : les antifongiques azolés, les échinocandines, les polyènes et les pyrimidines. Parmi ceux-ci, les plus utilisés sont les antifongiques azolés et les échinocandines, du fait d'une efficacité importante et d'une meilleure tolérance. Les levures du genre *Candida* spp. ont la capacité de s'adapter et de tolérer la présence de molécules antifongiques, limitant ainsi leur efficacité. De plus, l'utilisation massive des antifongiques azolés et des échinocandines dans la prévention et le traitement des infections à *Candida* spp. a conduit (i) à un changement de l'épidémiologie des candidoses invasives, avec une augmentation de l'isolement de souches non-*albicans* intrinsèquement moins sensibles à ces antifongiques, et (ii) à l'émergence de résistance acquise à ces antifongiques, associée à des échecs thérapeutiques. Pour toutes ces raisons, la recherche et le développement de nouvelles molécules antifongiques sont aujourd'hui nécessaires. Différentes stratégies peuvent être distinguées en ce sens, parmi lesquelles le développement de nouvelles molécules possédant une importante activité antifongique propre, ou encore le développement de nouvelles molécules permettant de potentialiser l'activité des antifongiques actuellement disponibles, en inhibant par exemple la tolérance et/ou la résistance à ces composés.

Mon projet de thèse s'inscrit dans cette deuxième stratégie, avec deux objectifs principaux : l'étude de la tolérance et de la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. et la caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles impliquées dans ces processus.

Pour répondre à ces objectifs, mon travail de thèse s'est divisé en trois parties : (i) identification de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp., (ii) implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans* et (iii) identification d'une nouvelle cible antifongique potentielle chez *C. glabrata* : la protéine Bdf1.

1. Identification de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.

La première partie de ce travail a consisté en l'analyse moléculaire d'isolats prélevés à différents temps chez des patients traités ou non par antifongiques, par une technique de séquençage nouvelle génération dont la mise au point a fait l'objet de ma thèse d'exercice pour l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie en 2013.

Ce travail, présenté dans la partie 4.1, a permis d'appréhender de nouveaux mécanismes de résistance avec, pour plusieurs isolats, des mutations détectées conjointement dans plusieurs des gènes impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines. Il a donné lieu à une publication dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* en 2015.

2. Implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans*

Dans un 2^{ème} temps, je me suis intéressée à la voie de signalisation du pH ou voie Rim chez *C. albicans*, avec deux objectifs : (i) confirmer l'implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines (implication du facteur de transcription terminal Rim101p, mais également des autres protéines de la voie) et (ii) appréhender les mécanismes impliqués dans la tolérance aux antifongiques médiée par la voie Rim.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la partie 4.2.

3. Identification d'une nouvelle cible antifongique potentielle chez *C. glabrata* : la protéine Bdf1.

Enfin, en collaboration avec l'équipe EDyP du laboratoire BGE (*Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble*, Grenoble) et l'équipe Infections virales et Cancer (Institut de Biologie Structurale, Grenoble) dans le cadre du partenariat de l'ANR FungiBET-14-CE16-0027-03, je me suis intéressée au gène *BDF1* chez *C. glabrata*, impliqué dans la régulation de la transcription et le remodelage de la chromatine, avec pour objectif de démontrer que ce gène et ses bromodomains BD1 et BD2 sont essentiels chez *C. glabrata*, comme cela a été montré chez *C. albicans*. Les résultats obtenus chez *C. albicans* par le consortium ont fait l'objet d'une publication actuellement en révision pour *Nature communications*.

Le travail concernant *BDF1* chez *C. glabrata* a été réalisé en collaboration avec Morgane Champleboux, doctorante dans l'équipe EDyP, avec laquelle j'ai participé à l'encadrement de Kaiyao Wei, étudiant en Master 2. Les résultats de ces travaux sont présentés dans la partie 4.3.

Parallèlement à ces activités de recherche, j'ai participé à la rédaction de deux revues de la littérature, l'une portant sur la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. en réanimation, l'autre sur les histones déacétylases et leur inhibition chez *Candida* spp.

Ces deux revues sont présentées dans la partie 3.

PARTIE 3 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. en réanimation

Cette revue, intitulée *Resistance of Candida spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?*, a été publiée en 2014 dans *Intensive Care Medicine* (nombre de citations : 32).

J'ai participé à la conception, la rédaction, la relecture et la révision de cet article. Je me suis en particulier investie dans la rédaction des parties et sous-parties portant sur les mécanismes moléculaires de résistance aux antifongiques, la résistance aux antifongiques en biofilms et l'épidémiologie de la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.

1.1. Résumé

Les candidoses invasives sont associées à une morbidité et une mortalité importante chez les patients de réanimation. L'utilisation croissante des antifongiques triazolés et des échinocandines dans la prophylaxie et le traitement des candidoses invasives a conduit à l'émergence de souches résistantes, associées à des échecs cliniques.

Cette revue décrit dans un premier temps les mécanismes d'action et mécanismes moléculaires de résistance aux quatre classes d'antifongiques disponibles pour le traitement des candidoses invasives : échinocandines, azolés, polyènes et pyrimidines. Est également évoquée la problématique de la résistance de *Candida* spp. en biofilms, du fait de la proportion élevée de patients porteurs de cathéters ou d'autres dispositifs médicaux implantables en réanimation.

Dans un second temps sont discutées les différentes techniques de détection de la résistance aux antifongiques en laboratoire de microbiologie. Les méthodes de référence proposées par le CLSI et l'EUCAST ne sont pas adaptées au diagnostic microbiologique de routine. Des techniques commerciales, comme les Etest® (Biomérieux) ou encore la technique Sensititre YeastOne® (Trek diagnostic systems) représentent des alternatives intéressantes. Ces techniques permettent de déterminer les CMI d'un antifongique vis-à-vis d'une souche donnée. Pour guider les microbiologistes et les cliniciens dans l'interprétation de ces CMI, le CLSI et l'EUCAST ont établi des *clinical breakpoints*, permettant de distinguer les souches sensibles, associées à une forte probabilité de succès du traitement antifongique, des souches résistantes pour lesquelles un échec du traitement est fortement probable. Les ECV, permettant de discriminer les souches sauvages des souches présentant potentiellement des mutations associées à la résistance aux antifongiques sont également proposés. Les modifications récentes des CBP des deux comités d'experts internationaux, CLSI et EUCAST, sont également discutées. Des techniques moléculaires de détection de mutations

associées à la résistance aux antifongiques directement à partir du prélèvement ou après culture ont également été développées.

Une 3^{ème} partie aborde l'épidémiologie de la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. en réanimation. La résistance acquise aux échinocandines et/ou aux antifongiques azolés est particulièrement préoccupante pour l'espèce *C. glabrata*, possiblement en raison de son génome haploïde. Elle reste rare pour les autres espèces pathogènes du genre *Candida* spp. La pré-exposition aux échinocandines a été identifiée comme facteur de risque d'apparition de mutations associées à la résistance à ces antifongiques.

Enfin est discuté l'impact de la résistance aux antifongiques en pratique clinique. La résistance microbiologique doit être distinguée de la résistance clinique. La seule détermination des CMI est insuffisante pour prédire un échec clinique. En revanche, il a été montré que la détection de mutations des gènes *FKS* associées à la résistance aux échinocandines chez *C. glabrata* est un facteur prédictif d'échec clinique. La connaissance de l'épidémiologie locale, et en particulier de la prévalence de souches résistantes dans un site donné, est importante afin d'adapter la stratégie thérapeutique.

En conclusion, l'émergence de résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. est problématique et doit faire améliorer les pratiques d'utilisation des antifongiques. Plusieurs mesures, permettant de détecter et de prévenir le risque d'échec clinique sont proposées ici : (i) évaluation des traitements antifongiques antérieurs reçus par le patient, (ii) surveillance étroite des patients traités par antifongiques, (iii) détermination et surveillance de la sensibilité aux antifongiques en routine et (iv) développement de méthodes pour la détection rapide de mutations associées à la résistance aux antifongiques.

1.2. Revue

Danièle Maubon
Cécile Garnaud
Thierry Calandra
Dominique Sanglard
Muriel Cornet

Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?

Received: 15 May 2014
Accepted: 10 July 2014
Published online: 5 August 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and ESICM 2014

Take-home message: The emergence of resistance is a warning signal triggering improvements in antifungal drug use, particularly in patients for whom the potential benefit of treatment is unproven. Practical proposals to detect and prevent the risk of clinical failure are (i) accurate assessments of prior antifungal exposure, (ii) close clinical monitoring of patients treated with antifungal drugs, (iii) routine surveillance of in vitro susceptibility testing and (iv) development of feasible methods for rapid detection of mutations.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00134-014-3404-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Maubon (✉) · C. Garnaud · M. Cornet
Parasitologie-Mycologie, Institut de
Biologie et de Pathologie, CHU de
Grenoble, Grenoble, France

e-mail: dmaubon@chu-grenoble.fr
Tel.: +33 4 76 76 54 90

D. Maubon · C. Garnaud · M. Cornet
Laboratoire TIMC-TheREx, UMR 5525
CNRS-UJF, Université Grenoble Alpes,
Grenoble, France

T. Calandra
Infectious Diseases Service, Department of
Medicine, Centre Hospitalier Universitaire
Vaudois and University of Lausanne,
Lausanne, Switzerland

D. Sanglard
Institute of Microbiology, Centre
Hospitalier Universitaire Vaudois and
University of Lausanne, Lausanne,
Switzerland

Abstract Current increases in antifungal drug resistance in *Candida* spp. and clinical treatment failures are of concern, as invasive candidiasis is a significant cause of mortality in intensive care units (ICUs). This trend reflects the large and expanding use of newer broad-spectrum antifungal agents, such as triazoles and echinocandins. In this review, we

firstly present an overview of the mechanisms of action of the drugs and of resistance in pathogenic yeasts, subsequently focusing on recent changes in the epidemiology of antifungal resistance in ICU. Then, we emphasize the clinical impacts of these current trends. The emergence of clinical treatment failures due to resistant isolates is described. We also consider the clinical usefulness of recent advances in the interpretation of antifungal susceptibility testing and in molecular detection of the mutations underlying acquired resistance. We pay particular attention to practical issues relating to ICU patient management, taking into account the growing threat of antifungal drug resistance.

Keywords Antifungal resistance · Resistance mechanisms · *Candida* resistance · Intensive care unit · Clinical resistance · Microbial resistance

Introduction

Invasive candidiasis is a major threat to intensive care unit (ICU) patients, causing significant mortality. An early initiation of antifungal therapy is crucial to improve the prognosis [1, 2]. However, the performance of current diagnostic tools for confirming the diagnosis remains limited. Increasing numbers of ICU patients without

documented candidiasis are therefore receiving prophylactic or empirical antifungal treatments in an attempt to decrease *Candida*-related mortality. This strategy has been encouraged by the introduction of new, better-tolerated antifungal drugs, such as triazoles and echinocandins, leading to stronger selective pressure [3, 4]. Antifungal drug resistance was considered less problematic in *Candida* spp. than in other pathogens, but

of the *FCY2* gene encoding the cytosine permease, and (2) impaired metabolism of the drug or its active metabolite (5-FU) due to mutations of *FCY1* or *FURI*. Such mutations have been described in clinical isolates of *C. albicans* and *C. lusitanae* [29, 30].

Antifungal drug resistance in *Candida* spp. biofilms

In ICUs, candidiasis may be favoured by biofilms formation, mostly on catheters but also on other implanted medical devices. Only a few antifungal drugs (L-AMB and echinocandins) have some efficacy against yeasts embedded in such complex structures [31]. Echinocandins are active against biofilms, but are more effective against biofilms containing *C. albicans* or *C. glabrata* than against biofilms of *C. tropicalis* or *C. parapsilosis* [32, 33]. Conversely, yeast cells in biofilms are up to 1,000 times more resistant to azoles than their planktonic counterparts [34].

The resistance of biofilms combines both planktonic and biofilm-specific resistance mechanisms. Efflux pump upregulation is involved in the early stages of biofilm development, whereas the greater resistance of mature biofilms is due to the presence of an extracellular matrix (ECM) and persister cells, changes to the sterol composition of the membrane and the activation of stress-induced pathways [35–37]. The ECM plays a key role, by sequestering antifungal agents and preventing their interaction with the target. This action is mediated at least by (1,3)- β -D-glucan polymers [38]. Stress responses, mediated by the PKC, calcineurin and heat shock protein 90 (HSP90) pathways, also control ECM production [35, 39]. Extracellular DNA also affects biofilm resistance and the treatment of *C. albicans* biofilms with DNase potentiates the antifungal activity of echinocandins and polyenes, but not fluconazole [40]. Persister cells have been described in *Candida* spp. biofilms, particularly those formed by *C. krusei* and *C. albicans*. These cells are phenotypic variants able to survive in the presence of antifungal agents. They can again proliferate when drug pressure is released and may cause relapses often described in clinical situations [35, 37].

Laboratory detection of antifungal resistance

Antifungal drug susceptibility testing assays

Methods for in vitro susceptibility testing are available from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [41, 42]. Other commercially available standardised tests, such as Etest[®] (bioMérieux), Sensititre YeastOne[®] (TREK diagnostic

systems), ATB fungus 2[®] (bioMérieux) and Vitek-2[®] (bioMérieux), are more appropriate for routine clinical use [43–45]. These tests determine the minimum inhibitory concentration (MIC) or directly classify isolates as susceptible (S), intermediate (I) or resistant (R), corresponding to a high probability of treatment success (S), an uncertain effect of treatment (I) or a high probability of treatment failure (R). This classification is based on the clinical breakpoints (CBPs) established for MIC interpretation. Previous CBPs were not species-specific and were too high to distinguish between *C. glabrata* isolates susceptible and resistant to azoles and to detect emerging resistance in *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. In addition, clinical resistance to echinocandins due to *FKS* mutations was increasingly being reported in patients infected with “S” strains, defined with a former CBP of 2 μ g/ml or less. Up to 45 % of *FKS* mutants have been incorrectly considered as susceptible [7, 46, 47].

The revised CBPs in current use are species-specific and were established on the basis of five parameters: dose regimens; MIC distributions from multiple laboratories; epidemiologic cut-off values defined with respect to the higher MIC of wild-type isolates; pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters and clinical outcome [20]. The key changes concern the susceptibility of *C. glabrata* and *C. parapsilosis* to fluconazole and echinocandins, respectively. The “S” category was abolished by CLSI and EUCAST for *C. glabrata* and fluconazole, considering all isolates to be intermediate or resistant. EUCAST was even more severe in its approach, recommending, as for *C. krusei*, that *C. glabrata* should not be tested with fluconazole and that fluconazole should not be used for *C. glabrata* infections [48]. The same removal of the “S” category was recommended, albeit only by EUCAST, for *C. parapsilosis* and echinocandins [20]. One other major difference between CLSI and EUCAST is that this latter does not determine CBPs for caspofungin. Indeed, CLSI and EUCAST agree that there is a lack of interlaboratory reproducibility in MIC values for caspofungin. Until this problem, not seen with other echinocandins, is resolved, neither CLSI nor EUCAST recommends caspofungin resistance testing [49–52]. EUCAST specifies that some mutations decrease susceptibility to anidulafungin and caspofungin but not micafungin, and thus recommends the use of anidulafungin as a marker for echinocandin resistance [20] (see Table 1 for simplified CLSI and EUCAST updated CBPs). Both CLSI and EUCAST also determined epidemiological cut-off values which are more sensitive than CBP to detect non-wild-type isolates exhibiting potential resistance mutations and mechanisms.

AMB testing remains particularly challenging and microbiological resistance is rarely detected [53]. Etest[®] (bioMérieux) was found to be superior to both CLSI and EUCAST reference methods for identifying resistant and intermediately susceptible *C. glabrata* isolates [54]. Thus,

Table 1 EUCAST and CLSI antifungal breakpoints for the main *Candida* species

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/l)									
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	≤S	>R	≤S	>R	≤S	>R	≤S	>R	≤S	>R
Amphotericin B										
EUCAST	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CLSI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fluconazole										
EUCAST	2	4	0.002	32	–	–	2	4	2	4
CLSI	2	4	0.002	32	–	–	2	4	2	4
Voriconazole										
EUCAST	0.12	0.12	IE	IE	IE	IE	0.12	0.12	0.12	0.12
CLSI	0.12	0.5	–	–	0.5	1	0.12	0.5	0.12	0.5
Anidulafungin										
EUCAST	0.03	0.03	0.06	0.06	0.06	0.06	0.002	4	0.06	0.06
CLSI	0.25	0.5	0.12	0.25	0.25	0.5	2	4	0.25	0.5
Micafungin										
EUCAST	0.016	0.016	0.03	0.03	IE	IE	0.002	2	IE	IE
CLSI	0.25	0.5	0.06	0.12	0.25	0.5	2	4	0.25	0.5

Adapted from Arendrup et al. [20] drug resistance updates (doi:10.1016/j.drug.2014.01.001) with permission. For complete data, see Arendrup et al. [20]

ND not done, IE insufficient evidence

AMB resistance is mainly identified through clinical failure.

While current MIC testing protocols are adapted for planktonic cells, these protocols are still not implemented in biofilms. Since biofilms can be detected in infected tissues, this is clearly another limitation in the interpretation of susceptibility tests for predicting patient outcome.

The performance of direct antifungal drug susceptibility testing, through the use of Etest[®] (bioMérieux) on positive blood samples, has been evaluated. Agreement between direct and standard methods was high and false-positive results for resistance to fluconazole and voriconazole were obtained for 7 % of isolates, with false-negative results obtained for 0.6 % of blood samples. No errors were detected for caspofungin, but the method was not reliable for AMB [55]. The new CBPs are species-specific, so this approach requires a rapid identification tool. Direct antifungal drug susceptibility testing should therefore be re-evaluated, according to the current standards, for both categorisation and identification.

Molecular detection of mutations conferring antifungal drug resistance

Molecular methods have been developed for the characterisation of resistance-causing mutations. Culture-based susceptibility assays take at least 24 h, but molecular tools can assess resistance more rapidly and with greater sensitivity. Both azole and echinocandin resistance mutations are accurately detected with next-generation sequencing platforms, allele-specific real-time probes,

melt curve analysis or microarrays, or microsphere-based technologies, such as Luminex Mag Pix (Austin, TX) [56–60] (C. Garnaud, personal communication). Moreover, as in *Aspergillus fumigatus* azole resistance, the direct detection of mutations in clinical samples may make it possible to detect mutations earlier by eliminating the time required for culture [61].

Update on the epidemiology of *Candida* spp. antifungal resistance

When focusing on species distribution and antifungal resistance, recent epidemiological studies, including the SENTRY cohort, did not show major differences between ICU and non-ICU patients [62, 63]. In both ICU and non-ICU, the five main species (i.e. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. krusei*) are responsible for more than 90 % of invasive fungal infections [62–65]. *C. albicans* still stands in first place, even if, since the early 2000s, a shift towards non-*albicans* species was clearly noticed [66, 67]. The fluconazole drug pressure may explain this trend but other factors, mainly underlying conditions or antibacterial therapy, have been suggested [68]. A main difference in species distribution is related to geographical location. In southern countries (Italy, Spain, South America) *C. parapsilosis* ranks second while in northern countries *C. glabrata* is the most frequent species after *C. albicans* [69]. These site specificities highlight the importance of local data on *Candida* epidemiology, specific to each health-care centre.

Table 2 Spectrum of activity of the antifungal agents used to treat invasive candidiasis

<i>Candida</i> spp.	Polyenes	Azoles				Echinocandins			Flucytosine
	AMB formulations	FLU	ITRA	VOR	POSA	CAS	MIC	ANI	
<i>C. albicans</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. glabrata</i>	+ ^a	+/-	+/-	+	+	++	++	++	++
<i>C. parapsilosis</i>	++	++	++	++	++	+	+	+	++
<i>C. tropicalis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. krusei</i>	+	-	+/-	+	+	++	++	++	-
<i>C. rugosa</i>	+ ^a	+	+	++	++	+	+	+	++
<i>C. guilliermondii</i>	++	++	++	++	++	+	+	+	++
<i>C. lusitaniae</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. inconspicua</i>	++	-	+/-	+	+	++	++	++	NS
<i>C. norvegensis</i>	++	-	+/-	+/-	+/-	++	++	++	NS

Adapted with permission from Denning DW, Hope WW (2010) Trends Microbiol (doi:10.1016/j.tim.2010.02.004). In vitro inherent activity: ++ good activity, + mild activity, +/- slight activity, - no activity; NS not specified

AMB amphotericin B, FLU fluconazole, ITRA itraconazole, VOR voriconazole, POSA posaconazole, CAS caspofungin, MIC micafungin, ANI anidulafungin

^a This slight decrease in susceptibility to AMB is more pronounced in North America than in Europe

Indeed, some non-*albicans* species show intrinsic resistance. For example *C. glabrata* and *C. krusei* are less susceptible to azoles than other species (Table 2; [70–72]) and *C. parapsilosis* is less susceptible to echinocandins owing to naturally occurring polymorphisms of the *FKS* genes [73, 74]. Breakthrough infections with these species may therefore occur during azoles or echinocandin treatment [75, 76].

Another major and increasing threat is the risk of becoming infected with a strain which has acquired a resistant phenotype. Acquired resistance is thought to be rare in *Candida* spp., or at least less frequent than intrinsic resistance. Fortunately, yeasts, unlike bacteria, do not display the horizontal transmission of resistance genes [77]. Moreover, cross-contamination between patients and health-care workers has been described mostly for *C. albicans* and *C. parapsilosis* but remains rare [69, 78, 79]. Acquired resistance thus results principally from the selection of mutants subjected to drug pressure in patients.

Acquired resistance to echinocandins is increasingly reported for most of the clinically important *Candida* spp. It remains uncommon in *C. albicans* (<1%), *C. tropicalis* (<5%) and *C. krusei* (<7%), but is now becoming frequent in *C. glabrata* (8–15%) [5, 63, 80, 81]. One recent study showed that the frequency of echinocandin resistance in *C. glabrata* increased from 4.9 to 12.3% between 2001 and 2010 [5]. It has been shown that 7 days of exposure to echinocandin is sufficient to induce *FKS* mutations in *C. glabrata* [5, 6]. The haploid trait of this species may partly explain the higher level of expression of molecular resistance exhibited by *C. glabrata*. *FKS* mutations have been described in almost all the clinically important *Candida* species: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* [82, 83],

C. krusei [84] and *C. kefyr* [85] and breakthrough infections are also increasingly reported [7, 75, 76, 86–90]. A recent study focusing on *C. glabrata* candidemia described 18% of *FKS* mutation, with prior echinocandin exposure as the only independent risk factor for the development of these mutations [91] confirming the results obtained previously by Alexander et al. [5]. Interestingly, the nature and/or the number of *FKS* mutations in *C. glabrata* and *C. albicans* influences the level of resistance in vivo [91, 92]. Even if the microbiological resistance to echinocandins is still uncommon, the growing incidence of *FKS* mutations is worrying and needs to be very closely monitored. *FKS* resistance mutations also need to be more deeply studied.

Azoles and especially fluconazole are widely prescribed for ICU patients. Acquired fluconazole resistance is frequent in *C. glabrata* (from 4 to 16%), which increasingly displays cross-resistance to voriconazole. So far, multidrug-resistant phenotype against azole and echinocandins has only been described for *C. glabrata* and is a matter of serious concern [5, 63, 66, 80, 81, 93, 94]. Fluconazole resistance remains uncommon in *C. albicans* (<5%), but is more prevalent in *C. parapsilosis* (4–10%) and *C. tropicalis* (4–9%) [63, 64, 81]. However, the recent China-SCAN study reported higher rates of fluconazole resistance in *C. albicans* (9.6%) and *C. parapsilosis* (19.3%) which may reflect geographical differences [93]. Again, most studies report that a previous history of azole pre-exposure increases the risk of in vitro azole resistance (from 2 to 58% in a 2013 study by Montagna et al. [65]).

Resistance to AMB remains rare despite its use in monotherapy for years. This may be due to its inherently fungicidal effect, limiting the selection of mutants. However, resistant isolates of *C. glabrata* and *C. krusei*

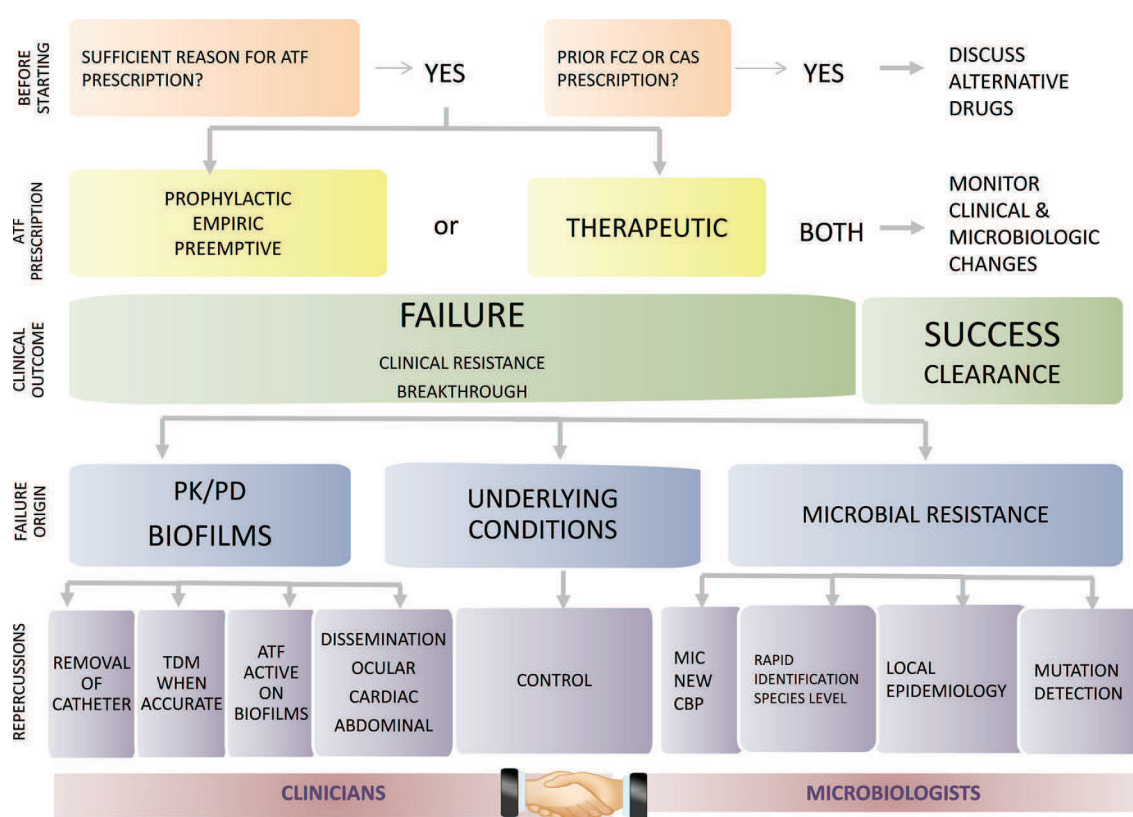


Fig. 3 Bedside strategy for circumventing antifungal drug resistance in 2014. *ATF* antifungal drug, *FCZ* fluconazole, *CAS* caspofungin, *PK/PD* pharmacokinetics and pharmacodynamics,

TDM therapeutic drug monitoring, *MIC* minimal inhibitory concentration, *CBP* clinical breakpoint

Similar predictive markers have been suggested for azole resistance. Exposure to fluconazole in the last 30 days has been shown to have a significant impact on species distribution and MIC [4]. Algorithms have also been developed for assessment of the growing risk of *C. glabrata* infections. Cohen et al. identified six independent risk factors for *C. glabrata* fungemia in ICU patients: age greater than 60 years, recent abdominal surgery, less than 7 days between ICU admission and first positive blood culture, recent use of cephalosporins, solid tumour and absence of diabetes mellitus [111].

Integration of clinical and microbiological data (as proposed in Fig. 3) is thus crucial to improve the prediction of treatment response. Previous exposure to fluconazole and echinocandin should be accurately monitored, although the exact period to be considered remains to be defined. Patients receiving prophylactic, empirical or targeted antifungal therapy should be carefully monitored for breakthrough infections. Local epidemiological investigations and MIC determinations for *Candida* spp. isolates are also crucial and should be interpreted with the most appropriate, revised CBPs. Molecular tools are also required for the rapid detection of mutant strains.

Impact of antifungal drug resistance on patient management

Epidemiological changes have a direct impact on clinical management, leading to the updating of international expert committee recommendations [104, 112–116]. These recommendations propose consensual attitudes to the management of invasive candidiasis, but divergence remains on several crucial, contentious points [107, 117, 118], which may be confusing for clinicians treating patients.

All experts agree that patients with *Candida*-positive blood cultures should be treated with systemic antifungal drugs, but ESCMID cites echinocandins as the only initial treatment with the highest levels of strength of recommendation (A) and quality of evidence (I) [104], whereas the European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA) consider fluconazole at the AI level of recommendation as a suitable alternative for patients with less severe or stable infection not previously exposed to azoles [10, 115, 116]. Indeed, in a recent study including 216 patients with *Candida*-induced septic shock, no difference

in mortality was observed between patients treated with fluconazole or with echinocandins [119]. In patients at risk of *C. glabrata* candidemia, echinocandins should be preferred. Voriconazole is not usually used as first-line therapy but it offers an alternate option for intrinsically less susceptible species (*C. krusei* or *C. glabrata*). Because acquired mutations can lead to cross-resistance to both fluconazole and voriconazole, a strain resistant to fluconazole should not be treated with voriconazole unless its susceptibility profile has been confirmed, or the mutation genetically characterized.

All expert panels strongly recommend the removal of central venous catheters 'whenever possible', but ESC-MID guidelines suggest that replacement is not formally required in patients treated with echinocandins or L-AMB [104]. Catheter exchange via a guide wire entails a risk of contaminating the new device with *Candida* and should be restricted to patients with limited venous access [107, 116, 120]. Given the specific link between *C. parapsilosis* and catheter infections and the low susceptibility of this species to echinocandins, catheter removal is appropriate in patients with invasive *C. parapsilosis* candidiasis. In stabilised patients infected with a fluconazole-susceptible isolate, with negative blood cultures, step-down therapy onto oral fluconazole is recommended, over a period of 3–10 days, depending on the guidelines considered.

Conclusions

Although drug resistance is rapidly spreading in *Candida* spp., antifungal treatments are still generally successful:

up to 80 % of *C. albicans* infections are cleared with echinocandins. Treatment success rates are also generally satisfactory for fluconazole. However, the emergence of antifungal resistance must be considered at the patient level in order to improve patient management. In ICUs, intrinsic resistance of *C. glabrata* and *C. krusei* to fluconazole can be detected and handled rapidly through correct species identification, detailed assessment of antifungal drug exposure and *Candida* spp. colonisation history. The emergence of acquired resistance during or after treatment is more worrying: it mostly involves *C. glabrata* and the echinocandins and leads to breakthrough infections or treatment failures. This highlights the need for (a) accurate assessments of prior antifungal exposure, (b) close monitoring of patients on antifungal drugs, (c) the routine surveillance of in vitro susceptibility testing and (d) the development of feasible methods for rapid detection of mutations. The emergence of resistance should also be considered at the community level as a warning sign triggering improvements in antifungal drug use, particularly in patients for whom the potential benefit of treatment is unproven. Closer monitoring of antifungal drug use is thus required.

Acknowledgments We are grateful to Audrey Le Gouëllec for her assistance in preparing the figures.

Conflicts of interest D. Maubon, C. Garnaud and M. Cornet received a research grant from Pfizer in 2013. T. Calandra: board membership: Pfizer; Consultancy: Pfizer, MSD; Speakers bureaus: BioMérieux, Pfizer; Development & educational presentations: MSD, Gilead Sciences (money to institution); Travel & meeting expenses: Astellas, Pfizer.

References

1. León C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M (2014) What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med.* doi: [10.1007/s00134-014-3281-0](https://doi.org/10.1007/s00134-014-3281-0)
2. Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G et al (2009) Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: part II. *Treatment Intensive Care Med* 35:206–214. doi: [10.1007/s00134-008-1339-6](https://doi.org/10.1007/s00134-008-1339-6)
3. Fournier P, Schwebel C, Maubon D et al (2011) Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 66:2880–2886
4. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K et al (2011) Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 55:532–538. doi: [10.1128/AAC.01128-10](https://doi.org/10.1128/AAC.01128-10)
5. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD et al (2013) Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis* 56:1724–1732. doi: [10.1093/cid/cit136](https://doi.org/10.1093/cid/cit136)
6. Shields RK, Nguyen MH, Press EG et al (2013) Caspofungin MICs correlate with treatment outcomes among patients with *Candida glabrata* invasive candidiasis and prior echinocandin exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3528–3535. doi: [10.1128/AAC.00136-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00136-13)
7. Perlin DS (2011) Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol* 6:441–457. doi: [10.2217/fmb.11.19](https://doi.org/10.2217/fmb.11.19)
8. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11:272–279

9. Sorgo AG, Heilmann CJ, Dekker HL et al (2011) Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 10:1071–1081. doi: [10.1128/EC.05011-11](https://doi.org/10.1128/EC.05011-11)
10. Pfaller M, Riley J (1992) Effects of fluconazole on the sterol and carbohydrate composition of four species of *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11:152–156
11. Gray KC, Palacios DS, Dailey I et al (2012) Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2234–2239. doi: [10.1073/pnas.1117280109](https://doi.org/10.1073/pnas.1117280109)
12. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG et al (2014) Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol* 10:400–406. doi: [10.1038/nchembio.1496](https://doi.org/10.1038/nchembio.1496)
13. Kotler-Brajtburg J, Price HD, Medoff G et al (1974) Molecular basis for the selective toxicity of amphotericin B for yeast and filipin for animal cells. *Antimicrob Agents Chemother* 5:377–382
14. Hamill RJ (2013) Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs* 73:919–934. doi: [10.1007/s40265-013-0069-4](https://doi.org/10.1007/s40265-013-0069-4)
15. Walker LA, Gow NAR, Munro CA (2010) Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* 47:117–126. doi: [10.1016/j.fgb.2009.09.003](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.09.003)
16. Sanglard D, Ischer F, Marchetti O et al (2003) Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* 48:959–976
17. LaFayette SL, Collins C, Zaas AK et al (2010) PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog* 6:e1001069. doi: [10.1371/journal.ppat.1001069](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001069)
18. Lee KK, Maccallum DM, Jacobsen MD et al (2012) Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 56:208–217. doi: [10.1128/AAC.00683-11](https://doi.org/10.1128/AAC.00683-11)
19. Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O (2014) Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1071–1083. doi: [10.1128/AAC.00946-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00946-13)
20. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW (2014) Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist Updat* 16(6):81–95. doi: [10.1016/j.drup.2014.01.001](https://doi.org/10.1016/j.drup.2014.01.001)
21. Coste A, Selmecki A, Forche A et al (2007) Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 6:1889–1904
22. Sanglard D, Coste A, Ferrari S (2009) Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 9:1029–1050. doi: [10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x)
23. Coste A, Turner V, Ischer F et al (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. doi: [10.1534/genetics.105.054767](https://doi.org/10.1534/genetics.105.054767)
24. Morio F, Loge C, Besse B et al (2010) Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66:373–384. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006)
25. Morio F, Pagniez F, Lacroix C et al (2012) Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol D5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother* 67:2131–2138. doi: [10.1093/jac/dks186](https://doi.org/10.1093/jac/dks186)
26. Poláková S, Blume C, Zárate JA et al (2009) Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2688–2693. doi: [10.1073/pnas.0809793106](https://doi.org/10.1073/pnas.0809793106)
27. Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F et al (2011) Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1852–1860. doi: [10.1128/AAC.01271-10](https://doi.org/10.1128/AAC.01271-10)
28. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R et al (2013) Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol* 11:e1001692. doi: [10.1371/journal.pbio.1001692](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001692)
29. Spampinato C, Leonardi D (2013) *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Bio Med Res Int* 2013:204237. doi: [10.1155/2013/204237](https://doi.org/10.1155/2013/204237)
30. Florent M, Noël T, Ruprich-Robert G et al (2009) Nonsense and missense mutations in FCY2 and FCY1 genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2982–2990. doi: [10.1128/AAC.00880-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00880-08)
31. Delattin N, Cammue BPA, Thevissen K (2014) Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem* 6:77–90. doi: [10.4155/fmc.13.189](https://doi.org/10.4155/fmc.13.189)
32. Kuhn DM, George T, Chandra J et al (2002) Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1773–1780
33. Choi HW, Shin JH, Jung SI et al (2007) Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1520–1523. doi: [10.1128/AAC.01141-06](https://doi.org/10.1128/AAC.01141-06)
34. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J (2004) Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother* 53:383–385. doi: [10.1093/jac/dkh071](https://doi.org/10.1093/jac/dkh071)
35. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR (2013) Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol* 8:1325–1337. doi: [10.2217/fmb.13.101](https://doi.org/10.2217/fmb.13.101)
36. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E (2012) Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses* 55:199–204. doi: [10.1111/j.1439-0507.2011.02076.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02076.x)
37. Mathé L, Van Dijck P (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet*. doi: [10.1007/s00294-013-0400-3](https://doi.org/10.1007/s00294-013-0400-3)

38. Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA et al (2013) Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-*albicans Candida* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 57:1918–1920. doi: [10.1128/AAC.02378-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02378-12)
39. Robbins N, Uppuluri P, Nett J et al (2011) Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathog* 7:e1002257. doi: [10.1371/journal.ppat.1002257](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002257)
40. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R (2012) Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses* 55:80–85. doi: [10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x)
41. EUCAST (2008) EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 14:398–405
42. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Third informational supplement. CLSI document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne
43. Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M (2002) Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol* 40:3841–3844
44. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A et al (2010) Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the sensititre yeastone and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol* 48:1782–1786. doi: [10.1128/JCM.02316-09](https://doi.org/10.1128/JCM.02316-09)
45. Lombardi G, Farina C, Andreoni S et al (2004) Comparative evaluation of Sensititre YeastOne vs. the NCCLS M27A protocol and E-test for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Mycoses* 47:397–401. doi: [10.1111/j.1439-0507.2004.01013.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01013.x)
46. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D et al (2011) Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat* 14:164–176. doi: [10.1016/j.drup.2011.01.004](https://doi.org/10.1016/j.drup.2011.01.004)
47. Arendrup MC, Garcia-Effron G, Buzina W et al (2009) Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1185–1193. doi: [10.1128/AAC.01292-08](https://doi.org/10.1128/AAC.01292-08)
48. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ et al (2010) Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 13:180–195. doi: [10.1016/j.drup.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.09.002)
49. Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA et al (2013) Interlaboratory variability of caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother* 57:5836–5842. doi: [10.1128/AAC.01519-13](https://doi.org/10.1128/AAC.01519-13)
50. Pfaller MA, Messer SA, Diekema DJ et al (2014) Use of micafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 3,764 clinical isolates of *Candida* by use of CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol* 52:108–114. doi: [10.1128/JCM.02481-13](https://doi.org/10.1128/JCM.02481-13)
51. Eschenauer GA, Nguyen MH, Shoham S et al (2014) Real-world experience with echinocandin MICs against *Candida* species in a multicenter study of hospitals that routinely perform susceptibility testing of bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1897–1906. doi: [10.1128/AAC.02163-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02163-13)
52. Shields RK, Nguyen MH, Press EG et al (2013) Anidulafungin and micafungin minimum inhibitory concentration breakpoints are superior to caspofungin for identifying *FKS* mutant *Candida glabrata* and echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. doi: [10.1128/AAC.01451-13](https://doi.org/10.1128/AAC.01451-13)
53. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA et al (2006) Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida glabrata* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1287–1292. doi: [10.1128/AAC.50.4.1287-1292.2006](https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1287-1292.2006)
54. Krogh-Madsen M, Arendrup MC, Heslet L, Knudsen JD (2006) Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin Infect Dis* 42:938–944. doi: [10.1086/500939](https://doi.org/10.1086/500939)
55. Guinea J, Recio S, Escibano P et al (2010) Rapid antifungal susceptibility determination for yeast isolates by use of Etest performed directly on blood samples from patients with fungemia. *J Clin Microbiol* 48:2205–2212. doi: [10.1128/JCM.02321-09](https://doi.org/10.1128/JCM.02321-09)
56. Wiederhold NP, Grabinski JL, Garcia-Effron G et al (2008) Pyrosequencing to detect mutations in *FKS1* that confer reduced echinocandin susceptibility in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4145–4148. doi: [10.1128/AAC.00959-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00959-08)
57. Park S, Perlin DS (2005) Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb Drug Resist* 11:232–238. doi: [10.1089/mdr.2005.11.232](https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.232)
58. Loeffler J, Hagemeyer L, Hebart H et al (2000) Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clin Chem* 46:631–635
59. Wang H, Kong F, Sorrell TC et al (2009) Rapid detection of ERG11 gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing. *BMC Microbiol* 9:167. doi: [10.1186/1471-2180-9-167](https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-167)
60. Pham CD, Bolden CB, Kuykendall RJ, Lockhart SR (2013) Development of a Luminex-based multiplex assay for detection of mutations conferring resistance to echinocandins in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. doi: [10.1128/JCM.03378-13](https://doi.org/10.1128/JCM.03378-13)
61. Zhao Y, Stensvold CR, Perlin DS, Arendrup MC (2013) Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* from bronchoalveolar lavage fluid samples of patients with chronic diseases. *J Antimicrob Chemother* 68:1497–1504. doi: [10.1093/jac/dkt071](https://doi.org/10.1093/jac/dkt071)

62. Bassetti M, Merelli M, Righi E et al (2013) Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol* 51:4167–4172. doi: [10.1128/JCM.01998-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01998-13)
63. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ et al (2011) *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY antimicrobial surveillance program (2008–2009). *Int J Antimicrob Agents* 38:65–69. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2011.02.016](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.016)
64. Puig-Asensio M, Pemán J, Zaragoza R et al (2014) Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med* 42:1423–1432. doi: [10.1097/CCM.0000000000000221](https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000221)
65. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G et al (2013) Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection* 41:645–653. doi: [10.1007/s15010-013-0432-0](https://doi.org/10.1007/s15010-013-0432-0)
66. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L et al (2012) The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73:45–48. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.001](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.001)
67. Chow JK, Golan Y, Ruthazer R et al (2008) Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 46:1206–1213. doi: [10.1086/529435](https://doi.org/10.1086/529435)
68. Kanafani ZA, Perfect JR (2008) Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 46:120–128. doi: [10.1086/524071](https://doi.org/10.1086/524071)
69. Guinea J (2014) Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*. doi:[10.1111/1469-0691.12539](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539)
70. Pfaller MA, Diekema DJ (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36:1–53
71. Guitard J, Angoulvant A, Letscher-Bru V et al (2013) Invasive infections due to *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*: report of 12 cases and review of the literature. *Med Mycol*. doi: [10.3109/13693786.2013.807444](https://doi.org/10.3109/13693786.2013.807444)
72. Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL et al (2006) *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* 44:3578–3582. doi: [10.1128/JCM.00863-06](https://doi.org/10.1128/JCM.00863-06)
73. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S et al (2008) A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in *FKS1p* in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2305–2312. doi: [10.1128/AAC.00262-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00262-08)
74. Cantón E, Pemán J, Sastre M et al (2006) Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2829–2832. doi: [10.1128/AAC.00524-06](https://doi.org/10.1128/AAC.00524-06)
75. Kabbara N, Lacroix C, Peffault de Latour R et al (2008) Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica* 93:639–640. doi: [10.3324/haematol.11149](https://doi.org/10.3324/haematol.11149)
76. Pfeiffer CD, Garcia-Effron G, Zaas AK et al (2010) Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol* 48:2373–2380
77. Anderson JB (2005) Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* 3:547–556. doi: [10.1038/nrmicro1179](https://doi.org/10.1038/nrmicro1179)
78. Marco F, Lockhart SR, Pfaller MA et al (1999) Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. *J Clin Microbiol* 37:2817–2828
79. Stéphan F, Bah MS, Desterke C et al (2002) Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis* 35:1477–1483. doi: [10.1086/344648](https://doi.org/10.1086/344648)
80. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR et al (2012) Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 50:1199–1203. doi: [10.1128/JCM.06112-11](https://doi.org/10.1128/JCM.06112-11)
81. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH et al (2012) Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clin Infect Dis* 55:1352–1361. doi: [10.1093/cid/cis697](https://doi.org/10.1093/cid/cis697)
82. Garcia-Effron G, Chua DJ, Tomada JR et al (2010) Novel *FKS* mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2225–2227. doi: [10.1128/AAC.00998-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00998-09)
83. Garcia-Effron G, Kontoyiannis DP, Lewis RE, Perlin DS (2008) Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4181–4183. doi: [10.1128/AAC.00802-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00802-08)
84. Hakki M, Staab JF, Marr KA (2006) Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to Caspofungin during therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2522–2524. doi: [10.1128/AAC.00148-06](https://doi.org/10.1128/AAC.00148-06)
85. Fekkar A, Meyer I, Brossas JY et al (2013) Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida kefyr* fungemia treatment with caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2380–2382. doi: [10.1128/AAC.02037-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02037-12)
86. Pfaller MA (2012) Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 125:S3–S13. doi:[10.1016/j.amjmed.2011.11.001](https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001)
87. Bizerra FC, Jimenez-Ortigosa C, Souza ACR et al (2014) Breakthrough candidemia due to multidrug resistant *C. glabrata* during prophylaxis with low dose of micafungin. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2438–2440. doi: [10.1128/AAC.02189-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02189-13)
88. Chan TSY, Gill H, Hwang Y–Y et al (2014) Breakthrough invasive fungal diseases during echinocandin treatment in high-risk hospitalized hematologic patients. *Ann Hematol* 93:493–498. doi: [10.1007/s00277-013-1882-2](https://doi.org/10.1007/s00277-013-1882-2)
89. Sun H–Y, Singh N (2010) Characterisation of breakthrough invasive mycoses in echinocandin recipients: an evidence-based review. *Int J Antimicrob Agents* 35:211–218. doi:[10.1016/j.ijantimicag.2009.09.020](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.09.020)

90. Myoken Y, Kyo T, Sugata T et al (2006) Breakthrough fungemia caused by fluconazole-resistant *Candida albicans* with decreased susceptibility to voriconazole in patients with hematologic malignancies. *Haematologica* 91:287–288.
91. Beyda ND, John J, Kilic A et al (2014) *FKS* mutant *Candida glabrata*; risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis*. doi: [10.1093/cid/ciu407](https://doi.org/10.1093/cid/ciu407)
92. Lackner M, Tscherner M, Schaller M et al (2014) Positions and numbers of *FKS* mutations in *Candida albicans* selectively influence in vitro and in vivo susceptibilities to echinocandin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3626–3635. doi: [10.1128/AAC.00123-14](https://doi.org/10.1128/AAC.00123-14)
93. Liu W, Tan J, Sun J et al (2014) Invasive candidiasis in intensive care units in China: in vitro antifungal susceptibility in the China-SCAN study. *J Antimicrob Chemother* 69:162–167. doi: [10.1093/jac/dkt330](https://doi.org/10.1093/jac/dkt330)
94. Chapeland-Leclerc F, Hennequin C, Papon N et al (2010) Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1360–1362. doi: [10.1128/AAC.01138-09](https://doi.org/10.1128/AAC.01138-09)
95. Pfaller MA, Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20:133–163. doi: [10.1128/CMR.00029-06](https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06)
96. Yang Y-L, Li S-Y, Cheng H-H et al (2005) The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. *BMC Infect Dis* 5:99. doi: [10.1186/1471-2334-5-99](https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-99)
97. Kontoyiannis DP, Lewis RE (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359:1135–1144. doi: [10.1016/S0140-6736\(02\)08162-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08162-X)
98. Silva S, Negri M, Henriques M et al (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 36:288–305. doi: [10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x)
99. Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA et al (2008) Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis* 47:674–683. doi: [10.1086/590566](https://doi.org/10.1086/590566)
100. Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C et al (1999) Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N Engl J Med* 340:764–771. doi: [10.1056/NEJM199903113401004](https://doi.org/10.1056/NEJM199903113401004)
101. Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ (2009) Liposomal amphotericin B. *Drugs* 69:361–392. doi: [10.2165/00003495-200969030-00010](https://doi.org/10.2165/00003495-200969030-00010)
102. Andes DR, Safdar N, Baddley JW et al (2012) Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis* 54:1110–1122. doi: [10.1093/cid/cis021](https://doi.org/10.1093/cid/cis021)
103. Puig-Asensio M, Pemán J, Zaragoza R et al (2014) Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med*. doi: [10.1097/CCM.0000000000000221](https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000221)
104. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T et al (2012) ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 18(Suppl 7):19–37. doi: [10.1111/1469-0691.12039](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12039)
105. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L et al (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
106. Felton T, Troke PF, Hope WW (2014) Tissue penetration of antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 27:68–88. doi: [10.1128/CMR.00046-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00046-13)
107. Glöckner A, Cornely OA (2013) Practical considerations on current guidelines for the management of non-neutropenic adult patients with candidemia: practical considerations on current guidelines. *Mycoses* 56:11–20. doi: [10.1111/j.1439-0507.2012.02208.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02208.x)
108. Shields RK, Nguyen MH, Press EG et al (2012) The presence of an *FKS* mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4862–4869. doi: [10.1128/AAC.00027-12](https://doi.org/10.1128/AAC.00027-12)
109. Baixench M-T, Aoun N, Desnos-Ollivier M et al (2007) Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chemother* 59:1076–1083. doi: [10.1093/jac/dkm095](https://doi.org/10.1093/jac/dkm095)
110. Bourgeois N, Laurens C, Bertout S et al (2014) Assessment of caspofungin susceptibility of *Candida glabrata* by the Etest®, CLSI, and EUCAST methods, and detection of *FKS1* and *FKS2* mutations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. doi: [10.1007/s10096-014-2069-z](https://doi.org/10.1007/s10096-014-2069-z)
111. Cohen Y, Karoubi P, Adrie C et al (2010) Early prediction of *Candida glabrata* fungemia in nonneutropenic critically ill patients. *Crit Care Med* 38:826–830. doi: [10.1097/CCM.0b013e3181cc4734](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181cc4734)
112. Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA et al (2011) Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses* 54:279–310. doi: [10.1111/j.1439-0507.2011.02040.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02040.x)
113. Colombo AL, Guimarães T, Camargo LFA et al (2013) Brazilian guidelines for the management of candidiasis—a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis* 17:283–312. doi: [10.1016/j.bjid.2013.02.001](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.001)
114. Bow EJ, Evans G, Fuller J et al (2010) Canadian clinical practice guidelines for invasive candidiasis in adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 21:e122–e150
115. Castagna L, Bramanti S, Sarina B et al (2012) ECIL 3-2009 update guidelines for antifungal management. *Bone Marrow Transpl* 47:866
116. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D et al (2009) *Candida*-clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:503–535. doi: [10.1086/596757](https://doi.org/10.1086/596757)
117. Leroux S, Ullmann AJ (2013) Management and diagnostic guidelines for fungal diseases in infectious diseases and clinical microbiology: critical appraisal. *Clin Microbiol Infect* 19:1115–1121. doi: [10.1111/1469-0691.12426](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12426)

-
118. Deshpande A, Gaur S, Bal AM (2013) Candidaemia in the non-neutropenic patient: a critique of the guidelines. *Int J Antimicrob Agents* 42:294–300. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2013.06.005](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.005)
119. Bassetti M, Righi E, Ansaldi F et al (2014) A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med* 40:839–845. doi: [10.1007/s00134-014-3310-z](https://doi.org/10.1007/s00134-014-3310-z)
120. Mermel LA, Allon M, Bouza E et al (2009) Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 49:1–45. doi: [10.1086/599376](https://doi.org/10.1086/599376)

Table S1. Overview of the genes involved in antifungal resistance in clinical isolates of *Candida* spp
(Limited to the 5 most frequent species involved in invasive candidiasis in ICUs and genes described in clinical isolates)

Mechanism of resistance	Antifungals	Genes involved in resistance (species)	Comments	Reference
Increased efflux	Azole antifungals	<i>TAC1</i> [*] , <u><i>CDR1</i></u> , <u><i>CDR2</i></u> (CA)	ABC transporters + role in biofilms	(1–3)
		<i>CgPDR1</i> [*] , <u><i>CgCDR1</i></u> , <u><i>CgCDR2</i></u> , <u><i>CgSNQ2</i></u> (CG)		
	Fluconazole	<i>MRR1</i> [*] (CA), <u><i>MDR1</i></u> (CA)	MFS transporters	(3,4)
Alteration of antifungal target	Azole antifungals	<i>ERG11</i> (CA, CG, CT)	Lanosterol-14 α -demethylase	(5–7)
	Echinocandins	<i>FKS1</i> (CA, CG, CK, CT, CP) <i>FKS2</i> (CG)	Beta-1,3-glucan synthase	(8)
Overexpression of antifungal target	Azole antifungals	<i>UPC2</i> [*] (CA), <u><i>ERG11</i></u> (CA, CT)		(3,9,10)
Metabolic by-pass	Azole antifungals	<i>ERG3</i> (CA)	Sterol $\Delta^{5,6}$ -desaturase	(11)
Changes in sterol composition of cell membranes	Amphotericin B	<i>ERG2</i> (CG) <i>ERG3</i> (CT, CG) <i>ERG5</i> (CA) <i>ERG6</i> (CG) <i>ERG11</i> in association with <i>ERG3</i> (CA)	Decrease or absence of ergosterol + role in biofilms	(4,12–16)
Chromosomic alterations	Azole antifungals	<i>ERG11</i> , <i>TAC1</i> , <i>CgPDR1</i> (CA, CG)	Increase of gene copy number	(3)
Reduced drug uptake	Flucytosine	<i>FCY2</i> (CA)	/	(17,18)
Alteration of drug metabolism	Flucytosine	<i>FCY1</i> , <i>FUR1</i> (CA)	/	

Bold = presence of mutations, underlined = overexpression, ^{*}= GOF mutations – transcription factors

CA: *C. albicans*, CG: *C. glabrata*, CP: *C. parapsilosis*, CK: *C. krusei*, CT: *C. tropicalis*

1. Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, et al. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*. 2006 Apr;172(4):2139–56.
2. Tsai H-F, Krol AA, Sarti KE, Bennett JE. *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1384–92.
3. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*. 2009 Oct;9(7):1029–50.

4. Eddouzi J, Lohberger A, Vogne C, Manai M, Sanglard D. Identification and antifungal susceptibility of a large collection of yeast strains isolated in Tunisian hospitals. *Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol*. 2013 Oct;51(7):737–46.
5. Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Apr;68(4):778–85.
6. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Apr;66(4):373–84.
7. Hull CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AGS, et al. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in ERG11 and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Aug;56(8):4223–32.
8. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW. Breakpoints for antifungal agents: An update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. 2014 Jan 27;
9. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, Toner G, Chadwick SG, Gyax SE, et al. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2012 Oct;11(10):1289–99.
10. Vasicek EM, Berkow EL, Flowers SA, Barker KS, Rogers PD. UPC2 is Universally Essential for Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2014 Mar 21;
11. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Sep;67(9):2131–8.
12. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AGS, et al. Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4527–33.
13. Hull CM, Bader O, Parker JE, Weig M, Gross U, Warrilow AGS, et al. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6417–21.
14. Vandeputte P, Tronchin G, Larcher G, Ernoult E, Bergès T, Chabasse D, et al. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Oct;52(10):3701–9.

15. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AGS, et al. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14alpha-demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Sep;54(9):3578–83.
16. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. *PLoS Biol.* 2013 Oct 29;11(10):e1001692.
17. Florent M, Noël T, Ruprich-Robert G, Da Silva B, Fitton-Ouhabi V, Chastin C, et al. Nonsense and missense mutations in FCY2 and FCY1 genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jul;53(7):2982–90.
18. Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Res Int.* 2013;2013:204237.

ND, not done; IP, in preparation; IE, insufficient evidence.

Notes:

¹ Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints.

² The ECOFFs for these species are in general higher than for *C. albicans*.

³ Due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin, EUCAST breakpoints have not yet been established.

⁴ MICs for *C. tropicalis* are 1–2 two-fold dilution steps higher than for *C. albicans* and *C. glabrata*. In the clinical study successful outcome was numerically slightly lower for *C. tropicalis* than for *C. albicans* at both dosages (100 and 150 mg daily). However, the difference was not significant and whether it translates into a relevant clinical difference is unknown. MICs for *C. krusei* are approximately three two-fold dilution steps higher than those for *C. albicans* and, similarly, those for *C. guilliermondii* are approximately eight two-fold dilutions higher. In addition, only a small number of cases involved these species in the clinical trials. This means there is insufficient evidence to indicate whether the wild-type population of these pathogens can be considered susceptible to micafungin.

⁵ Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and antimicrobial susceptibility tests on any such isolate must be repeated and if the result is confirmed the isolate sent to a reference laboratory. Until there is evidence regarding clinical response for confirmed isolates with MIC above the current resistant breakpoint (in italics) they should be reported resistant.

2. Histone déacétylases (HDACs) et leur inhibition chez *Candida* spp.

Cette revue, intitulée *Histone deacetylases and their inhibition in Candida species*, a été publiée en 2016 dans *Frontiers in Microbiology* (nombre de citations : 1).

J'ai participé à la conception, la rédaction, la relecture et la révision de cet article. Je me suis plus particulièrement intéressée à l'implication des HDACs et inhibiteurs de HDACs dans le développement de la résistance aux antifongiques, et à l'activité des inhibiteurs de HDACs en association aux antifongiques actuellement disponibles dans le traitement des candidoses invasives.

2.1. Résumé

Comme vu précédemment, l'émergence de souches résistantes aux antifongiques chez *Candida* spp. et le nombre limité de molécules disponibles pour la prise en charge des candidoses invasives nécessitent un besoin urgent de nouvelles stratégies antifongiques. Les HDACs sont responsables de l'élimination de groupements acétyl sur les résidus lysine des histones et d'autres protéines, et jouent un rôle crucial dans la régulation de la transcription médiée par la chromatine. Des études antérieures suggèrent que l'inhibition des HDACs permettrait de diminuer la virulence et la croissance des levures du genre *Candida* spp., et de potentialiser l'activité des antifongiques actuellement disponibles, faisant de ces enzymes de nouvelles cibles antifongiques d'intérêt.

Cette revue s'intéresse dans une 1^{ère} partie aux HDACs et rôles fonctionnels des HDACs chez les deux espèces les plus fréquemment impliquées en pathologie humaine en Europe et Amérique du Nord: *C. albicans* et *C. glabrata*. Au total, 11 HDACs ont été identifiées chez ces deux espèces, réparties en trois classes : I, II et III. Ces enzymes participent à différents processus clés impliqués dans la virulence de *C. albicans*, en particulier la transition levure-filament, la transition *white-opaque* et la formation de biofilms. De plus, chez cette espèce, la délétion des gènes codant pour les HDACs Rpd31 ou Hst3 est associée à une diminution de la virulence *in vivo*. Les HDACs sont également impliquées dans le développement de la résistance aux antifongiques azolés : l'inhibition des HDACs phénocopie l'inhibition pharmacologique ou génétique de Hsp90. Chez *C. glabrata*, les HDACs sont indispensables à l'adaptation à divers stress environnementaux. Elles participent également à la virulence par la régulation de l'adhésion. Enfin, elles interviennent également dans la résistance aux antifongiques azolés.

Une 2^{ème} partie s'intéresse à l'inhibition des HDACs fongiques comme nouvelle stratégie antifongique, à l'instar de l'inhibition des HDACs humaines comme stratégie thérapeutique en oncologie. Un seul inhibiteur sélectif a été développé à ce jour : MGCD290, inhibiteur sélectif de

Hos2. L'alignement des séquences des HDACs humaines et fongiques a permis d'identifier d'autres HDACs potentiellement intéressantes pour le développement d'inhibiteurs spécifiques, et en particulier la protéine Set3. Les inhibiteurs de HDACs ne possèdent qu'une activité modeste sur *Candida* spp. En revanche, ils présentent un intérêt en association aux antifongiques actuellement disponibles, en potentialisant l'activité de ces antifongiques en conditions planctoniques ou en biofilm. Ils permettent également de restaurer l'activité de ces antifongiques sur des souches résistantes. Seuls trois inhibiteurs de HDACs ont été évalués dans des modèles animaux à ce jour, avec des résultats discordants, et un seul, MGCD290, a fait l'objet d'essai clinique. Toutefois, l'association du composé MGCD290 avec le fluconazole n'a pas montré d'intérêt par rapport au fluconazole seul dans le traitement des candidoses vulvo-vaginales (essai clinique de phase 2). L'utilité clinique des inhibiteurs de HDACs reste donc à confirmer par d'autres évaluations.

2.2. Revue



Histone Deacetylases and Their Inhibition in *Candida* Species

Cécile Garnaud^{1,2†}, Morgane Champleboux^{3†}, Danièle Maubon^{1,2}, Muriel Cornet^{1,2*} and Jérôme Govin^{3*}

¹ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie et de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Grenoble, France, ² Laboratoire TIMC-IMAG-TheREx, UMR 5525 CNRS-UGA, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France, ³ Université Grenoble Alpes, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1038, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble – Large Scale Biology Laboratory, Grenoble, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Dominique Sanglard,
University of Lausanne, Switzerland

Reviewed by:

Nir Osherov,
Tel Aviv University, Israel
Dimitrios P. Kontoyiannis,
University of Texas MD Anderson
Cancer Center, USA

*Correspondence:

Muriel Cornet
mcomet@chu-grenoble.fr
Jérôme Govin
jerome.govin@inserm.fr

† These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 02 June 2016

Accepted: 25 July 2016

Published: 05 August 2016

Citation:

Garnaud C, Champleboux M,
Maubon D, Cornet M and Govin J
(2016) Histone Deacetylases
and Their Inhibition in *Candida*
Species. *Front. Microbiol.* 7:1238.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01238

Fungi are generally benign members of the human mucosal flora or live as saprophytes in the environment. However, they can become pathogenic, leading to invasive and life threatening infections in vulnerable patients. These invasive fungal infections are regarded as a major public health problem on a similar scale to tuberculosis or malaria. Current treatment for these infections is based on only four available drug classes. This limited therapeutic arsenal and the emergence of drug-resistant strains are a matter of concern due to the growing number of patients to be treated, and new therapeutic strategies are urgently needed. Adaptation of fungi to drug pressure involves transcriptional regulation, in which chromatin dynamics and histone modifications play a major role. Histone deacetylases (HDACs) remove acetyl groups from histones and actively participate in controlling stress responses. HDAC inhibition has been shown to limit fungal development, virulence, biofilm formation, and dissemination in the infected host, while also improving the efficacy of existing antifungal drugs toward *Candida* spp. In this article, we review the functional roles of HDACs and the biological effects of HDAC inhibitors on *Candida* spp., highlighting the correlations between their pathogenic effects *in vitro* and *in vivo*. We focus on how HDAC inhibitors could be used to treat invasive candidiasis while also reviewing recent developments in their clinical evaluation.

Keywords: HDAC, chromatin, acetylation, *Candida*, HDAC inhibitors

Invasive fungal infections have become a major public health problem, with up to two million cases worldwide each year (Brown et al., 2012). In developed countries, disseminated candidiasis, mostly caused by the yeasts *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*, remains the predominant threat, with more than 400,000 cases per year (Brown et al., 2012). Antifungal treatments are currently based on only four classes of drugs: polyenes, principally represented by amphotericin B; triazoles; echinocandins; and pyrimidines (Denning and Bromley, 2015). The emergence of strains resistant to this limited arsenal makes the need for novel therapeutic agents urgent (Denning and Bromley, 2015).

Candida albicans is the predominant cause of invasive candidiasis, and is also the most extensively studied *Candida* species. Its great success as a pathogen is linked to its capacity to survive in the bloodstream, to invade tissues and to effectively adapt to a range of host niches. One of its key virulence traits is its morphological plasticity; its ability to shift from a yeast form to

a hyphal form has been clearly linked to virulence (Sudbery, 2011; Gow et al., 2012). Hyphal forms adhere better to mucosal niches, making it easier to maintain their colonization. This colonization can lead to epithelial rupture, dissemination of the pathogen in the bloodstream and ultimately invasion of deep-seated tissues. Other virulence factors, such as the white-to-opaque switch, the GUT (Gastrointestinally IndUCed Transition) or gray phenotypes, cell wall plasticity, adherence, and biofilm formation favor development in the host (Polke et al., 2015).

Candida albicans' capacity to adapt to various environmental conditions, including drug pressure, is linked to a complex interplay of stress-signaling responses (Fuchs and Mylonakis, 2009; Shor and Perlin, 2015). This signaling alters the transcription program to adapt the production of proteins, causing the emergence of the biological state that will be the most beneficial for yeast survival and development. Transcriptional regulation requires transcription factors to bind their DNA template and subsequently recruit dedicated machinery for transcription repression or activation. Classical histone modifications, such as acetylation, methylation, and phosphorylation have been shown to play a role in regulating stress responses, antifungal tolerance and virulence in *C. albicans* and *C. glabrata* (Liu et al., 2005; Rai et al., 2012; Stevenson and Liu, 2013; Kim et al., 2015; Tscherner et al., 2015). In particular, reversible acetylation by various histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs, also known as lysine deacetylases or KDACs) is crucial to chromatin-mediated transcriptional regulation. Recent studies have suggested that inhibiting fungal HDACs may have beneficial and synergistic effects, reducing the virulence and growth of *Candida* spp., while also decreasing their tolerance and resistance to existing antifungal drugs (Al-Dhaheri and Douglas, 2010; Wurtele et al., 2010; Stevenson and Liu, 2011; Hnisz et al., 2012; Lu et al., 2012; Nobile et al., 2014; Rajasekharan et al., 2015; Li et al., 2015; Pfaller et al., 2015; Zhang and Xu, 2015).

In this review, we briefly summarize the advances made in the characterization of HDACs in *Candida* spp. We have also correlated the functional roles of HDACs and the *in vitro* biological properties of HDAC inhibitors on *Candida* spp., mostly *C. albicans*, with their *in vivo* effects and discussed the potential for development of new antifungal compounds.

HDACs IN *Candida* SPECIES

To date, a total of 11 HDACs have been identified in *C. albicans* and *C. glabrata* (Figure 1; Tables 1 and 2). These two species represent the major proportion of the fungal infections clinically observed and regroup most of the molecular information accumulated on fungal HDACs. Three main classes of HDACs have been originally described in *C. albicans* based on the key *S. cerevisiae* enzymes (Trojer et al., 2003; Kim et al., 2015). The key enzyme for Class I HDACs is Rpd3, for Class II it is Hda1, and for Class III it is Sir2, a sirtuin. This family of enzymes uses a specific enzymatic chemistry based on the cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD).

Class I HDACs: Rpd31, Rpd32, Hos1, and Hos2

Interestingly, *C. albicans* possesses two genes which are potential orthologs of *S. cerevisiae*'s *RPD3*. These genes are now designated as *RPD31* and *RPD32*. The current annotation of these genes has given rise to some confusion, with discrepancies between the original publication (Srikantha et al., 2001) and the current annotation in the *Candida* Genome Database (CGD; Assembly 22, version s06-m01-r01). **Table 1** presents updated information on the gene and protein accession numbers. Hos1 was first identified and cloned 15 years ago in *C. albicans*, but its functional role has remained elusive (Srikantha et al., 2001). Hos2 was initially described in the CGD as a Class III enzyme with sirtuin activity (Karthikeyan et al., 2013), but it is now presented as a member of the class I family (Kim et al., 2015). *In vitro* analysis of the enzymatic activity of recombinant Hos2 showed it to be inactive on acetylated histones but capable of deacetylating acetylated tubulin (Karthikeyan et al., 2013). These findings remain to be confirmed *in vivo*.

Class II HDACs: Hda1 and Hos3

Hda1 was identified in 2001 and was shown to play an important role in hyphal development (see below). Hos3 was also described in 2001, but its function has yet to be studied in detail in *Candida* spp. (Srikantha et al., 2001).

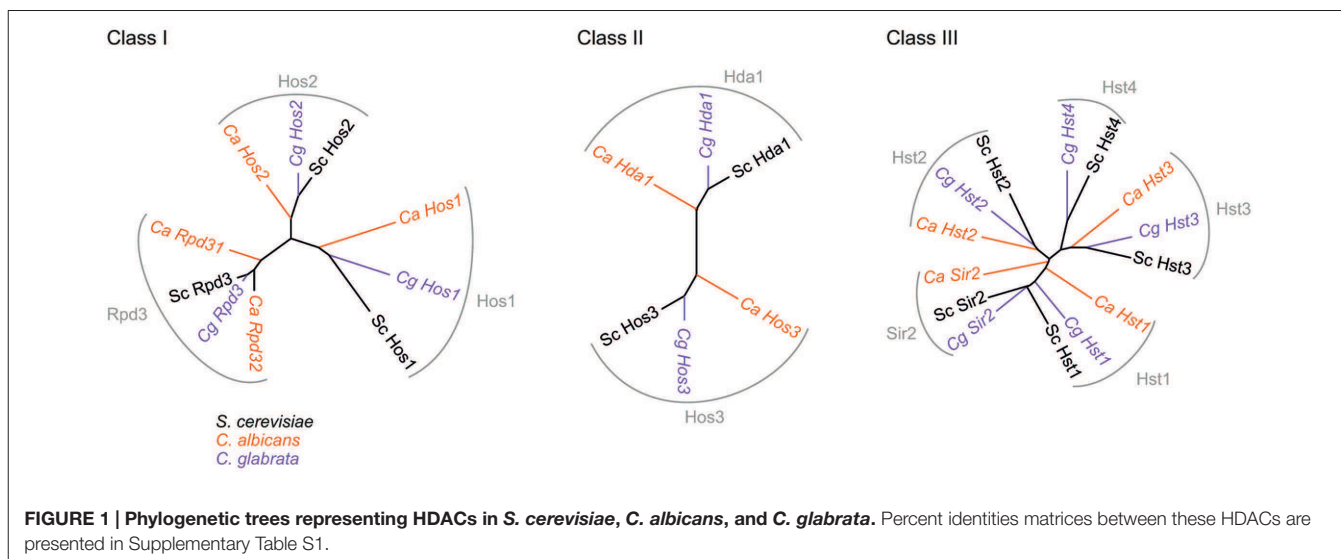
Class III HDACs: Sir2 and Hst Proteins

The sirtuin family, a group of NAD⁺-dependent HDACs, is conserved between some yeasts and humans. Sirtuins were first characterized in *Candida* spp. in 1999, with the identification and cloning of the *SIR2* gene in *C. albicans* (Pérez-Martín et al., 1999). Sir2 deacetylates histones, specifically lysine 16 on histone H4, it is also important for silencing at telomeres and ribosomal genomic regions (Freire-Benítez et al., 2016). Interestingly, *SIR2* is not present in all *Candida* spp. Thus, for example in *C. lusitanae*, no Sir functionality for heterochromatic silencing in subtelomeric and pericentric regions has been detected, while in other species such as *C. albicans* or *C. glabrata*, an ancestral gene was duplicated to generate *HST1* and *SIR2* (Froyd et al., 2013; Kapoor et al., 2015).

Hst are also members of the sirtuin family; Hst1 is a component of the Set3 HDAC complex, while Hst3 is involved in nucleosome assembly. With the HAT Rtt109, Hst3 dynamically controls the level of lysine 56 acetylation on histone H3 (Rundlett et al., 1996; Wurtele et al., 2010).

Other HDACs: Set3

Set3 is an NAD⁺-dependent HDAC, which, in *S. cerevisiae*, forms a 7-subunit complex (Set3C) containing HDAC and non-HDAC proteins in *C. albicans* (Hnisz et al., 2010, p. 2). Four of these proteins, Set3, Hos2, Snt1 and Sif2, constitute the core complex and are essential for Set3C assembly, while three others (Hos4, Hst1, and Cpr1) are peripheral. Set3, Hos2, and Hst1 have HDAC activity. In addition, the PhD finger domain of Set3 binds methylated H3K4 and recruits the Set3C complex to chromatin in *S. cerevisiae* (Kim et al., 2012). This complex is conserved



in *C. albicans*, where it is important for morphogenesis (Nobile et al., 2014).

FUNCTIONAL ROLES OF HDACs IN *Candida albicans*

HDACs and Yeast-to-Hyphae Transition

Candida albicans exists in various morphological forms: an ovoid-shaped yeast phase is commonly found on mucosal and skin surfaces, where it is well tolerated by the immune system; hyphal forms possess a long tube-like extension to provide increased potential invasiveness. Both forms contribute to disseminated infections, but the ability to reversibly switch from one form to the other has been directly linked to virulence. The yeast-to-hyphae transition is controlled by various pathways which were recently reviewed (Sudbery, 2011).

The functional role of many HDACs has been linked to the yeast-to-hyphae transition (Figure 2A). First, Hda1 was reported to be important for a specific chromatin state during hyphal elongation and maintenance (Lu et al., 2011); *C. albicans* strains deleted for the *HDA1* gene are unable to maintain hyphal development. Hda1 is recruited by the transcription factor Brg1 and establishes a chromatin state which is not permissive to Nrg1 repressor binding. Thus, Nrg1 is unable to bind the promoter regions of hypha-specific genes and prevent their expression (Lu et al., 2011, 2012). And in the absence of Nrg1, Hda1 also maintains a nucleosomal structure compatible with the expression of the hyphal genes.

The yeast-to-hyphae transition is also controlled by Rpd31, which acts both as a repressor and an activator (Figure 2A). In yeast cells, Rpd31 is repressing the expression of hyphal-specific genes such as *HWP1* and *ECE1* and under non-hyphae-inducing conditions, these genes are activated when *RPD31* or *SSN6* are deleted (Lee et al., 2015). However, under filament-inducing conditions, the Rpd31-Ssn6 complex

TABLE 1 | Gene and protein accession numbers for HDACs expressed in *C. albicans*.

Classes	Name	Gene name	Protein ID	Reference
I Rpd3 type	Rpd31	CR_02760C	Q5A209	Srikantha et al., 2001
	Rpd32	C3_07000W	Q5ADP0	Hnisz et al., 2009
	Hos1	C4_06010C	Q59Q78	Srikantha et al., 2001
	Hos2	C3_00780W	Q5A839 Q5A7T9	Srikantha et al., 2001
II Hda1 type	Hda1	CR_02050C	Q5A960	Klar et al., 2001; Srikantha et al., 2001; Hnisz et al., 2009; Zacchi et al., 2010
	Hos3	C4_02300W	Q5AF34	Srikantha et al., 2001
III Sirtuin	Sir2	C2_01330C	O59923	Klar et al., 2001; Maglott et al., 2007; Fu et al., 2008; Nobile et al., 2012
	Hst1	C1_09050W	Q5AQ47	Maglott et al., 2007; Hnisz et al., 2009
	Hst2	CR_01800C	Q5A985	Maglott et al., 2007; Hnisz et al., 2009; Nobile et al., 2012
	Hst3	C5_01340W	Q5A1W9	Enjalbert et al., 2006; Maglott et al., 2007; Wurtele et al., 2010; Singh et al., 2011; Stevenson and Liu, 2011
	Fungi only	Set3	C1_14140C_A	Q59ZX1

promotes filamentous elongation by triggering the expression of the master regulator *UME6*, a key factor in hyphal differentiation (Lee et al., 2015). Finally, the Set3C complex has been identified as a repressor of the yeast-to-hyphae transition (Figure 2A). In hyphae-inducing conditions *in vitro*,

TABLE 2 | Gene and protein accession numbers for HDACs expressed in *C. glabrata*.

Classes	Name	Gene name	Protein ID	Reference	
I	Rpd3 type	Rpd3	CAGL0B01441g	Q6FXA7	This study
		Hos1	CAGL0D01430g	Q6FWB7	Dujon et al., 2004
		Hos2	CAGL0A03322g	Q6FY81	This study
II	Hda1 type	Hda1	CAGL0J03454g	Q6FPJ0	This study
		Hos3	CAGL0J06974g	Q6FP35	Dujon et al., 2004
III	Sirtuin	Sir2	CAGL0C05357g	Q6FWI7	Dujon et al., 2004
		Hst1	CAGL0K01463g	Q6FNA6	This study
		Hst2	CAGL0L08668g	Q6FKU1	Dujon et al., 2004; Domergue et al., 2005
		Hst3	CAGL0H08239g	Q6FRI7	Dujon et al., 2004
		Hst4	CAGL0F05621g	Q6FU79	This study
Fungi only	Set3	CAGL0G04499g	Q6FT89	This study	

set3-, and *hos2*-null mutant strains had hyperfilamentous phenotypes (Hnisz et al., 2010, p. 3). The same authors later showed that the *set3* mutant induces transient upregulation of *EFG1* and *NRG1*, and downregulation of other hyphal associated genes, such as *BRG1* and *TEC1* (Hnisz et al., 2012).

HDACs and the White-to-Opaque Transition

Candida albicans colonies are typically white and smooth, but under some specific conditions, such as genetic conversion at the mating-type locus, a morphological white-to-opaque switch can occur. White cells have been showed to be more virulent in murine models (Kvaal et al., 1997). In human systemic infections, white cells are more likely to be isolated, whereas opaque cells may be better adapted to colonization (Morschhäuser, 2010).

The white-to-opaque transition involves a set of transcription factors responsible for the control of genes specific to white and opaque cells (Hernday et al., 2013). These factors are naturally linked to the transcription and chromatin machinery. Strains deleted for either *HDA1* or *RPD31* showed an enhanced ability to switch from the white to the opaque state, while only the *rpd31*Δ mutant displayed increased reverse opaque-to-white switch (Figure 2B). Thus, Hda1 selectively represses the white-to-opaque switch and Rpd31 suppresses the transition in both directions (Klar et al., 2001; Srikantha et al., 2001).

The sirtuins Hst3 and Sir2 were identified as switch repressors, whereas Set3C HDACs (Set3 and Hos2) were recognized as key activators of the white-to-opaque switch (Figure 1) (Pérez-Martín et al., 1999; Hnisz et al., 2009; Stevenson and Liu, 2011).

HDACs and Biofilm Formation

Candida albicans can form biofilms – multicellular structures of mixed communities of microorganisms containing yeast and hyphal forms surrounded by a self-produced extracellular matrix – which commonly develop on implanted medical devices, such as intravascular catheters or prostheses, as well as on mucosal surfaces. Biofilms create secondary infectious foci in

hematogenous disseminated candidiasis through the release of yeast cells into the bloodstream. They are also an important source of antifungal resistance because the extracellular matrix hinders drug diffusion (Taff et al., 2013; Perlin et al., 2015).

Set3C HDACs have been shown to be important for the development of biofilms (Nobile et al., 2014). Thus, deletion of *SET3* and *HOS2* decreases biofilm formation and biomass, and these mutants seem to be more resistant to mechanical shearing and yeast dispersion *in vivo* (Nobile et al., 2014). The Set3C complex binds to five of the six biofilm master regulators, namely *NRG1*, *BRG1*, *TEC1*, *NDT80*, and *ROB1*. Notably, *Nrg1*, which is transiently repressed by Set3C during filamentation, is involved in the regulation of cellular dispersion (Uppuluri et al., 2010).

Role of HDACs in Virulence *In vivo*

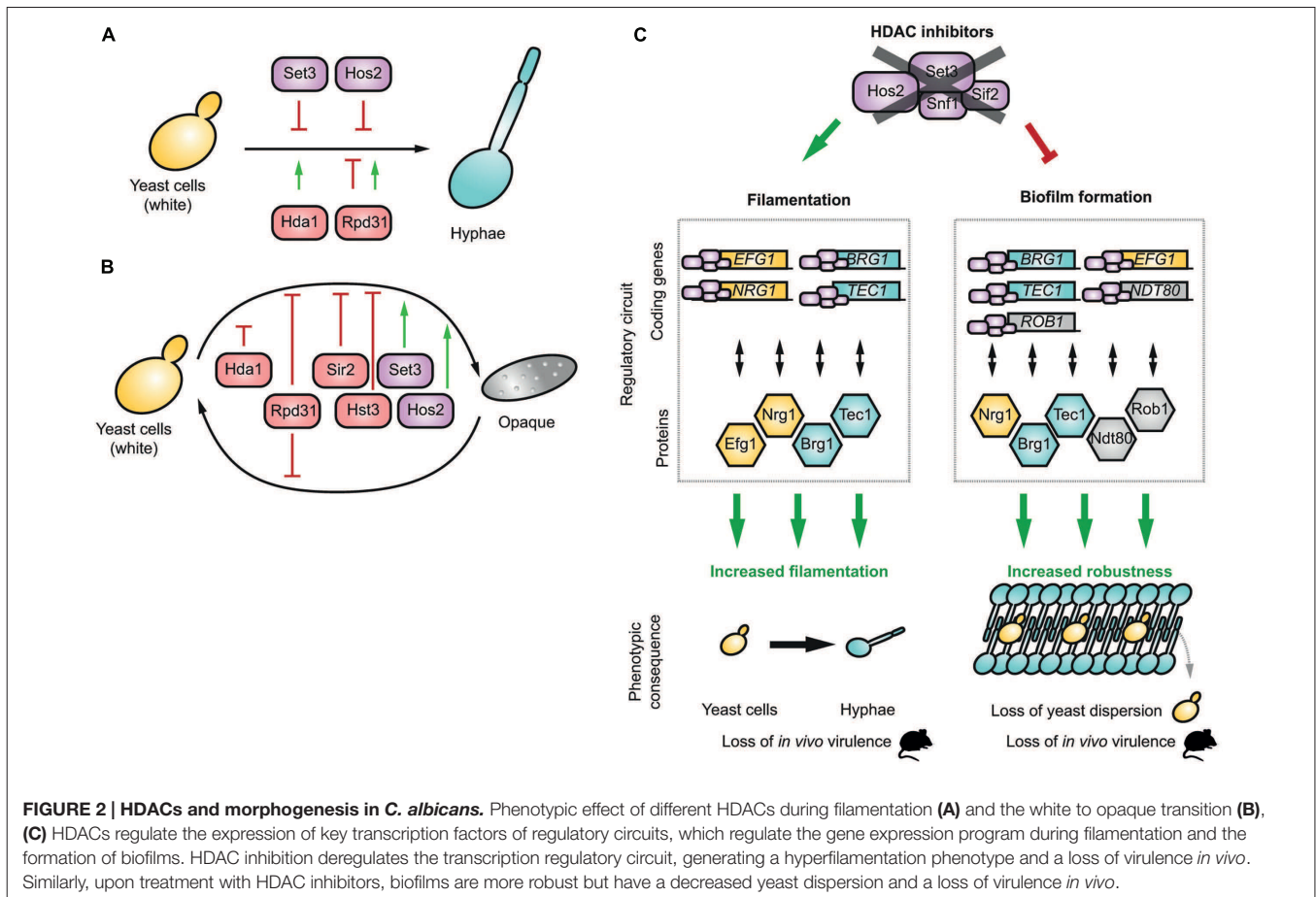
Several studies have investigated the role of HDACs in *C. albicans* virulence through *in vivo* experiments, mostly assessing survival rates after systemic injection of wild-type and mutant strains.

The *RPD31* deletion induced filamentation defects and attenuated virulence when injected into mice (Srikantha et al., 2001; Lee et al., 2015). These results are consistent with the hyphae-inducing conditions found in animal models. Likewise, the *set3* mutant displayed a hyperfilamentous phenotype *in vitro*. This phenotype was confirmed *in vivo* in mouse kidneys, but, surprisingly, it was associated with attenuated virulence (Hnisz et al., 2010) (Figure 2C). This attenuated virulence could be linked to the Set3C-mediated transcription regulation which includes transient downregulation of *EFG1* and *NRG1* and induction of *BRG1* and *TEC1* (Hnisz et al., 2012). In addition, Hst3 deletion leads to increased H3K56 acetylation, decreased cell viability with abnormal filamentous growth and genomic instability. *In vivo*, this deletion attenuates the virulence of *C. albicans* in mice models (Wurtele et al., 2010).

HDACs and Antifungal Resistance

Histone acetylation dynamics and HDACs have been shown to be involved in the development of resistance to antifungal drugs. Notably, Li et al. (2015) showed that the expression of *HDA1* and *RPD3* was increased during acquisition of azole resistance, but decreased once resistance had been established. Hda1 and Rpd3 control the acetylation of Hsp90, a protein involved in the development of drug resistance in various fungi (Cowen and Lindquist, 2005; Robbins et al., 2012). Inactivation of HDACs in *C. albicans* phenocopies the genetic and pharmacological inhibition of Hsp90, restoring azole susceptibility by blocking the Hsp90-dependent response involved in azole resistance (Cowen and Lindquist, 2005).

Some authors initially hypothesized that this effect was achieved because HDACs directly influenced the expression of efflux transporter genes involved in azole resistance. However, recent studies suggest that the deletion of HDACs or the use of HDAC inhibitors could decrease the expression of efflux transporters as a part of a general decrease of histone acetylation and its consequence on transcription regulation (Li et al., 2015).



FUNCTIONAL ROLES OF HDACs IN *Candida glabrata*

In the species distribution of invasive candidiasis, *C. glabrata* ranks second after *C. albicans* (Brown et al., 2012). Chromatin remodeling and sirtuin-family HDACs are required for *C. glabrata* to adapt to stressful conditions such as survival inside phagocytes, adhesion and maintenance of colonization, or multidrug resistance (Rai et al., 2012; Orta-Zavalza et al., 2013; De Las Peñas et al., 2015).

Sir2 is important for the regulation of cell adhesion; its absence reduces silencing and many subtelomeric adhesin-encoding EPA genes are derepressed (De Las Peñas et al., 2015). Hst1 in *C. glabrata* is recruited by the transcription factor Sum1 and contributes to the repression of *PDR1* and *CDR1*, which regulate the expression of efflux pumps. Thus, when Hst1 is deleted, these genes are upregulated and azole resistance is enhanced (Orta-Zavalza et al., 2013).

EFFECTS OF HDAC INHIBITORS ON *Candida* spp. *IN VITRO*

Inhibitors of mammalian HDAC enzymes were first developed nearly 35 years ago. As soon as the first molecules were

identified, several pioneer studies analyzed their effects on yeast HDACs.

Non-selective Inhibitors of Class I and II HDACs

Trichostatin A (TSA) is a well-known HDAC inhibitor. It was first isolated from a culture broth of *Streptomyces platensis* and was initially presented as a fungistatic drug inhibiting growth of *Trichophyton* and *Aspergillus* (Tsuji et al., 1976). Rapidly, however, it was shown to act on the differentiation of mammalian cells and to inhibit their HDACs (Yoshida et al., 1987, 1990). Ten years later, TSA was tested on pathogenic yeasts, including *C. albicans* where it induced a dramatic increase in white-to-opaque transition (Klar et al., 2001). This phenotype is fully compatible with Hda1 and/or Rpd31 inhibition (see above, Klar et al., 2001; Srikantha et al., 2001). TSA was also shown to trigger the yeast-to-hyphae conversion of *C. albicans* through inhibition of Set3C HDACs (Hnisz et al., 2010). Finally, the deletion of Hos2, a Set3C subunit, but none of the other HDACs, phenocopies the TSA induced yeast-to-hyphae transition (Hnisz et al., 2010). No *in vitro* assessment of TSA on *Candida* HDACs has been yet reported but TSA is active on purified Rpd3, Hda1 and Hos3 in *S. cerevisiae* (Carmen et al., 1999). Therefore, the phenotypes observed in *Candida* spp. are likely to be mediated by a direct

inhibition of the Rpd3, Hda1, and a Hos2 enzyme as a TSA treatment phenocopies the deletion of these HDACs.

Sodium butyrate is another well-known HDAC inhibitor. In 1978, this fatty acid was shown to inhibit mammalian HDACs. In 2002, it was tested in *C. albicans* with other HDAC inhibitors (Candido et al., 1978; Smith and Edlind, 2002). Sodium butyrate alone was shown to have minimal effects on growth, heat sensitivity, and germ tube formation in *C. albicans* (Smith and Edlind, 2002), although some reports suggested that it inhibited growth and biofilm formation in *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *Cryptococcus neoformans*, while also enhancing the functions of macrophages *in vitro* (Candido et al., 1978). Whether its effect on HDAC enzymes is direct or not remain to be determined.

Some uracil-based compounds have been identified, among which suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), also known as vorinostat. This compound is currently licensed for clinical use for the treatment of cancer. When tested against *C. albicans* strains, it displayed relatively low antifungal activity (Mai et al., 2007), although another study showed that the same concentration could reduce the pathogenicity of *C. albicans* by decreasing its adherence to cultured human cells by 90%, and significantly inhibiting serum-induced germination (Simonetti et al., 2007). Finally, apicidin, a cyclic tetrapeptide, displays limited direct antifungal activity against *C. albicans* (Smith and Edlind, 2002).

Sirtuin Inhibitors

Nicotinamide is a vitamin and precursor of NAD⁺ and a well-described inhibitor of Class III HDACs, including Sir2 (Landry et al., 2000; Bitterman et al., 2002; Sanders et al., 2007). It was shown to have broad antifungal activity against several pathogenic *Candida* and *Aspergillus* species. In particular, the addition of nicotinamide to wild-type *C. albicans* cells led to morphological alterations and strong growth inhibition *in vitro*, these effects are thought to be mediated through inhibition of H3K56 deacetylation (Wurtele et al., 2010).

Thus, the *in vitro* effects of these non-selective HDAC inhibitors used alone were only studied in *C. albicans* and results were somewhat conflicting. Further studies including *C. glabrata* will be needed.

Selective HDAC Inhibitors

In addition to the pan-HDACs inhibitors, such as TSA and SAHA, a fungal-specific Hos2 inhibitor, MGCD290, has been developed (Pfaller et al., 2009). No enzymatic data currently evaluates its effect on purified Hos2, but *in vitro*, this compound alone showed a modest activity against *Candida* spp., with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 0.5 to 16 µg/mL, depending on the species. However, in combination with azoles, MGCD290 was active against a broad range of fungi, including molds such as *Aspergillus* spp., and was promoted as the way forward for the development of a new class of clinical drugs.

More generally, the HDAC enzymatic activity is dependent of key residues which have been highly conserved through evolution (Lombardi et al., 2011 and Supplementary Figure S1). Sequence alignments of class I and class II HDACs from

C. albicans and human reveal that Set3 is the most divergent enzyme, with <20% of identity with human or other *C. albicans* HDACs (Supplementary Figure S1; Supplementary Table S2). The functional study of this enzyme has demonstrated its importance for the biology of *C. albicans* and its virulence *in vivo* (see section Functional Roles of HDACs in *Candida albicans*). Altogether, Set3 appears to be an exceptional candidate for the development fungal specific HDAC inhibitors. Alternatively, Hos1, Hos3, and Hst3 could also constitute new potential targets (Supplementary Table S2).

A new generation of inhibitors has currently been developed and targets selectively human HDAC isoforms, such as HDAC1/2, HDAC3, or HDAC8 (for review, Falkenberg and Johnstone, 2014). This illustrates that high levels of selectivity can be reached among human HDACs. Similarly, it is very likely that specific compounds could probably target specifically fungal HDACs. Structural studies showed that HDAC8 active site is very malleable and adapts its conformation when different inhibitors are bound (Somoza et al., 2004). Future work will hopefully generate more structural information on fungal HDACs and provide additional insights to the quest for specific fungal inhibitors.

THE CLINICAL POTENTIAL OF HDAC INHIBITION IN *Candida* INFECTIONS

HDAC Inhibitors Bolster Existing Antifungal Drugs and Limit the Emergence of Resistance

When used alone, HDAC inhibitors seem to display only a modest anti-*Candida* activity, however, their potential increases exponentially when they are used in combination with existing antifungal agents. This activity is observed not only with planktonic cells but also with biofilms.

Thus, HDAC inhibitors can significantly enhance azole activity *in vitro* (Smith and Edlind, 2002; Mai et al., 2007; Li et al., 2015). Combination of TSA with fluconazole, itraconazole, or voriconazole significantly reduced trailing growth (the phenotypic expression of drug-tolerance) and/or the azole MICs, in *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis* (Smith and Edlind, 2002; Mai et al., 2007). Similar effects were observed in *C. albicans* when SAHA or other hydroxamate-based inhibitors were used in combination with fluconazole. These observations are consistent with the increased azole susceptibility of the *HDA1* or *RPD3* mutants of *C. albicans* (Mai et al., 2007; Zhang and Xu, 2015). MGCD290 also potentiates the activity of triazoles against *Candida* spp. *in vitro* (Pfaller et al., 2009, 2015). This synergy between HDAC inhibitors and antifungals is not limited to azoles, and TSA was shown to enhance the activity of other antifungal agents acting on membrane synthesis, including terbinafine, although it had no effect on the activities of amphotericin B and 5-fluorocytosine (Smith and Edlind, 2002). MGCD290 was also found to potentiate the echinocandins, although this synergistic effect was less pronounced than the effect with azoles (Pfaller et al., 2015).

Apart from its activity against *Candida* spp., MGCD290 was shown to have a synergistic activity with azoles against *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhodotorula*, and *Trichosporon* genus (Pfaller et al., 2009).

One of the growing threats in the treatment of invasive candidiasis is the emergence of multidrug resistance, including echinocandin resistance, especially in *C. glabrata* (Maubon et al., 2014). Synergy between HDAC inhibitors, azoles (especially fluconazole) and echinocandins was also demonstrated for the treatment of several resistant strains of *C. albicans*, *C. glabrata*, or *C. krusei* (Pfaller et al., 2009; Li et al., 2015, p. 3). *In vitro*, MGCD290 also decreased the echinocandin-resistance of *C. glabrata*, *C. albicans*, and *C. krusei* isolates. Moreover, in most azole- or echinocandin-resistant strains, combination with a HDAC inhibitor led to a shift from resistance to greater susceptibility (Pfaller et al., 2015). Similarly, several echinocandin- or azole-resistant *C. albicans* isolates were as sensitive to nicotinamide as susceptible strains upon combined treatment with a HDAC inhibitor (Wurtele et al., 2010).

Through similar studies, several HDAC inhibitors were shown to enhance the action of antifungal drugs against fungi present in biofilms. Thus, Al-Dhaheri and Douglas (2010) showed that, in the presence of amphotericin B, TSA or apicidin, sodium butyrate significantly reduced viability of *Candida* spp. in biofilms. Similarly, sodium valproate, an organic compound used as an anticonvulsive agent which has been shown to be a HDAC inhibitor, used in combination with amphotericin B showed synergistic antifungal activity on biofilms produced by *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis* (Göttlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001; Al-Dhaheri and Douglas, 2010). Valproate was the most effective agent against *C. krusei*, while butyrate had the greatest impact on *C. albicans*. Using a biofilm formation assay, butyrate alone showed antifungal activity against *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. neoformans* (Hnisz et al., 2012). A combination therapy based on flavonoids and butyrate also significantly reduced a *C. tropicalis* biofilm (Rajasekharan et al., 2015).

Even though they are preliminary, these results with HDAC inhibitors on biofilms are encouraging. Despite their lack of specificity, HDAC inhibitors may be used at high concentrations in the particular context of lock therapy, which involves the direct application of very high local doses of active drugs to contaminated catheters. In addition, combinatorial strategies against biofilms have recently gained interest for the treatment of *Candida* infections associated with biofilms on devices (Liu et al., 2005). Indeed, the disruption of the membrane or the cell wall by antifungal agents may help promote the uptake of compounds that are active inside cells.

Use of HDAC Inhibitors in Animal Models and Clinical Studies

The animal experiments described above confirmed that genetic inhibition of HDACs produced strains with attenuated virulence (Figure 2). These experiments are important for functional studies, but genetic knock-out models are not entirely predictive

of the ability of HDAC inhibitors to cure *Candida* infection *in vivo*.

Indeed, until now, only three HDAC inhibitors have been tested as therapeutic agents in animal models: the sirtuin inhibitor nicotinamide (intraperitoneal injection), valproic acid (intraperitoneal injection) and the Hos2 inhibitor MGCD290 (oral route). Wurtele et al. (2010) demonstrated that nicotinamide, mimics the *in vitro* effects of Hst3 repression, leading to a loss of virulence in mice. This antifungal effect requires the presence of the acetyltransferase RTT109 which acetylates H3K56, suggesting that nicotinamide exerts its therapeutic effect through inhibition of Hst3p-mediated H3K56 deacetylation. Paradoxically, the intra-peritoneal injection of high doses of valproic acid in a disseminated mice model of candidiasis was associated with accelerated (mean time to death: 21.5 days vs. >40 days) and increased mortality (44% vs. 75%, $P = 0.02$; Roger et al., 2011). Similarly, MGCD290 was tested in a murine model of invasive candidiasis in combination with fluconazole (Besterman J., presented at Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy IAAC in 2012 in San Francisco, CA, USA). The results of this study indicated that kidney fungal loads in animals receiving both MGCD290 and fluconazole were significantly lower than fungal loads in animals treated with fluconazole alone. These preliminary results on the use of HDAC inhibitors in murine models of candidiasis are conflicting, but there are also major differences between these *in vivo* models. In the future, the relevancy of such *in vivo* experiment will probably need to be attested to provide clear information on the therapeutic potential of the tested compounds. Also, HDAC inhibitors still need to be rigorously tested under a range of experimental conditions to examine both their toxicity and antifungal efficacy. Indeed, as several regulatory and signaling pathways/mechanisms are highly conserved between fungal and human eukaryotic cells, the use of a non-selective HDAC inhibitor (acting upstream these pathways) exposes to the risk of unwanted adverse effects. However, HDAC inhibitors toxicity does not seem to be a major issue yet, but the commercially available HDAC is today were only recently approved. The most common serious adverse events reported with HDAC inhibitors in cancerology were cytopenia (thrombocytopenia, anemia, neutropenia, or leukopenia), pyrexia, infection, sepsis, or cardiac toxicity. Other frequent adverse reactions are fatigue, nausea and diarrhea (Mottamal et al., 2015). In a recent phase 2 clinical study, the combination of oral MGCD290 and fluconazole in patients with moderate or severe vulvo-vaginal candidiasis, although well tolerated, did not significantly improve outcome compared with fluconazole alone (Augenbraun et al., 2013). This result does not support the therapeutic use of this HDAC inhibitor in this particular clinical context. Also, there is currently no available data suggesting that patients treated with HDACs inhibitors are less susceptible to *Candida* infection, and more specifically designed studies, among onco-hematological patients, are needed to answer this issue. Thus, for now, the clinical utility of HDAC inhibitors remains to be validated, and further research is more necessary than ever. The recent and expanding use of the

Galleria mellonella larvae model, which *inter alia* allows high-throughput screening of chemical libraries for the discovery of new antifungal compounds will probably facilitate the discovery of more selective and efficient HDAC inhibitors (Lionakis, 2011).

CONCLUSION

The activity of HDAC proteins is essential for the functionality of chromatin in all eukaryotic cells. In *Candida* species, most HDACs contribute to life cycle regulation, morphogenic plasticity, and biofilm formation; they are also involved in azole- and echinocandin-resistance. Therefore, their genetic or chemical inhibition can affect yeast virulence and its capacity to form biofilms while also enhancing the efficacy of existing antifungal drugs, even toward resistant strains. Three HDAC inhibitors now have FDA-approval for clinical use and a dozen compounds are included in clinical trials for cancer therapy. Obviously, the development of fungal-specific drugs would have a high clinical impact as they would avoid inhibition of endogenous host HDACs, therefore probably reducing side effects. These molecules already represent a great potential to create new antifungal treatments, especially given their behavior and how well they are tolerated in patients. Along with other compounds targeting innovative machineries (i.e., mitochondrial function, glycosylphosphatidylinositol biosynthesis, vesicle transport) which are currently in preclinical development, they may be

incorporated in the antifungal pipeline. However, *in vivo* tests should be expanded to include more diverse animal models, including invertebrates.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed, have made substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

MCh is supported by a fellowship from the Région Rhône Alpes (France). MCo and JG's groups received funding from the ANR through the FungiBET ANR-14-CE16-0027-02 program. JG's group has also received support from French National Agency for Research (ANR) through the EpiGam ANR-11-PDOC-0011 and the FP7 Marie Curie Action "Career Integration Grant" EpiGam2 304003.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01238>

REFERENCES

- Al-Dhaheeri, R. S., and Douglas, L. J. (2010). Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. *J. Med. Microbiol.* 59, 149–157. doi: 10.1099/jmm.0.015784-0
- Augenbraun, M., Livingston, J., Parker, R., Lederman, S., Chavoustie, S., Morgan, F., et al. (2013). "Fluconazole and MGCD290 in vulvo vaginal candidiasis (VVC): results from a randomized phase II study," in *Poster 1330 in IDWeek 2013*, San Francisco, CA.
- Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M., and Sinclair, D. A. (2002). Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J. Biol. Chem.* 277, 45099–45107. doi: 10.1074/jbc.M205670200
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., and White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4, 165rv13. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404
- Candido, E. P., Reeves, R., and Davie, J. R. (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14, 105–113. doi: 10.1016/0092-8674(78)90305-7
- Carmen, A. A., Griffin, P. R., Calaycay, J. R., Rundlett, S. E., Suka, Y., and Grunstein, M. (1999). Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12356–12361. doi: 10.1073/pnas.96.22.12356
- Cowen, L. E., and Lindquist, S. (2005). Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309, 2185–2189. doi: 10.1126/science.1118370
- De Las Peñas, A., Juárez-Cepeda, J., López-Fuentes, E., Briones-Martín-Del-Campo, M., Gutiérrez-Escobedo, G., and Castaño, I. (2015). Local and regional chromatin silencing in *Candida glabrata*: consequences for adhesion and the response to stress. *FEMS Yeast Res.* 15, fov056. doi: 10.1093/femsyr/fov056
- Denning, D. W., and Bromley, M. J. (2015). Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science* 347, 1414–1416. doi: 10.1126/science.aaa6097
- Domergue, R., Castaño, I., De Las Peñas, A., Zupancic, M., Lockatell, V., Hebel, J. R., et al. (2005). Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308, 866–870. doi: 10.1126/science.1108640
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., et al. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35–44. doi: 10.1038/nature02579
- Enjalbert, B., Smith, D. A., Cornell, M. J., Alam, I., Nicholls, S., Brown, A. J. P., et al. (2006). Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 17, 1018–1032. doi: 10.1091/mbc.E05-06-0501
- Falkenberg, K. J., and Johnstone, R. W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 673–691. doi: 10.1038/nrd4360
- Freire-Benítez, V., Price, R. J., Tarrant, D., Berman, J., and Buscaino, A. (2016). *Candida albicans* repetitive elements display epigenetic diversity and plasticity. *Sci. Rep.* 6, 22989. doi: 10.1038/srep22989
- Froyd, C. A., Kapoor, S., Dietrich, F., and Rusche, L. N. (2013). The deacetylase Sir2 from the yeast *Clavispora lusitanae* lacks the evolutionarily conserved capacity to generate subtelomeric heterochromatin. *PLoS Genet.* 9:e1003935. doi: 10.1371/journal.pgen.1003935
- Fu, X.-H., Meng, F.-L., Hu, Y., and Zhou, J.-Q. (2008). *Candida albicans*, a distinctive fungal model for cellular aging study. *Aging Cell* 7, 746–757. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00424.x
- Fuchs, B. B., and Mylonakis, E. (2009). Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot. Cell* 8, 1616–1625. doi: 10.1128/EC.00193-09
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20, 6969–6978. doi: 10.1093/emboj/20.24.6969
- Gow, N. A. R., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J. P., and Netea, M. G. (2012). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 112–122. doi: 10.1038/nrmicro2711
- Hernday, A. D., Lohse, M. B., Fordyce, P. M., Nobile, C. J., DeRisi, J. L., and Johnson, A. D. (2013). Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 90, 22–35. doi: 10.1111/mmi.12329

- Hnisz, D., Bardet, A. F., Nobile, C. J., Petryshyn, A., Glaser, W., Schöck, U., et al. (2012). A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS Genet.* 8:e1003118. doi: 10.1371/journal.pgen.1003118
- Hnisz, D., Majer, O., Frohner, I. E., Komnenovic, V., and Kuchler, K. (2010). The Set3/Hos2 histone deacetylase complex attenuates cAMP/PKA signaling to regulate morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6:e1000889. doi: 10.1371/journal.ppat.1000889
- Hnisz, D., Schwarzmüller, T., and Kuchler, K. (2009). Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 74, 1–15. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06772.x
- Kapoor, S., Zhu, L., Froyd, C., Liu, T., and Rusche, L. N. (2015). Regional centromeres in the yeast *Candida lusitanae* lack pericentromeric heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 12139–12144. doi: 10.1073/pnas.1508749112
- Karthikeyan, G., Paul-Satyaseela, M., Dhatchana Moorthy, N., Gopalaswamy, R., and Narayanan, S. (2013). Functional characterization of *Candida albicans* Hos2 histone deacetylase. *F1000Res.* 2, 238. doi: 10.12688/f1000research.2-238.v3
- Kim, J., Lee, J.-E., and Lee, J.-S. (2015). Histone deacetylase-mediated morphological transition in *Candida albicans*. *J. Microbiol.* 53, 805–811. doi: 10.1007/s12275-015-5488-3
- Kim, T., Xu, Z., Clauder-Münster, S., Steinmetz, L. M., and Buratowski, S. (2012). Set3 HDAC mediates effects of overlapping noncoding transcription on gene induction kinetics. *Cell* 150, 1158–1169. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.016
- Klar, A. J., Srikantha, T., and Soll, D. R. (2001). A histone deacetylation inhibitor and mutant promote colony-type switching of the human pathogen *Candida albicans*. *Genetics* 158, 919–924.
- Kvaal, C. A., Srikantha, T., and Soll, D. R. (1997). Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect. Immun.* 65, 4468–4475.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., et al. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5807–5811. doi: 10.1073/pnas.110148297
- Lee, J.-E., Oh, J.-H., Ku, M., Kim, J., Lee, J.-S., and Kang, S.-O. (2015). Ssn6 has dual roles in *Candida albicans* filament development through the interaction with Rpd31. *FEBS Lett.* 589, 513–520. doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.011
- Li, X., Cai, Q., Mei, H., Zhou, X., Shen, Y., Li, D., et al. (2015). The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1993–2003. doi: 10.1093/jac/dkv070
- Lionakis, M. S. (2011). *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. *Virulence* 2, 521–527. doi: 10.4161/viru.2.6.18520
- Liu, T. T., Lee, R. E. B., Barker, K. S., Lee, R. E., Wei, L., Homayouni, R., et al. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2226–2236. doi: 10.1128/AAC.49.6.2226-2236.2005
- Lombardi, P. M., Cole, K. E., Dowling, D. P., and Christianson, D. W. (2011). Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 735–743. doi: 10.1016/j.sbi.2011.08.004
- Lu, Y., Su, C., and Liu, H. (2012). A GATA transcription factor recruits Hda1 in response to reduced Tor1 signaling to establish a hyphal chromatin state in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 8:e1002663. doi: 10.1371/journal.ppat.1002663
- Lu, Y., Su, C., Wang, A., and Liu, H. (2011). Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *PLoS Biol.* 9:e1001105. doi: 10.1371/journal.pbio.1001105
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D., and Tatusova, T. (2007). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 35, D26–D31. doi: 10.1093/nar/gkl993
- Mai, A., Rotili, D., Massa, S., Brosch, G., Simonetti, G., Passariello, C., et al. (2007). Discovery of uracil-based histone deacetylase inhibitors able to reduce acquired antifungal resistance and trailing growth in *Candida albicans*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1221–1225. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.12.028
- Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D., and Cornet, M. (2014). Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med.* 40, 1241–1255. doi: 10.1007/s00134-014-3404-7
- Morschhäuser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 47, 94–106. doi: 10.1016/j.fgb.2009.08.002
- Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L., and Wang, G. (2015). Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Mol. Basel Switz.* 20, 3898–3941. doi: 10.3390/molecules20033898
- Nobile, C. J., Fox, E. P., Hartooni, N., Mitchell, K. F., Hnisz, D., Andes, D. R., et al. (2014). A histone deacetylase complex mediates biofilm dispersal and drug resistance in *Candida albicans*. *mBio* 5, e01201–e1214. doi: 10.1128/mBio.01201-14
- Nobile, C. J., Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M., Hernday, A. D., et al. (2012). A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell* 148, 126–138. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.048
- Orta-Zavalza, E., Guerrero-Serrano, G., Gutiérrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Juárez-Cepeda, J., Castaño, I., et al. (2013). Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol.* 88, 1135–1148. doi: 10.1111/mmi.12247
- Pérez-Martín, J., Uría, J. A., and Johnson, A. D. (1999). Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a SIR2 gene. *EMBO J.* 18, 2580–2592. doi: 10.1093/emboj/18.9.2580
- Perlin, D. S., Shor, E., and Zhao, Y. (2015). Update on antifungal drug resistance. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 2, 84–95. doi: 10.1007/s40588-015-0015-1
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Georgopapadakou, N., Martell, L. A., Besterman, J. M., and Diekema, D. J. (2009). Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3797–3804. doi: 10.1128/JCM.00618-09
- Pfaller, M. A., Rhomberg, P. R., Messer, S. A., and Castanheira, M. (2015). In vitro activity of a Hos2 deacetylase inhibitor, MGCD290, in combination with echinocandins against echinocandin-resistant *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 81, 259–263. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.008
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., and Klein, P. S. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* 276, 36734–36741. doi: 10.1074/jbc.M101287200
- Polke, M., Hube, B., and Jacobsen, I. D. (2015). *Candida* survival strategies. *Adv. Appl. Microbiol.* 91, 139–235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002
- Rai, M. N., Balusu, S., Gorityala, N., Dandu, L., and Kaur, R. (2012). Functional genomic analysis of *Candida glabrata*-macrophage interaction: role of chromatin remodeling in virulence. *PLoS Pathog.* 8:e1002863. doi: 10.1371/journal.ppat.1002863
- Rajasekharan, S. K., Ramesh, S., and Bakkiyaraj, D. (2015). Synergy of flavonoids with HDAC inhibitor: new approach to target *Candida tropicalis* biofilms. *J. Chemother.* 27, 246–249. doi: 10.1179/1973947814Y.0000000186
- Robbins, N., Leach, M. D., and Cowen, L. E. (2012). Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance. *Cell Rep.* 2, 878–888. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.035
- Roger, T., Lugrin, J., Le Roy, D., Goy, G., Mombelli, M., Koessler, T., et al. (2011). Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to toll-like receptor agonists and to infection. *Blood* 117, 1205–1217. doi: 10.1182/blood-2010-05-284711
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M., and Grunstein, M. (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 14503–14508. doi: 10.1073/pnas.93.25.14503
- Sanders, B. D., Zhao, K., Slama, J. T., and Marmorstein, R. (2007). Structural basis for nicotinamide inhibition and base exchange in Sir2 enzymes. *Mol. Cell* 25, 463–472. doi: 10.1016/j.molcel.2006.12.022
- Shor, E., and Perlin, D. S. (2015). Coping with stress and the emergence of multidrug resistance in fungi. *PLoS Pathog.* 11:e1004668. doi: 10.1371/journal.ppat.1004668
- Simonetti, G., Passariello, C., Rotili, D., Mai, A., Garaci, E., and Palamara, A. T. (2007). Histone deacetylase inhibitors may reduce pathogenicity and virulence

- in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 7, 1371–1380. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00276.x
- Singh, R. P., Prasad, H. K., Sinha, I., Agarwal, N., and Natarajan, K. (2011). Cap2-HAP complex is a critical transcriptional regulator that has dual but contrasting roles in regulation of iron homeostasis in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 286, 25154–25170. doi: 10.1074/jbc.M111.233569
- Smith, W. L., and Edlind, T. D. (2002). Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3532–3539. doi: 10.1128/AAC.46.11.3532-3539.2002
- Somoza, J. R., Skene, R. J., Katz, B. A., Mol, C., Ho, J. D., Jennings, A. J., et al. (2004). Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* 12, 1325–1334. doi: 10.1016/j.str.2004.04.012
- Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A. J., and Soll, D. R. (2001). The histone deacetylase genes HDA1 and RPD3 play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 183, 4614–4625. doi: 10.1128/JB.183.15.4614-4625.2001
- Stevenson, J. S., and Liu, H. (2011). Regulation of white and opaque cell-type formation in *Candida albicans* by Rtt109 and Hst3. *Mol. Microbiol.* 81, 1078–1091. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07754.x
- Stevenson, J. S., and Liu, H. (2013). Nucleosome assembly factors CAF-1 and HIR modulate epigenetic switching frequencies in an H3K56 acetylation-associated manner in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 12, 591–603. doi: 10.1128/EC.00334-12
- Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 737–748. doi: 10.1038/nrmicro2636
- Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., and Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* 8, 1325–1337. doi: 10.2217/fmb.13.101
- Trojer, P., Brandtner, E. M., Brosch, G., Loidl, P., Galehr, J., Linzmaier, R., et al. (2003). Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts. *Nucleic Acids Res.* 31, 3971–3981. doi: 10.1093/nar/gkg473
- Tscherner, M., Zwolanek, F., Jenull, S., Sedlazeck, F. J., Petryshyn, A., Frohner, I. E., et al. (2015). The *Candida albicans* histone acetyltransferase Hat1 regulates stress resistance and virulence via distinct chromatin assembly pathways. *PLoS Pathog.* 11:e1005218. doi: 10.1371/journal.ppat.1005218
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y., and Koizumi, K. (1976). A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J. Antibiot.* 29, 1–6. doi: 10.7164/antibiotics.29.1
- Uhl, M. A., Biery, M., Craig, N., and Johnson, A. D. (2003). Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*. *EMBO J.* 22, 2668–2678. doi: 10.1093/emboj/cdg256
- Uppuluri, P., Pierce, C. G., Thomas, D. P., Bubeck, S. S., Saville, S. P., and Lopez-Ribot, J. L. (2010). The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot. Cell* 9, 1531–1537. doi: 10.1128/EC.00111-10
- Wurtele, H., Tsao, S., Lépine, G., Mullick, A., Tremblay, J., Drogaris, P., et al. (2010). Modulation of histone H3 lysine 56 acetylation as an antifungal therapeutic strategy. *Nat. Med.* 16, 774–780. doi: 10.1038/nm.2175
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265, 17174–17179.
- Yoshida, M., Nomura, S., and Beppu, T. (1987). Effects of trichostatin on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 47, 3688–3691.
- Zacchi, L. F., Schulz, W. L., and Davis, D. A. (2010). HOS2 and HDA1 encode histone deacetylases with opposing roles in *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS ONE* 5:e12171. doi: 10.1371/journal.pone.0012171
- Zhang, L., and Xu, W. (2015). Histone deacetylase inhibitors for enhancing activity of antifungal agent: a patent evaluation of WO2014041424(A1). *Expert Opin. Ther. Pat.* 25, 237–240. doi: 10.1517/13543776.2014.981256

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Garnaud, Champlébois, Maubon, Cornet and Govin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Figure 1

Histone deacetylases and their inhibition in *Candida* species

Cécile Garnaud, Morgane Champleboux, Danièle Maubon, Muriel Cornet*, Jérôme Govin*

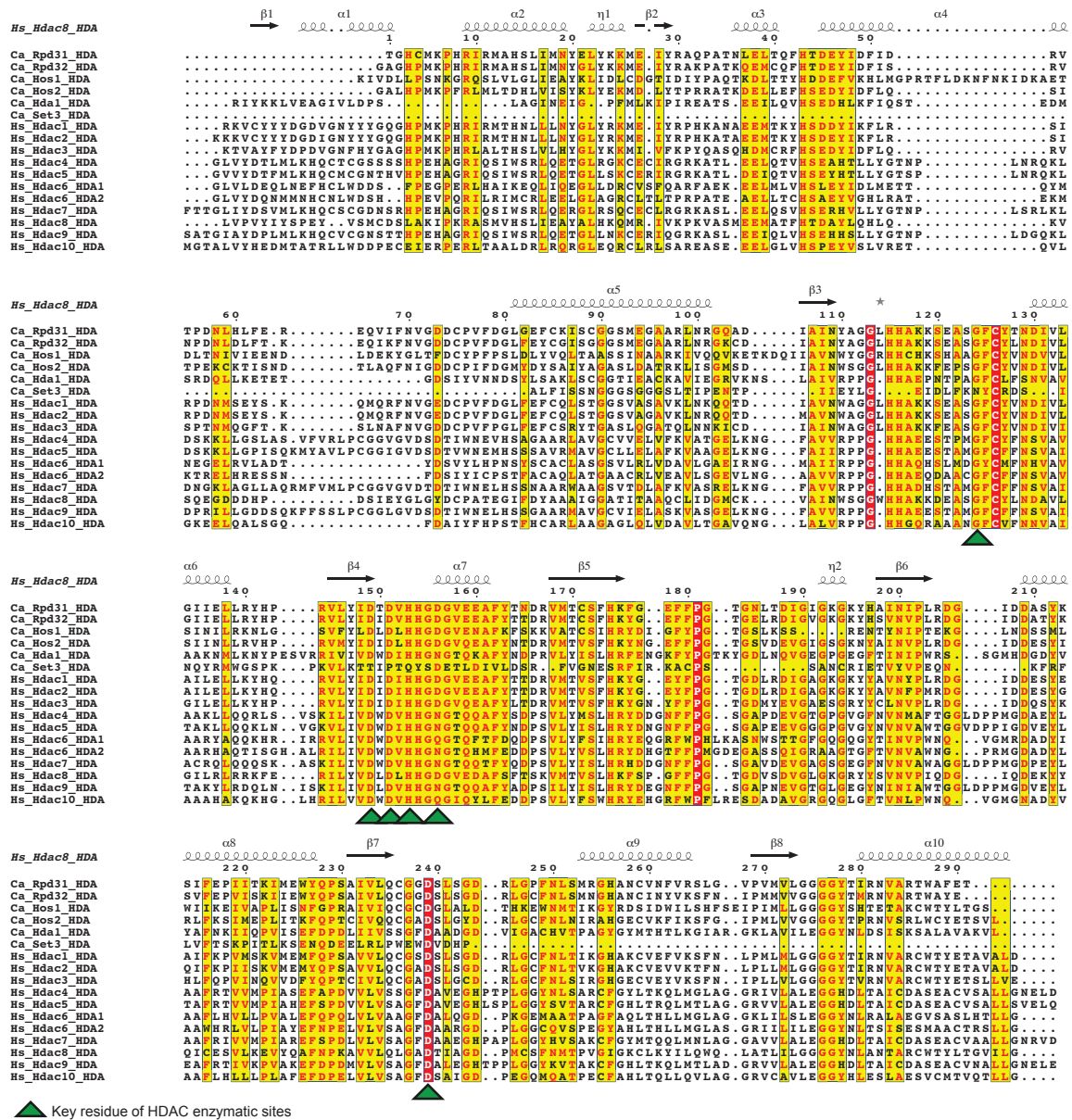
*** Correspondence:**

Muriel Cornet

mcornet@chu-grenoble.fr

Jérôme Govin

Jerome.Govin@inserm.fr



Supplementary Figure 1. Sequence alignment of histone deacetylase domain from human and *C. albicans* HDACs.

Histone deacetylase domains were aligned with NPS@ (Combet et al., 2000) and represented with ESPrnt 3.0 (Robert and Gouet, 2014). Secondary structure was obtained from HDAC8 (PDB 1T69). Sirtuins were omitted for clarity reasons. Key amino acids of the enzymatic pocket are pointed by a green arrow and obtained from (Lombardi et al., 2011).

Supplemental references

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deléage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25, 147–150.

Lombardi, P. M., Cole, K. E., Dowling, D. P., and Christianson, D. W. (2011). Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 735–743. doi:10.1016/j.sbi.2011.08.004.

Robert, X., and Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, W320-324. doi:10.1093/nar/gku316.

Supplementary Table 1

Histone deacetylases and their inhibition in *Candida* species

Cécile Garnaud, Morgane Champleboux, Danièle Maubon, Muriel Cornet*, Jérôme Govin*

*** Correspondence:**

Muriel Cornet

mcornet@chu-grenoble.fr

Jérôme Govin

Jerome.Govin@inserm.fr

Class I

	Ca_Rpd31	Ca_Rpd32	Cg_Rpd3	Sc_Rpd3	Ca_Hos2	Cg_Hos2	Sc_Hos2	Ca_Hos1	Cg_Hos1	Sc_Hos1
Ca_Rpd31	100	74	76	75	47	44	45	30	31	29
Ca_Rpd32	74	100	86	84	49	47	46	30	33	29
Cg_Rpd3	76	86	100	93	50	49	47	29	31	29
Sc_Rpd3	75	84	93	100	51	48	47	29	31	29
Ca_Hos2	47	49	50	51	100	65	66	31	32	32
Cg_Hos2	44	47	49	48	65	100	82	31	33	29
Sc_Hos2	45	46	47	47	66	82	100	33	34	31
Ca_Hos1	30	30	29	29	31	31	33	100	37	37
Cg_Hos1	31	33	31	31	32	33	34	37	100	47
Sc_Hos1	29	29	29	29	32	29	31	37	47	100

Class II

	Ca_Hda1	Cg_Hda1	Sc_Hda1	Ca_Hos3	Cg_Hos3	Sc_Hos3
Ca_Hda1	100	53	54	21	20	20
Cg_Hda1	53	100	77	23	22	22
Sc_Hda1	54	77	100	21	21	20
Ca_Hos3	21	23	21	100	54	52
Cg_Hos3	20	22	21	54	100	76
Sc_Hos3	20	22	20	52	76	100

Class III

	Ca_Hst2	Cg_Hst2	Sc_Hst2	Ca_Sir2	Sc_Sir2	Cg_Sir2	Sc_Hst1	Cg_Hst1	Ca_Hst1	Cg_Hst4	Sc_Hst4	Ca_Hst3	Cg_Hst3	Sc_Hst3
Ca_Hst2	100	48	45	38	34	36	34	33	34	27	27	30	28	29
Cg_Hst2	48	100	50	36	35	33	33	33	31	26	26	25	26	26
Sc_Hst2	45	50	100	35	33	32	32	33	33	25	26	26	26	23
Ca_Sir2	38	36	35	100	36	38	38	36	40	25	24	30	31	29
Sc_Sir2	34	35	33	36	100	62	63	58	42	24	25	27	28	28
Cg_Sir2	36	33	32	38	62	100	66	56	43	22	25	29	28	29
Sc_Hst1	34	33	32	38	63	66	100	56	45	24	26	28	28	28
Cg_Hst1	33	33	33	36	58	56	56	100	43	23	25	29	29	31
Ca_Hst1	34	31	33	40	42	43	45	43	100	27	26	30	29	31
Cg_Hst4	27	26	25	25	24	22	24	23	27	100	56	32	33	35
Sc_Hst4	27	26	26	24	25	25	26	25	26	56	100	33	32	32
Ca_Hst3	30	25	26	30	27	29	28	29	30	32	33	100	43	48
Cg_Hst3	28	26	26	31	28	28	28	29	29	33	32	43	100	58
Sc_Hst3	29	26	23	29	28	29	28	31	31	35	32	48	58	100

Supplementary Table 1. Percent identity matrix of full length HDACs from *C. albicans*, *C. glabrata* and *S. cerevisiae*.

Full length HDAC proteins from *C. albicans*, *C. glabrata* and *S. cerevisiae* have been aligned with Clustal Omega (McWilliam et al., 2013), where this information has been downloaded. Each class of HDACs has been treated independently. This information corresponds to the phylogenetic trees presented in Fig. 1.

Supplemental references

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., et al. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597-600. doi:10.1093/nar/gkt376.

Supplementary Table 2

Histone deacetylases and their inhibition in *Candida* species

Cécile Garraud, Morgane Champleboux, Danièle Maubon, Muriel Cornet*, Jérôme Govin*

*** Correspondence:**

Muriel Cornet

mcornet@chu-grenoble.fr

Jérôme Govin

Jerome.Govin@inserm.fr

																											<i>C. albicans</i>		<i>H. sapiens</i>					
	Ca_Hst3_HDA	Hs_Sirt1_HDA	Ca_Hst1_HDA	Ca_Sir2_HDA	Ca_Hst2_HDA	Hs_Sirt2_HDA	Hs_Sirt3_HDA	Hs_Sirt6_HDA	Hs_Sirt7_HDA	Hs_Sirt4_HDA	Hs_Sirt5_HDA	Ca_Set3_HDA	Ca_Hos3_HDA	Ca_Hda1_HDA	Hs_Hdac7_HDA	Hs_Hdac9_HDA	Hs_Hdac4_HDA	Hs_Hdac5_HDA	Hs_Hdac6_HDA2	Hs_Hdac10_HDA	Hs_Hdac6_HDA2	Ca_Hos1_HDA	Hs_Hdac8_HDA	Ca_Hos2_HDA	Hs_Hdac3_HDA	Hs_Hdac1_HDA	Hs_Hdac2_HDA	Ca_Rpd31_HDA	Ca_Rpd32_HDA	Min		Max	Min	Max
Ca_Hst3_HDA	100	33	34	32	32	33	30	23	26	23	21	15	14	16	11	15	13	12	14	12	12	14	16	16	15	15	16	14	14	14	100	11	33	Ca_Hst3_HDA
Hs_Sirt1_HDA	33	100	51	46	41	45	42	24	23	28	27	16	12	12	14	14	13	14	15	14	13	12	15	16	15	15	15	17	16	12	51	13	100	Hs_Sirt1_HDA
Ca_Hst1_HDA	34	51	100	55	40	38	39	24	23	28	26	14	11	15	14	16	13	14	14	13	13	15	17	15	13	14	14	14	14	11	100	13	51	Ca_Hst1_HDA
Ca_Sir2_HDA	32	46	55	100	40	41	43	25	27	27	28	13	8	13	15	15	14	12	11	13	11	8	14	12	11	10	10	14	8	100	10	46	Ca_Sir2_HDA	
Ca_Hst2_HDA	32	41	40	40	100	48	46	26	25	24	23	15	12	14	13	14	14	14	12	11	13	11	13	14	12	15	14	18	11	100	11	48	Ca_Hst2_HDA	
Hs_Sirt2_HDA	33	45	38	41	48	100	54	27	24	27	24	12	10	17	13	14	13	14	11	11	13	12	13	14	13	14	12	15	10	48	11	100	Hs_Sirt2_HDA	
Hs_Sirt3_HDA	30	42	39	43	46	54	100	28	27	28	25	10	13	16	15	18	16	15	13	12	14	11	14	12	13	14	15	15	11	46	12	100	Hs_Sirt3_HDA	
Hs_Sirt6_HDA	23	24	24	25	26	27	28	100	41	28	23	9	11	13	14	15	13	15	10	12	12	12	12	10	10	12	11	12	10	26	10	100	Hs_Sirt6_HDA	
Hs_Sirt7_HDA	26	23	23	27	25	24	27	41	100	29	25	11	13	10	12	14	13	12	10	10	10	14	9	13	14	14	14	15	10	27	9	100	Hs_Sirt7_HDA	
Hs_Sirt4_HDA	23	28	28	27	24	27	28	28	29	100	28	11	11	13	12	15	17	15	13	14	13	12	14	16	17	13	13	14	12	11	28	12	100	Hs_Sirt4_HDA
Hs_Sirt5_HDA	21	27	26	28	23	24	25	23	25	28	100	11	13	9	12	12	13	12	12	14	12	13	11	12	12	13	12	12	9	28	11	100	Hs_Sirt5_HDA	
Ca_Set3_HDA	15	16	14	13	15	12	10	9	11	11	11	100	14	16	15	17	18	14	13	14	13	8	15	13	13	11	11	17	8	17	9	18	Ca_Set3_HDA	
Ca_Hos3_HDA	14	12	11	8	12	10	13	11	13	11	13	14	100	24	23	23	21	20	25	24	24	17	18	21	20	18	18	16	16	8	100	10	25	Ca_Hos3_HDA
Ca_Hda1_HDA	16	12	15	13	14	17	16	13	10	13	9	16	24	100	41	43	44	42	45	40	42	23	28	30	26	27	28	27	26	13	100	9	45	Ca_Hda1_HDA
Hs_HDAC7_HDA	11	14	14	15	13	13	15	14	12	12	12	15	23	41	100	73	77	72	50	43	43	19	23	24	23	25	24	23	23	11	41	12	100	Hs_HDAC7_HDA
Hs_HDAC9_HDA	15	14	16	15	14	14	18	15	14	15	12	17	23	43	73	100	77	78	46	40	42	21	24	25	24	25	24	23	23	14	43	12	100	Hs_HDAC9_HDA
Hs_HDAC4_HDA	13	13	13	14	14	13	16	13	13	17	13	18	21	44	77	77	100	79	51	41	43	19	23	26	24	26	25	26	26	13	44	13	100	Hs_HDAC4_HDA
Hs_HDAC5_HDA	12	14	14	12	14	14	15	15	12	15	12	14	20	42	72	78	79	100	47	39	42	19	23	26	26	26	25	25	25	12	42	12	100	Hs_HDAC5_HDA
Hs_HDAC6_HDA2	14	15	14	11	12	11	13	10	10	13	12	13	25	45	50	46	51	47	100	54	49	24	27	25	23	26	26	24	24	11	45	10	100	Hs_HDAC6_HDA2
Hs_HDAC10_HDA	12	14	13	13	11	11	12	12	10	14	14	14	24	40	43	40	41	39	54	100	56	20	24	23	22	22	22	22	22	11	40	10	100	Hs_HDAC10_HDA
Hs_HDAC6_HDA2	12	13	13	11	13	13	14	12	10	13	12	13	24	42	43	42	43	42	49	56	100	20	23	26	24	25	25	25	25	11	42	10	100	Hs_HDAC6_HDA2
Ca_Hos1_HDA	14	12	15	8	11	12	11	12	14	12	13	8	17	23	19	21	19	19	24	20	20	100	38	36	32	36	36	33	33	8	100	11	38	Ca_Hos1_HDA
Hs_HDAC8_HDA	16	15	17	14	13	13	14	12	9	14	11	15	18	28	23	24	23	23	27	24	23	38	100	42	43	44	44	41	45	13	45	9	100	Hs_HDAC8_HDA
Ca_Hos2_HDA	16	16	15	12	14	14	12	10	13	16	12	13	21	30	24	25	26	26	25	23	26	36	42	100	63	58	56	55	56	12	100	10	63	Ca_Hos2_HDA
Hs_HDAC3_HDA	15	15	13	11	12	13	13	10	14	17	12	13	20	26	23	24	24	26	23	22	24	32	43	63	100	66	65	60	66	11	66	10	100	Hs_HDAC3_HDA
Hs_HDAC1_HDA	15	15	14	10	15	14	14	12	14	13	13	11	18	27	25	25	26	26	26	22	25	36	44	58	66	100	94	67	70	10	70	12	100	Hs_HDAC1_HDA
Hs_HDAC2_HDA	16	15	14	10	14	12	15	11	14	13	12	11	18	28	24	25	25	26	26	22	25	36	44	56	65	94	100	68	70	10	70	11	100	Hs_HDAC2_HDA
Ca_Rpd31_HDA	14	17	14	14	18	15	15	12	15	14	12	17	16	27	23	24	26	25	24	22	25	33	41	55	60	67	68	100	83	14	100	12	68	Ca_Rpd31_HDA
Ca_Rpd32_HDA	14	16	14	11	16	14	13	12	14	12	9	16	16	26	23	23	26	25	24	22	25	33	45	56	66	70	70	83	100	11	100	9	70	Ca_Rpd32_HDA

Supplementary Table 2. Percent identity matrix of the histone deacetylase domains of HDACs from *C. albicans* and human.

Sequences have been downloaded from NCBI and aligned with Clustal Omega (McWilliam et al., 2013) and the percent identity matrix was downloaded. Gray shades highlight the level of identity between entries. Set3 has been highlighted in red as the most divergent HDAC from human ones. Minimal and maximal values of the matrix are indicated for histone deacetylase domains from *C. albicans* and *H. sapiens*.

HDA, histone deacetylase domain.

Supplemental references

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., et al. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597-600. doi:10.1093/nar/gkt376.

PARTIE 4 : RESULTATS

1. Identification de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.

Une première partie de mon travail de thèse a consisté en l'étude des mécanismes moléculaires associés à la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. par séquençage nouvelle génération. Différents gènes impliqués dans la résistance aux antifongiques ont été séquencés au sein d'isolats cliniques, dans l'objectif d'identifier des mutations impliquées dans la résistance aux antifongiques et d'étudier la cinétique d'apparition ou de disparition de ces mutations sous pression antifongique.

Ce travail a donné lieu à une publication dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* en 2015 (nombre de citations : 6).

1.1. Résumé

Du fait de l'utilisation croissante des antifongiques azolés et des échinocandines dans la prévention et le traitement des candidoses invasives, des souches résistantes voire multi-résistantes à ces composés émergent. Comme vu plus haut, la résistance aux antifongiques a une origine génétique. Afin d'investiguer les mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*, 6 gènes impliqués dans la résistance ont été étudiés par séquençage nouvelle génération (NGS) pour 40 isolats cliniques : 9 isolats possédant un génotype connu, 8 isolats cliniques résistants et 23 isolats séquentiels prélevés à différents temps chez des patients traités ou non par antifongiques. Au total, 402 933 séquences ont été obtenues et analysées, permettant d'identifier 391 SNPs, parmi lesquels 6 SNPs préalablement impliqués dans la résistance aux antifongiques et cinq SNPs inédits. De plus, une duplication de deux nucléotides conduisant à l'apparition d'un codon-stop prématuré a été détectée au sein du gène *CgPDR1* pour un des isolats. Toutes les mutations des gènes *FKS* identifiées dans cette étude ont été détectées au sein de souches isolées de patients ayant reçu un traitement antérieur par échinocandines, confirmant le rôle de la pression antifongique dans la sélection de mutants résistants. Enfin, l'analyse simultanée de gènes impliqués dans la résistance aux échinocandines et de gènes impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés chez *Candida* spp. a permis de détecter des mutations conjointes au sein de ces différents gènes. Par exemple, un isolat de *C. glabrata* résistant aux échinocandines et hypersensible aux antifongiques azolés possédait la mutation S663P du gène *FKS2*, préalablement associée à la résistance aux échinocandines, ainsi qu'une mutation du gène *CgPDR1* qui pourrait être une mutation perte de fonction responsable du phénotype

hypersensible aux azolés de cette souche. De même, un autre isolat de *C. glabrata* possédait à la fois une mutation de *FKS2* et une mutation de *CgPDR1*. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour savoir si ces associations de mutations sont fortuites ou non. Ce travail démontre l'intérêt du NGS et d'une approche multigénique pour l'étude des mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.

1.2. Article

Next-generation sequencing offers new insights into the resistance of *Candida* spp. to echinocandins and azoles

Cécile Garnaud^{1,2*}, Françoise Botterel^{3,4}, Natacha Sertour⁵, Marie-Elisabeth Bougnoux^{5,6}, Eric Dannaoui^{4,7}, Sylvie Larrat^{8,9}, Christophe Hennequin^{10,11}, Jesus Guinea¹², Muriel Cornet^{1,2} and Danièle Maubon^{1,2}

¹Laboratoire de Parasitologie–Mycologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France; ²Laboratoire TIMC–TheREx, UMR 5525 CNRS–UJF, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France; ³Unité de Parasitologie–Mycologie, Département de Virologie, Bactériologie–Hygiène, Mycologie–Parasitologie, CHU Henri Mondor, APHP, DHU VIC, Créteil, France; ⁴EA Dynamyc UPEC–ENVA, Créteil, France; ⁵Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques–INRA USC2019, Institut Pasteur, Paris, France; ⁶Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker Enfants Malades, Service de Microbiologie, Unité de Parasitologie–Mycologie, F-75015 Paris, France; ⁷Université Paris–Descartes, Faculté de Médecine, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Unité de Parasitologie–Mycologie, Service de Microbiologie, Paris, France; ⁸Laboratoire de Virologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France; ⁹UVHCI UMI 3265 CNRS–UJF–EMBL, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France; ¹⁰Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital St Antoine, Service de Parasitologie–Mycologie, F-75012 Paris, France; ¹¹Centre d’Immunologie et de Maladies Infectieuses (CIMI–Paris), Inserm U1135, CNRS ERL 8255, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 CR7, Paris, France; ¹²Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

*Corresponding author. Laboratoire de Parasitologie–Mycologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France. Tel: +33-4-76-76-54-90; Fax: +33-4-76-76-52-28; E-mail: cgarnaud@chu-grenoble.fr

Received 20 January 2015; returned 24 February 2015; revised 24 April 2015; accepted 24 April 2015

Objectives: MDR *Candida* strains are emerging. Next-generation sequencing (NGS), which enables extensive and deep genome analysis, was used to investigate echinocandin and azole resistance in clinical *Candida* isolates.

Methods: Six genes commonly involved in antifungal resistance (*ERG11*, *ERG3*, *TAC1*, *CgPDR1*, *FKS1* and *FKS2*) were analysed using NGS in 40 *Candida* isolates (18 *Candida albicans*, 15 *Candida glabrata* and 7 *Candida parapsilosis*). The strategy was validated using strains with known sequences. Then, 8 clinical strains displaying antifungal resistance and 23 sequential isolates collected from 10 patients receiving antifungal therapy were analysed.

Results: A total of 391 SNPs were detected, among which 6 coding SNPs were reported for the first time. Novel genetic alterations were detected in both azole and echinocandin resistance genes. A *C. glabrata* strain, which was resistant to echinocandins but highly susceptible to azoles, harboured an *FKS2* S663P mutation plus a novel presumed loss-of-function *CgPDR1* mutation. This isolate was from a patient with deep-seated and urinary candidiasis. Another *C. glabrata* isolate, with an MDR phenotype, carried a new *FKS2* S663A mutation and a new putative gain-of-function *CgPDR1* mutation (T370I); this isolate showed mutated (80%) and WT (20%) populations and was collected after 75 days of exposure to caspofungin from a patient who underwent complicated abdominal surgery.

Conclusions: This study shows that NGS can be used for extensive assessment of genetic mutations involved in antifungal resistance. This type of wide genome approach will become very valuable for detecting mechanisms of resistance in clinical strains subjected to multidrug pressure.

Keywords: NGS, antifungals, mutations

Introduction

Recent increases in the resistance of *Candida* spp. to antifungals have led to refractory infections in patients treated with azoles or echinocandins.^{1–3} The molecular mechanisms underlying the acquired resistance of *Candida* spp. to echinocandins involve mutations in the *FKS* genes: *FKS1* in *Candida* spp. and *FKS1* and *FKS2* in

Candida glabrata. Most of these mutations confer cross-resistance to all three echinocandins by modifying (1,3)- β -D-glucan synthase, which catalyses the elongation of (1,3)- β -D-glucan, a major cell wall component. Acquired resistance to azoles is generally mediated by different mechanisms, frequently drug efflux resulting from gain-of-function (GOF) mutations of genes encoding regulators of transporters of the ATP-binding cassette (ABC)

superfamily.⁴ Overproduction of the target enzyme, Erg11p, or amino acid substitutions in Erg11p are also important mechanisms in azole resistance.^{5,6} *ERG3* mutations are associated with cross-resistance to azoles through a metabolic bypass.⁷ There is growing evidence that the presence of mutations, especially *FKS* mutations, may be a predictive marker of clinical failure.^{1,8} Recent reports document the worrying emergence of MDR *C. glabrata* strains, indicating the need for a more comprehensive approach to studying the genomic basis of antifungal resistance, especially for azole and echinocandin target genes.^{1,9,10}

The development of next-generation sequencing (NGS) over recent years has led to the availability of benchtop platforms, making these techniques accessible to clinical microbiologists. Clinical applications are constantly growing,^{11–13} but NGS has not yet been used to detect antifungal resistance in the three species most commonly involved in disseminated candidiasis. Here, we describe the use of NGS to detect resistance mutations in clinical *Candida* spp. strains collected from patients given antifungal treatment. We show that NGS technology allows accurate and thorough genotyping of genes commonly involved in antifungal resistance and confirm that NGS is suitable for studying antifungal resistance in clinical settings.

Materials and methods

Study design, strains and patients

The study was divided into three phases. Phase 1 (validation phase) involved establishing the feasibility and reliability of the GS Junior[®] sequencing strategy to detect azole and echinocandin resistance. In this phase, three ATCC[®] reference strains and seven isolates with known sequences of the genes of interest were analysed (Table 1). Clinical strains with unknown genotypes were analysed in Phases 2 and 3. In Phase 2, eight strains displaying resistance or decreased susceptibility to azoles or echinocandins and collected from eight patients hospitalized in Grenoble University Hospital (GUH, Grenoble, France) were sequenced (Table 2). Phase 3 involved studying the kinetics of appearance or disappearance of resistance mutations under antifungal pressure: 23 clinical isolates collected sequentially from 10 patients selected on the basis of antifungal exposure and hospitalized in GUH or the Henri Mondor University Hospital (Créteil, France) were analysed (Table 3). A total of 40 isolates (18 *Candida albicans*, 15 *C. glabrata* and 7 *Candida parapsilosis*) were analysed in this study.

Amplicon library preparation

Six genes often involved in antifungal resistance were analysed: *ERG11* (azole target), *ERG3* (ergosterol biosynthesis pathway), *TAC1* and *CgPDR1* (transcription factors involved in the regulation of ABC transporters) and *FKS1* and *FKS2* (echinocandin targets). These genes were either entirely (*ERG11* and *ERG3*) or partly (*TAC1*, *CgPDR1*, *FKS1* and *FKS2*) sequenced (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). Due to technical constraints, selection of these genes and amplicons was based on their implication in multidrug resistance, their size as well as the number and position of known mutations. The amplicon library was prepared using the Universal Tailed Amplicon Sequencing design. Briefly, each region of interest was first amplified using specific oligonucleotides coupled to M13 universal primers (PCR1). These universal sequences were then targeted in a second PCR (PCR2) to add a multiplex identifier plus the primers A or B of the 454 Sequencing System as described in the 'Guidelines for Amplicon Experimental Design—454 Sequencing System' (Roche Diagnostics).

DNA extraction and PCR

A 24 h pre-culture of each relevant strain was plated onto Sabouraud chloramphenicol medium (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). To favour the detection of any different variant strains, which is one of the main advantages of NGS, five colonies (and thus 5 cfu) were inoculated into 5 mL of liquid YPD medium (0.5% yeast extract, 1% peptone and 2% glucose) and incubated for 20 h at 30°C. The QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and mechanical cell lysis were used to isolate DNA. PCR1 was carried out with 100 ng of DNA and PCR2 with a 1:100 dilution of PCR1 products or, if necessary, a 1:2 dilution of purified PCR1 products. Primer sequences are detailed in Tables S2 and S3.

Purification

PCR products were purified with Agencourt AMPureXP magnetic beads (Beckmann Coulter, Beverly, MA, USA). After qualitative and quantitative analysis, purified PCR2 products were diluted to 1×10^9 molecules/ μ L and an equal volume of each dilution was pooled to generate the amplicon library. An additional purification step was performed on the amplicon pool.

Emulsion PCR (emPCR) and sequencing

EmPCR and sequencing were carried out as recommended in the 'Lib-A emPCR Amplification Method Manual' and the 'Sequencing Method Manual for GS Junior Titanium Series' (Roche Diagnostics).

Bioinformatics analysis

Reads were analysed and compared with the reference sequences (Table S4) using ReferenceMapper software (Roche Diagnostics). Combining information on flow signal, quality score and difference type, the software established a list of 'high-confidence' nucleotide differences, which were further studied ('454 Sequencing System Software Manual', Roche Diagnostics). Non-synonymous mutations were compared with published data.

Drug susceptibility testing

MICs were first determined using the standardized Etest[®] method as it is the method used in routine practice. All were confirmed by the EUCAST reference method (except for amphotericin B) and interpreted according to the revised EUCAST breakpoints (anidulafungin MIC was used as the marker for echinocandin susceptibility).^{14,15}

Genotyping

Sequential isolates of *C. albicans* were subjected to an MLST genotyping analysis as previously described.¹⁶ Sequential isolates of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* were typed using microsatellites according to the methods described by Sabino et al.¹⁷ and Enache-Angoulvant et al.,¹⁸ respectively.

Results

NGS analysis of *Candida* spp. reference strains and resistant strains displaying previously characterized mutations

Six *C. albicans*, three *C. glabrata* and one *C. parapsilosis* strains with known sequences of the genes of interest were analysed concomitantly in a single run (Table 1). The deep sequencing of 122 amplicons allowed 96510 reads to be obtained. Mean and extreme depth coverages were 720 \times (217 \times ; 1667 \times). NGS analysis

Table 1. Characteristics of the strains analysed in Phase 1 (validation phase)

Isolate	Species	Isolation site	Phenotype	Amino acid substitutions ^a						Described in
				ERG11	ERG3	TAC1	CgPDR1	FKS1	FKS2	
ATCC [®] 90028 ^{TMb}	CA	blood culture	WT	WT	WT	WT	—	WT	—	http://www.lgcstandards-atcc.org/
DSY2323	CA	oropharynx	azole resistant	S405F (100%)	WT	G980E (100%)	—	WT	—	Coste et al. ³²
DSY292	CA	oropharynx	azole resistant	Y132H (50%), G464S (100%), R467K (100%)	WT	WT	—	WT	—	Sanglard et al. ³³
DSY296	CA	oropharynx	azole resistant	G129A (100%), G464S (100%), G450E (100%)	WT	N977D (100%)	—	WT	—	MacCallum et al. ³⁴
CAAL2	CA	respiratory tract	azole resistant	D116E (46%), D153E (46%)	L193R (100%)	WT	—	WT	—	Morio et al. ^{6,7}
CAAL74	CA	mouth	fluconazole resistant	Y132F (99.9%), E266D (98%), G448V (98%), V488I (97%)	H28Y (45%), L193R (95%)	WT	—	WT	—	Morio et al. ⁶
ATCC [®] 2001 ^{TMb}	CG	faeces	WT	WT	—	—	WT	WT	WT	http://www.lgcstandards-atcc.org/
D/748	CG	blood culture	echinocandin resistant	WT	—	—	WT	WT	S663P (100%)	Singh-Babak et al. ²⁵ (Isolate D)
4/Tg5	CG	blood culture	azole and echinocandin resistant	WT	—	—	WT	F1335L (100%)	S663P (100%), M1331I (100%)	Chapeland-Leclerc et al. ³¹ (Isolate 4)
ATCC [®] 22019 ^{TMb}	CP	faeces	WT	F132Y ^c (99.9%)	—	—	—	—	—	http://www.lgcstandards-atcc.org/

CA, *C. albicans*; CG, *C. glabrata*; CP, *C. parapsilosis*.

^aLimited to the proteins encoded by the genes or regions of genes analysed in the study.

^bReference strains.

^cKnown difference between the amino acid sequence of this strain (GenBank: GQ302972.1) and the reference sequence used in this study (Table S4).

Table 2. Characteristics of the isolates displaying antifungal resistance *in vitro* and analysed in Phase 2

Patient	Isolate	Species	Underlying condition(s)	Antifungal pre-exposure ^a	Isolation site	MIC ^b (mg/L)						Clinical outcome
						CAS	ANF	MCF	FLC	VRC	AMB	
1	CA-GRE-TOP	CA	sarcoma	MCF, FLC	urine	2	0.25	1	≤0.125	≤0.015	0.25	death
2	CG-GRE-DUC	CG	HIV	CAS	mouth	>8	2	0.25	8	0.25	0.5	death
3	CG-GRE-AHR	CG	aspergilloma	CAS, VRC	BAL	0.5	0.06	≤0.015	>64	4	0.38	favourable
4	CG-GRE-CAP	CG	ureteral lithiasis	NA	urine	4	2	1	1	0.03	0.38	favourable
5	CG-GRE-ALF	CG	HIV	FLC	urine	0.5	0.03	≤0.015	32	0.5	0.23	favourable
6	CP-GRE-RIV1	CP	pancreatitis	none	peritoneal fluid	2	2	1	4	0.125	0.032	favourable
7	CP-GRE-MAR	CP	septic shock, diabetes	none	blood culture	2	2	1	4	0.125	0.125	death
8	CP-GRE-CHA	CP	HIV	MCF, FLC, AMB ^c	catheter	1	2	1	4	0.125	0.19	death

CA, *C. albicans*; CG, *C. glabrata*; CP, *C. parapsilosis*; CAS, caspofungin; ANF, anidulafungin; MCF, micafungin; FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; AMB, amphotericin B; BAL, bronchoalveolar lavage; NA, not available.

^aDuring the past year.

^bDetermined by the EUCAST reference method (except for amphotericin B: Etest[®] method).

^cLiposomal amphotericin B.

of the resistant strains sequences that had been previously characterized successfully identified all expected mutations and frequencies of mutations. These frequencies were consistent with the heterozygous or the homozygous allelic dosages in the diploid species (Table 1). Five additional missense mutations were detected (Table 1): *FKS1* F1335L and *FKS2* M1331I (*C. glabrata* 4/Tg5) as well as *ERG3* H28Y and *ERG3* L193R (*C. albicans* CAAL74) were found in regions that were not previously analysed in these strains; and *ERG11* G450E was found in *C. albicans* strain DSY296 and has previously been described in other strains.^{6,19}

Neither positive nor false negative mutation was evidenced in the NGS reads. The protocol was therefore used in further experiments.

NGS analysis of *Candida* spp. clinical isolates

Altogether, 8 clinical strains and 23 sequential isolates with unknown genotypes were analysed in Phases 2 and 3. Three sequencing runs were successively performed on 106, 94 and 208 amplicons and gave 86027, 108665 and 111731 reads, respectively. Mean and extreme depth coverages were 810× (215×; 2984×), 1150× (488×; 2648×) and 537× (58×; 1626×), respectively. A total of 391 SNPs were detected (Tables S5 and S6): 37 were coding SNPs, including 25 known polymorphisms and 5 known mutations involved in antifungal resistance (underlined in Tables 4 and 5)—*FKS1* S645P (CA-GRE-TOP), *ERG3* W228Stop (CA-HM-MAC1 and CA-HM-MAC2), *FKS1* F625S (CG-GRE-DUC), *FKS2* S663P (CG-GRE-CAP) and *FKS2* F659S (CG-HM-HAB2). We thus report six mutations for the first time (in bold in Tables 4 and 5): four were found in three *C. glabrata* isolates with non-WT susceptibility phenotypes suggesting an implication of these mutations in antifungal resistance [*CgPDR1* K359Stop (CG-GRE-CAP), *CgPDR1* T370I (CG-HM-HAB1 and 2) and *FKS2* S663A (CG-HM-HAB2)], one in a *C. glabrata* strain with a WT phenotype [*FKS2* G1365C (CG-GRE-FAU1)] and one in a heterozygous state in a *C. albicans* strain with a WT phenotype for which implication in antifungal resistance needs to be assessed [*ERG3* D103N (CA-GRE-TOP)].

An *FKS* mutation was detected in all echinocandin-resistant strains analysed in Phase 2: *FKS1* S645P (CA-GRE-TOP), *FKS1* F625S (CG-GRE-DUC) and *FKS2* S663P (CG-GRE-CAP) (Tables 4 and 5).

The simultaneous sequencing of genes implicated in both azole and echinocandin resistance revealed two novel missense mutations in unexpected targets. In the echinocandin-resistant, azole-susceptible strain CA-GRE-TOP, the *FKS1* S645P substitution was associated with a heterozygous *ERG3* D103N mutation. In the echinocandin-resistant strain CG-GRE-CAP, the *FKS2* mutation was combined with a duplication of two nucleotides (−1020AG) in the *CgPDR1* gene (encoding the *CgPDR1* transcription factor), which leads to a frameshift and a premature stop codon (Figure 1). This duplication was confirmed by another NGS experiment and Sanger sequencing (data not shown).

Five azole-resistant strains (three *C. parapsilosis* and two *C. glabrata*) were analysed in Phase 2. No missense mutation was detected in these isolates.

Phase 3 involved studying the kinetics of appearance or disappearance of resistance mutations under antifungal therapy in 10 series of isolates. The clonal origin of isolates in each series was confirmed by genotyping analysis (data not shown).

Under echinocandin therapy, four *C. albicans* and four *C. glabrata* strains were isolated repeatedly (Patients 11–17, Table 3). In the *C. albicans* strains, NGS analysis did not reveal any change of the genomic sequences between the first and second isolates despite an echinocandin exposure ranging from 10 to 65 days (Table 3). All these *C. albicans* strains remained susceptible to echinocandins *in vitro* (Table 3). Allelic polymorphism of the *TAC1*, *ERG11* and *ERG3* genes was detected in all these strains. Isolates CA-HM-MAC1 and CA-HM-MAC2 displayed an *ERG3* mutation (W228Stop) that has been described elsewhere in the heterozygous state; both strains were azole susceptible (Tables 3 and 4).²⁰

Among the four *C. glabrata* strains that persisted *in vivo* under caspofungin therapy (ranging from 11 to 75 days), one, CG-HM-HAB, developed *in vitro* resistance after 75 days of treatment (Table 3). NGS analysis of the CG-HM-HAB2 isolate revealed two

Table 3. Characteristics of sequential isolates recovered under antifungal therapy and analysed in Phase 3

Patient	Strain		Underlying condition	Antifungal exposure (days) (period) ^a	Type of antifungal treatment	Isolation		MIC ^b (mg/L)					Clinical outcome
	isolate	species				site	day ^a	CAS	ANF	MCF	FLC	VRC	
6	CP-GRE-RIV1	CP	acute pancreatitis	AMB ^c (7) (D23; D30)	curative	peritoneal fluid	D1	2	2	1	4	0.125	favourable
	catheter					D24	2	2	1	4	0.125		
9	CP-GRE-LOR1	CP	colectomy surgery	FLC (30) (D2; D32)	curative	blood culture	D1	2	2	1	4	0.125	NA
	blood culture					D19	2	2	1	8	0.25		
10	CA-GRE-VIG1	CA	acute pancreatitis	FLC (30) (D4; D34)	pre-emptive	blood culture	D1	0.125	≤0.015	≤0.015	0.25	≤0.015	favourable
	drain fluid					D10	0.125	≤0.015	0.03	0.25	≤0.015		
	peritoneal fluid					D33	0.125	≤0.015	≤0.015	≤0.125	≤0.015		
11	CG-GRE-FAU1	CG	liver transplant	CAS (33) (D2; D35)	curative	blood culture	D1	0.25	0.03	≤0.015	8	0.25	favourable
	blood culture					D13	0.5	0.03	0.06	8	0.25		
12	CA-HM-FON1	CA	liver transplant	CAS (65) (D-1; D64)	prophylactic	urine	D1	0.125	≤0.015	0.06	≤0.125	≤0.015	death
	urine					D65	0.25	≤0.015	0.06	≤0.125	≤0.015		
	CG-HM-FON1	CG	liver transplant	CAS (65) (D-3; D62)	prophylactic	mouth	D1	0.25	0.03	0.06	16	0.25	
	peritoneal fluid					D56	0.25	0.03	0.06	16	0.25		
13	CA-HM-MAC1	CA	liver transplant	CAS (60) (D16; D76)	curative	mouth	D1	0.125	≤0.015	≤0.015	0.25	≤0.015	death
	axillary sample					D42	0.25	≤0.015	≤0.015	0.25	≤0.015		
14	CA-HM-CHV1	CA	liver transplant	CAS (16) (D3; D19)	prophylactic	catheter	D1	0.125	0.03	≤0.015	0.125	≤0.015	favourable
	mouth					D13	0.125	≤0.015	≤0.015	≤0.125	≤0.015		
15	CA-HM-SOU1	CA	liver transplant	CAS (32) (D-1; D31)	prophylactic	mouth	D1	0.125	≤0.015	0.03	0.25	≤0.015	favourable
	bile					D49	0.25	≤0.015	0.03	0.25	≤0.015		
16	CG-HM-HAB1	CG	liver transplant	CAS (95) (D-5; D90)	prophylactic then curative	urine	D1	0.5	0.03	0.06	>64	4	favourable
	urine					D70	2	2	1	>64	8		
17	CG-HM-BIL1	CG	liver transplant	CAS (17) (D-2; D15)	prophylactic	BAL	D1	0.25	0.03	0.06	8	0.25	favourable
	urine					D35	0.25	0.03	0.06	8	0.125		

CA, *C. albicans*; CG, *C. glabrata*; CP, *C. parapsilosis*; CAS, caspofungin; ANF, anidulafungin; MCF, micafungin; FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; D, day; NA, not available.

^aD1 is defined for each strain as the day of isolation of the first isolate.

^bDetermined by the EUCAST reference method.

^cLiposomal amphotericin B.

Table 4. *C. albicans* non-synonymous mutations found in this study

Patient	Isolate	Gene	Nucleotide substitution	Depth	Frequency	Amino acid change	Interpretation	
1	CA-GRE-TOP	<i>ERG11</i>	T348A	402	12.0	D116E	polymorphism ^a	
		<i>ERG3</i>	G307A	1584	51.0	D103N	may contribute to antifungal resistance	
		<u><i>FKS1</i> (HS1)</u>	<u>T1933C</u>	<u>852</u>	<u>100.0</u>	<u>S645P</u>	<u>involved in echinocandins resistance</u>	
		<i>TAC1</i>	C2804T	598	54.0	S935L	polymorphism ^a	
10	CA-GRE-VIG1	<i>TAC1</i>	T2822C	1287	97.0	S941P	polymorphism ^a	
	CA-GRE-VIG2	<i>TAC1</i>	T2822C	1110	98.0	S941P	polymorphism ^a	
	CA-GRE-VIG3	<i>TAC1</i>	T2822C	1190	99.0	S941P	polymorphism ^a	
12	CA-HM-FON1	<i>TAC1</i>	C2804T	149	62.0	S935L	polymorphism ^a	
	CA-HM-FON2	<i>TAC1</i>	T2822C	150	63.0	S941P	polymorphism ^a	
		<i>TAC1</i>	C2804T	198	49.0	S935L	polymorphism ^a	
13	CA-HM-MAC1	<u><i>ERG3</i></u>	<u>G684A</u>	<u>369</u>	<u>49.0</u>	<u>W228Stop</u>	<u>involved in azole resistance in the homozygous state</u>	
		<i>TAC1</i>	C2804T	156	49.0	S935L	polymorphism ^a	
		<i>TAC1</i>	T2822C	156	49.0	S941P	polymorphism ^a	
	CA-HM-MAC2	<u><i>ERG3</i></u>	<u>G684A</u>	<u>1313</u>	<u>48.0</u>	<u>W228Stop</u>	<u>involved in azole resistance in the homozygous state</u>	
		<i>TAC1</i>	C2804T	1260	53.0	S935L	polymorphism ^a	
		<i>TAC1</i>	T2822C	1258	54.0	S941P	polymorphism ^a	
14	CA-HM-CHV1	<i>ERG11</i>	T348A	58	21.0	D116E	polymorphism ^a	
		<i>ERG3</i>	C1052T	360	49.0	A351V	polymorphism ^a	
15	CA-HM-CHV2	<i>ERG3</i>	C1052T	182	60.0	A351V	polymorphism ^a	
	CA-HM-SOU1	<i>ERG11</i>	T348A	307	27.0	D116E	polymorphism ^a	
			<i>ERG11</i>	A798C	913	100.0	E266D	polymorphism ^a
			<i>ERG3</i>	C1052T	252	46.0	A351V	polymorphism ^a
	CA-HM-SOU2	<i>TAC1</i>	T2822C	788	100.0	S941P	polymorphism ^a	
	<i>ERG11</i>	T348A	438	52.0	D116E	polymorphism ^a		
		<i>ERG11</i>	A798C	355	100.0	E266D	polymorphism ^a	
		<i>ERG3</i>	C1052T	414	50.0	A351V	polymorphism ^a	
		<i>TAC1</i>	T2822C	483	100.0	S941P	polymorphism ^a	

Bold formatting indicates newly described mutations and underlining indicates mutations involved in antifungal resistance.
^aIncluding allelic polymorphism.

Table 5. *C. glabrata* non-synonymous mutations found in this study

Patient	Isolate	Gene	Nucleotide substitution	Depth	Frequency	Amino acid change	Interpretation
2	CG-GRE-DUC	<u><i>FKS1</i> (HS1)</u>	<u>T1874C/C1875T</u>	<u>614</u>	<u>100.0</u>	<u>F625S</u>	<u>involved in echinocandin resistance</u>
4	CG-GRE-CAP	<u><i>FKS2</i> (HS1)</u>	<u>T1987C</u>	<u>215</u>	<u>99.0</u>	<u>S663P</u>	<u>involved in echinocandin resistance</u>
		<i>CgPDR1</i>	-1020AG	492	100.0	frameshift and premature stop codon	may contribute to azole hypersusceptibility
11	CG-GRE-FAU1	<i>FKS2</i> (HS2)	G4093T	979	100.0	G1365C	unknown
16	CG-HM-HAB1	<i>CgPDR1</i>	C1109T	298	100.0	T370I	may contribute to azole resistance
	CG-HM-HAB2	<u><i>FKS2</i> (HS1)</u>	<u>T1976C</u>	<u>660</u>	<u>100.0</u>	<u>F659S</u>	<u>involved in echinocandin resistance</u>
		<i>FKS2</i> (HS1)	T1987G	660	80.0	S663A	may contribute to echinocandin resistance
		<i>CgPDR1</i>	C1109T	861	100.0	T370I	may contribute to azole resistance

Bold formatting indicates newly described mutations and underlining indicates mutations involved in antifungal resistance.

missense mutations in the hot spot (HS) 1 region of *FKS2*: one was the known F659S mutation, but the other was a new S663A substitution. Similar to the observations for the echinocandin-

resistant strains CA-GRE-TOP and CG-GRE-CAP, the *FKS2* S663A mutation appeared with a mutation in a gene usually linked to azole resistance. The novel mutation *CgPDR1* T370I was found

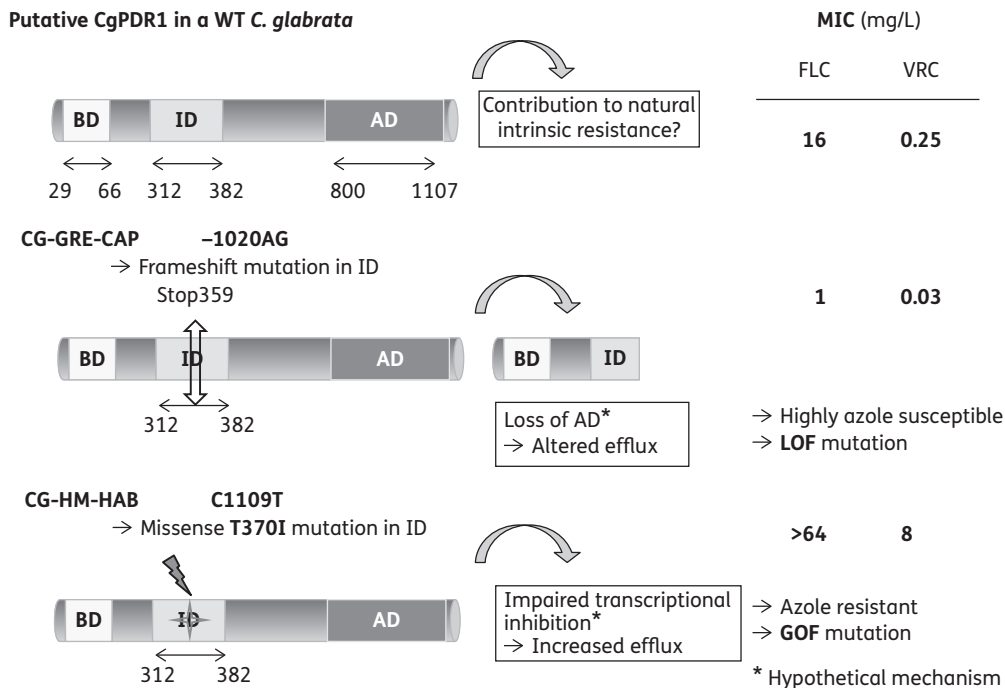


Figure 1. Hypothetical mechanisms of CgPDR1 LOF and GOF mutations in two *C. glabrata* clinical isolates. BD, binding domain; ID, inhibitory domain; AD, activation domain; FLC, fluconazole; VRC, voriconazole.

in both CG-HM-HAB1 and CG-HM-HAB2 isolates, which exhibited resistance to both fluconazole and voriconazole (Tables 3 and 5). The three other *C. glabrata* strains displayed stable anidulafungin MICs under echinocandin exposure and no modification of the *FKS1* or *FKS2* HS regions was detected in these isolates. A previously undescribed missense mutation (G1365C), close to the *FKS2* HS2 region, was present in the first isolate of the strain CG-GRE-FAU and absent in the second isolate (Table 5). This result was confirmed in an independent experiment (data not shown).

NGS analysis of the two strains (CA-GRE-VIG and CP-GRE-LOR) that persisted under azole therapy did not reveal any missense mutation other than allelic polymorphism (Table 4). No phenotypic resistance emerged in these strains after 29 and 17 days of fluconazole therapy, respectively (Table 3).

Discussion

We used NGS to detect antifungal resistance mutations in clinically important *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*). MDR is emerging and this is a concern. NGS allows comprehensive analysis with extreme sensitivity for the detection of mutations, so we screened numerous isolates for genetic events involved in azole and echinocandin resistance. This strategy was applied to clinical strains with phenotypic resistance to antifungal agents and to isolates collected from patients given antifungal therapy. We documented new combinations of mutations that would probably not have been revealed by a more targeted sequencing strategy.

Patients 4 and 16 carried *C. glabrata* isolates resistant to echinocandins (Tables 2 and 3) in which NGS detected three distinct

FKS2 mutations involved in echinocandin resistance (Table 5). The broad sequencing approach revealed that these mutations were found along with two different mutations in *CgPDR1*, the gene encoding a transcription factor involved in the regulation of the ABC transporter genes (Figure 1). The isolate from Patient 4 (CG-GRE-CAP) harboured a duplication (–1020AG) generating a frameshift mutation and leading to a premature stop codon (K359Stop) in the putative inhibitory domain (ID) of the CgPdr1 protein²¹ and thus a probably inactive CgPdr1p. Indeed, the MICs of fluconazole and voriconazole for strain CG-GRE-CAP were extremely low with respect to the general EUCAST MIC distribution for *C. glabrata* isolates (<http://mic.eucast.org/> and Table 2). This suggests that the *CgPDR1* –1020AG duplication is a loss-of-function (LOF) mutation, reminiscent of the phenotype of the constructed null mutant $\Delta pdr1$.^{22–24} This is, to the best of our knowledge, the first description in a clinical isolate of a stop codon in *CgPDR1* leading to an LOF mutation in a hypersensitive *C. glabrata* strain. Whether the *CgPDR1* K359Stop mutation enhances drug susceptibility is still to be confirmed. Moreover, to date, we do not have an acceptable explanation for the presence of both *CgPDR1* and *FKS2* mutations in this *C. glabrata* clinical isolate. A hypothesis could be the fitness cost due to the *FKS* mutation, as reported previously.²⁵ Thus, whether or not the *CgPDR1* K359Stop mutation could be a compensatory mechanism requires further investigation with fitness studies and *in vivo* animal models of virulence. Another hypothesis could be the fortuitous presence of both mutations. In Patient 4, no previous history of echinocandin prescription could be found, but the complete medical records might not have been exhaustive because this patient was hospitalized in several healthcare centres. Patient 16 carried another *C. glabrata* isolate (CG-HM-HAB) harbouring a

combination of *FKS2* and *CgPDR1* mutations. The *CgPDR1* mutation was detected in both isolates whereas the two *FKS2* mutations were present in the second, but not in the first: presumably these *FKS2* mutations were acquired during the 75 day caspofungin treatment of this patient. Again, the *CgPDR1* T370I mutation was located in the putative ID of *CgPdr1p* (Figure 1).²¹ Consistent with previous studies describing *CgPDR1* GOF mutations, the CG-HM-HAB strain showed cross-resistance to triazoles (Table 3), strongly suggesting that T370I is indeed a new GOF mutation.²⁶ Antifungal therapy failed to clear the infection in this case; indeed, the infection and poor clinical status led to the death of the patient.

The NGS analysis revealed a combination of an *FKS1* mutation (S645P) and an *ERG3* heterozygous mutation (D103N) in an echinocandin-resistant *C. albicans* isolate (CA-GRE-TOP) (Table 4). These mutations did not affect the azole-susceptible phenotype and we are currently investigating the consequences, if any, of this combination of mutations for azole and/or echinocandin resistance. Patient 1 had a previous history of unsuccessful fluconazole and micafungin treatment and infection and the poor clinical status led to the death of the patient.

The CG-HM-HAB2 isolate (Patient 16) carried the *FKS2* HS1 F659S mutation described previously and also a novel S663A substitution.²⁷ This S663A substitution presents three remarkable features. First, although the F659S was present in 100% of the sequences, the S663A substitution was detected in 80%, with the other 20% carrying the WT sequence (Table 5). These percentages suggest that S663A emerged within the clonal population carrying F659S. Second, S663A is the result of a T1987G transversion (interchanges of the purine T for the pyrimidine G) whereas previously described mutations [i.e. S663P (T1987C) and S663F (C1988T)] are transition mutations (interchanges between purines or between pyrimidines). Third, this double mutation is, in itself, a rare event; to the best of our knowledge, a double *FKS2* HS1 mutation, selected *in vivo*, has only been reported once in *C. glabrata*, by Dannaoui *et al.*²⁸ (L664V substitution associated with the F659S mutation). These three unusual characteristics may be related to the long duration of the drug treatment of the patient carrying this strain (~70 days).

In addition to the *CgPDR1* mutations, other molecular events were found associated with azole resistance. Patient 13 carried the CA-HM-MAC isolate with an *ERG3* W228Stop heterozygous nonsense mutation (Table 4), which has been described previously;²⁰ the susceptibility of this isolate to azoles appeared to be unaffected, suggesting that a homozygous state is needed for resistance. Apart from the *CgPDR1* and *ERG3* mutations detected, no other mutations were found in the genes involved in azole resistance that we sequenced (i.e. *ERG11*, *ERG3*, *TAC1* and *CgPDR1*) in any of the 10 isolates showing various levels of resistance or decreased susceptibility to azoles. The absence of *ERG11* point mutations in our azole-resistant *C. glabrata* strains (Patients 3, 5 and 16) is in accordance with previous results and suggests that *CgERG11* is not the main gene involved in azole resistance, unlike the up-regulation of the ABC efflux transporters.²⁹ Similarly, no mutation in *ERG11* was detected in any of the seven *C. parapsilosis* isolates. Our strategy involved targeting *ERG11*, *ERG3*, *TAC1* and *CgPDR1*; therefore, this approach was not fully exhaustive and did not cover all mechanisms of azole resistance. In further studies, we will analyse the transcription factors *Upc2* and *Mrr1*, which regulate

ERG11 and *MDR1*, respectively, and the entire sequences of *TAC1* and *CgPDR1*.³⁰

A growing number of clinical studies highlight the threat of MDR phenotypes, particularly in *C. glabrata*.^{1,9,10} Pham *et al.*¹⁰ showed that, in their recent collection of echinocandin-resistant *C. glabrata* strains, 37% were also resistant to fluconazole. However, these studies only considered *FKS* mutations and the association of azole and echinocandin mutations has rarely been described. Our findings highlight the ability of *C. glabrata* to acquire resistance to multiple antifungal drugs through successive genetic events.^{25,31} The haploid nature of the *C. glabrata* genome may explain the rapid expression of MDR phenotypes. Clinical failures under echinocandin therapy have been reported in patients infected with *FKS*-mutated strains,¹ although not in all such cases.¹⁰ Even though we did not specifically focus on the clinical consequences of *FKS* mutations, our results confirm that *FKS* mutations and their clinical consequences need to be rapidly detected and studied in detail, especially in clinical isolates of *C. glabrata*. Indeed, we found no *FKS* mutations in the four *C. albicans* strains studied, even after a long course of echinocandin therapy (up to 65 days).

Conclusions

We demonstrate that NGS technology is suitable for a wide and extensive assessment of gene mutations involved in resistance to antifungal agents. Using this technique, we describe novel molecular events implicated in the phenotypic resistance of clinical isolates. The effects of these new mutations need to be confirmed by additional functional analyses to assess the expression level of the mutated genes and study the proteins produced. The two non-synonymous *CgPDR1* mutations revealed by NGS and which were found along with *FKS2* mutations, may have opposite consequences: one is likely to lead to an LOF mutation, the other to a GOF mutation. We intend to determine whether these combinations of *CgPDR1* and *FKS2* mutations are: (i) fortuitous findings of independent events; (ii) the result of a history of multidrug antifungal pressure; or (iii) new molecular events generating compensatory mechanisms. Nevertheless, they show that, due to the increasing exposure of patients to diverse drugs, antifungal resistance should now be considered in its entirety using wide genome approaches. We show that the great sensitivity of NGS is such that it can be used to study and identify mixtures of mutated and WT populations of yeasts in samples of *Candida* spp. This is the first step towards molecular characterization of *Candida* spp. antifungal resistance directly from clinical samples, which has the advantages of avoiding the selection of more culturable isolates or species and allowing earlier detection of mutated populations. The practicability and feasibility of these high-throughput sequencing methods in daily clinical practice remains challenging, but the current rapid progression of automation of these technologies makes their upcoming routine application likely.

Acknowledgements

We are grateful to Thierry Noël, Patrice Le Pape, Dominique Sanglard and Leah Cowen for the generous gift of strains used in the validation phase. We acknowledge Katia Fusillier, Réjane Beugnot and Sylvie Moulin for their helpful discussion and technical support. We are also grateful to Sandra Vellaissamy for her excellent technical assistance for microsatellite

typing. We thank Roche Diagnostics and its staff for providing the GS Junior System and sharing their GS Junior experience.

Funding

This work was supported by a grant from Pfizer (Prix de recherche Société Française de Mycologie Médicale—Pfizer 2012). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Transparency declarations

During the past 5 years, E. D. has received money for board membership from Astellas and Innothra, grants from Gilead, Ferrer and Bio-Rad, payments for lectures from Gilead, MSD and Schering, and travel expenses from MSD, Astellas and Schering. C. H. has received research grants from and acted as a speaker for MSD, Pfizer and Astellas. All other authors: none to declare.

Supplementary data

Tables S1 to S6 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD *et al.* Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 1724–32.
- Shields RK, Nguyen MH, Press EG *et al.* Caspofungin MICs correlate with treatment outcomes among patients with *Candida glabrata* invasive candidiasis and prior echinocandin exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3528–35.
- White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 382–402.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR *et al.* Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 291–321.
- Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 2009; **9**: 1029–50.
- Morio F, Loge C, Besse B *et al.* Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; **66**: 373–84.
- Morio F, Pagniez F, Lacroix C *et al.* Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2131–8.
- Shields RK, Nguyen MH, Press EG *et al.* The presence of an *FKS* mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4862–9.
- Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR *et al.* Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 1199–203.
- Pham CD, Iqbal N, Bolden CB *et al.* Role of *FKS* mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 4690–6.
- Hauser PM, Bernard T, Greub G *et al.* Microbiota present in cystic fibrosis lungs as revealed by whole genome sequencing. *PLoS One* 2014; **9**: e90934.
- Delhaes L, Monchy S, Fréalle E *et al.* The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community—implications for therapeutic management. *PLoS One* 2012; **7**: e36313.
- Angebault C, Djossou F, Abélanet S *et al.* *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians. *J Infect Dis* 2013; **208**: 1705–16.
- Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F *et al.* EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 398–405.
- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C *et al.* Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist Updat* 2013; **16**: 81–95.
- Bougnoux M-E, Tavanti A, Bouchier C *et al.* Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5265–6.
- Sabino R, Sampaio P, Rosado L *et al.* New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1677–82.
- Enache-Angoulvant A, Bourget M, Brisse S *et al.* Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida glabrata*: application to analysis of genetic relationships between bloodstream and digestive system isolates. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 4028–34.
- Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR *et al.* Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2676–84.
- Chau AS, Gurnani M, Hawkinson R *et al.* Inactivation of sterol $\Delta 5,6$ -desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3646–51.
- Kolaczowska A, Kolaczowski M, Delahodde A *et al.* Functional dissection of Pdr1p, a regulator of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 2002; **267**: 96–106.
- Vermitsky J-P, Earhart KD, Smith WL *et al.* Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol Microbiol* 2006; **61**: 704–22.
- Schwarz Müller T, Ma B, Hiller E *et al.* Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes. *PLoS Pathog* 2014; **10**: e1004211.
- Thakur JK, Arthanari H, Yang F *et al.* A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* 2008; **452**: 604–9.
- Singh-Babak SD, Babak T, Diezmann S *et al.* Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002718.
- Ferrari S, Ischer F, Calabrese D *et al.* Gain of function mutations in *CgPDR1* of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* 2009; **5**: e1000268.
- García-Effron G, Lee S, Park S *et al.* Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3- β -D-glucan

synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3690–9.

28 Dannaoui E, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D *et al.* *Candida* spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004–2010. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 86–90.

29 Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B *et al.* Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 668–79.

30 Silva AP, Miranda IM, Guida A *et al.* Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3546–56.

31 Chapeland-Leclerc F, Hennequin C, Papon N *et al.* Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream

isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1360–2.

32 Coste AT, Karababa M, Ischer F *et al.* *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* 2004; **3**: 1639–52.

33 Sanglard D, Kuchler K, Ischer F *et al.* Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2378–86.

34 MacCallum DM, Coste A, Ischer F *et al.* Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1476–83.

Supplementary data

Table S1. List of amplicons analysed in this study

Strain	Gene	Amplicon	Size (bp)	Position (nucleotides)	Overlap (bp)
<i>C. albicans</i>	<i>ERG11</i> (1587 pb)	CaERG11 R1	413	-71 ; 342	/
		CaERG11 R2	392	272 ; 664	R1/R2 : 70
		CaERG11 R3	377	597 ; 974	R2/R3 : 67
		CaERG11 R4	375	912 ; 1287	R3/R4 : 62
		CaERG11 R5	435	1174 ; +22	R4/R5 : 113
	<i>TAC1</i> (2946 pb)	CaTAC1 R1	375	1878 ; 2253	/
		CaTAC1 R2	393	2719 ; +166	/
	<i>ERG3</i> (1161 pb)	CaERG3 R1	388	-33 ; 355	/
		CaERG3 R2	371	291 ; 662	R1/R2 : 64
		CaERG3 R3	420	509 ; 929	R2/R3 : 153
CaERG3 R4		419	770 ; +28	R3/R4 : 159	
<i>FKS1</i> (5694 pb)	CaFKS1 HS1	379	1751 ; 2130	/	
	CaFKS1 HS2	389	3884 ; 4273	/	
<i>FKS1</i> (5592 pb)	CgFKS1 HS1	383	1692 ; 2075	/	
	CgFKS1 HS2	395	2830 ; 4225	/	
	<i>FKS2</i> (5694 pb)	CgFKS1 HS1	396	1781 ; 2177	/
		CgFKS1 HS2	392	3934 ; 4326	/
<i>C. glabrata</i>	<i>ERG11</i> (1602 pb)	CgERG11 R1	443	-89 ; 354	/
		CgERG11 R2	436	249 ; 685	R1/R2 : 105
		CgERG11 R3	435	560 ; 995	R2/R3 : 125
		CgERG11 R4	434	887 ; 1321	R3/R4 : 108
		CgERG11 R5	449	1198 ; +45	R4/R5 : 123
	<i>CgPDR1</i> (3324 pb)	CgPDR1 R1	365	803 ; 1168	/
		CgPDR1 R2	397	1525 ; 1922	/
		CgPDR1 R3	399	2354 ; 2753	/
		CgPDR1 R4	388	2967 ; +31	/
<i>C. parapsilosis</i>	<i>ERG11</i> (1569 pb)	CpERG11 R1	399	-48 ; 351	/
		CpERG11 R2	404	291 ; 695	R1/R2 : 60
		CpERG11 R3	410	636 ; 1049	R2/R3 : 59
		CpERG11 R4	417	958 ; 1375	R3/R4 : 91
		CpERG11 R5	386	1267 ; +84	R4/R5 : 108

Table S2. List of primers used for PCR1

Typical structure: 5'- **M13 universal primer**-specific primer-3'

<i>C. albicans</i>	<i>ERG11</i>	R1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTATTCTTCCATATTACTTGTCTTC	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGCAGAAACATCAGATAATTTAG	
		R2	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTATGACGGTTTTATTTAGGTCC	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAATATAGTTGAGCAAATGAACG	
		R3	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTGCTTCAAGATCTTTATTTGGTG	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCACCTAAATGTAACAAGAACC		
		R4	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCTTATGGGTGGTCAACATAC	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGTATCCCATCTAGTTGGATC		
		R5	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCCAATTATATTGTTCCAAAAGGTC	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCGAAAGAAAGTTGCCGTTT		
		<i>TAC1</i>	R1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTTAGCAGATGAGGCCAAACC
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCAAATGGTTCTGACTCTGGT	
			R2	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTTTGCTATGCTCAGTCACCAA
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTATTGGACTCGGGGTTTTCC	
		<i>ERG3</i>	R1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCTTTCCGATTCCGTTTAGC
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTTTCTGAAAATGTTTGATCTGG	
	R2		Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTTTTTCCAGTACTGATTTTCAT	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCACAATCGGTGAAAAGAATG	
		R3	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTGCCATTCCAGTTATGGTTTT	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCATTGACAACGGGTCATT		
		R4	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTCAGTTGATGGGTTCTTCC	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCAATGGTCCAAAACAAAGATG		
	<i>FKS1</i>	HS1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCATGCCATTGGGTGGTTTTAT	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTGAACGACCAATGGAGAAGA	
		HS2	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCTATGGTCATCCAGTTTTCCA	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCACCAACGGTCAAATCAGTG		
<i>C. glabrata</i>	<i>ERG11</i>	R1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTCCTTCATGTCCATTGTCTT	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCAACCTGGCGTTGAAGATGA	
		R2	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTGCCAAAAGAAATACGGTGA	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGTAAGCGAAGTCGGTGTC	
		R3	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCAACGAAAACAACCTCCGGTA	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGCCAAATGCAATAGACACCA	
			R4	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTGGTACTAAGATGACCGACCAA
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCACTGGAAGAAGCAGCATCA	
			R5	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTTGTCCCAAGGGACTACCAC
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTGACCATTGATTATTGGAAGAAA	
		<i>CgPDR1</i>	R1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTGAAAGTGCCACCACTAAGTCA
				Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCGACTTTCATTGATATGGTGA
			R2	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTGTGAAGCGGAAGAAATGCTC
				Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGAAAACCTCACCTATCCAGA
			R3	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCATGAAGGGGCATCTTAACAG
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGCAAGGTCAGGGCATACTTC		
		R4	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTGATACCACCACCGCTGTTTC	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGGCTATGCACACTGTCTAAA		
	<i>FKS1</i>	HS1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTTTTTCTCAGTCATGCCATTG	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCCAACGAAAAGACAGTGTTG	
		HS2	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCTACTATGCGCACCTGGTT	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCACCACCAACAGTCAAATCG		
	<i>FKS2</i>	HS1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTGGCCACTGTTTTATTCTTCTCG	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCCAACAGAGAAGACAGTGTTGA	
		HS2	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTACTATGCGCATCCTGGTTTC	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCACCACCACAGTCATGTCAC		
<i>C. parapsilosis</i>	<i>ERG11</i>	R1	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTCCTACCTTCGTTTCATCCA	
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGGCGTCTTCAGCAGAAACAT	
		R2	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTCCCAAGGGTCATGAATTTGT	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTTGATTGGGGTGAATCCTTT		
		R3	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTTTGATGCTTCATTTGCTCA	
		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCATCCAAGTTGCCACCTTTACC		

R4	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTTGTTGCATTTGGCTGAGAAG
	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCACCAAATGGCAAATACGAA
R5	Forward	TGTA AACGACGGCCAGTACCCTCACAGATGGGATGAA
	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCTGCATTAAACCCATTGA

Table S3. List of primers used for PCR2

Typical structure: 5'-Roche adaptor A or B – Key –MID – M13 universal primer-3'

PCR 2 - MID 1	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGAGTGCCTTGTA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTCAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 2	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCTCGACATGTA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACA CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 3	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACGCACTCTGTA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGACGCACTC CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 4	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAGTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCACTGTAG CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 5	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGC CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 6	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAG CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 7	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTGTCTCTATGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGTGTCTCTA CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 8	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCGCGTGTCTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCGCGTGTCC CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 9	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGTATCAGCTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAGTATCAGCC CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 10	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTATGCGTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTATGCGC CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 11	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATACGTCTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATACGTCTC CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 12	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACTGAGCTATGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACTGAGCTA CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 13	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATAGTAGTGTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATAGTAGTGC CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 14	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGAGATACTGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAGAGATAAC CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 15	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATACGACGTATGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATACGACGTA CAGGAAACAGCTATGACC
PCR 2 - MID 16	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTACTATGTAA AACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTACTA CAGGAAACAGCTATGACC

Table S4. Reference sequences used in this study [available in Candida Genome Database website (www.candidagenome.org)]

Strain	Gene	Coordinates
<i>C. albicans</i> SC5314 Assembly 22	ERG11/C5_00660C_A (orf19.922)	Ca22chr5A_C_albicans_SC5314: 149701-148115
	TAC1/C5_01840C_A (orf19.3188)	Ca22chr5A_C_albicans_SC5314: 419345-416400
	ERG3/C1_04770C_A (orf19.767)	Ca22chr5A_C_albicans_SC5314: 992790-991630
	FKS1 : GSC1/C1_02420C_A (orf19.2929)	Ca22chr1A_C_albicans_SC5314: 511655-505962
<i>C. glabrata</i> CBS138	FKS1/CAGL0G01034g	ChrG_C_glabrata_CBS138 : 93468-99059
	FKS2/CAGL0K04037g	ChrK_C_glabrata_CBS138 : 373375-379068
	ERG11/CAGL0E04334g	ChrE_C_glabrata_CBS138 : 417189-415588
	PDR1/CAGL0A00451g	ChrA_C_glabrata_CBS138 : 47557-50880
<i>C. parapsilosis</i> CDC137	ERG11/CPAR2_303740	Contig005806_C_parapsilosis_CDC317 : 870311-868743

Table S5. List of mutations detected in the *C. albicans* isolates analysed in phases 2 and 3

Patient	Strain	Gene	Nucleotide substitution	Depth	Frequency	Amino-acid substitution	
1	CA-GRE-TOP	<i>ERG11</i>	T315C	677	64.0	D116E	
		<i>ERG11</i>	T348A	402	12.0		
		<i>ERG11</i>	A357G	402	11.0		
		<i>ERG11</i>	C658T	420	54.0		
		<i>ERG11</i>	A1020G	901	55.0		
		<i>ERG11</i>	C1110T	899	49.0		
		<i>ERG11</i>	A1440G	544	58.0		
		<i>ERG11</i>	T1470C	544	56.0		
		<i>ERG3</i>	G307A	1584	51.0	D103N	
		<i>FKS1 (HS1)</i>	A1929T	852	100.0	S645P	
		<i>FKS1 (HS1)</i>	T1933C	852	100.0		
		<i>FKS1 (HS2)</i>	C4230T	753	100.0		
		<i>TAC1</i>	A2202G	843	54.0	S935L S941P	
		<i>TAC1</i>	T2214C	844	54.0		
		<i>TAC1</i>	C2804T	598	54.0		
		<i>TAC1</i>	T2822C	598	55.0		
		<i>TAC1</i>	G2874A	598	57.0		
10	CA-GRE-VIG1	<i>ERG11</i>	T549C	896	62.0		S941P
		<i>ERG11</i>	C658T	1739	98.0		
		<i>ERG11</i>	T996C	1401	98.0		
		<i>ERG11</i>	C1110T	1401	99.0		
		<i>ERG11</i>	T1140C	1401	98.0		
		<i>ERG11</i>	T1203C	1598	98.0		
		<i>ERG11</i>	C1296T	1598	98.0		
		<i>ERG11</i>	T1302C	1598	98.0		
		<i>ERG3</i>	C306T	749	100.0		
		<i>FKS1 (HS1)</i>	A1929T	1091	45.0		
		<i>TAC1</i>	T1977C	1020	46.0		
		<i>TAC1</i>	G1998A	1020	49.0		
		<i>TAC1</i>	C2040T	1020	49.0		
		<i>TAC1</i>	A2202G	1020	54.0		
		<i>TAC1</i>	T2214C	1020	55.0		
		<i>TAC1</i>	T2822C	1287	97.0		
		<i>TAC1</i>	G2874A	1287	97.0		
	CA-GRE-VIG2	<i>ERG11</i>	T549C	1082	79.0	S941P	
		<i>ERG11</i>	C658T	1647	99.0		
		<i>ERG11</i>	T996C	1691	99.0		
		<i>ERG11</i>	C1110T	1691	100.0		
		<i>ERG11</i>	T1140C	1691	98.0		
		<i>ERG11</i>	T1203C	1690	99.0		
		<i>ERG11</i>	C1296T	988	100.0		
		<i>ERG11</i>	T1302C	988	100.0		
<i>ERG3</i>		C306T	1001	100.0			
<i>FKS1 (HS1)</i>		A1929T	677	51.0			
<i>TAC1</i>		T1977C	1710	46.0			
<i>TAC1</i>		G1998A	1710	47.0			
<i>TAC1</i>		C2040T	1710	48.0			
<i>TAC1</i>		A2202G	1710	55.0			
<i>TAC1</i>		T2214C	1710	55.0			
<i>TAC1</i>		T2822C	1110	98.0			
<i>TAC1</i>		G2874A	1110	98.0			
CA-GRE-VIG3		<i>ERG11</i>	T549C	878	100.0		S941P
	<i>ERG11</i>	C658T	855	100.0			
	<i>ERG11</i>	T996C	1414	100.0			

		<i>ERG11</i>	C1110T	1414	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1140C	1414	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1203C	1413	100.0	
		<i>ERG11</i>	C1296T	923	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1302C	923	100.0	
		<i>ERG3</i>	C306T	1044	100.0	
		<i>FKS1 (HS1)</i>	A1929T	717	51.0	
		<i>TAC1</i>	T1977C	488	47.0	
		<i>TAC1</i>	G1998A	488	51.0	
		<i>TAC1</i>	C2040T	488	53.0	
		<i>TAC1</i>	A2202G	488	49.0	
		<i>TAC1</i>	T2214C	489	51.0	
		<i>TAC1</i>	T2822C	1190	99.0	S941P
		<i>TAC1</i>	G2874A	1190	99.0	
12	CA-HM-FON1	<i>ERG11</i>	A1020G	419	49.0	
		<i>ERG11</i>	C1110T	417	49.0	
		<i>ERG11</i>	A1440G	299	57.0	
		<i>ERG11</i>	T1470C	299	50.0	
		<i>ERG3</i>	C306T	352	61.0	
		<i>FKS1 (HS1)</i>	A1929T	423	52.0	
		<i>FKS1 (HS2)</i>	C4230T	292	49.0	
		<i>TAC1</i>	C2804T	149	62.0	S935L
		<i>TAC1</i>	T2822C	150	63.0	S941P
	<i>TAC1</i>	G2874A	151	64.0		
	CA-HM-FON2	<i>ERG11</i>	A1020G	671	48.0	
		<i>ERG11</i>	C1110T	669	46.0	
		<i>ERG11</i>	A1440G	375	57.0	
		<i>ERG11</i>	T1470C	375	51.0	
		<i>ERG3</i>	C306T	401	58.0	
		<i>FKS1 (HS1)</i>	A1929T	331	48.0	
		<i>FKS1 (HS2)</i>	C4230T	660	52.0	
		<i>TAC1</i>	C2804T	198	49.0	S935L
		<i>TAC1</i>	T2822C	198	50.0	S941P
<i>TAC1</i>	G2874A	198	52.0			
13	CA-HM-MAC1	<i>ERG11</i>	T315C	261	57.0	
		<i>ERG11</i>	C658T	479	50.0	
		<i>ERG11</i>	A1020G	1271	51.0	
		<i>ERG11</i>	C1110T	1270	51.0	
		<i>ERG11</i>	A1440G	286	55.0	
		<i>ERG11</i>	T1470C	286	57.0	
		<i>ERG3</i>	C306T	755	52.0	
		<i>ERG3</i>	G684A	369	49.0	W228Stop
		<i>FKS1 (HS1)</i>	A1929T	400	47.0	
		<i>FKS1 (HS2)</i>	C4230T	1433	46.0	
		<i>TAC1</i>	A2202G	1615	100.0	
	<i>TAC1</i>	T2214C	1614	100.0		
	<i>TAC1</i>	C2804T	156	49.0	S935L	
	<i>TAC1</i>	T2822C	156	49.0	S941P	
	<i>TAC1</i>	G2874A	157	52.0		
	CA-HM-MAC2	<i>ERG11</i>	T315C	223	60.0	
		<i>ERG11</i>	C658T	1230	51.0	
		<i>ERG11</i>	A1020G	1159	51.0	
		<i>ERG11</i>	C1110T	1154	53.0	
<i>ERG11</i>		A1440G	736	57.0		
<i>ERG11</i>		T1470C	736	54.0		
<i>ERG3</i>		C306T	1626	56.0		
<i>ERG3</i>		G684A	1313	48.0	W228Stop	
<i>FKS1 (HS1)</i>		A1929T	247	46.0		
<i>FKS1 (HS2)</i>		C4230T	352	48.0		
<i>TAC1</i>	A2202G	980	100.0			
<i>TAC1</i>	T2214C	980	100.0			
<i>TAC1</i>	C2804T	1260	53.0	S935L		

		TAC1	T2822C	1258	54.0	S941P		
		TAC1	G2874A	1262	55.0			
14	CA-HM-CHV1	ERG11	T348A	58	21.0	D116E		
		ERG11	A357G	59	19.0			
		ERG11	C411T	59	47.0			
		ERG11	T549C	59	24.0			
		ERG11	T996C	1414	100.0			
		ERG11	A1083G	1414	100.0			
		ERG11	C1110T	1414	100.0			
		ERG11	T1203C	1413	100.0			
		ERG11	T1284C	474	100.0			
		ERG11	A1440G	473	100.0			
		ERG11	T1470C	473	100.0			
		ERG3	T51C	778	37.0			
		ERG3	C306T	1030	100.0			
		ERG3	T381C	1030	49.0			
		ERG3	T432C	1030	100.0			
		ERG3	C1052T	360	49.0	A351V		
		FKS1 (HS1)	A1929T	1073	100.0			
		FKS1 (HS2)	C4230T	397	100.0			
		TAC1	A2202G	639	51.0			
		TAC1	T2214C	639	50.0			
TAC1	G2874A	551	53.0					
14	CA-HM-CHV2	ERG11	T996C	552	100.0			
		ERG11	A1083G	551	100.0			
		ERG11	C1110T	551	100.0			
		ERG11	T1203C	551	100.0			
		ERG11	T1284C	267	100.0			
		ERG11	A1440G	267	100.0			
		ERG11	T1470C	267	100.0			
		ERG3	T51C	387	36.0			
		ERG3	C306T	387	100.0			
		ERG3	T381C	359	46.0			
		ERG3	T432C	359	100.0			
		ERG3	C1052T	182	60.0	A351V		
		FKS1 (HS1)	A1929T	369	100.0			
		FKS1 (HS2)	C4230T	198	100.0			
		TAC1	A2202G	454	54.0			
		TAC1	T2214C	455	55.0			
		TAC1	G2874A	617	50.0			
		15	CA-HM-SOU1	ERG11	T315C	385	99.0	
				ERG11	T348A	307	27.0	D116E
				ERG11	A357G	307	23.0	
ERG11	C411T			307	100.0			
ERG11	T549C			307	74.0			
ERG11	C658T			913	100.0			
ERG11	A798C			913	100.0	E266D		
ERG11	T996C			1017	63.0			
ERG11	A1020G			1017	38.0			
ERG11	A1026G			1017	63.0			
ERG11	C1110T			1018	100.0			
ERG11	T1203C			1015	60.0			
ERG11	A1440G			434	95.0			
ERG11	T1470C			434	95.0			
ERG3	T51C			852	100.0			
ERG3	C306T			852	100.0			
ERG3	T432C			392	100.0			
ERG3	C438T			392	40.0			
ERG3	C513T			392	50.0			
ERG3	C1052T			252	46.0	A351V		
FKS1 (HS1)	A1929T	418	100.0					
FKS1 (HS2)	C4230T	925	100.0					
TAC1	T1977C	353	45.0					

	<i>TAC1</i>	A2202G	353	51.0	
	<i>TAC1</i>	T2214C	353	48.0	
	<i>TAC1</i>	T2822C	788	100.0	S941P
	<i>TAC1</i>	G2874A	789	50.0	
	<i>ERG11</i>	T315C	438	96.0	
	<i>ERG11</i>	T348A	438	52.0	D116E
	<i>ERG11</i>	A357G	438	49.0	
	<i>ERG11</i>	C411T	437	100.0	
	<i>ERG11</i>	T549C	437	46.0	
	<i>ERG11</i>	C658T	355	100.0	
	<i>ERG11</i>	A798C	355	100.0	E266D
	<i>ERG11</i>	T996C	301	46.0	
	<i>ERG11</i>	A1020G	301	52.0	
	<i>ERG11</i>	A1026G	301	50.0	
	<i>ERG11</i>	C1110T	301	100.0	
	<i>ERG11</i>	T1203C	301	42.0	
CA-HM-SOU2	<i>ERG11</i>	A1440G	346	98.0	
	<i>ERG11</i>	T1470C	346	99.0	
	<i>ERG3</i>	T51C	946	100.0	
	<i>ERG3</i>	C306T	946	100.0	
	<i>ERG3</i>	T432C	487	100.0	
	<i>ERG3</i>	C438T	487	37.0	
	<i>ERG3</i>	C513T	487	41.0	
	<i>ERG3</i>	C1052T	414	50.0	A351V
	<i>FKS1 (HS1)</i>	A1929T	333	100.0	
	<i>FKS1 (HS2)</i>	C4230T	350	100.0	
	<i>TAC1</i>	T1977C	188	57.0	
	<i>TAC1</i>	A2202G	188	55.0	
	<i>TAC1</i>	T2214C	188	53.0	
	<i>TAC1</i>	T2822C	483	100.0	S941P
	<i>TAC1</i>	G2874A	484	48.0	

Table S6. List of mutations detected in *C. glabrata* isolates analysed in phases 2 and 3

Patient	Strain	Gene	Nucleotide substitution	Depth	Frequency	Amino-acid substitution
2	CG-GRE-DUC	<i>ERG11</i>	C678T	825	100.0	F625S
		<i>ERG11</i>	T768C	825	100.0	
		<i>ERG11</i>	T834C	825	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	631	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1275C	631	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1275C	565	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	564	100.0	
		<i>FKS1(HS1)</i>	T1874C/C1875T	614	100.0	
		<i>FKS1(HS2)</i>	C3870T	699	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	489	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2010A	489	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	C2025T	489	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	489	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	383	100.0	
3	CG-GRE-AHR	<i>ERG11</i>	T768C	1730	100.0	
		<i>ERG11</i>	G927A	1730	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	803	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	256	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	648	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C837T	683	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	683	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	543	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	810	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	1318	100.0	
<i>CgPDR1</i>	G3156A	1317	100.0			
4	CG-GRE-CAP	<i>ERG11</i>	T768C	434	100.0	S663P
		<i>ERG11</i>	T834C	434	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	963	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	754	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	215	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	C1959T	215	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T1987C	215	99.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2046C	215	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	215	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	549	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	492	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	-1020AG	492	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	642	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	674	100.0	
<i>CgPDR1</i>	T2994C	782	100.0			
<i>CgPDR1</i>	G3156A	782	100.0			
5	CG-GRE-ALF	<i>ERG11</i>	T768C	1154	100.0	
		<i>ERG11</i>	G927A	1154	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	1012	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	773	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	1293	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C837T	564	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	564	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	560	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	398	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	606	100.0	
<i>CgPDR1</i>	G3156A	607	100.0			
11	CG-GRE-FAU1	<i>ERG11</i>	G87A	724	100.0	
		<i>ERG11</i>	C192T	724	100.0	
		<i>ERG11</i>	T768C	778	100.0	

		<i>ERG11</i>	T834C	778	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	712	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	643	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1941T	1033	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	1032	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	1032	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	G4093T	979	100.0	G1365C
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	979	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	1144	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	913	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	964	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	1187	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	G3156A	1186	100.0	
		<i>ERG11</i>	G87A	2435	100.0	
		<i>ERG11</i>	C192T	2435	100.0	
		<i>ERG11</i>	T768C	1140	100.0	
		<i>ERG11</i>	T834C	1140	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	986	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	774	100.0	
	CG-GRE-FAU2	<i>FKS2 (HS1)</i>	A1941T	777	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	776	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	776	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	1006	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	1135	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	1137	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	931	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	957	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	G3156A	954	100.0	
		<i>ERG11</i>	C588T	711	100.0	
		<i>ERG11</i>	T768C	711	100.0	
		<i>ERG11</i>	C918T	711	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	364	99.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	214	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	419	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2010A	419	100.0	
	CG-HM-FON1	<i>FKS2 (HS1)</i>	C2025T	419	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	419	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	512	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	574	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	535	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	436	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	272	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	G3156A	272	100.0	
12		<i>ERG11</i>	C588T	432	100.0	
		<i>ERG11</i>	T768C	275	100.0	
		<i>ERG11</i>	C918T	435	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	435	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	636	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	486	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2010A	486	100.0	
	CG-HM-FON2	<i>FKS2 (HS1)</i>	C2025T	486	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	486	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	237	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	517	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	562	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	484	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	270	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	G3156A	270	100.0	
16	CG-HM-HAB1	<i>ERG11</i>	C588T	475	100.0	
		<i>ERG11</i>	T768C	474	100.0	
		<i>ERG11</i>	C918T	474	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	314	100.0	

		<i>ERG11</i>	T1557A	1095	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	496	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2010A	496	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	C2025T	496	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	496	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	900	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	298	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1109T	298	100.0	T370I
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	1037	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	329	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	409	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	G3156A	409	100.0	
		<i>ERG11</i>	C588T	604	100.0	
		<i>ERG11</i>	T768C	424	100.0	
		<i>ERG11</i>	C918T	424	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	322	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	256	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	660	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T1976C	660	100.0	F659S
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T1987G	660	80.0	S663A
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2010A	660	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	C2025T	660	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	660	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	1542	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	861	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1109T	861	100.0	T370I
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	821	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	604	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	1109	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	G3156A	1109	100.0	
		<i>ERG11</i>	T300C	992	100.0	
		<i>ERG11</i>	T768C	835	100.0	
		<i>ERG11</i>	T834C	835	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	333	100.0	
		<i>ERG11</i>	C1194T	333	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	270	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	923	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	C1959T	923	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2046C	923	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	923	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	490	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	T4195C	490	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	409	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	C1749T	358	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2578C	430	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T2994C	874	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	G3156A	874	100.0	
		<i>ERG11</i>	T300C	327	100.0	
		<i>ERG11</i>	T768C	367	100.0	
		<i>ERG11</i>	T834C	367	100.0	
		<i>ERG11</i>	A1023G	267	100.0	
		<i>ERG11</i>	C1194T	267	100.0	
		<i>ERG11</i>	T1557A	139	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	A1956G	292	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	C1959T	292	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2046C	292	100.0	
		<i>FKS2 (HS1)</i>	T2119C	292	99.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	C4104T	309	100.0	
		<i>FKS2 (HS2)</i>	T4195C	309	100.0	
		<i>CgPDR1</i>	T871C	351	100.0	

<i>CgPDR1</i>	C1749T	304	100.0
<i>CgPDR1</i>	T2578C	546	100.0
<i>CgPDR1</i>	T2994C	307	100.0
<i>CgPDR1</i>	G3156A	307	100.0

2. Implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans*

Dans un deuxième temps, je me suis intéressée à l'implication de la voie de signalisation du pH ou voie Rim dans la résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans* en tant que nouvelle cible antifongique potentielle. Les principaux résultats de ce travail sont présentés dans le manuscrit ci-après, en préparation pour *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

2.1. Résumé

Comme vu plus haut, les antifongiques azolés et les échinocandines sont les deux principales classes d'antifongiques utilisées pour la prévention et le traitement des candidoses invasives. Cependant, leur efficacité est limitée à la fois par l'émergence de résistance acquise, mais également par la capacité des levures à tolérer ou contrer la présence de ces molécules. Ce phénomène, appelé tolérance aux antifongiques, est réversible et se traduit par une croissance persistante des levures à des concentrations en antifongiques supérieures à la CMI. De nombreuses voies de signalisation ont été impliquées dans la tolérance aux antifongiques chez *C. albicans*, parmi lesquelles la voie de signalisation du pH ou voie Rim : il a en effet été montré que le facteur de transcription terminal de cette voie, Rim101, est impliqué dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez cette espèce. Cette voie de signalisation est spécifique du règne fongique et également impliquée dans la pathogénicité et la virulence de *C. albicans*, ce qui en fait une cible antifongique potentielle d'intérêt.

Le premier objectif de ce travail était de démontrer qu'en plus de Rim101, l'ensemble des protéines Rim est impliqué dans la tolérance aux antifongiques chez *C. albicans*, comme cela a été montré chez *S. cerevisiae*. Dans cette optique ont été réalisés des tests de croissance en milieu solide en présence de différents antifongiques azolés ou d'échinocandines, ainsi que des tests de fongicidie en milieu liquide (*time-kill curves*) pour des souches mutées pour les différentes protéines Rim, des souches complémentées, des souches surexprimant *RIM101* et des souches contrôles. Parallèlement ont été déterminées les CMI de ces antifongiques pour ces différentes souches. Ces différentes expériences ont permis de montrer que, comme attendu, l'ensemble des mutants *rim* est hypersensible aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans*.

Le second objectif de ce travail était l'identification des mécanismes impliqués dans la tolérance aux antifongiques médiée par la voie Rim. Une analyse transcriptomique par RNA-SEQ d'une souche disruptée pour le gène *RIM101*, d'une souche surexprimant *RIM101* et d'une souche de référence a été réalisée dans des conditions d'activation (pH 7,6) et d'inactivation (pH 4) de la voie Rim. Celle-ci a

permis d'identifier de nouveaux gènes Rim-dépendants impliqués dans la tolérance aux antifongiques, à l'exemple de *HSP90*, qui code pour une protéine chaperone majeure de *C. albicans* impliquée dans la régulation de multiples processus cellulaires, et de *IPT1*, impliqué dans la biosynthèse des sphingolipides membranaires. Les mutants *rim* sont également hypersensibles à la geldanamycine, un inhibiteur pharmacologique de Hsp90. L'ensemble de ces données suggèrent que Rim101 agirait en amont de Hsp90. Cibler la voie Rim représenterait donc une nouvelle stratégie antifongique d'intérêt pour potentialiser l'activité des antifongiques actuellement commercialisés, et cibler indirectement Hsp90.

2.2. Manuscrit

1 **Title:** The Rim pathway mediates antifungal tolerance in *Candida albicans* through newly identified
2 Rim101 transcriptional targets including Hsp90 and Ipt1

3

4 **Running title:** Rim pathway and antifungal resistance

5

6 **Authors:**

7 Cécile Garnaud^{a, b}, Encarnacion García-Oliver^{c,d,e*}, Danièle Maubon^{a,b}, Sébastien Bailly^{e,f}, Morgane
8 Champleboux^{c,d,e*}, Jérôme Govin^{c,d,e}, Muriel Cornet^{a, b,#}

9

10 **Authors' affiliations:**

11 ^aLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, Département des Agents Infectieux, Institut de Biologie et
12 de Pathologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

13 ^bLaboratoire TIMC-IMAG-TheREx, UMR 5525 CNRS-UGA, Université Grenoble Alpes, France

14 ^cU1038, Université Grenoble Alpes, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG),
15 Grenoble, France

16 ^dLaboratoire Biologie à Grande Echelle (BGE), Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies
17 alternatives (CEA), Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG), Grenoble, France

18 ^eU1038, Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Grenoble, France

19 ^fUniversité Grenoble Alpes, HP2, Grenoble, France

20 [#]INSERM U1042, Grenoble, France

21

22 **Corresponding author:**

23 Pr Muriel Cornet. mcornet@chu-grenoble.fr

24

25 *Present address:

26

27 **ABSTRACT:**

28

29 Invasive candidiasis (IC) is a major cause of morbidity and mortality despite antifungal treatment.
30 Azoles and echinocandins are used as first-line therapies in IC. However, their efficacy is limited by
31 both yeast tolerance and the emergence of acquired resistance. Tolerance to antifungal drugs is
32 described as a reversible stage due to the capacity to counter the antifungal drug exposure, leading
33 to persistent growth. In *C. albicans*, multiple stress signaling pathways have been shown to
34 contribute to this adaptation. Among those, Rim101p, the transcription factor of the Rim pH-
35 responsive pathway, was shown to mediate azole and echinocandin tolerance. The Rim pathway is
36 fungal-specific and conserved among the fungal kingdom, and plays a key role in both pathogenesis
37 and virulence. This study aimed at investigating the implication of the other Rim proteins in
38 antifungal tolerance in *C. albicans*, as well as the mechanisms underlying it. Time-kill curves
39 experiments and colony formation tests showed that the genetic inhibition of all the Rim factors
40 enhances echinocandins and azoles' antifungal activity. Through a transcriptomic analysis including a
41 *rim101*^{-/-} mutant, a strain constitutively overexpressing *RIM101* and a wild-type strain, we described
42 several novel Rim-dependent genes, among which *HSP90* known to play a major role in antifungal
43 tolerance, and *IPT1*. Rim mutants were also hypersensitive to pharmacological inhibition of Hsp90.
44 Taken together, these data suggest that Rim101 acts upstream Hsp90. Targeting the Rim pathway
45 could therefore represent a promising antifungal strategy in combination with existing antifungal
46 drugs, to indirectly and specifically target Hsp90 in yeasts.

47

48 **INTRODUCTION**

49

50 Invasive candidiasis (IC) is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients
51 and in other critically ill patients such as those hospitalized in intensive care units. Its incidence has
52 increased over the past three decades, and, despite antifungal treatment, its mortality remains high,

53 ranging from 46 to 75% (1). *Candida albicans* is responsible for approximately half of cases of
54 invasive candidiasis worldwide (2).

55 Prophylaxis and treatment of IC mainly relies on two classes of antifungal drugs: azoles and
56 echinocandins (3). Their use has dramatically increased over the past years because of their
57 interesting pharmacokinetic and safety profiles, and the increasing number of patients requiring
58 antifungal prophylactic, pre-emptive, empirical or curative treatment. As a predictable consequence,
59 acquired resistance to both classes has emerged and became a high concern in medical settings. As
60 high as 25% of *C. glabrata* isolates were found to be non-susceptible to echinocandins in given
61 medical centres in the United States between 2008 and 2014 (4). In addition, multidrug resistant *C.*
62 *glabrata* isolates, resistant to both echinocandins and azoles, have been isolated, leaving very few
63 therapeutic options. In *C. albicans*, resistance rates are lower, around 0.5% for azoles and <1% for
64 echinocandins (5, 6).

65 Apart from resistance, which can be defined as an increase of the minimal inhibitory concentration
66 (MIC) of an antifungal compound for a given strain, tolerance has also been described in *Candida*
67 spp. Tolerance reflects the yeast's capacity to adapt to the presence of the antifungal drug, and
68 allows persistent growth at antifungal concentrations above the MIC (7). As a result, yeasts are not
69 completely eradicated in the presence of the drug, leading to a condition that enable the selection of
70 resistant mutants. Tolerance has been described for both fungistatic (azoles) and fungicidal
71 (echinocandins) drugs. Mechanisms underlying this phenomenon are not completely elucidated.
72 Multiple stress signaling pathways, activated in response to cell wall or membrane damages, have
73 been shown to contribute to azoles and/or echinocandin tolerance *in C. albicans*. Among which are
74 the calcium-calcineurin, Protein Kinase C cell integrity pathway, High Osmolarity Glycerol and
75 sphingolipid biosynthesis pathways (8–16). Hsp90, a molecular chaperone interacting with about 10%
76 of the *C. albicans* proteome, also plays a crucial role in antifungal tolerance: genetic or
77 pharmacological inhibition of Hsp90 enhance azole and echinocandin activities in *C. albicans* (10, 17–

78 19). Lysine deacetylases, such as Hos2, HDa1, Rpd3 and Rpd31, have also been shown to play a role
79 in antifungal tolerance through Hsp90 deacetylation (20).

80 In addition to these mechanisms, a role of the pH in tolerance to azole antifungals has been
81 described. Trailing growth, consisting in persistent growth at azoles concentrations above the MIC, is
82 inhibited at acidic pH in *Candida* spp. (21). In yeasts, environmental pH signaling is mediated by the
83 Rim pathway. This pathway is fungal specific and well-conserved in the fungal kingdom (22). In *C.*
84 *albicans*, external pH is sensed by a complex of 2 transmembrane proteins Rim9 and Rim21/Dfg16,
85 and the arrestin-like protein Rim8. In neutral-alkaline conditions, Rim8 becomes
86 hyperphosphorylated, leading to endocytosis of this membrane complex, and recruitment of the
87 Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) I, II and III. Two other Rim proteins,
88 Rim20 and Rim13, the signaling protease, are then recruited leading to the cleavage of the C-terminal
89 inhibitory domain of Rim101, the final transcription factor of the Rim pathway. Once activated,
90 Rim101p migrates to the nucleus and regulates expression of target genes involved in multiple
91 cellular processes, including growth, iron metabolism, cell wall structure, yeast-to-hyphae transition,
92 adhesion and biofilm formation (Figure 1A) (22). As such, this pathway is involved in both
93 pathogenesis and virulence in *C. albicans* (23–26). The implication of the Rim pathway in tolerance to
94 antifungals was first investigated in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*: all Rim proteins
95 mutants were found to be hypersensitive to azoles (27). In *C. albicans*, genetic disruption of *RIM101*
96 leads to hypersusceptibility to both echinocandins and azoles, but implication of other Rim proteins
97 in antifungal tolerance has not been assessed yet (28).

98

99 Here, we show that the whole Rim pathway is involved in azole and echinocandin tolerance in *C.*
100 *albicans*. Transcriptomic and phenotypic analysis suggests that its implication in tolerance could be
101 mediated through Hsp90, offering interesting perspectives for new antifungal strategies.

102

103

104 **RESULTS**

105

106 **The Rim factors are involved in azole and echinocandin tolerance in *C. albicans***

107 To investigate whether all the Rim factors were involved in response to antifungals, *rim* mutants, as
108 well as complemented strains and strains constitutively overexpressing *RIM101* (Table 1) were
109 subjected to colony-forming assays at alkaline pH (7.6) in presence of fluconazole (FLC), voriconazole
110 (VRC), posaconazole (POS), micafungin (MFG) or anidulafungin (AFG). As shown in Figure 1B, all the
111 *rim* mutants were hypersensitive to the five antifungals tested, whereas complemented and *RIM101*-
112 overexpressing strains displayed phenotypes similar to the one of the control strains.

113 To further characterize the hypersensitive phenotype of the *rim* mutants, time-kill curves
114 experiments were performed, albeit only for azoles as previous studies reported that these assays
115 were unsuitable for echinocandins because of clumping effect (10). Yeasts were cultured in liquid
116 medium in presence of azole antifungals and sampled at different time points on solid agar medium,
117 in order to proceed to the determination of the number of colony-forming-units (CFU). As depicted in
118 Figure 1C, the growth of the *rim* mutants after 48h of incubation was significantly reduced in
119 presence of azole antifungals as compared to the growth of the control strain for the three
120 compound tested: FLC, VRC and POS ($p < 0.001$). By contrast, growth of complemented strains was
121 similar to the one of the control strain (data not shown). In our experiments, no significant reduction
122 of initial inoculum was evidenced for any mutant strain, impeding the confirmation that Rim
123 inhibition restores a fungicidal effect. Yet, we used a lower initial inoculum (10^4 CFU/mL) than the
124 one recommended (at least 10^5 CFU/mL). Indeed, because of the alkaline pH that is required to show
125 a Rim phenotype, severe clumping occurred when using the usual initial inoculum especially for the
126 control strain, rendering CFU count on agar plates inaccurate.

127 Finally, azole and echinocandin MICs were determined as recommended by the EUCAST
128 microdilution method at neutral pH (29, 30). MICs did not differ between control and mutant strains,

129 suggesting that the Rim factors are rather involved in tolerance than resistance to echinocandins and
130 azoles (Table S1).

131 Taken together, these data show that the genetic inhibition of all the Rim factors enhances the
132 antifungal activity of the azoles and the echinocandins in *C. albicans*, which appears to result from
133 inhibition of tolerance to these antifungals.

134

135 **Transcriptomic analysis**

136 In order to assess by which mechanism the Rim pathway contributes to antifungal tolerance,
137 transcriptomic analysis of the SC5314 reference strain (wild-type), a *rim101*^{-/-} disrupted strain
138 (DAY25) and a strain constitutively overexpressing *RIM101* (CGY1) were performed. Samples were
139 collected after growth at pH 4 (Rim pathway inactivated) and 7.6 (Rim pathway activated). Analysis
140 was performed using biological triplicates (Figure 2A). RNA were extracted, prepared and sequenced
141 using standard RNA-SEQ methods. Transcriptomic analysis was performed following the pipeline
142 described in the Method section and presented in Supplemental Figure 1A.

143

144 As shown in Figure 2B representing the distance between each sample and condition, biological
145 replicates appeared clustered by strain. Moreover, at pH 4, the transcription profiles were similar in
146 the three strains. The transcription programs of the reference strain and the *RIM101*-overexpressed
147 strain also appeared clustered together at alkaline pH. By contrast, *rim101*^{-/-} transcription profile at
148 pH 7.6 significantly differed from both previous clusters (Figure 2B). The same observations were
149 made based on an independent assessment using principal component analysis (Supplemental figure
150 1B). These data confirm that environmental pH crucially affects gene expression in *C. albicans*, and
151 that *RIM101* plays a major role in adaptation to alkaline pH conditions.

152

153

154

155 Acidic pH-response

156 No statistically significant difference in transcription profiles was evidenced when comparing the
157 *rim101*^{-/-} mutant and the SC5314 reference strain at pH 4, suggesting that *RIM101* is not required for
158 the transcriptional response in acidic conditions. By contrast, 965 genes were significantly
159 differentially expressed between the *RIM101*-overexpressed strain and the wild-type strain in such
160 conditions (fold-change below -1.5 or above 1.5, adjusted p-value <0.05) (Table S2). GO-term analysis
161 of these genes identified a significant enrichment in three biological processes categories:
162 transmembrane transport, drug transport and serine family amino acid metabolic process
163 (Supplemental Figure 2).

164

165 Alkaline pH-response in the SC5314 reference strain

166 A total of 751 genes were differentially expressed at pH 7.6 versus pH 4 for the SC5314 reference
167 strain, including 402 alkaline-upregulated and 349 alkaline-downregulated genes (Table S4 and
168 Figure 2C). *RIM101* and *RIM13* were upregulated at alkaline pH, consistent with the activation of the
169 Rim pathway in such alkaline conditions (Figure 2D). By contrast, *RIM8* was downregulated, which is
170 in accordance with its implication in the negative feedback of the Rim pathway and its preferential
171 expression at acidic pH (22, 31) (Figure 2D). Expression of the other *RIM* genes, were not significantly
172 different at pH 7.6 compared to pH 4.

173 Interestingly, GO-term analysis revealed that the alkaline-upregulated genes were mostly enriched in
174 genes involved in pathogenesis, such as filamentous growth, biofilm formation, response to host and
175 response to stimulus. The alkaline-downregulated genes were significantly enriched in
176 transmembrane and drug transport, metabolic process, biosynthetic process and oxidation-reduction
177 process categories (Figure 2C).

178 Among genes potentially involved in antifungal tolerance and/or resistance (listed in Table S3), 33
179 were differentially expressed at alkaline and acidic pH. Among those with the highest fold-changes
180 were genes involved in membrane biosynthesis. Expression of *IPT1*, a gene coding for an enzyme

181 responsible for the synthesis of the most abundant sphingolipid, mannose-(inositol-P)₂-ceramide,
182 was alkaline-induced (Figure 2D), whereas expression of *ERG11*, *ERG1* and *ERG3*, genes involved in
183 ergosterol biosynthesis, a major component of fungal cell membrane, were alkaline-repressed (Table
184 S4). Expression of several genes involved in the cell wall biosynthesis was also pH-dependent. *SKN1*,
185 coding for a protein involved in β -1,6-glucan synthesis, was strongly induced at alkaline-pH (fold-
186 change = 24.25). Similarly, *PHR1* and *PHR2*, two genes coding for cell-wall transglycosidases, were
187 respectively alkaline-upregulated and alkaline-downregulated. In addition, *MNN1*, and *MNN22*, both
188 coding for mannosyltransferases, were down-regulated at alkaline pH. All the above pH-dependent
189 genes involved in cell wall synthesis but *MNN22*, are known to be regulated by Rim101. Surprisingly,
190 *KRE6*, known to be induced by *RIM101*, was found to be downregulated at alkaline pH in our study.
191 Interestingly, *CDR1* and *MDR1*, genes coding for transporters involved in azole antifungals efflux, and
192 *BCR1*, a transcription factor potentially involved in fluconazole resistance, were alkaline-induced.

193

194 As expected, transcriptomic analysis of the SC5314 reference strain revealed that genes upregulated
195 at alkaline pH are mostly involved in pathogenesis. In addition, several genes involved in antifungal
196 tolerance were differentially expressed at acidic and alkaline pH, confirming that pH influences this
197 phenomenon.

198

199 Alkaline pH-response in the *rim101Δ*-disrupted strain

200 In order to identify *RIM101*-dependent genes, transcription profiles at pH 7.6 of the *rim101Δ*-
201 disrupted strain and the SC5314 reference strain were compared. A total of 1002 differentially
202 expressed genes was retrieved, among which 462 were down-regulated and 540 were up-regulated
203 (Table S5 and Figure 2E).

204 Rim-dependent genes upregulated in the *rim101*^{-/-} mutant at alkaline pH were mainly enriched in
205 ion and transmembrane transport categories, whereas Rim-dependent downregulated genes were

206 more diverse and mostly enriched in metabolic, cellular, biosynthesis and oxidation-reduction
207 processes categories, as well as interaction and response to host (GO-term analysis, Figure 2E).

208

209 As for alkaline pH-responsive genes, a focus was given on genes potentially involved in antifungal
210 tolerance and resistance (Table S3). Thirty-seven of these genes were differentially expressed in the
211 mutant as compared to the wild-type strain, among which 15 were also identified as alkaline pH-
212 responsive genes by transcriptomic analysis of the wild-type strain. As expected, *SKN1* and *PHR1*,
213 known to be *RIM101*-induced, were significantly downregulated in the *rim101*^{-/-} mutant compared
214 to the wild-type, whereas the *RIM101*-repressed genes *PHR2* and *MNN1* were upregulated. Many
215 other genes coding for proteins involved in cell wall biosynthesis were upregulated in the *rim101Δ*-
216 disrupted strain. Consistent with our previous observation in the wild-type strain, *KRE6* was induced
217 in the *rim101*^{-/-} mutant, which confirms that this gene must be repressed rather than induced by
218 *RIM101*.

219 Interestingly, *IPT1*, involved in sphingolipid biosynthesis, was significantly lower expressed in the
220 mutant compared to the wild-type (Figure 2D): its expression therefore appears to be both Rim- and
221 pH-dependent.

222 Another gene, already known to be involved in antifungal tolerance, *HSP90*, was found to be
223 significantly downregulated in the *rim101*^{-/-} mutant (fold-change = 1.78) compared to the wild-type
224 at alkaline pH (Figure 2D). This gene encodes a molecular chaperone, interacting with about 10% of
225 the *C. albicans* proteome, which plays a key role in echinocandin and azole tolerance tolerance in this
226 species (10, 17, 18). *HSP90* therefore appears to be a downstream effector of *RIM101*. Intriguingly,
227 its expression was not significantly affected by environmental pH in the wild-type strain.

228

229 **Hsp90 could participate to the Rim-dependent antifungal tolerance in *C. albicans***

230 We therefore hypothesized that the implication of the Rim pathway in antifungal tolerance could be
231 partly mediated by *HSP90*.

232 In parallel to the RNA-SEQ analysis, expression of *HSP90* was assessed by RT-qPCR in a control strain
233 (DAY185), the *rim101Δ*-disrupted strain (DAY25) and a complemented strain constitutively
234 expressing the active form of Rim101 (Rim101SL). As seen in Figure 3, *HSP90* expression was
235 significantly reduced in the *rim101Δ*-disrupted strain compared to the control strain and the
236 complemented strain at pH 7.6, whereas its expression was similar in all strains at pH 4. Transcription
237 profile of the DAY185 strain and the SC5314 reference strain at both alkaline and acidic pH did not
238 significantly differ in the RNA-SEQ analysis (data not shown), suggesting that both strains can be used
239 as controls. As for RNA-SEQ, these results suggest that *RIM101* acts upstream *HSP90*.

240

241 [Hsp90 western-blot: in progress.]

242

243 To further characterize the interaction between Hsp90 and the Rim pathway, susceptibility to
244 geldanamycin, a pharmacological inhibitor of Hsp90, was assessed by colony formation assays in *rim*
245 mutants, wild-type, *RIM101*-overexpressed and complemented strains. Geldanamycin binds to the N-
246 terminal ATP/ADP-binding domain of Hsp90 and inhibits its ATPase activity which is essential for its
247 chaperone function (32, 33). Combination of both a high pH (7.6) and geldanamycin resulted in a too
248 high stress which strikingly inhibited yeast growth. For this reason, the experiment was performed at
249 a lower pH (7.2) than the previous experiments, yet sufficient to activate the rim pathway. As
250 depicted in Figure 4, all *rim* mutants were hypersensitive to geldanamycin, while the *RIM101*-
251 overexpressed or the complemented strains displayed a phenotype similar to the one of the control
252 strain. These data suggest that Rim101 and Hsp90 display parallel functions. Taken together, the
253 transcriptomic and phenotypic results therefore contradict previous studies that suggested that
254 Rim101 was a client-protein of Hsp90 (19, 34).

255

256 Implication of Hsp90 in antifungal tolerance is known to be mediated by at least two client-proteins:
257 calcineurin (Cmp1) and Mkc1 (10, 17, 18). As opposed to *HSP90*, *CMP1* was upregulated in the

258 *rim101*^{-/-} mutant compared to the wild-type (Figure 2D). In addition, no difference in sensitivity to
259 ciclosporin, a pharmacological calcineurin inhibitor, was noticed between the *rim101*^{-/-} mutant, a
260 strain overexpressing *RIM101* and the control strain (Supplemental Figure 3). This suggests that
261 Hsp90 may be involved in Rim-dependent antifungal tolerance independently of calcineurin. In
262 addition, no difference in *MKC1* level of expression was evidenced by RNA-sequencing analysis
263 between the mutant and the wild-type strain at alkaline pH (Figure 2D). Thus, implication of Hsp90 in
264 antifungal tolerance mediated by the Rim pathway may involve additional mechanisms and requires
265 further investigation.

266

267 **DISCUSSION**

268

269 This study explored the implication of the Rim pathway in response to azoles and echinocandins in *C.*
270 *albicans* by phenotypic and transcriptomic analysis. It confirmed the implication of the Rim pathway
271 in both azole and echinocandin tolerance. Moreover it showed that, in addition to Rim101p, the
272 terminal transcription factor of the pathway, all the Rim proteins are involved in this tolerance. This
273 study also identified new Rim101 downstream effectors such as Hsp90, a major molecular
274 chaperone, and Ipt1, involved in sphingolipid biosynthesis, that may contribute to the Rim-mediated
275 antifungal tolerance.

276

277 First, we showed that all *rim* mutants were hypersensitive to azoles and echinocandins by colony-
278 forming assays, suggesting an involvement of the Rim pathway in tolerance and/or resistance to
279 these antifungals. We then performed time-kill curves experiments, recommended as a key method
280 to explore antifungal tolerance, which confirmed the enhanced activity of azoles towards the *rim*
281 mutants (35). However, this assay presents severe limitations due to clumping effect: it has
282 previously been shown to be inaccurate for echinocandins, yet one of the most widely prescribed
283 antifungal class (10). In this study, we also showed that it is not an optimal test at alkaline pH, known

284 to induce filamentation. Evaluation of antifungal tolerance at alkaline pH therefore remains
285 challenging. However, azoles and echinocandins MICs, which did not differ between the control
286 strain and the *rim* mutants, suggest that the Rim pathway is rather involved in tolerance than
287 resistance to these antifungals.

288

289 RNA-sequencing of both a wild-type and a strain disrupted for *RIM101* was then performed at both
290 alkaline and acidic pH to identify potential candidates underlying involvement of the Rim pathway in
291 antifungal tolerance. Two previous studies performed transcriptomic profiling of a *C. albicans* wild-
292 type strain in both alkaline (pH 8) and acidic (pH 4) conditions. Bensen *et al.* used microarrays and
293 described 514 pH-responsive genes in the DAY185 strain using a ≥ 2 fold-change criteria (36). More
294 recently, Bruno *et al.* performed RNA-sequencing analysis of the SC5314 reference strain at pH 4 and
295 pH 8, in order to proceed to the comprehensive annotation of the *C. albicans* transcriptome: 1381
296 genes were found to be differentially expressed at alkaline versus acidic pH. Using a ≥ 2 fold-change
297 criteria, our study identified only 346 differentially expressed genes. Half of them were also identified
298 as such in the Bruno's study. However, direct comparison of results is not accurate as different
299 experimental conditions were used: notably, incubation time, media and pH conditions varied
300 between the 3 studies. Bruno *et al.* also studied the transcriptomic profiles of the DAY25 *rim101*-/
301 mutant at acidic and alkaline pH. However, our study is the first to investigate it by RNA-sequencing.
302 Several genes potentially involved in antifungal tolerance and resistance were identified as Rim-
303 dependent. Among them, two particularly retained our interest.

304 First, *HSP90* was identified as a Rim-dependent gene: its expression was decreased in the *rim101* Δ -
305 disrupted strain compared to the SC5314 reference strain at alkaline pH. Moreover, *rim* mutants
306 were hypersensitive to pharmacological Hsp90 inhibition. *RIM101* has previously been identified as a
307 genetic interactor of *HSP90* in *C. albicans* (37). Another study suggested that Rim101p was a client-
308 protein of the chaperone Hsp90 in yeasts, based on the results of a genome-wide genetic screen in *S.*

309 *cerevisiae* (19, 34). By contrast, our transcriptomic and phenotypic results rather support that
310 Rim101 acts upstream Hsp90.

311 Secondly, *IPT1* was shown to be drastically downregulated in the *rim101*^{-/-} mutant compared to the
312 wild-type strain. To our knowledge, this is the first study to identify this gene as Rim-dependent. *IPT1*
313 is responsible for the biosynthesis of the more abundant membrane sphingolipid, mannose-(inositol-
314 P)2-ceramide (15). It has previously been shown that disruption of this gene was associated with
315 hypersensitivity to fluconazole in *C. albicans* (15). In addition, membrane sphingolipids may influence
316 the interaction between the echinocandins and their target, Fks1p, and therefore modulate their
317 antifungal activity (16). *IPT1* was also identified as a pH-dependent gene: its expression was
318 significantly induced at alkaline pH versus acidic pH in the wild-type strain. All these data suggest that
319 *IPT1* could contribute to Rim-mediated antifungal tolerance.

320

321 These results open great perspectives. Hsp90 was shown to play a crucial role in antifungal tolerance
322 in *C. albicans* (10, 17, 18). It has also been involved in development of resistance in this species (18).
323 Moreover, under stress conditions, it has been shown to induce genetic instability, leading to
324 aneuploidy and the occurrence of antifungal resistance in *S. cerevisiae* (38). Efungumab, a
325 recombinant human antibody fragment targeting fungal Hsp90, has been evaluated as a new
326 antifungal strategy in combination with amphotericin B *in vitro* and *in vivo*. In a phase III clinical trial
327 in patients with invasive candidiasis, efungumab in combination with lipid-associated amphotericin B
328 decreased the *Candida*-attributable mortality, improved the overall clinical response rate and
329 increased the rate of culture-confirmed clearance of the infection (39). However, despite its good
330 antifungal activity, its development was stopped due to quality and safety issues. As Hsp90 is not a
331 fungal-specific protein, developing anti-Hsp90 antifungal strategies may expose to toxicity. By
332 contrast, the Rim pathway is fungal-specific and relatively well-conserved among the fungal kingdom.
333 As it appears to act upstream Hsp90, targeting this pathway would be an interesting way to indirectly
334 target Hsp90 and avoid toxicity in humans. Moreover, as this pathway is also involved in

335 pathogenesis and virulence, as well as in antifungal tolerance, inhibiting the Rim pathway in
336 combination with commercially available antifungals would have a great potential as a new
337 therapeutic strategy. Such a strategy would therefore be limited to the treatment of infections in
338 anatomical sites displaying neutral or alkaline pH, that is to say conditions in which the Rim pathway
339 is activated. However, this is the case of most of the invasive candidiasis, and notably candidemia or
340 intra-abdominal candidiasis. It would also be interesting to investigate the Rim pathway in other
341 pathogenic *Candida* species, and especially in *C. glabrata*, which is the second most frequent agent
342 of invasive candidiasis and displays a high genetic distance to *C. albicans*. Indeed, resistance and
343 therapeutic failures are more challenging in *C. glabrata* than in *C. albicans*, although until now the
344 Rim pathway and the mechanisms of antifungal drug tolerance have been described more
345 thoroughly in this last species (2, 6).

346

347 In conclusion, this study showed that all the Rim proteins are involved in azoles and echinocandins
348 tolerance in *C. albicans*. Transcriptomic and phenotypic analysis suggests that this implication in
349 tolerance could be partly mediated through Hsp90 and Ipt1. Further studies are warranted to
350 characterize the interactions between Rim101 and Hsp90, as well as to describe the role of Ipt1 in
351 antifungal tolerance. Targeting the Rim pathway could therefore represent a promising antifungal
352 strategy, in combination with existing antifungal drugs.

353

354 **MATERIALS AND METHODS**

355

356 **Strains and antifungals**

357 All strains used in the study are listed in Table 1. pTDH3-*RIM101* overexpression strain was
358 constructed using the Gateway® technology (Gateway® LR clonase kit, ThermoFisher Scientific) and a
359 Clp-pTDH3-GTW expression vector, kindly given by Christophe d'Enfert.

360 Antifungals powders were obtained from the following pharmaceutical companies: fluconazole,
361 voriconazole and anidulafungin from Pfizer, posaconazole from MSD and micafungin from Astellas.

362

363 **Time-kill curves experiments**

364 Time-kill curves experiments were performed in RPMI medium buffered with HEPES at pH 7.6.
365 Fluconazole, voriconazole and posaconazole were used at 8, 5 and 2.5 µg/mL respectively.
366 Anidulafungin and micafungin were used at 0.5 µg/mL. An initial inoculum of 10⁴ or 10⁶ CFU/mL,
367 obtained from overnight pre-culture of each strain in liquid YPD medium, was added to each tube,
368 which was further incubated at 30°C under agitation for 48 hours. After 8, 24 and 48 hours of
369 incubation, 10 µL of each suspension were sampled, serially diluted in NaCl 0.9%, and 20 µL of the
370 diluted-suspension were plated in duplicates on YPD agar. Determination of CFUs was performed
371 after 24 to 48 hours of incubation at 30°C. A minimum of 2 replicates was performed for each time-
372 kill curve experiment. A control without any antifungal was realized in parallel.

373

374 **Colony formation assays**

375 Each strain was pre-cultured overnight in liquid YPD medium at 30°C under agitation, then diluted to
376 an OD₆₀₀ of 5. Yeasts were plotted on SC-medium buffered at pH 7.6 or SC-medium buffered at pH
377 7.6 containing anidulafungin (0.5 µg/mL), micafungin (0.5 µg/mL), fluconazole (8 µg/mL) or
378 posaconazole (2.5 µg/mL), or SC-medium buffered at pH 7.2 containing geldanamycin (10 µM) in a
379 ten-fold dilution series. Plates were incubated at 30°C for 48 hours to 6 days prior to imaging.

380

381 **RNA extraction**

382 Each strain was pre-cultured overnight in liquid YPD medium at 30°C under agitation, then diluted to
383 an OD₆₀₀ of 0.1 in SC medium buffered at pH 7.6 or pH 4 respectively with HEPES or citrate buffer.
384 Cells were then incubated at 30°C under agitation until an OD₆₀₀ of 0.6-0.8 was reached, and

385 collected by centrifugation. RNA extraction was performed on the pellet using the MasterPure™
386 Yeast RNA Purification Kit (Epicentre), according to manufacturer's instructions.

387

388 **RT-PCR**

389 RT-PCR were performed using the KAPA Probe Fast qPCR Master Mix (Clinisciences). Primers and
390 probes are listed in Table S6. Gene expression levels were normalized to the *ACT1* ones.

391

392 **RNA-sequencing analysis**

393 Library preparation and RNA-sequencing were performed by GATC Biotech (European Genome and
394 Diagnostics Centre, Constance, Germany). The bioinformatics analysis pipeline can be summarized as
395 follows (Supplemental Figure 1A): reads were quality-checked using FastQC before and after cleaning
396 by Trimmomatic applying default parameters (40). Reads were then aligned to *C. albicans* genome
397 Assembly 22 (allele A, available from Candida genome database) using Bowtie2 (41). Raw read counts
398 for each gene were calculated using HTSeqCount using defaults parameters (42). Read count data
399 was normalised using the DESeq2 R-package (43). DESeq2 normalised read counts were used to
400 identify differentially expressed genes with an adjusted p-value <0.05 and a fold change below -1.5
401 or above 1.5 (or below -2 or above 2 for comparison with previously published data). Gene ontology
402 analysis was performed using the GO slim mapper available from Candida genome database. Data
403 from the RNA-seq is available from the GEO repository X.

404

405 **Statistical analysis**

406 Statistical analysis was performed by two-way ANOVA (antifungal and strain with interaction
407 antifungal-strain) and a Tukey-Kramer post-hoc analysis. A secondary analysis was performed for
408 each antifungal.

409

410

411 **ACKNOWLEDGMENTS**

412 We are grateful to Christophe d'Enfert, Murielle Chauvel and Aaron P. Mitchell for the generous gift
413 of strains and plasmid used in this study. We thank Rose-Laurence Bertini and Quentin Despinasse
414 for technical help.

415

416 **REFERENCES**

- 417 1. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden killers:
418 human fungal infections. *Sci Transl Med* 4:165rv13.
- 419 2. Kullberg BJ, Arendrup MC. 2015. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med* 373:1445–1456.
- 420 3. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC,
421 Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. 2016. Executive Summary: Clinical Practice
422 Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of
423 America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 62:409–417.
- 424 4. Vallabhaneni S, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Schaffner W, Beldavs ZG, Derado G,
425 Pham CD, Lockhart SR, Smith RM. 2015. Epidemiology and Risk Factors for Echinocandin
426 Nonsusceptible *Candida glabrata* Bloodstream Infections: Data From a Large Multisite Population-
427 Based Candidemia Surveillance Program, 2008-2014. *Open Forum Infect Dis* 2:ofv163.
- 428 5. Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. 2016. Antifungal susceptibility patterns
429 of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013).
430 *Diagn Microbiol Infect Dis* 85:200–204.
- 431 6. Shields RK, Nguyen MH, Clancy CJ. 2015. Clinical perspectives on echinocandin resistance
432 among *Candida* species. *Curr Opin Infect Dis* 28:514–522.
- 433 7. Delarze E, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. 2015. Adaptation of a *Gaussia princeps* Luciferase
434 reporter system in *Candida albicans* for *in vivo* detection in the *Galleria mellonella* infection model.
435 *Virulence* 6:684–693.
- 436 8. Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. 2003. Ergosterol biosynthesis inhibitors
437 become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida*
438 *glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:956–964.
- 439 9. Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. 2003. Calcineurin A of *Candida albicans*:
440 involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* 48:959–976.
- 441 10. Singh SD, Robbins N, Zaas AK, Schell WA, Perfect JR, Cowen LE. 2009. Hsp90 governs
442 echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS Pathog*
443 5:e1000532.

- 444 11. Yu S-J, Chang Y-L, Chen Y-L. 2015. Calcineurin signaling: lessons from *Candida* species. FEMS
445 Yeast Res 15:fov016.
- 446 12. Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Prince RA, Lewis RE. 2005. Attenuation of the activity of
447 caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*: possible role of cell wall integrity and
448 calcineurin pathways. Antimicrob Agents Chemother 49:5146–5148.
- 449 13. Dichtl K, Samantaray S, Wagener J. 2016. Cell wall integrity signalling in human pathogenic
450 fungi. Cell Microbiol 18:1228–1238.
- 451 14. Rauceo JM, Blankenship JR, Fanning S, Hamaker JJ, Deneault J-S, Smith FJ, Nantel A, Mitchell
452 AP. 2008. Regulation of the *Candida albicans* cell wall damage response by transcription factor Sko1
453 and PAS kinase Psk1. Mol Biol Cell 19:2741–2751.
- 454 15. Prasad T, Saini P, Gaur NA, Vishwakarma RA, Khan LA, Haq QMR, Prasad R. 2005. Functional
455 Analysis of CaIPT1, a Sphingolipid Biosynthetic Gene Involved in Multidrug Resistance and
456 Morphogenesis of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 49:3442.
- 457 16. Healey KR, Challa KK, Edlind TD, Katiyar SK. 2015. Sphingolipids mediate differential
458 echinocandin susceptibility in *Candida albicans* and *Aspergillus nidulans*. Antimicrob Agents
459 Chemother 59:3377–3384.
- 460 17. LaFayette SL, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Betancourt-Quiroz M, Gunatilaka AAL, Perfect JR,
461 Cowen LE. 2010. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via
462 circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. PLoS Pathog 6:e1001069.
- 463 18. Cowen LE. 2013. The fungal Achilles' heel: targeting Hsp90 to cripple fungal pathogens. Curr
464 Opin Microbiol 16:377–384.
- 465 19. Leach MD, Klipp E, Cowen LE, Brown AJP. 2012. Fungal Hsp90: a biological transistor that
466 tunes cellular outputs to thermal inputs. Nat Rev Microbiol 10:693–704.
- 467 20. Li X, Cai Q, Mei H, Zhou X, Shen Y, Li D, Liu W. 2015. The Rpd3/Hda1 family of histone
468 deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother.
- 469 21. Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. 1999. The trailing end point phenotype in antifungal
470 susceptibility testing is pH dependent. Antimicrob Agents Chemother 43:1383–1386.
- 471 22. Cornet M, Gaillardin C. 2014. pH signaling in human fungal pathogens: a new target for
472 antifungal strategies. Eukaryot Cell 13:342–352.
- 473 23. Nobile CJ, Solis N, Myers CL, Fay AJ, Deneault J-S, Nantel A, Mitchell AP, Filler SG. 2008.
474 *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall
475 functions. Cell Microbiol 10:2180–2196.
- 476 24. Cheng S, Clancy CJ, Xu W, Schneider F, Hao B, Mitchell AP, Nguyen MH. 2013. Profiling of
477 *Candida albicans* gene expression during intra-abdominal candidiasis identifies biologic processes
478 involved in pathogenesis. J Infect Dis 208:1529–1537.

- 479 25. Mitchell BM, Wu TG, Jackson BE, Wilhelmus KR. 2007. *Candida albicans* strain-dependent
480 virulence and Rim13p-mediated filamentation in experimental keratomycosis. Invest Ophthalmol Vis
481 Sci 48:774–780.
- 482 26. Davis DA. 2009. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence.
483 Curr Opin Microbiol 12:365–370.
- 484 27. Parsons AB, Brost RL, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown GW, Kane PM, Hughes TR, Boone
485 C. 2004. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to
486 cellular target pathways. Nat Biotechnol 22:62–69.
- 487 28. Cornet M, Gaillardin C, Richard ML. 2006. Deletions of the endocytic components VPS28 and
488 VPS32 in *Candida albicans* lead to echinocandin and azole hypersensitivity. Antimicrob Agents
489 Chemother 50:3492–3495.
- 490 29. EUCAST. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth
491 dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect. 2008;14:398-405.
- 492 30. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, EUCAST-AFST. 2012. EUCAST
493 technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth
494 dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST).
495 Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 18:E246-247.
- 496 31. Gomez-Raja J, Davis DA. 2012. The β -arrestin-like protein Rim8 is hyperphosphorylated and
497 complexes with Rim21 and Rim101 to promote adaptation to neutral-alkaline pH. Eukaryot Cell
498 11:683–693.
- 499 32. Roe SM, Prodromou C, O’Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. 1999. Structural basis for
500 inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and
501 geldanamycin. J Med Chem 42:260–266.
- 502 33. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. 1994. Inhibition of heat shock
503 protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential
504 role for stress proteins in oncogenic transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 91:8324–8328.
- 505 34. Zhao R, Houry WA. 2005. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation.
506 Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell 83:703–710.
- 507 35. Delarze E, Sanglard D. 2015. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance
508 and the concept of persistence. Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother
509 23:12–19.
- 510 36. Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J, Davis DA. 2004. Transcriptional profiling in *Candida*
511 *albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. Mol
512 Microbiol 54:1335–1351.
- 513 37. O’Meara TR, Veri AO, Polvi EJ, Li X, Valaei SF, Diezmann S, Cowen LE. 2016. Mapping the
514 Hsp90 Genetic Network Reveals Ergosterol Biosynthesis and Phosphatidylinositol-4-Kinase Signaling
515 as Core Circuitry Governing Cellular Stress. PLoS Genet 12:e1006142.

- 516 38. Chen G, Bradford WD, Seidel CW, Li R. 2012. Hsp90 stress potentiates rapid cellular
517 adaptation through induction of aneuploidy. *Nature* 482:246–250.
- 518 39. Pachel J, Svoboda P, Jacobs F, Vandewoude K, van der Hoven B, Spronk P, Masterson G,
519 Malbrain M, Aoun M, Garbino J, Takala J, Drgona L, Burnie J, Matthews R, Mycograb Invasive
520 Candidiasis Study Group. 2006. A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated
521 amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein
522 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 42:1404–1413.
- 523 40. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence
524 data. *Bioinforma Oxf Engl* 30:2114–2120.
- 525 41. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*
526 9:357–359.
- 527 42. Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput
528 sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl* 31:166–169.
- 529 43. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for
530 RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
- 531 44. Fonzi WA, Irwin MY. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida*
532 *albicans*. *Genetics* 134:717–728.
- 533 45. Davis D, Edwards JE, Mitchell AP, Ibrahim AS. 2000. *Candida albicans* RIM101 pH response
534 pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 68:5953–5959.
- 535 46. Davis DA, Bruno VM, Loza L, Filler SG, Mitchell AP. 2002. *Candida albicans* Mds3p, a
536 conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis.
537 *Genetics* 162:1573–1581.
- 538 47. Wilson RB, Davis D, Mitchell AP. 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans*
539 through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* 181:1868–1874.
- 540 48. Davis D, Wilson RB, Mitchell AP. 2000. RIM101-Dependent and -Independent Pathways
541 Govern pH Responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 20:971–978.
- 542 49. Li M, Martin SJ, Bruno VM, Mitchell AP, Davis DA. 2004. *Candida albicans* Rim13p, a Protease
543 Required for Rim101p Processing at Acidic and Alkaline pHs. *Eukaryot Cell* 3:741–751.
- 544 50. Gigou Cornet M. 2006. Rôle des gènes *RIM* et *VPS* dans la signalisation du pH, la virulence et
545 la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans*. *Biochimie, INAPG (AgroParisTech)*.
- 546 51. Cornet M, Bidard F, Schwarz P, Da Costa G, Blanchin-Roland S, Dromer F, Gaillardin C. 2005.
547 Deletions of endocytic components VPS28 and VPS32 affect growth at alkaline pH and virulence
548 through both RIM101-dependent and RIM101-independent pathways in *Candida albicans*. *Infect*
549 *Immun* 73:7977–7987.

550 52. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegerville M, Le Pape P. 2012. Amino acid substitutions in the
551 *Candida albicans* sterol Δ 5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two
552 novel mutants with impaired virulence. J Antimicrob Chemother 67:2131–2138.

553

554 **FIGURES**

Figure 1

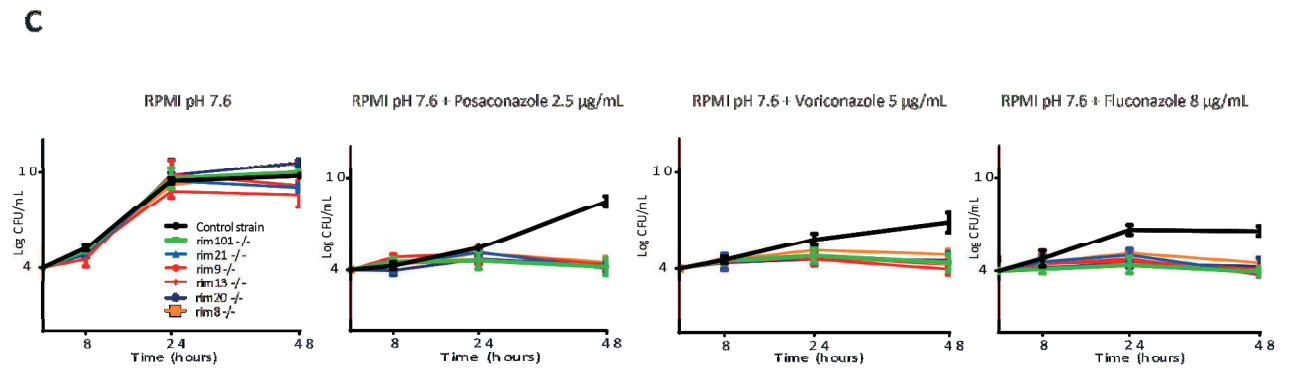
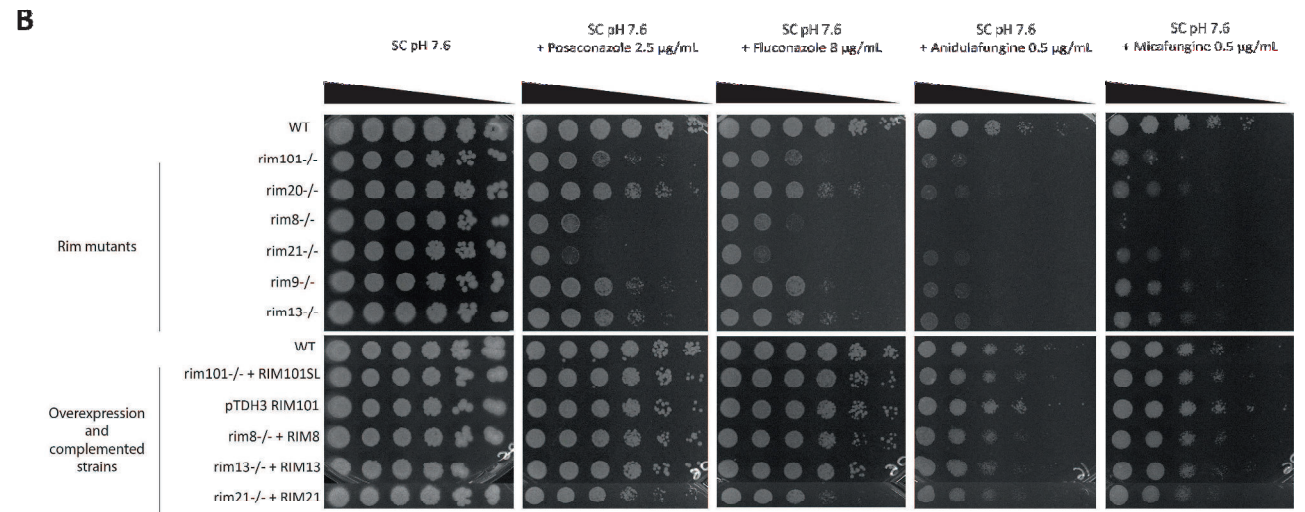
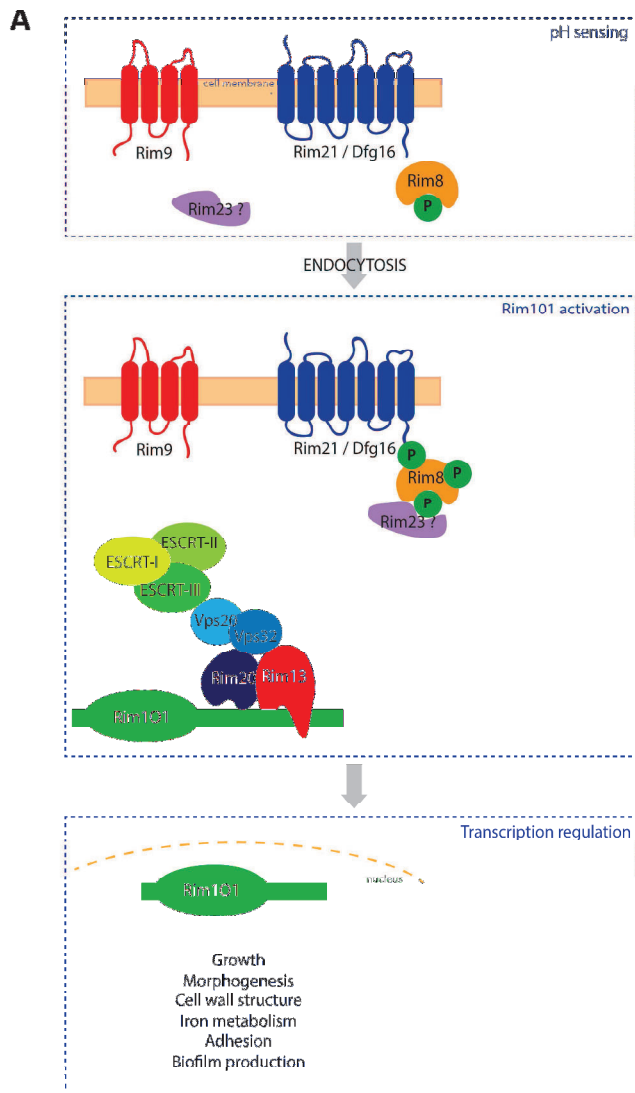


Figure 1: The rim pathway is involved in antifungal tolerance in *C. albicans*

(A) Schematic representation of the Rim pathway in *C. albicans*. External pH is sensed by a complex of 2 transmembrane proteins Rim9 and Rim21/Dfg16, and the arrestin-like protein Rim8. In neutral-alkaline conditions, Rim8 becomes hyperphosphorylated, leading to endocytosis of this membrane complex, and recruitment of the Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) I, II and III. Two other Rim proteins, Rim20 and Rim13, the signaling protease, are then recruited (via Rim8 or an orthologue of *S. cerevisiae* Rim23, which has not been identified yet in *C. albicans*), leading to the cleavage of the C-terminal inhibitory domain of Rim101, the final transcription factor of the Rim pathway. Once activated, Rim101p migrates to the nucleus and regulates expression of target genes involved in multiple cellular processes, including growth, iron metabolism, cell wall structure, yeast-to-hyphae transition, adhesion and biofilm formation. **(B)** Colony forming assays. Cells were plated in ten-fold dilutions in presence of fluconazole (8 µg/mL), posaconazole (2.5 µg/mL), anidulafungin (0.5 µg/mL) or micafungin (0.5 µg/mL) in SC-medium buffered at pH 7.6. The 6 *rim* mutants were hypersensitive to the different antifungals. **(C)** Time-kill curves of the *rim* mutants and a control strain in presence of posaconazole (2.5 µg/mL), voriconazole (5 µg/mL) and fluconazole (8 µg/mL) at pH 7.6. Growth rates of the mutants at 48 hours were significantly lower than the ones of the control strain for the three azoles compounds ($p < 0.01$).

Figure 2

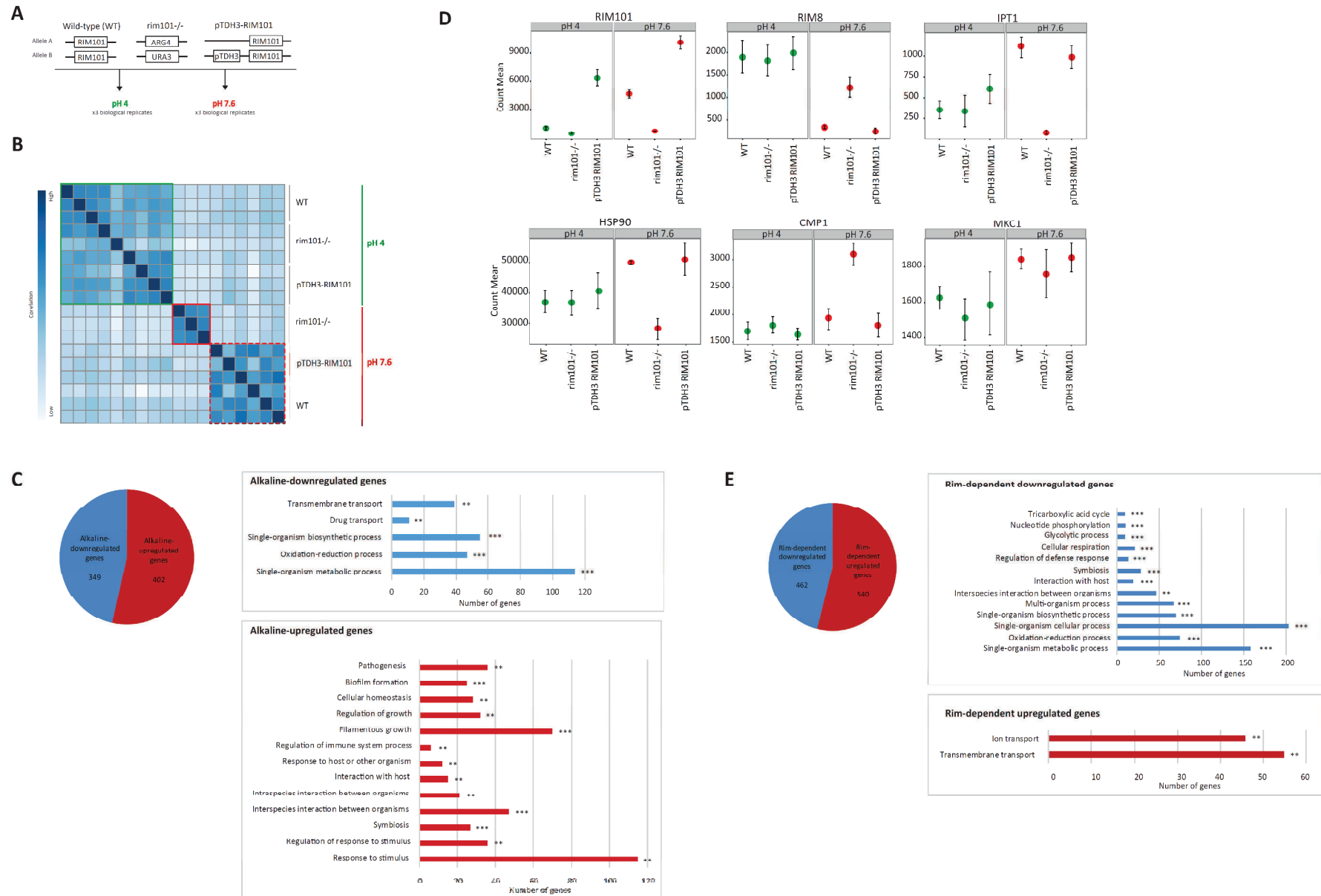


Figure 2: Transcriptomic analysis of a *rim101Δ*-disrupted strain (DAY25), a strain overexpressing RIM101 (pTDH3) and the SC5314 reference strain.

(A) Experimental design of RNA-SEQ experiments. **(B)** Unsupervised hierarchical clustering of the distance between samples. All replicates are presented. **(C)** Alkaline upregulated and downregulated in the SC5413 reference strain. GO-term enrichment analysis of biological processes among alkaline upregulated and downregulated genes. The number of genes is expressed on the x-axis. The symbols ** and *** respectively indicate p-values < 0.01 and p-values < 0.001. **(D)** *RIM101*, *RIM8*, *IPT1*, *HSP90*, *CMP1* and *MKC1* mean gene counts obtained from RNA-sequencing at both acidic and alkaline pH in the three analyzed strains. **(E)** Rim-dependent upregulated and downregulated in the *rim101Δ*-disrupted strain (DAY25). GO-term enrichment analysis of biological processes among Rim-dependent upregulated and downregulated genes. The number of genes is expressed on the x-axis. The symbols ** and *** respectively indicate p-values < 0.01 and p-values < 0.001.

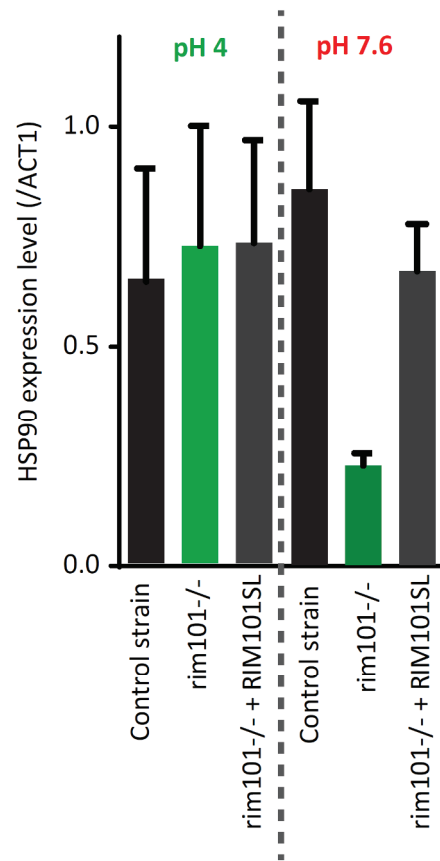


Figure 3: *HSP90* is a Rim-dependent pH-independent gene

HSP90 expression level normalized to *ACT1* obtained in RT-qPCR at acidic and alkaline pH in the DAY25 *rim101Δ*-disrupted strain, the DAY5SL complemented strain and the DAY185 control strain.

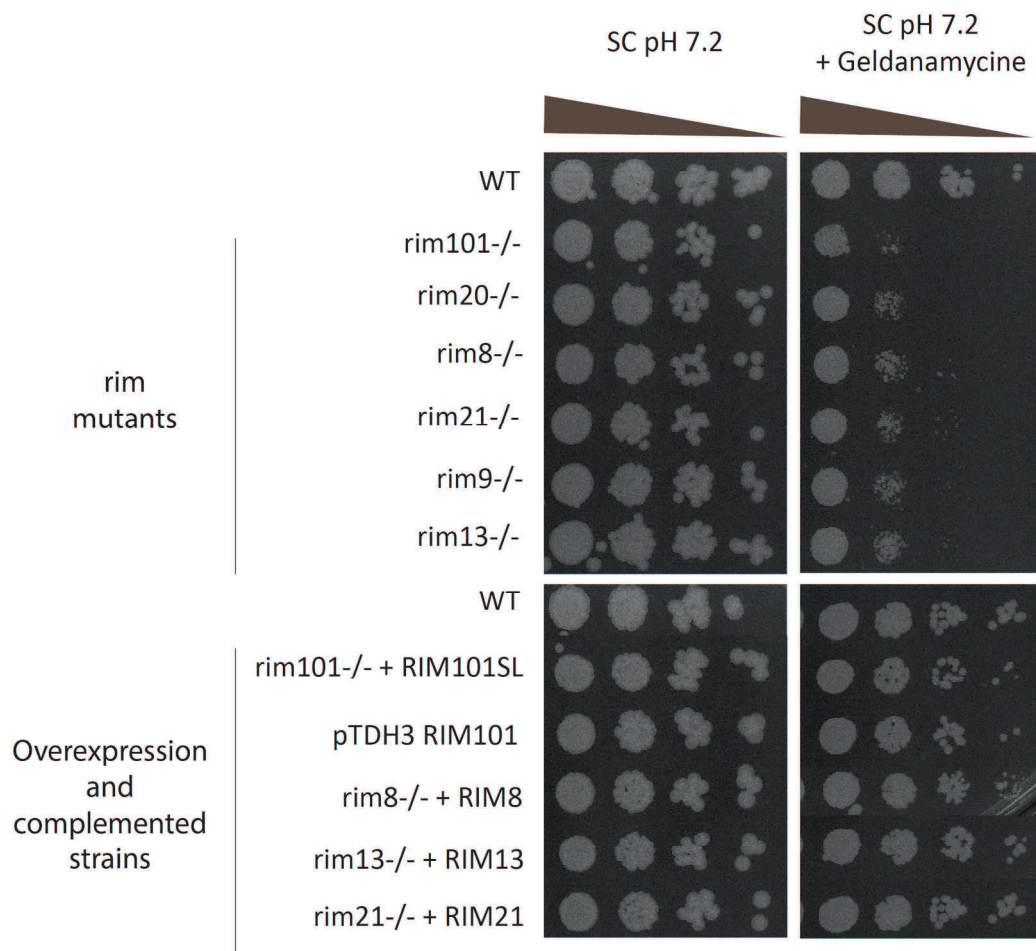


Figure 4: The *rim* mutants are hypersensitive to pharmacological inhibition of Hsp90.

Colony forming assays in presence of geldanamycin (10 μ M). Cells were plated in ten-fold dilutions in presence of geldanamycin (10 μ M) in SC-medium buffered at pH 7.2.

TABLES

Table 1: Strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
SC5314	Reference strain	
CAI4	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434</i>	(44)
DAY185	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pHIS1::his1::hisG/his1::hisG pARG4::URA3::arg4::hisG/arg4::hisG</i>	(45)
DAY25	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pHIS1::his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim101::ARG4/rim101::URA3</i>	(45)
DAY286	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG pARG4::URA3::arg4::hisG/arg4::hisG</i>	(46)
DAY5	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim101::ARG4/rim101::URA3</i>	(47)
DAY23	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim20::URA3/rim20::ARG4</i>	(47)
DAY61	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim8::URA3/rim8::ARG4</i>	(48)
GKO88	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim13::Tn7-UAU1/rim13::Tn7-URA3</i>	(49)
MC21	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim21::URA3/rim21::URA3</i>	(50)
MC23	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim9::URA3/rim9::ARG4</i>	(50)
MC21C	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pHIS1::RIM21::his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim21::URA3/rim21::URA3</i>	(50)
MC23C	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pHIS1::RIM9::his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim9::URA3/rim9::ARG4</i>	(50)
DAY106	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim8::URA3/rim8::ARG4::pRIM8::HIS1</i>	(45)
DAY226	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pHIS1::RIM13::his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim13::URA3/rim13::ARG4</i>	(49)
DAY5SL (MC13)	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pRIM101SL::HIS'rim101/RIM101 arg4::hisG/arg4::hisG rim101::ARG4/rim101::URA3</i>	(51)
CGY1	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 RPS1/RPS1::pTDH3-RIM101</i>	This study

SUPPLEMENTAL DATA

Table S1 : MICs determined by the EUCAST reference technique

Strain		Mean MIC ₅₀ (mg/L)			
		Fluconazole	Posaconazole	Anidulafungin	Micafungin
DAY286	Control strain	0.1875	0.007875	≤0.0078125	0.03125
DAY5	<i>rim101-/-</i>	0.125	0.007875	0.01575	0.03125
DAY23	<i>rim20-/-</i>	0.125	0.007875	NA	0.03125
DAY61	<i>rim8-/-</i>	0.1875	0.007875	0.01575	0.03125
GKO88	<i>rim13-/-</i>	0.125	0.007875	0.01575	0.03125
MC21	<i>rim21-/-</i>	0.1875	0.007875	0.01575	0.03125
MC23	<i>rim9-/-</i>	0.125	0.01575	0.01575	0.03125

Tables S2, S4 and S5:

These xlsx files will be submitted with the final version of the manuscript. If needed, they are available on request for the PhD committee members.

Table S3: List of genes involved or potentially involved in tolerance and resistance to antifungals in *C. albicans* used in this study

Gène	Nom courant	Gène	Nom courant	Gène	Nom courant
C4_02900C_A	CRH11	C6_02040W_A	MCR1	C4_04590W_A	SCS7
C5_02630C_A	MNN1	C4_03180W_A	NCP1	C7_02770W_A	CHS1
C1_10720C_A	MNN2	C1_08460C_A	UPC2	CR_09020C_A	CHS2
C5_02570W_A	MNN13	C4_04760C_A	C4_04760C_A	C1_13110C_A	CHS3
C3_05610W_A	MNN14	C1_04770C_A	ERG3	C3_00710W_A	CHS8
C1_04900W_A	MNN15	C4_02280W_A	IDI1	CR_00180C_A	CHT1
C4_04770C_A	MNN22	C3_04470W_A	PKC1	C5_04130C_A	CHT2
C1_10070C_A	MNN23	C7_01250W_A	ASC1	CR_10110W_A	CHT3
C2_01300C_A	MNN24	C1_00730C_A	CMP1	C5_00220W_A	ROT2
C7_03600W_A	MNN26	C5_05160C_A	CNB1	C3_01320C_A	SGA1
CR_04800W_A	MNT4	C3_05780C_A	CRZ1	C4_02250C_A	BGL2
C3_01730C_A	UTR2	C4_06030W_A	CMD1	C4_04530C_A	PHR1
C1_14060W_A	C1_14060W_A	C1_01100W_A	CCH1	C1_00220W_A	PHR2
C1_02990C_A	XOG1	C5_03990W_A	MID1	C1_10830W_A	BIG1
C1_02420C_A	GSC1	C6_02610C_A	CDC37	CR_03790C_A	KRE1
C1_05600W_A	GSL1	C2_03330C_A	HOG1	C3_02960C_A	KRE5
CR_00850C_A	GSL2	C4_05030C_A	SSK2	C3_05830W_A	KRE6
C6_00820W_A	SUN41	C2_03770C_A	STE11	C3_04180W_A	KRE9
C4_02250C_A	BGL2	C3_02100W_A	STE50	C3_05810C_A	SKN1
C1_03680W_A	ENG1	C3_06070C_A	PBS2	CR_04660C_A	UGP1
C6_01690W_A	ACF2	C4_01190W_A	CAS5	CR_05140W_A	CR_05140W_A
C1_02990C_A	XOG1	C7_02800W_A	NIK1	CR_01000C_A	SLN1
C1_02630C_A	EXG2	C5_00240W_A	SKN7	C2_03320W_A	CHK1
C5_05390C_A	PGA4	C2_01780W_A	MSB2	C2_04930C_A	CRK1
C7_00700W_A	CYB5	C7_01410C_A	NBP2	CR_05940W_A	CEK2
C1_08590C_A	ERG1	CR_03650W_A	SGD1	C1_14010W_A	CSK1
C5_00660C_A	ERG11	C4_00390W_A	C4_00390W_A	C3_06070C_A	PBS2
C2_04580W_A	ERG20	C1_07240W_A	YPD1	C2_05780C_A	MKK2
C2_09400C_A	ERG24	CR_07380C_A	KSR1	C7_02990W_A	BCK1
CR_02370W_A	ERG25	C2_09150W_A	MIT1	C4_05030C_A	SSK2
C4_06270C_A	ERG26	C3_04710W_A	ARV1	CR_03900W_A	HST7
CR_01140C_A	ERG27	C5_01240W_A	AUR1	CR_00120C_A	MKC1
C7_02840C_A	ERG5	C1_12790C_A	FEN1	C1_12410C_A	PKH2
C3_02150C_A	ERG6	C2_03230C_A	FEN12	C6_00350W_A	PKH3
C2_02460W_A	ERG7	C3_00980W_A	FLC1	C2_03770C_A	STE11
C2_08610W_A	ERG9	CR_07100W_A	FLC2	C3_04250W_A	WSC1
C2_04310W_A	ERG10	C1_09120W_A	IPT1	C1_13930W_A	SSK1
C1_09460W_A	ERG12	C1_13900C_A	LCB2	C1_10000C_A	CPP1
CR_09160C_A	ERG13	C2_02860W_A	SUR2	C4_03890W_A	PTP2
C1_00800C_A	ERG2	CR_07580C_A	TSC11	C1_09260C_A	PTC1
C2_01090C_A	ERG28	C7_03050W_A	C7_03050W_A	CR_01520W_A	PTC2

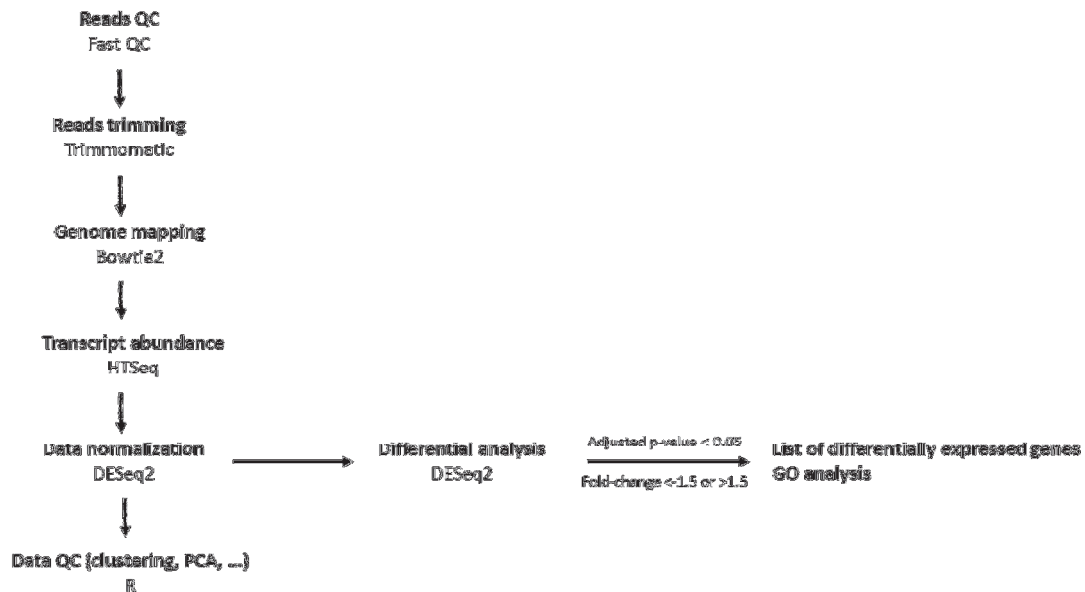
C3_00760W_A	ERG4	CR_06070W_A	CR_06070W_A	CR_10340W_A	PTP3
C4_01870C_A	ERG8	CR_08640C_A	CR_08640C_A	C4_06480C_A	CEK1
C1_03780C_A	HMG1	C1_08540C_A	C1_08540C_A	C6_04430W_A	CST5
C6_03380W_A	C6_03380W_A	C2_00440W_A	SAS2	C3_03670W_A	C3_03670W_A
C3_00780W_A	HOS2	CR_01540W_A	SAS3	C4_01780C_A	C4_01780C_A
C1_12230W_A	SNT1	C1_07110W_A	TAF145	CR_06780W_A	CR_06780W_A
C1_13930W_A	SSK1	C4_07210W_A	C4_07210W_A	CR_09490W_A	CR_09490W_A
C4_05030C_A	SSK2	CR_00410W_A	RTT109	C3_05220W_A	CDR1
C6_01220C_A	C6_01220C_A	CR_06710C_A	GCN5	C3_04890W_A	CDR2
CR_02860W_A	RHO1	C1_10860C_A	ADA2	C5_01840C_A	TAC1
C2_07750W_A	RHO2	C1_03290W_A	NGG1	C6_03170C_A	MDR1
CR_07770C_A	PTC6	C6_02310W_A	C6_02310W_A	C3_05920W_A	MRR1
C1_03770W_A	SKO1	CR_10230W_A	CR_10230W_A	C3_07860C_A	MRR2
C1_03320C_A	EHD3	CR_02050C_A	HDA1	C1_04770C_A	ERG3
C5_02340C_A	CST20	C4_06010C_A	HOS1	C7_02030W_A	HSP90
C1_08450C_A	CDC42	C3_00780W_A	HOS2	C1_08670W_A	SWI6
C1_09140C_A	SSU81	C4_02300W_A	HOS3	C1_01790W_A	SWI4
C1_04670W_A	HAT1	C5_01340W_A	HST3	C4_01260W_A	RLM1
C6_04540C_A	HAT2	CR_02760C_A	RPD3	CR_06440C_A	BCR1
C3_06060W_A	ELP3	C3_07000W_A	RPD31	C5_04800W_A	CRH12
C4_01250W_A	NAT4	C5_03560W_A	C5_03560W_A	C4_06980W_A	PRA1

Table S6: Primers and probes used for RT-qPCR

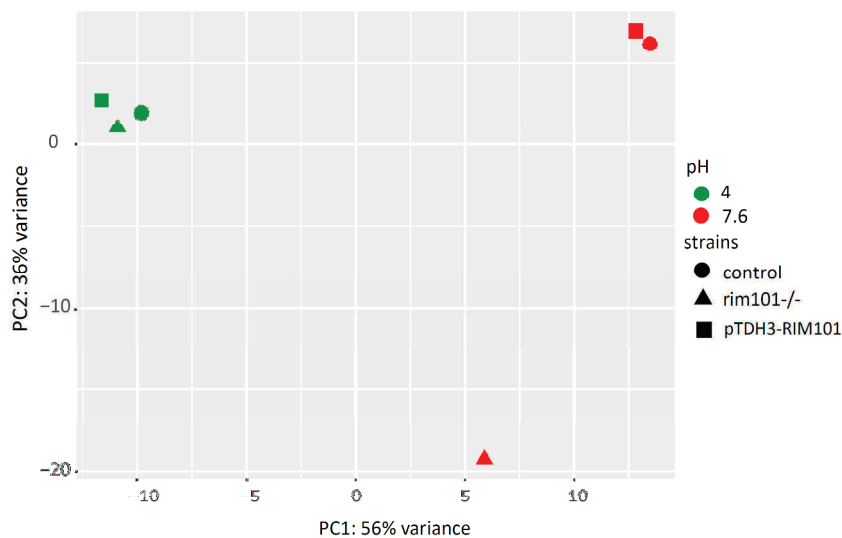
Gene	Primers and probes	Reference
<i>ACT1</i>	F-ACT1 : TTGGTGATGAAGCCCAATCC R-ACT1 : CATATCGTCCCAGTTGGAAACA S-ACT1 : FAM-TTGACCTTGAGATACCCAATTGAACACGGTA-Tamra	(52)
<i>HSP90</i>	F-HSP90 : GCTGACGTTTCTATGATTG R-HSP90 : CATCCAAAGTAACAGTGAAC S-HSP90 : FAM-TCTACTCCTGTTCTGGTGTGCTGAT-Tamra	This study

SUPPLEMENTAL FIGURES

A

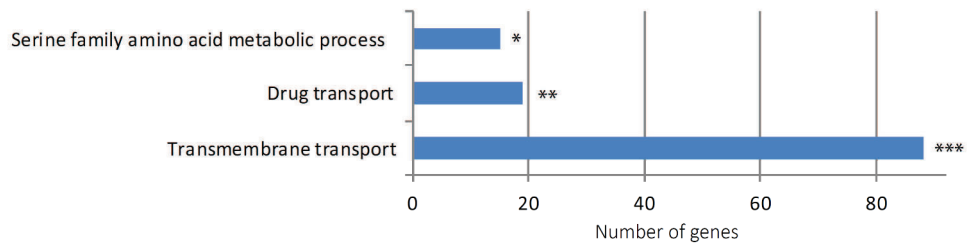


B



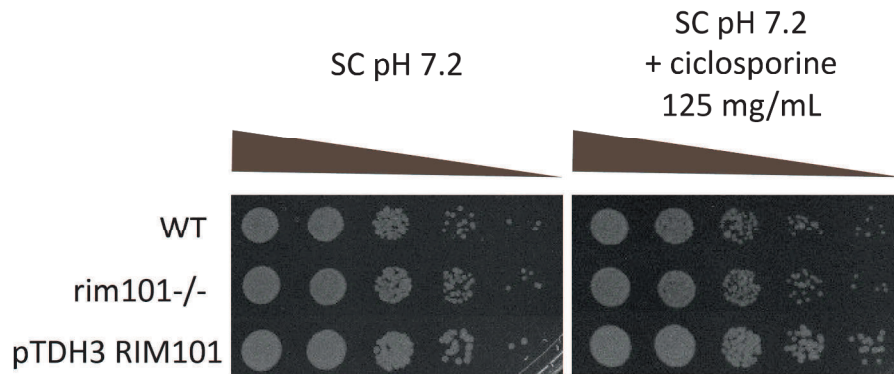
Supplemental Figure 1: Transcriptomic analysis

(A) Schematic representation of the bioinformatic pipeline used for RNA-Seq data analysis, **(B)** Principal Component Analysis applied on the normalized counts of each sample. Replicates are collapsed. Principal components are represented on the x- and y-axis. Data obtained at acidic pH are shown in green; data obtained at alkaline pH are shown in red, strains are identified by the following shapes: wild-type (SC5314), round; *rim101Δ*-disrupted strain (DAY 25), triangle; *RIM101*-overexpressed strain (CGY1), square.



Supplemental Figure 2: GO-term enrichment analysis at acidic pH

GO-term enrichment analysis of biological processes among genes differentially expressed at acidic pH between the RMI101-overexpressed strain (CGY1) and the SC5314 reference strain. The number of genes is expressed on the x-axis. The symbols *, ** and *** respectively indicate p-values < 0.05, p-values < 0.01 and p-values < 0.001.



Supplemental Figure 3: Pharmacological inhibition of calcineurin

Colony forming assays in presence of ciclosporin, a pharmacological inhibitor of calcineurin. Cells were plated in ten-fold dilutions in presence of ciclosporin (125 mg/mL) in SC-medium buffered at pH 7.2. No specific phenotype was observed.

3. Bdf1, nouvelle cible antifongique ?

3.1. Inhibition de la protéine BET Bdf1 chez *C. albicans*

3.1.1. Contexte

L'inhibition des protéines BET comme nouvelle stratégie antifongique a été évaluée chez *C. albicans* dans le cadre de l'ANR FungiBET-14-CE16-0027-03. Les résultats de cette évaluation sont présentés en détail dans l'article par Mietton *et coll.* intitulé *Selective BET inhibition as an antifungal strategy*, dont la version révisée présentée ci-après a été soumise à *Nature microbiology* début février 2017. Brièvement, les principaux résultats sont les suivants : (i) le gène *BDF1* est essentiel chez *C. albicans* et des mutations inactivant les deux bromodomains, responsables de la liaison de Bdf1 à la chromatine, sont associées à une perte de viabilité *in vitro* et une diminution de la virulence *in vivo*. (ii) l'inhibition sélective des bromodomains de la protéine BET fongique Bdf1 est possible. Un screening chimique d'un très grand nombre de molécules (environ 80 000) a permis l'identification de plusieurs composés candidats, stériquement incompatibles avec l'inhibition des bromodomains des protéines BET humaines. (iii) un de ces composés de type dibenzothiazepinone phénocopie les effets des mutations des bromodomains sur la viabilité de *C. albicans in vitro*, ce qui suggère que l'inhibition sélective des protéines BET fongiques est une stratégie antifongique prometteuse.

Ma participation à ce travail a consisté en la réalisation de tests de sensibilité aux antifongiques pour des souches délétées ou mutées pour le bromodomaine BD1 ou le bromodomaine BD2 et une souche contrôle, afin d'investiguer le rôle de Bdf1 dans la tolérance et/ou la résistance au fluconazole et au voriconazole (voir partie 5 : discussion). J'ai également participé à différentes réunions de suivi du projet, ainsi qu'à la relecture de cet article.

3.1.2. Article

1 **Selective BET inhibition as an antifungal therapeutic strategy**

2
3 Flore Mietton^{1,2,*}, Elena Ferri^{3,*}, Morgane Champleboux^{1,*}, Ninon Zala¹, Danièle Maubon⁴,
4 Yingsheng Zhou³, Mike Harbut⁵, Didier Spittler², Cécile Garnaud⁴, Marie Courçon¹, Murielle
5 Chauvel⁶, Christophe d'Enfert⁶, Boris A. Kashemirov³, Mitchell Hull⁵, Muriel Cornet⁴, Charles E.
6 McKenna^{3,**}, Jérôme Govin^{1,**}, Carlo Petosa^{2,**}

7
8 ¹ Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, Laboratoire Biologie à Grande Échelle,
9 Université de Grenoble Alpes, CEA, Inserm, 38054 Grenoble, France

10 ² Institut de Biologie Structurale (IBS), Université de Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble,
11 France

12 ³ Department of Chemistry, Dana and David Dornsife College of Letters, Arts and Sciences,
13 University of Southern California, University Park Campus, Los Angeles, CA 90089, United States

14 ⁴ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes,
15 Grenoble, France, Laboratoire TIMC-IMAG-TheREx, UMR 5525 CNRS, Université Grenoble Alpes,
16 Grenoble, France

17 ⁵ California Institute for Biomedical Research, 11119 N Torrey Pines Rd, La Jolla, CA, 92037, USA.

18 ⁶ Institut Pasteur, INRA, Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques, Paris, France.

19
20 *These authors contributed equally to this work.

21
22 **Correspondence and requests for materials should be addressed to C.E.McK (email:
23 mckenna@usc.edu), J.G. (email: jerome.govin@inserm.fr) or C.P. (email: carlo.petosa@ibs.fr).

24 ABSTRACT

25 Invasive fungal infections cause significant morbidity and mortality among immunocompromised
26 individuals, posing an urgent need for new antifungal therapeutic strategies. We investigated the BET
27 protein Bromodomain factor 1 (Bdf1) in *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. We show
28 that *BDF1* is essential in *C. albicans* and that mutations inactivating its two bromodomains result in a
29 loss of viability *in vitro* and decreased virulence *in vivo*. Chemical screening identified compounds
30 which inhibit *C. albicans* Bdf1 with high selectivity over human BET bromodomains. Crystal
31 structures reveal binding modes for these inhibitors that are sterically incompatible with the human
32 BET binding pockets. We report a dibenzothiazepinone compound which phenocopies the effects of a
33 Bdf1 bromodomain-inactivating mutation on *C. albicans* viability. These findings establish BET
34 inhibition as a promising antifungal therapeutic strategy and identify Bdf1 as an antifungal drug target
35 that can be selectively inhibited without antagonizing human BET function.

36

37 INTRODUCTION

38 Invasive fungal infections are a major global health concern, with ~2 million cases and >800,000
39 deaths estimated annually worldwide¹. *Candida* species such as *C. albicans* and *C. glabrata* are
40 among the most significant human fungal pathogens, with invasive candidiases yielding 30-40%
41 mortality^{2,3}. An increase in drug-resistant fungal strains and the limited repertoire of available drugs
42 has led to an urgent need for novel therapeutic agents^{1,4-6}. Promising results have emerged from the
43 study of chromatin-interacting proteins as antifungal targets, including histone acetyltransferases
44 (HATs) and deacetylases (HDACs)^{7,8}. HDAC inhibitors have weak antifungal activity when used
45 alone but synergize with antifungal drugs such as azoles and echinocandins^{8,9}. Deletion of either the
46 HDAC (*HST3*) or HAT (*RTT109*) regulating histone H3 Lys56 acetylation (H3K56ac) in *C. albicans*
47 increases susceptibility to genotoxic and antifungal agents¹⁰. In a study of the Mediator complex
48 subunit Med15, which interacts via its KIX domain with a transcription factor (Pdr1) implicated in
49 pleiotropic drug resistance in *C. glabrata*, drug-resistant strains were re-sensitized to antifungals by a
50 small-molecule inhibitor targeting the KIX domain-Pdr1 interface¹¹. These findings point to an
51 important role of chromatin-interacting proteins in fungal drug susceptibility.

52 Here, we investigated an epigenetic reader module, the bromodomain (BD) from the bromo- and
53 extra-terminal domain (BET) family, as a potential antifungal target in *C. albicans*. BET proteins are
54 chromatin-associated factors that regulate transcription and chromatin remodelling¹². Human BET
55 family members are Brd2, Brd3, Brd4 and Brdt (**Fig. 1a**). BET proteins bind chromatin through their
56 two BDs (BD1 and BD2), which specifically recognize histones acetylated on lysine residues.
57 Whereas canonical BDs bind mono-acetylated histone peptides, BET BDs possess a wider ligand
58 binding pocket allowing them to recognize diacetylated peptides^{13,14} (**Supplementary Fig. 1a**).
59 Small-molecule inhibitors such as JQ1 and I-BET which selectively target BET BDs have been used
60 to validate BET inhibition as a therapeutic strategy against cancer, cardiovascular disease,

61 inflammatory disorders and other medical conditions, with several inhibitors currently in clinical
62 trials^{12,15-21}.

63 The fungal BET protein Bdf1 has been characterized as a global transcriptional regulator in
64 *Saccharomyces cerevisiae*, where it regulates over 500 genes²². Bdf1 associates with acetylated
65 histones H3 and H4²²⁻²⁴ and with the general transcription factor TFIID²⁵, and is a subunit of the
66 SWR1 chromatin remodelling complex^{24,26,27}. Bdf1 is also important for chromatin compaction during
67 sporulation²⁸ and for the salt stress response²⁹. In addition to *BDF1*, *S. cerevisiae* possesses a second
68 BET gene, *BDF2*, which is partly functionally redundant with *BDF1*^{24,25,30,31}. Disruption of *BDF1*
69 causes severe morphological and growth defects, while deletion of both *BDF1* and *BDF2* is lethal^{22,23}.
70 Point mutations that abolish ligand binding by Bdf1 BD1 and BD2 cause growth and sporulation
71 defects²⁴ and affect the majority of transcripts altered by disruption of the entire gene²². Many
72 pathogenic fungal species (including *C. albicans*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus*
73 *neoformans* and *Pneumocystis jirovecii*) lack *BDF2*, suggesting that inhibition of the sole BET family
74 protein Bdf1 might significantly reduce viability and virulence³². Here we demonstrate that Bdf1 BD
75 functionality is essential in *C. albicans* and identify small-molecule inhibitors that target Bdf1 BDs
76 without inhibiting human BET proteins, establishing Bdf1 inhibition as a potential anti-fungal
77 therapeutic strategy.

78

79 RESULTS

80 *C. albicans* Bdf1 BDs bind multi-acetylated histone tails

81 The BDs from *C. albicans* Bdf1 (*CaBdf1*) share 31-46% sequence identity with human BET BDs
82 and 58-66% identity with those from *S. cerevisiae* Bdf1 (*ScBdf1*) and hence are likely to bind multi-
83 acetylated H3 and H4 tails (**Fig. 1b**). To verify this hypothesis, we purified recombinant *CaBdf1* BD1
84 and BD2 and assessed binding to a microarray of human histone tail peptides bearing diverse post-
85 translational modifications (PTMs). While H2A and H2B tail sequences differ considerably between
86 human and *C. albicans*, those of H3 and H4 are nearly perfectly conserved, justifying use of the array
87 (**Fig. 1c**). As expected, *CaBdf1* BDs showed weak binding to mono-acetylated peptides and stronger
88 binding to peptides bearing two or more acetylation marks (**Fig. 1d,e** and **Supplementary Data 1**).
89 Of the two BDs, BD1 exhibited more promiscuous binding, recognizing 14 distinct H3 and H4
90 acetylation patterns, versus only 7 for BD2. We replaced a conserved tyrosine residue in the binding
91 pocket of each BD by phenylalanine, a mutation known to compromise ligand binding in *ScBdf1*^{22,23}
92 (**Supplementary Fig. 1a,b**). These two "YF" mutations (Y248F and Y425F) abolished binding to all
93 acetylated peptides, confirming interaction specificity (**Fig. 1d,e**). For both BD1 and BD2 the
94 strongest binding was observed with an H4 peptide tetra-acetylated on lysines 5, 8, 12 and 16
95 (hereafter denoted H4ac4). A pull-down assay confirmed H4ac4 peptide recognition by both BDs,
96 which was abolished by the YF mutation (**Fig. 1f**). Interestingly, *CaBdf1* BD1 and BD2 bound tetra-
97 acetylated H4 peptides with comparable strength (**Fig. 1e**), in contrast with mammalian Brd2, Brd4

98 and Brdt, which bind tetra-acetylated H4 more tightly through BD1 than through BD2^{13,14},
99 highlighting a certain redundancy in the ligand-binding activity of the two *CaBdf1* BDs.

100

101 **Bdf1 BD functionality is essential in *C. albicans***

102 We next asked whether Bdf1 BD function is important for the viability of *C. albicans*. Although a
103 heterozygous *BDF1* deletion mutant generated in strain SC5314 exhibited no significant phenotype,
104 we were unable to obtain a homozygous *bdf1* Δ/Δ mutant, suggesting that *BDF1* is essential. To
105 confirm essentiality we placed the remaining allele of the *BDF1* gene in the heterozygous strain under
106 the control of a conditional promoter and evaluated survival under repressive conditions. We used
107 either a methionine-repressible promoter or a newly engineered tetracycline (Tet)-regulatable cassette
108 compatible with animal studies. Tet-dependent gene expression in *C. albicans* is usually achieved by
109 integrating a chimeric transactivator protein and a Tet-responsive promoter independently into the
110 genome^{33,34}. Here, we constructed a cassette allowing integration of all required components in a
111 single step. The cassette contains the transactivator (TetR-VP16), a selective marker (*ARG4*), and
112 seven tandem Tet operator elements, which we inserted upstream of the *BDF1* ORF to generate strain
113 $\Delta bdf1/pTetO-BDF1$ (**Fig. 2a**). Immunoblotting with a polyclonal antibody developed in this study to
114 allow specific *CaBdf1* detection (**Supplementary Fig. 1c,d**) confirmed that Bdf1 was expressed from
115 the *pTetO* promoter in the absence of doxycycline (Dox), albeit at a weaker level than from the
116 endogenous *BDF1* promoter, and was effectively repressed in the presence of Dox (**Fig. 2b**).
117 Strikingly, the growth of strain $\Delta bdf1/pTetO-BDF1$ mirrored these expression levels: compared to
118 WT, growth was reduced in the absence of Dox and abrogated in its presence (**Fig. 2c**). The
119 phenotype was rescued by re-introducing a functional copy of *BDF1* (strain *BDF1-R/pTetO-BDF1*),
120 confirming that *BDF1* is essential in *C. albicans*.

121 To verify the importance of BD function for fungal growth, we generated strains in which one or
122 both Bdf1 BDs were inactivated by domain deletion or by the YF point mutation while the other WT
123 allele is expressed from the Dox-repressible promoter. Strains in which both BDs were inactivated
124 grew as poorly as the conditional deletion mutant, whereas strains in which only BD1 or BD2 was
125 inactivated displayed milder growth defects, with BD2 inactivation yielding the more pronounced
126 defect (**Fig. 2d**). Additional assays evaluating stress resistance or cell wall integrity did not reveal any
127 significant phenotype. Growth rates in liquid media recapitulated the phenotypes observed in the
128 colony formation assay (**Fig. 2e**). Analogous results were obtained when *BDF1* expression was
129 repressed using the methionine-regulatable promoter (**Supplementary Fig. 2**). Thus, *C. albicans*
130 viability *in vitro* requires the presence of at least one functional BD within Bdf1.

131

132 **Bdf1 BDs are required for virulence in a mouse model**

133 Using our Tet-OFF system for Dox-repressible Bdf1 expression, we verified the role of Bdf1 in a
134 murine model of invasive candidiasis. Initially, mice were injected with either WT *C. albicans*, the
135 conditional *BDF1* deletion strain (*bdf1* $\Delta/pTetO-BDF1$) or the rescue strain (*BDF1-R/pTetO-BDF1*).

136 Mice injected with the WT or rescue strains exhibited a high fungal load (>110,000 CFU/g) in the
137 kidney 7 days post-infection (**Fig. 2f**). The fungal load observed with strain *bdf1Δ/pTetO-BDF1* was
138 reduced by 30-fold (~3500 CFU/g) in the absence of Dox and was abolished in its presence, mirroring
139 the growth phenotypes observed *in vitro* (**Fig. 2c**). Subsequently, we evaluated the virulence of strains
140 in which both Bdf1 BDs were deleted or inactivated by the YF point mutations (**Fig. 2g**). These
141 strains exhibited markedly reduced fungal loads (by approximately 8800- and 1600-fold,
142 respectively), consistent with the *in vitro* growth rates associated with these mutations (**Fig. 2d, e** and
143 **Supplementary Fig. 2**). Hence, Bdf1 BD functionality appears critical for the virulence of *C.*
144 *albicans in vivo*.

145

146 **CaBdf1 BDs are resistant to human BET inhibitors**

147 For Bdf1 inhibition to be a feasible anti-fungal therapeutic strategy, small-molecule inhibitors need
148 to discriminate fungal from human BET BDs. To probe the similarity between the ligand binding
149 pockets of *C. albicans* and human BET BDs, we asked whether human BET inhibitors (BETi) could
150 inhibit *CaBdf1* BDs. We used a homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay to evaluate
151 the ability of four chemically diverse BETi compounds (JQ1, PFI-1, IBET-151 and bromosporine) to
152 inhibit BD binding to an H4ac4 peptide (**Supplementary Fig. 3a**). The four compounds inhibited
153 human Brd4 BD1 and BD2 with IC₅₀ values in the low nM range (3-95 nM), consistent with previous
154 reports^{16,35,36}. In contrast, the *CaBdf1* BDs were relatively insensitive to these inhibitors, with IC₅₀
155 values between 0.3 and >10 μM, or approximately a 2- to 3-fold log-reduction in sensitivity
156 (**Supplementary Fig. 3b**). These results were confirmed for JQ1 by isothermal titration calorimetry
157 (ITC): whereas JQ1 bound Brd4 BD1 tightly (K_d of 62 nM), no binding was detected for *CaBdf1*
158 BD1 or BD2 (**Supplementary Fig. 3c** and **Supplementary Table 1**). None of the BETi compounds
159 significantly inhibited growth of *C. albicans in vitro* at 10 μM concentration (**Supplementary Fig.**
160 **3d**). This finding is consistent with the poor IC₅₀ values observed for JQ1 and PFI-1 towards *CaBdf1*
161 BDs; it also indicates that IBET-151 and bromosporine, which display (sub)micromolar IC₅₀ values,
162 have poor cellular potency, possibly due to mechanisms known to reduce drug potency in *C. albicans*,
163 including cell wall and plasma membrane permeability barriers^{37,38} and the activity of efflux pumps
164 leading to rapid drug extrusion^{39,40}. In summary, *CaBdf1* and human BET BDs have distinct BETi
165 binding activity, supporting the feasibility of targeting *CaBdf1* BDs with highly selective small-
166 molecule inhibitors.

167

168 **BETi resistance by CaBdf1 is due to smaller pocket residues**

169 To identify features differentiating the ligand binding pockets of human and fungal BET BDs,
170 we determined crystal structures for *CaBdf1* BD1 and BD2 (**Supplementary Table 2**). These
171 structures exhibit the canonical BD fold (comprising helices Z, A, B and C, with the ZA and BC loops
172 defining the ligand binding pocket; **Supplementary Fig. 4a**) and closely resemble those of their
173 human BET counterparts (mean pairwise RMSDs ≤1.5 Å; **Supplementary Table 3**). The ligand

174 binding loops are structurally well conserved, including nearly all water molecules implicated in
175 ligand recognition (**Supplementary Fig. 5**), although the overall binding surfaces are less negatively
176 charged in *CaBdf1* (**Supplementary Fig. 4b**). Superimposing the *CaBdf1* BD structures onto that of
177 JQ1-bound Brd4 BD1 reveals no major steric clashes between JQ1 and the fungal BDs. However,
178 whereas JQ1 fits snugly into the Brd4 binding pocket, the fit with the *CaBdf1* binding pockets is poor.
179 In Brd4 the fused ring system of JQ1 is sandwiched between the "WPF" shelf (Trp81, Pro82 and
180 Phe83) and Leu residues 92 and 94, with the thiophene ring positioned within the "ZA channel"
181 defined by Trp81 and Leu92 (ref.⁴¹). Replacement of Trp81 by a Val or Phe residue in *CaBdf1* BD1
182 and BD2, respectively, widens the ZA channel, resulting in a poorer fit (black diamonds in
183 **Supplementary Fig. 4c**). Replacement of Brd4 residue Leu94 by a Val or Ile residue further
184 contributes to the poor fit. In addition, the *p*-chlorophenyl group of JQ1 occupies a groove in Brd4
185 which is absent (BD1) or shallower (BD2) in *CaBdf1* (asterisks in **Supplementary Fig. 4c**). A similar
186 lack of complementarity between the ligand and binding pocket explains the insensitivity of *CaBdf1*
187 BDs towards PFI-1, IBET-151 and bromosporine.

188 More generally, recognition of the four BETi compounds by human BET BDs involves 16
189 residues, including the 8 signature residues previously used to classify human BD binding sites⁴²
190 (**Supplementary Fig. 6**). Five of these residues in BD1 and four in BD2 are invariant across human
191 BET proteins but diverge in *CaBdf1* (magenta arrows in **Supplementary Fig. 6**), including the WPF-
192 shelf Trp residue and the Leu residue opposite this shelf, at signature positions 1 and 3, respectively.
193 Remarkably, nearly all of these residues have shorter side chains in *CaBdf1* than in the human BET
194 proteins, implying that selective *CaBdf1* inhibition could conceivably be achieved via small
195 molecules that clash sterically with the human, but not fungal, side chains. Interestingly, other
196 pathogenic fungal *Bdf1* sequences also diverge from human BET proteins at these residue positions,
197 suggesting that selective chemical inhibition might also be feasible for these targets.

198

199 ***CaBdf1* BDs can be selectively targeted by small molecules**

200 We next set out to identify small molecule inhibitors that would target *C. albicans* *Bdf1* BDs
201 without inhibiting human BET BDs. We used our HTRF inhibition assay to screen a library of
202 ~80,000 chemically diverse compounds, resulting in several hundred hits for each BD (**Fig. 3a**).
203 Dose-response curves measured for *CaBdf1* and Brd4 BDs identified 125 and 44 compounds
204 selective for the fungal BD1 and BD2, respectively. In particular, several compounds possessing a
205 dibenzothiazepinone scaffold exhibited low-micromolar IC₅₀ values towards *CaBdf1* BD1 and no or
206 only weak inhibition of Brd4 BD1 at the highest concentration (20 μM) tested. One such inhibitor was
207 compound **1** (**Fig. 3b**). ITC measurements showed that **1** binds *CaBdf1* BD1 with a K_d of 5 μM,
208 consistent with the IC₅₀ value (4.3 μM) determined by HTRF, whereas no or only modest binding and
209 inhibition were detected for Brd4 BD1 and *CaBdf1* BD2 (**Fig. 3c,d** and **Supplementary Table 1**).
210 Furthermore, a BROMOscan screen from DiscoverX revealed that compound **1** showed no significant
211 activity against 32 representative human (BET and non-BET) BDs (**Supplementary Fig. 7**); indeed,

212 an ITC experiment confirmed that the two human BDs (SMARCA2 and SMARCA4) with the
213 strongest BROMOscan response did not detectably bind compound **1** (**Supplementary Fig. 8a**).
214 Compound **1** also exhibited low cytotoxicity towards HeLa and IMR90 (a primary fibroblast) cells
215 ($LC_{50} \geq 100 \mu\text{M}$) as measured in an MTT colorimetric assay (**Supplementary Fig. 9**).

216 To understand the molecular basis of selectivity we solved the crystal structure of *CaBdf1* BD1
217 bound to **1**. Compound **1** mimics the acetyllysine ligand by interacting with the conserved Tyr248 and
218 Asn291 residues, forming direct and water-mediated hydrogen bonds via the thiazepinone carbonyl
219 group (**Fig. 3e-g**). The dibenzothiazepinone ring system engages hydrophobic residues from the VPF
220 shelf (Pro233), helix B (Phe290) and the ZZ' loop (Val238, Leu243 and Val245), while the
221 cyclopropyl group interacts with the VPF shelf (Pro233 and Phe234), helix B (Cys287) and the
222 gatekeeper residue on helix C (Ile297). In contrast, the oxadiazole and pyrazine groups point away
223 from the pocket, adopting different orientations in the four complexes present in the crystal's
224 asymmetric unit (**Supplementary Fig. 10**). Superimposing the ligand-bound structure with that of
225 Brd4 BD1 results in a steric overlap between the larger Brd4 side chains at signature positions 1 and 3
226 (Trp81 and Leu94) and the oxadiazole and distal benzene groups of compound **1**, explaining why **1**
227 fails to inhibit the human BD (**Fig. 3f,h**). Steric hindrance from the corresponding residues in *CaBdf1*
228 BD2 (Phe409 and Ile422) also account for this domain's insensitivity to compound **1**.

229 Similarly, we identified an imidazopyridine compound, **2** (**Supplementary Fig. 11a**), which
230 inhibits *CaBdf1* BD2 with high selectivity: HTRF and ITC assays yielded IC_{50} and K_d values of 1.1
231 and 2.1 μM , respectively, whereas human Brd4 BD2 and *CaBdf1* BD1 were only weakly inhibited
232 ($IC_{50} \geq 40 \mu\text{M}$) (**Supplementary Fig. 11b,c** and **Supplementary Table 1**). Moreover, no significant
233 inhibition of any human BDs was observed for compound **2** by BROMOscan profiling and by an ITC
234 assay on the two most sensitive BDs identified by this screen (SMARCA2 and SMARCA4;
235 **Supplementary Fig. 7 and 8b**); and only mild cytotoxicity ($LC_{50} \sim 60 \mu\text{M}$) was observed towards
236 mammalian cells (**Supplementary Fig. 9**). The crystal structure of *CaBdf1* BD2 bound to **2** reveals
237 that the compound forms a hydrogen bond via its amino group with the conserved Asn468 residue, as
238 well as a cation- π interaction involving the phenolic ring and the partial positive charge on Asn468
239 (**Supplementary Fig. 11d-f**). However, unlike most BET inhibitors, a water-mediated hydrogen bond
240 with Tyr425 is not observed for **2** (presumably because the ligand dislodges water molecule 1,
241 consistent with the dislodgement of this water by a glycerol molecule in the unbound BD structure;
242 **Supplementary Fig. 5d**). Instead, the compound's imidazolyl and hydroxyl groups form water-
243 mediated hydrogen bonds with backbone atoms of the FPF shelf (Pro410) and helix B (Val460).
244 Replacement of the hydroxyl group in **2** by a hydrogen (**2a**) or fluorine (**2b**) atom severely reduces
245 inhibitory activity, underscoring the importance of this group for high-affinity binding
246 (**Supplementary Fig. 12**). The methylpyridinyl and phenolic groups are sandwiched between the FPF
247 shelf and gatekeeper residue Val474 on one side, and residues Val415 and Leu420 on the other, while
248 the tolyl group additionally contacts residues Ile422 and Phe467 (**Supplementary Fig. 11d-f**). A
249 structural alignment with Brd4 BD2 shows that larger Brd4 side chains at four of these contact

250 positions, including signature positions 1, 3 and 5 (Trp374, Leu387, His437) and residue Tyr432
251 (**Supplementary Fig. 11e,g**), reduces the volume available for compound **2**, explaining the inability
252 of **2** to inhibit the human BD. In contrast, the poor affinity for *CaBdf1* BD1 is due to smaller side
253 chains at signature positions 1 and 3 (Val232 and Val245), resulting in poor complementarity between
254 the binding pocket and ligand. The above results establish proof-of-principle that *CaBdf1* BDs can be
255 selectively targeted by small-molecule inhibitors *in vitro* without compromising the function of
256 human BD-containing proteins.

257

258 **A Bdf1 BD1 inhibitor phenocopies genetic inactivation of BD1**

259 We next assessed the antifungal activity of compounds identified in our screen by evaluating
260 their effect on *C. albicans* growth in liquid media. Not surprisingly, none of the compounds
261 significantly inhibited growth of the WT strain, consistent with the fact that inactivating a single
262 *CaBdf1* BD only weakly affects growth (**Fig. 2d,e**) and that none of the compounds tested can
263 individually inhibit both *CaBdf1* BDs. Attempts to simultaneously inhibit both BDs by testing binary
264 combinations of compounds also did not result in significant growth inhibition. We therefore tested
265 individual compounds on mutant strains in which either BD1 or BD2 was inactivated. Most inhibitors,
266 including compounds **1** and **2**, showed little antifungal activity against these strains, presumably
267 because they failed to enter the fungal cell or were metabolized or eliminated before a significant
268 growth defect was detected. The most active compound was dibenzothiazepinone **3**, an analog of **1** in
269 which the cyclopropyl, oxadiazole and pyrazine groups are replaced by smaller methyl,
270 carboxyamidyl and tetrahydrofuran groups, respectively (**Fig. 4a**). HTRF and ITC assays showed that
271 **3** inhibits *CaBdf1* BD1 with low micromolar affinity and 3- to 5-fold selectivity relative to human
272 Brd4 BD1 (**Fig. 4b,c** and **Supplementary Table 1**). The crystal structure of *CaBdf1* BD1 bound to **3**
273 shows that the compound is slightly rotated within the binding pocket compared to **1** (**Fig. 4d**).
274 Consequently, in a structural alignment with Brd4 BD1, the steric hindrance observed for **1** due to the
275 larger Trp81 and Leu94 side chains is largely relieved for compound **3**, explaining the reduced
276 selectivity of this compound. (Both enantiomers of **3** are equally active, consistent with the lack of
277 interaction between the BD and the tetrahydrofuran ring; **Supplementary Fig. 13**). Liquid culture
278 assays show that **3** has little effect on the growth of *C. albicans* strains expressing either WT Bdf1 or
279 Bdf1 inactivated in BD1, but significantly inhibited the growth of strains inactivated in BD2 (**Fig. 4e**),
280 consistent with the specificity of compound **3** for BD1. A dose-response curve revealed a cellular
281 EC₅₀ value of 35 ± 7 μM, corresponding to a 20-fold cell shift relative to the IC₅₀ value determined by
282 HTRF *in vitro* (or 7-fold relative to the K_d by ITC) (**Fig. 4f**). At this concentration compound **3**
283 showed relatively little cytotoxicity towards mammalian cells (LC₅₀ >100 μM) (**Supplementary Fig.**
284 **9**). Taken together, these results demonstrate the feasibility of using a small-molecule inhibitor to
285 antagonize *CaBdf1* function in the fungal cell.

286

287 **DISCUSSION**

288 We have shown that *C. albicans* *BDF1* deletion is lethal and that mutations abolishing BD-
289 mediated ligand-binding activity severely compromise growth (**Fig. 2c-e**), validating BET BD
290 inhibition as a potential antifungal strategy in *C. albicans*. Whereas the combined inactivation of both
291 *CaBdf1* BDs is lethal, that of a single BD leads to only a partial reduction in growth (**Fig. 2d,e** and
292 **Fig. 4e**). This likely reflects functional redundancy between the two BDs, consistent with their similar
293 binding profiles towards acetylated H4 tails (**Fig. 1d,e**). Growth inhibition appears slightly more
294 pronounced upon BD2 inactivation compared to that of BD1 (**Fig. 2d,e**). This contrasts with the
295 finding that the selective inhibition of human BET BD2 in liver cancer cells induced only minor
296 effects on transcriptional regulation⁴³ and that BD1 plays a more important role than BD2 in Brd-
297 mediated chromatin remodelling⁴⁴, in recruiting Brd3 to acetylated sites on GATA1⁴⁵, and in
298 chromatin binding by Brd4⁴⁶. This discrepancy may partly reflect differences between human and *C.*
299 *albicans* BET BD selectivity towards acetylated histone peptides, as well as different histone
300 acetylation patterns in these species.

301 Because *C. albicans* strains inactivated in only one *Bdf1* BD remain viable, a chemotherapeutic
302 strategy targeting *CaBdf1* would likely require the inhibition of both BDs to be effective. Such
303 inhibition could be achieved via a single compound which targets both BDs or through the combined
304 use of two compounds, supplied independently or covalently linked as a bivalent BD inhibitor.
305 Indeed, dual-warhead BET inhibitors that simultaneously engage both BDs within a single BET
306 protein have recently been described which possess greatly enhanced biochemical and cellular
307 potency as well as increased efficacy in animal disease models relative to monovalent inhibitors while
308 maintaining acceptable pharmacokinetic profiles⁴⁷⁻⁴⁹. Alternatively, one could envisage a Proteolysis
309 Targeting Chimera (PROTAC) approach, whereby a single-BD inhibitor conjugated to a ligand for an
310 E3 ubiquitin ligase would trigger the degradation of *CaBdf1*, as recently demonstrated for human
311 BET proteins⁵⁰⁻⁵³.

312 Compounds **1** and **2** target *CaBdf1* BD1 and BD2, respectively, with low micromolar affinity,
313 yet do not significantly inhibit human BET or non-BET BDs, demonstrating that small-molecule
314 inhibition of *CaBdf1* BDs can be achieved with high selectivity. The selectivity of **1** and **2** for *CaBdf1*
315 results from steric incompatibility with bulkier side chains in the human BET BD binding pockets,
316 particularly at signature positions 1 and 3. Remarkably, all 169 *CaBdf1*-selective hits identified in our
317 screen target either *CaBdf1* BD1 or BD2, but not both, in contrast with many BETi compounds which
318 inhibit both BD1 and BD2 in human BET proteins. A likely explanation is that, whereas residues at
319 signature positions 1 and 3 are conserved between human BET BD1 and BD2, they diverge between
320 *CaBdf1* BD1 and BD2, facilitating the identification of *CaBdf1* inhibitors with single-BD selectivity
321 (**Supplementary Fig. 14**). Nevertheless, an inhibitor that targets both *CaBdf1* BDs without inhibiting
322 human BET BDs is in principle achievable, because the WPF-shelf Trp residue at signature position 3
323 in human BET BDs is bulkier than the corresponding (Val and Phe) residues in both *CaBdf1* BD1 and
324 BD2. For example, medicinal chemistry optimization of compound **2** could conceivably yield an

325 analog that would inhibit both *CaBdf1* BD1 and BD2 without losing selectivity against human BET
326 BDs.

327 Our chemical screen identified a dibenzothiazepinone compound, **3**, that selectively inhibited
328 *CaBdf1* BD1 and displayed antifungal activity against susceptible strains. Although we were unable
329 to obtain biochemical evidence for a direct interaction between **3** and Bdf1 in *C. albicans* cells, the
330 different susceptibility of Bdf1 mutant strains provides compelling evidence that Bdf1 BD1 is the
331 intracellular target (**Fig. 4e,f**). Specifically, strains expressing Bdf1 mutants in which BD1 was the
332 lone functional BD (mutants *bdf1-bd2Δ* and *bdf1-Y245F*) were sensitive to **3**, consistent with this
333 compound's selectivity for *CaBdf1* BD1, whereas all other strains with a functional BD2 were
334 insensitive, arguing strongly against a potential off-target effect. Strikingly, compound **1** did not
335 significantly inhibit growth, despite being an analog of **3** with nearly identical binding affinity for
336 *CaBdf1* BD1. This makes the dibenzothiazepinone an attractive scaffold for structure-activity
337 relationship studies, as these may reveal the molecular determinants of a compound's ability to reach
338 its intracellular target and thereby lead to analogs with improved cellular potency.

339 In conclusion, Bdf1 BDs are required for the viability and virulence of *C. albicans* and can be
340 selectively targeted by small molecule inhibitors without compromising human BET BD function.
341 These findings pave the way for the development of BET inhibitors as a novel class of antifungal
342 therapeutics.

343

344 **METHODS**

345 **Chemicals**

346 BET inhibitors PFI-1, IBET-151 and bromosporine were purchased from Sigma while JQ1 was from
347 Clinisciences (Nanterre, France). Compound **1** was purchased from ChemDiv as powder and
348 dissolved in DMSO without further purification. Compounds **2** and **3** (the latter as the racemate),
349 initially purchased from ChemDiv, were resynthesized in house where the individual enantiomers of **3**
350 were also prepared (Supplementary Methods) and used for all *in vitro* and cell-based assays.
351 Derivatives **2a** and **2b** were synthesized in house for this study (Supplementary Methods).

352

353 **Protein expression and purification**

354 *Proteins used for crystallization and for ITC.* DNA fragments encoding *CaBdf1* BD1 (residues 193-
355 327) or BD2 (residues 386-491) and human Brd4 BD1 (residues 22-204) were PCR amplified from
356 genomic or cDNA libraries and cloned into a pETM11 vector as fusion constructs bearing an N-
357 terminal His tag followed by a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site. Transformed *E. coli*
358 strain BL21(DE3) cells were grown in LB medium containing kanamycin (50 µg/mL) at 37°C until
359 reaching an OD₆₀₀ of 1, induced with 0.5 mM IPTG and further incubated at 16°C for 12-20 h before
360 harvesting. Cells were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10%
361 glycerol, 25 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoethanol and protease inhibitors) and lysed by
362 sonication. The cleared lysate was incubated with NiNTA resin (Qiagen) and washed with buffer A

363 containing 0.5 M NaCl. Proteins were eluted with 250 mM imidazole, dialysed overnight in the
364 presence of His-tagged TEV protease against buffer A containing no imidazole, and incubated with
365 Ni-NTA resin to remove His-tagged species. Proteins were further purified on a Superdex 75 10/300
366 (GE Healthcare) column in 50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT. Proteins were
367 concentrated to >20 mg/ml on a Centricon device (Millipore) and used for ITC, TSA and
368 crystallization experiments. Human SMARCA2 and SMARCA4 bromodomain plasmids bearing an
369 N-terminal His tag and TEV protease site were purchased from Addgene (plasmid no. 73250 and
370 74664, respectively). Expression and purification was performed as above, except that buffer A was
371 replaced by buffer B (50 mM Hepes pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole and
372 protease inhibitors) and gel filtration was performed in 10 mM Hepes pH 7.5, 500 mM NaCl and 5%
373 glycerol.

374

375 *Proteins used for HTRF assays.* GST-tagged human Brd4 BD2 (residues 349-460) was purchased
376 from Reaction Biology Corp. Human Brd4 BD1 (residues 22-204) and CaBdf1 BD1 (residues 193-
377 327) and BD2 (residues 361-501) were cloned into a pGEX4t1 vector as GST-tagged fusion proteins.
378 Expression in *E. coli* strain BL21(DE3) cells was performed as for His-tagged constructs. Harvested
379 cells resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and protease inhibitors were lysed by
380 sonication. The clarified lysate was incubated with glutathione sepharose (GE Healthcare) and then
381 washed with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl and 1% NP-40. Proteins were eluted with 10
382 mM glutathione and further purified on a Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) column in 50 mM
383 Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT.

384

385 **Pull-down and peptide array assays**

386 Biotinylated peptides corresponding to non-acetylated (H4ac0) and tetra-acetylated
387 (H4K5acK8acK12acK16ac) histone H4 tails were synthesized by Covalab (Villeurbanne, France) and
388 immobilized on Streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin C1; Thermo
389 Fisher) according to the manufacturer's instructions. Beads were incubated with 1.25 µg of GST-
390 tagged CaBdf1 BD1 or BD2 in binding buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40,
391 10% glycerol 10%, 1 mM DTT) in a volume of 250 µL for 2 h at 4°C and subsequently washed in
392 binding buffer containing 500 mM NaCl. Bound proteins were eluted by boiling in SDS-PAGE
393 sample loading buffer and analyzed by Western blot using an anti-GST antibody (GE Healthcare).

394 Histone peptide arrays were obtained from Active Motif and used in accordance with the supplier's
395 recommendations. In short, arrays were blocked and incubated with 1 µM of purified CaBdf1 BD1 or
396 BD2. Arrays were incubated with recombinant bromodomains for 2 h at 4 °C in binding buffer (Tris-
397 HCl 50 mM pH 7.4, NP-40 0.1%, NaCl 150 mM, glycerol 10%). They were then washed in the same
398 buffer and binding detected by a standard western blot procedure using an anti-GST antibody
399 (Dutscher, ref. 27-4577-01). An antibody directed against a spotted c-myc peptide was used as a
400 positive control and its signal intensity was used for normalization. Assays were performed in

401 duplicate. Images were acquired on a Bio-Rad ChemiDoc XRS Imaging machine and data were
402 quantified using the array analyzer software provided by Active Motif. The results of the
403 quantification are summarized in **Supplementary File 1**.

404

405 **Isothermal Titration Calorimetry (ITC)**

406 Calorimetric experiments were performed on a NanoITC calorimeter (TA Instruments) at 25°C while
407 stirring at 250 rpm. All proteins were buffer exchanged by gel filtration into 50 mM Hepes pH 7.5,
408 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT, except for SMARCA2 and SMARCA4A bromodomains, which were
409 exchanged into 10 mM Hepes pH 7.5, 500 mM NaCl and 5% glycerol. Typically, 10-100 µM
410 compound and 60-900 µM protein were placed in the cell and syringe, respectively. Titrations
411 consisted of an initial injection of 1.5 µl followed by 19 identical injections of 2.5 µl made at time
412 intervals of 5 min. ITC data were corrected for the heat of dilution of injectant into buffer and
413 analysed with software provided by the manufacturer using a single binding site model. The first data
414 point was excluded from the analysis. Thermodynamic parameters determined from the ITC data are
415 summarized in **Supplementary Table 1**.

416

417 **Homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay**

418 Biotinylated and non-biotinylated tetra-acetylated H4 peptides (H4K5acK8acK12acK16ac; denoted
419 H4ac4) were synthesized by Covalab (Villeurbanne, France). HTRF reagents and buffers were
420 purchased from Cisbio Bioassays and the assay performed according to the manufacturer's
421 instructions. The assay used a Terbium (III) cryptate donor reagent conjugated to an anti-GST
422 antibody (MAb anti-GST-Tb), a streptavidin-conjugated acceptor reagent (Streptavidin-d2) and
423 Cisbio proprietary buffers (EPIgeneous Binding Domain Diluent and Detection buffers). Incubation
424 with GST-tagged BDs and biotinylated H4ac4 brings the donor and acceptor into close proximity and
425 allows FRET. The non-biotinylated H4ac4 peptide competes for binding and was used as a positive
426 control for inhibition. GST-tagged proteins in 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT
427 were assayed at 5 nM final concentration. Biotinylated H4ac4 peptides were used at a final
428 concentration of 50, 600, 300 or 400 nM in assays involving Brd4 BD1, Brd4 BD2, *CaBdf1* BD1 and
429 *CaBdf1* BD2, respectively. The antibody-conjugated donor was used at 0.5 nM and the streptavidin-
430 conjugated acceptor was used at 1/8 of the H4ac4 peptide concentration. Inhibitors were tested by
431 performing a 9-point dilution series with a maximal final concentration of 10 µM (JQ1, IBET-151,
432 PFI-1, bromosporine), 20 µM (**1**, **3**) or 40 µM (**2**). These concentrations allowed the DMSO
433 concentration to remain below the limit (1% for *CaBdf1* BD1 and Brd4 BD1, and 0.4% for *CaBdf1*
434 BD2 and Brd4 BD2) that allowed the assay to maintain a Z' factor⁵⁴ ≥ 0.8 . Components were
435 incubated at room temperature for 1 h (*CaBdf1* BD1 and Brd4 BD1) or at 4°C for 6-24 h (*CaBdf1*
436 BD2 and Brd4 BD2). Experiments were performed in 384-well white plates (Greiner 781080) in a
437 volume of 20 µL and analyzed in a ClarioStar plate reader (BMG LABTECH). Excitation was at 330
438 nm and emission intensities were measured at 620 nm and 665 nm (corresponding to the donor and

439 acceptor emission peaks, respectively; the 665/620 ratio is used to calculate the specific HTRF signal)
440 with an integration delay of 60 μ s and an integration time of 400 μ s.

441

442 **High-throughput chemical screening**

443 The HTRF assay described above was miniaturized for performance in a 5 μ L reaction volume in
444 1536-well black plates. Approximately 80,000 compounds from the ChemDiv and LifeChem
445 Diversity collections were dispensed into wells by an Echo acoustic liquid dispenser. A master mix
446 comprising MAb anti-GST-Tb donor, streptavidin-d2 acceptor, GST-tagged BD protein, biotinylated
447 H4ac4 peptide was then added and the plates incubated for 6-24 h prior to reading. The primary
448 screen was performed with compounds at a final concentration of 20 μ M (*CaBdf1* BD1) or 8 μ M
449 (*CaBdf1* BD2), corresponding to a final DMSO concentration of 1% and 0.4%, respectively. Hits
450 were initially confirmed by repeating the assay at a single concentration in triplicate, and
451 subsequently by dose-response curves constructed using 8-point dilutions between 0 and 20 (or 8)
452 μ M.

453

454 **BROMOscan profiling**

455 BROMOscan profiling was performed by DiscoverX. T7 phage strains displaying bromodomains
456 were grown in parallel 24-well blocks in an *E. coli* host derived from the BL21 strain as described⁵⁵.
457 *E. coli* were grown to log-phase and infected with T7 phage from a frozen stock (multiplicity of
458 infection = 0.4) and incubated with shaking at 32°C until lysis (90-150 minutes). The lysates were
459 centrifuged (5,000 g) and filtered (0.2 μ m) to remove cell debris. Streptavidin-coated magnetic beads
460 were treated with biotinylated small molecule or acetylated peptide ligands for 30 minutes at room
461 temperature to generate affinity resins for bromodomain assays. Ligand loading densities were
462 optimized as described⁵⁶. The liganded beads were blocked with excess biotin and washed with
463 blocking buffer (SeaBlock (Pierce), 1 % BSA, 0.05 % Tween 20, 1 mM DTT) to remove unbound
464 ligand and to reduce non-specific phage binding. Binding reactions were assembled by combining
465 bromodomains, liganded affinity beads, and test compounds in 1x binding buffer (16 % SeaBlock,
466 0.32x PBS, 0.02%BSA, 0.04 % Tween 20, 7.9 mM DTT). Test compounds were prepared as 1000X
467 stocks in 100% DMSO and subsequently diluted 1:25 in monoethylene glycol (MEG). The
468 compounds were then diluted directly into the assays such that the final concentrations of DMSO and
469 MEG were 0.1% and 2.4%, respectively. All reactions were performed in polypropylene 384-well
470 plates in a final volume of 20 μ l. The assay plates were incubated at room temperature with shaking
471 for 1 hour and the affinity beads were washed with wash buffer (1x PBS, 0.05% Tween 20). The
472 beads were then re-suspended in elution buffer (1x PBS, 0.05% Tween 20, 2 μ M non-biotinylated
473 affinity ligand) and incubated at room temperature with shaking for 30 minutes. The bromodomain
474 concentration in the eluates was determined by qPCR. Compounds **1** and **2** were screened at 10 μ M
475 concentration in duplicate. DMSO was used as a negative control and a small-molecule or peptide
476 ligand specific for each BD in the screen was used as a positive control. Results are reported as

477 Percent Control, where lower values indicate stronger inhibition. Percent control was calculated as
478 $100 \cdot (t - p) / (n - p)$, where t is the test compound signal and p and n are the positive and negative
479 control signals, respectively.

480

481 **Crystallization and crystal structure determination**

482 Initial crystallization conditions were identified by the sitting drop vapour diffusion method at 4
483 °C using a Cartesian PixSys 4200 crystallization robot at the High Throughput Crystallization
484 Laboratory of the EMBL Grenoble Outstation (<https://htxlab.embl.fr>). Crystals used for data
485 collection were obtained by the hanging drop method at 4 °C by mixing 1 µL of the protein or
486 protein/inhibitor sample with 1 µL of the reservoir solution, as follows. Unbound *CaBdf1* BD1 (40
487 mg/mL) was mixed with 0.2 M ammonium iodide (pH 6.5) and 26% (w/v) PEG 3350. Unbound
488 *CaBdf1* BD2 (40 mg/mL) was mixed with 0.1 M TRIS-HCl (pH 8.5) and 1 M ammonium phosphate.
489 *CaBdf1* BD1 bound to compound **1** was crystallized by mixing a solution of 20 mg/mL protein and
490 0.4 mM inhibitor with 0.1 M TRIS-HCl (pH 8.5), 23% (w/v) PEG MME 2000 and 10 mM NiCl₂.
491 *CaBdf1* BD1 bound to compound **3** was crystallized by mixing a solution of 25 mg/mL protein and
492 1.5 mM inhibitor with 0.1 M sodium acetate (pH 4.6) and 2.4 M ammonium sulfate. *CaBdf1* BD2
493 bound to compound **2** was crystallized by mixing a solution of 22 mg/mL protein and 1.5 mM
494 inhibitor with 0.1 M sodium acetate (pH 4.6) and 25% (w/v) PEG 3000. Crystals were flash-cooled in
495 liquid nitrogen after being transferred into the well solution supplemented with the following cryo-
496 protectants: unbound *CaBdf1* BD1, unbound *CaBdf1* BD2, and *CaBdf1* BD1 bound to **1**, 30% (v/v)
497 glycerol; *CaBdf1* BD1 bound to **3(S)**, 3.2 M ammonium sulfate; *CaBdf1* BD2 bound to **2**, 25% (v/v)
498 glycerol.

499 Diffraction data were collected at beamlines of the ESRF, as indicated in **Supplementary Table**
500 **2**. Data collected on MarMOSAIC (ID23-2), Pilatus 6M (ID29) and Pilatus3 2M (ID30A-1) detectors
501 were processed using XDS⁵⁷ and programs of the CCP4 suite⁵⁸. Structures were solved by molecular
502 replacement using Phaser⁵⁹. Structures 2OSS and 2OUO (human Brd4 BD1 and BD2, respectively)
503 were used as search models to solve the structures of *CaBdf1* BD1 and BD2, respectively. Initial
504 solutions were improved by automated protein chain tracing with ARP/WARP⁶⁰, followed by further
505 manual building using Coot⁶¹. Inhibitor coordinates and .cif restraints files were generated using the
506 Cactus online SMILES translator (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>) and JLigand⁶², respectively.
507 Structures were refined with Phenix⁶³ and validated using MolProbity⁶⁴ and the built-in tools in Coot.
508 Data collection and refinement statistics are summarized in **Supplementary Table 2**.

509

510 **Cytotoxicity assays on human cells**

511 Proliferation of human cells was assessed using an MTT colorimetric assay (Cell Proliferation Kit I,
512 Roche). HeLa (epithelial cells, ATCC number CCL-2) and IMR90 (primary fibroblasts cells, ATCC
513 number CCL-186) cells were cultured in humidified atmosphere (37°C and 5% CO₂) in DMEM
514 medium containing 10% heat inactivated fetal calf serum and 2 mM glutamine. Cells were seeded at a

515 concentration of 5000 HeLa cells/well or 15000 IMR90 cells/well in 100 μ l culture medium
516 containing the test compound (compounds **1**, **2**, **3**, amphotericin B or fluconazole) into 96 wells
517 microplates (Falcon ref. 353072). Plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 28 h before adding
518 10 μ l of MTT labeling reagent (final concentration 0.5 mg/ml) to each well. After incubating for a
519 further 4 hours, 100 μ l of the Solubilization solution were added in each well. Plates were allowed to
520 stand overnight in the incubator before measuring the spectrophotometrical absorbance at 570 nm and
521 at the reference wavelength of 690 nm in a ClarioStar plate reader. The values of $A_{570\text{ nm}}-A_{690\text{ nm}}$ were
522 normalized relative to that obtained with vehicle (0.2% DMSO) and plotted against compound
523 concentration.

524

525 **Generation of *C. albicans* mutant strains**

526 Plasmids used in this study to incorporate different mutations into the *BDF1* gene are listed in
527 **Supplementary Table 4**. All DNA fragments were fused in a pCR2.1-TOPO vector using a Gibson
528 assembly kit (New England Biolabs) and validated by sequencing. The *pMET3* promoter sequence
529 was recycled from the plasmid pFA-ARG4-MET3p (ref.⁶⁵). The pTetO cassette (**Fig. 2a**) was
530 generated by assembling the following fragments with the Gibson assembly kit (New England
531 Biolabs) in a pCR2.1-TOPO vector: (i) *ARG4* gene from the plasmid pFA-ARG4-MET3p (ref.⁶⁵); (ii)
532 a tetracycline dependent-transactivation protein (TetR-VP16) obtained by gene synthesis with
533 corrections for the genetic code of the CTU clade (Thermo), flanked by the promoter (500 bp) and
534 terminator (500 bp) of the *C. albicans TDH3* gene; (iii) the repressible tetracycline operator (pTetO)
535 from the plasmid pCM184 (ref.⁶⁶). In this study, ~500 bp homologous regions were used to integrate
536 the pTet cassette upstream of the *BDF1* ORF. The *BDF1* point mutant cassettes were obtained using
537 the QuikChange site-directed kit (Agilent) with the *BDF1* plasmid pJG214 or pJG215. All cassettes
538 were obtained by digesting 4 μ g of the pCR2.1-TOPO plasmids and were transformed in *C. albicans*
539 by a lithium acetate procedure, as previously described⁶⁷. Mutations introduced in the *BDF1* gene in
540 *C. albicans* were confirmed by PCR, sequencing of the mutated region in the genomic DNA and
541 western blot. Strains used in this study are listed in **Supplementary Table 5**.

542

543 **Growth assays**

544 *Growth on solid media.* *C. albicans* strains were grown in SC media to an OD₆₀₀ of 0.5-0.8, pelleted
545 and resuspended in sterile water at a final OD₆₀₀ of 0.13. Cells were spotted on solid media in a three-
546 fold dilution series starting at an OD₆₀₀ of 0.13. Plates were incubated at 30°C for 1 d prior to
547 imaging. Stress resistance was tested using the following conditions: H₂O₂ (4.5 and 6 mM), methyl-
548 methanesulfonate (MMS; 0.005 and 0.02%), hydroxyurea (10 mM), nicotinamide (0.5, 1, and 4 mM),
549 caffeine (15 mM), sorbitol (1, 1.5 and 2 M), Congo red (50 μ g/mL), calcofluor white (20 μ M), SDS
550 (0.04%), and heat shock at 42°C.

551 *Growth on liquid media.* *C. albicans* strains were grown at 30°C in SC medium to an OD₆₀₀ of 0.5-
552 0.8. For the evaluation of growth defects related to Bdf1 mutations, log-phase growing cells were

553 counted using a Neubauer chamber and diluted in liquid media to a final concentration of 5400
554 cells/mL per well in a sterile 96 well-plate. Doxycycline (50 µg/mL) or methionine (5 mM) / cysteine
555 (0.25 mM) were added to the media if required. Plates were incubated at 30°C and OD₆₀₀ was
556 measured using a Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Fisher). For the evaluation of
557 chemical compounds, strains were grown in SC medium supplemented with 50 µg/mL doxycycline or
558 5 mM methionine / 0.25mM cysteine 24h prior to counting and then seeded in 96-well plates at the
559 same concentration as mentioned above, with or without chemical compounds. Statistical tests were
560 performed using two-sided Welch *t*-tests.

561

562 **Analysis of whole cell extracts and antibodies**

563 *C. albicans* strains were grown at 30°C in SC media to an OD₆₀₀ of 0.5-0.8. Cells were lysed in
564 Fastprep™ (MPBiologicals) twice at 6.5 m/s for 1 min with intermediate incubation on ice. Histone
565 H4 antibody was purchased from Active Motif (ref 39269) and the *CaBdf1* antibody was developed
566 in house using a full-length recombinant protein injected in rabbits (Covalab).

567

568 **Mouse experiments**

569 A mouse model of hematogeneously disseminated candidiasis was used and approved by the French
570 National Animal Experimentation Ethic Committee (reference B385161006) under the file reference
571 2015042015538706 v4 (AFAPIS#644). *Candida* strains were inoculated from an overnight subculture
572 in liquid YPD. In each condition, 6 female BALB/c mice (8 weeks old) were injected in the lateral
573 caudal vein with 2×10^5 cells of a *C. albicans* suspension. If necessary, doxycycline repression was
574 added to the drinking water starting at 48h before the injection until the day of euthanasia. To limit
575 severity and duration of pain, a pilot experiment established an endpoint 7 days post-infection, when
576 the virulence of each strain was assessed by kidney fungal burden evaluation, as described before^{68,69}.
577 Briefly, mice were euthanized, left kidneys removed aseptically, weighed and homogenized
578 suspensions were cultured to evaluated colony forming units (CFU). The final results were expressed
579 as log colony-forming units per gram of tissue and statistically tested using two-sided Wilcoxon rank
580 sum tests with continuity correction.

581

582 **Statistics**

583 Each statistical test is indicated in the legend of the corresponding figure and has been chosen for its
584 compliance with the sample size. Sample size for mouse experiments was chosen as the best
585 compromise between statistical power and regulations of the French National Animal
586 Experimentation Ethic Committee. No inclusion / exclusion criteria were pre-established. Animal
587 studies were neither randomized nor performed blinded.

588

589 **Data availability**

590 Coordinates and structure factors for have been deposited with the Protein Data Bank with accession
591 codes XXX (unbound *CaBdf1* BD1), XXX (*CaBdf1* BD1 bound to **1**), XXX (*CaBdf1* BD1 bound to
592 **3**) and XXX (*CaBdf1* BD2 bound to **2**). The authors declare that all other data supporting the findings
593 of this study are available within the article and its supplementary information files, or from the
594 corresponding authors upon request..

595

596 **Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

597 **References**

- 598 1 Brown, G. D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* **4**, 165rv113
599 (2012).
- 600 2 Moran, C., Grussemeier, C. A., Spalding, J. R., Benjamin, D. K., Jr. & Reed, S. D. *Candida*
601 *albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients:
602 comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J* **28**, 433-435 (2009).
- 603 3 Arendrup, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* **16**, 445-452 (2010).
- 604 4 Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D. & Cornet, M. Resistance of *Candida* spp.
605 to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med* **40**, 1241-1255 (2014).
- 606 5 Denning, D. W. & Bromley, M. J. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline.
607 *Science* **347**, 1414-1416 (2015).
- 608 6 Sanglard, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front Med*
609 (*Lausanne*) **3**, 11 (2016).
- 610 7 Hniz, D., Tscherner, M. & Kuchler, K. Targeting chromatin in fungal pathogens as a novel
611 therapeutic strategy: histone modification gets infectious. *Epigenomics* **3**, 129-132 (2011).
- 612 8 Garnaud, C., Champleboux, M., Maubon, D., Cornet, M. & Govin, J. Histone Deacetylases and
613 Their Inhibition in *Candida* Species. *Front Microbiol* **7**, 1238 (2016).
- 614 9 Kmetzsch, L. Histone deacetylases: Targets for antifungal drug development. *Virulence* **6**,
615 535-536 (2015).
- 616 10 Wurtele, H. *et al.* Modulation of histone H3 lysine 56 acetylation as an antifungal therapeutic
617 strategy. *Nat Med* **16**, 774-780 (2010).
- 618 11 Nishikawa, J. L. *et al.* Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator-
619 Mediator interaction. *Nature* **530**, 485-489 (2016).
- 620 12 Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine
621 acetylation. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 337-356 (2014).
- 622 13 Moriniere, J. *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single
623 bromodomain. *Nature* **461**, 664-668 (2009).
- 624 14 Filippakopoulos, P. *et al.* Histone recognition and large-scale structural analysis of the
625 human bromodomain family. *Cell* **149**, 214-231 (2012).
- 626 15 Nicodeme, E. *et al.* Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* **468**,
627 1119-1123 (2010).
- 628 16 Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067-1073
629 (2010).
- 630 17 Schaefer, U. Pharmacological inhibition of bromodomain-containing proteins in
631 inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6** (2014).
- 632 18 Brand, M. *et al.* Small Molecule Inhibitors of Bromodomain-Acetyl-lysine Interactions. *ACS*
633 *Chem Biol* **10**, 22-39 (2015).
- 634 19 Wang, C. Y. & Filippakopoulos, P. Beating the odds: BETs in disease. *Trends Biochem Sci* **40**,
635 468-479 (2015).
- 636 20 Ferri, E., Petosa, C. & McKenna, C. E. Bromodomains: Structure, function and pharmacology
637 of inhibition. *Biochem Pharmacol* **106**, 1-18 (2016).
- 638 21 Romero, F. A. *et al.* Disrupting Acetyl-Lysine Recognition: Progress in the Development of
639 Bromodomain Inhibitors. *J Med Chem* **59**, 1271-1298 (2016).
- 640 22 Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R. & Tjian, R. Bromodomains mediate an acetyl-histone
641 encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**, 365-376 (2003).
- 642 23 Matangkasombut, O. & Buratowski, S. Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2
643 to histone H4 acetylation. *Mol Cell* **11**, 353-363 (2003).
- 644 24 Garcia-Oliver, E. *et al.* Bdf1 Bromodomains Are Essential for Meiosis and the Expression of
645 Meiotic-Specific Genes. *PLoS Genet* **13**, e1006541 (2017).
- 646 25 Matangkasombut, O., Buratowski, R. M., Swilling, N. W. & Buratowski, S. Bromodomain
647 factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev* **14**, 951-962 (2000).
- 648 26 Krogan, N. J. *et al.* A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone
649 H2A variant Htz1. *Mol Cell* **12**, 1565-1576 (2003).

650 27 Mizuguchi, G. *et al.* ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1
651 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348 (2004).

652 28 Govin, J. *et al.* Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4
653 during gametogenesis. *Genes Dev* **24**, 1772-1786 (2010).

654 29 Fu, J. *et al.* The Yeast BDF1 Regulates Endocytosis via LSP1 Under Salt Stress. *Current*
655 *microbiology* (2015).

656 30 Liu, X. *et al.* Genetic and comparative transcriptome analysis of bromodomain factor 1 in the
657 salt stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current microbiology* **54**, 325-330 (2007).

658 31 Durant, M. & Pugh, B. F. NuA4-directed chromatin transactions throughout the
659 *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Mol Cell Biol* **27**, 5327-5335 (2007).

660 32 Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N. & Regev, A. Natural history and evolutionary principles
661 of gene duplication in fungi. *Nature* **449**, 54-61 (2007).

662 33 Roemer, T. *et al.* Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and
663 applications to antifungal drug discovery. *Molecular microbiology* **50**, 167-181 (2003).

664 34 Xu, Q. R. *et al.* Molecular genetic techniques for gene manipulation in *Candida albicans*.
665 *Virulence* **5**, 507-520 (2014).

666 35 Dawson, M. A. *et al.* Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for
667 MLL-fusion leukaemia. *Nature* **478**, 529-533 (2011).

668 36 Fish, P. V. *et al.* Identification of a chemical probe for bromo and extra C-terminal
669 bromodomain inhibition through optimization of a fragment-derived hit. *J Med Chem* **55**,
670 9831-9837 (2012).

671 37 Douglas, L. M. & Konopka, J. B. Plasma membrane organization promotes virulence of the
672 human fungal pathogen *Candida albicans*. *J Microbiol* **54**, 178-191 (2016).

673 38 Francois, J. M. Cell Surface Interference with Plasma Membrane and Transport Processes in
674 Yeasts. *Adv Exp Med Biol* **892**, 11-31 (2016).

675 39 Prasad, R., Rawal, M. K. & Shah, A. H. *Candida* Efflux ATPases and Antiporters in Clinical Drug
676 Resistance. *Adv Exp Med Biol* **892**, 351-376 (2016).

677 40 Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D. & Perlin, D. S. Mechanisms of
678 Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, a019752 (2014).

679 41 Chung, C. W. *et al.* Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET
680 family bromodomains. *J Med Chem* **54**, 3827-3838 (2011).

681 42 Vidler, L. R., Brown, N., Knapp, S. & Hoelder, S. Druggability analysis and structural
682 classification of bromodomain acetyl-lysine binding sites. *J Med Chem* **55**, 7346-7359 (2012).

683 43 Picaud, S. *et al.* RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the
684 second bromodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 19754-19759 (2013).

685 44 Pivot-Pajot, C. *et al.* Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-
686 specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**, 5354-5365 (2003).

687 45 Lamonica, J. M. *et al.* Bromodomain protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to
688 promote its chromatin occupancy at erythroid target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**,
689 E159-168 (2011).

690 46 Baud, M. G. *et al.* Chemical biology. A bump-and-hole approach to engineer controlled
691 selectivity of BET bromodomain chemical probes. *Science* **346**, 638-641 (2014).

692 47 Tanaka, M. *et al.* Design and characterization of bivalent BET inhibitors. *Nat Chem Biol* **12**,
693 1089-1096 (2016).

694 48 Waring, M. J. *et al.* Potent and selective bivalent inhibitors of BET bromodomains. *Nat Chem*
695 *Biol* **12**, 1097-1104 (2016).

696 49 Rhyasen, G. W. *et al.* AZD5153: A Novel Bivalent BET Bromodomain Inhibitor Highly Active
697 against Hematologic Malignancies. *Mol Cancer Ther* **15**, 2563-2574 (2016).

698 50 Winter, G. E. *et al.* DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo
699 target protein degradation. *Science* **348**, 1376-1381 (2015).

700 51 Lu, J. *et al.* Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem Biol*
701 **22**, 755-763 (2015).

- 702 52 Zengerle, M., Chan, K. H. & Ciulli, A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the
703 BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem Biol* **10**, 1770-1777 (2015).
- 704 53 Raina, K. *et al.* PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-
705 resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 7124-7129 (2016).
- 706 54 Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in
707 Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**, 67-73
708 (1999).
- 709 55 Fabian, M. A. *et al.* A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat*
710 *Biotechnol* **23**, 329-336 (2005).
- 711 56 Wodicka, L. M. *et al.* Activation state-dependent binding of small molecule kinase inhibitors:
712 structural insights from biochemistry. *Chem Biol* **17**, 1241-1249 (2010).
- 713 57 Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132 (2010).
- 714 58 Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D*
715 *Biol Crystallogr* **67**, 235-242 (2011).
- 716 59 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674 (2007).
- 717 60 Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. Automated macromolecular model
718 building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat Protoc* **3**, 1171-1179
719 (2008).
- 720 61 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D*
721 **60**, 2126-2132 (2004).
- 722 62 Lebedev, A. A. *et al.* JLigand: a graphical tool for the CCP4 template-restraint library. *Acta*
723 *Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 431-440 (2012).
- 724 63 Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular
725 structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-221 (2010).
- 726 64 Chen, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular
727 crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12-21 (2010).
- 728 65 Gola, S., Martin, R., Walther, A., Dunkler, A. & Wendland, J. New modules for PCR-based
729 gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of
730 flanking homology region. *Yeast* **20**, 1339-1347 (2003).
- 731 66 Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable
732 promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**,
733 837-848 (1997).
- 734 67 Walther, A. & Wendland, J. An improved transformation protocol for the human fungal
735 pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet* **42**, 339-343 (2003).
- 736 68 Spellberg, B., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., Jr. & Filler, S. G. Mice with disseminated
737 candidiasis die of progressive sepsis. *J Infect Dis* **192**, 336-343 (2005).
- 738 69 LaFayette, S. L. *et al.* PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida*
739 *albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog* **6**, e1001069
740 (2010).
- 741 70 Flynn, E. M. *et al.* A Subset of Human Bromodomains Recognizes Butyryllysine and
742 Crotonyllysine Histone Peptide Modifications. *Structure* **23**, 1801-1814 (2015).

743

744 ACKNOWLEDGEMENTS

745 This work used the platforms of the Grenoble Instruct Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-
746 EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01)
747 within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). We acknowledge the European
748 Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities and thank EMBL and
749 ESRF staff for assistance at the beamlines, particularly M. Bowler and D. de Sanctis. We thank
750 Myriam Ferro and Christophe Bruley for their general support, Sandrine Miesch-Fremy and Marie

751 Arlotto for technical support, Joanna Timmins for access to and help with the CLARIOstar plate
752 reader, Inah Kang for administrative support and EDyP team members for scientific discussions. This
753 work was supported by grants from the FACE foundation (Partner University Fund to CMcK & CP),
754 the National Institutes of Health (1R21AI113704 to CMcK), the Agence Nationale de Recherche
755 [ANR-14-CE16-0027-01 (FungiBET) to CP, JG and MCo; ANR-11-PDOC-011-01 (EpiGam) to JG;
756 ANR ANR-10-INBS-08 (ProFI) to JG; ANR-10-LABX-62-IBEID to CD], the EU FP7 Marie Curie
757 Action (Career Integration Grant 304003 to JG) as well as by the USC Dornsife College of Letters,
758 Arts and Sciences (EF, CMcK), a Chateaubriand Fellowship (EF) and a FINOVI fellowship from the
759 Région Rhône Alpes, France (MCham).

760

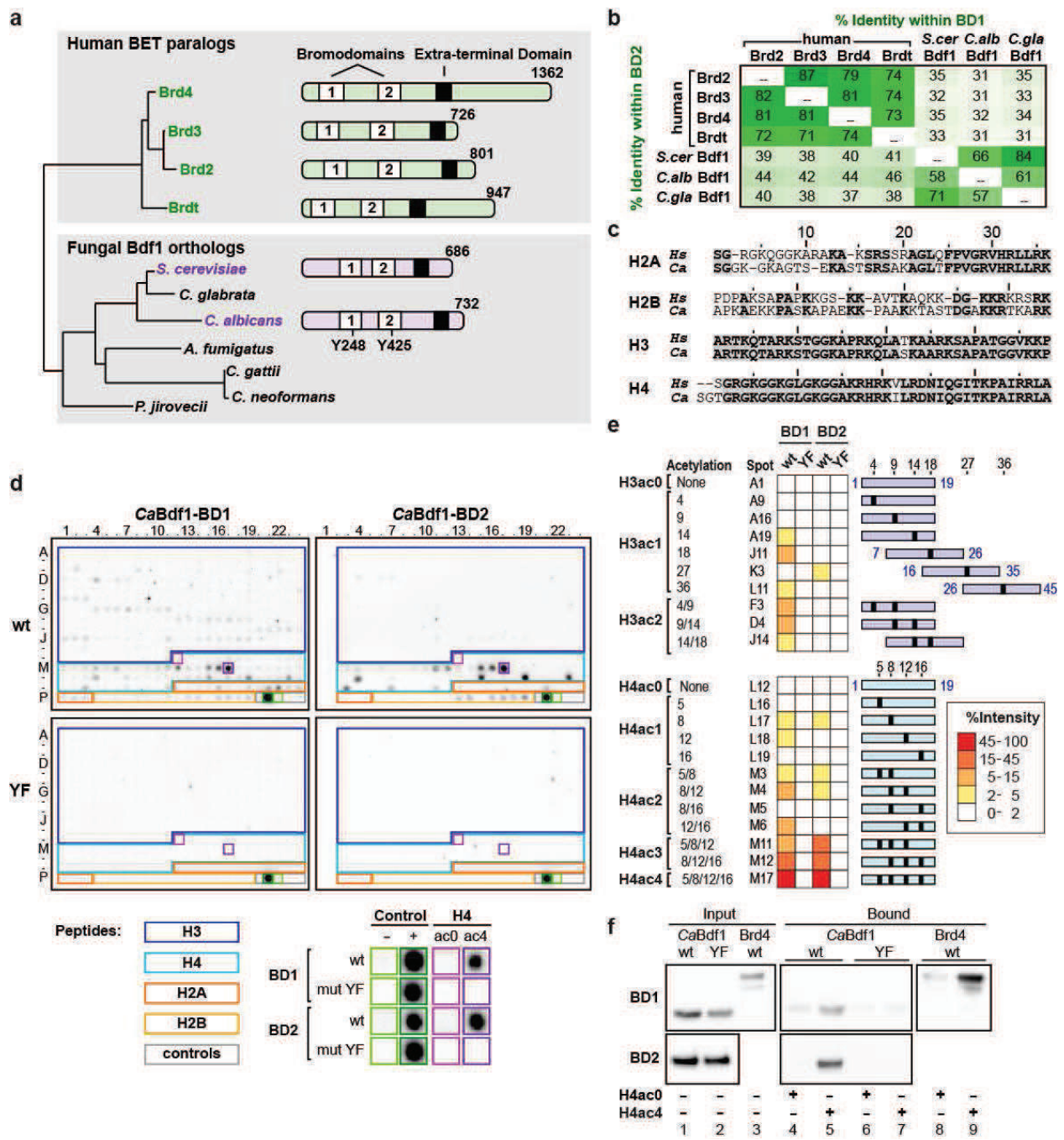
761 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

762 FM, CMK, JG and CP conceived and designed the study. FM, EF, MCham, NZ, DM, YZ, MHa, DS,
763 CG, MCo, MChau, CdE, BAK, MHu, MCo, JG and CP performed experiments and analysed data.
764 CMK, JC and CP wrote the manuscript. All authors discussed results and commented on the
765 manuscript.

766

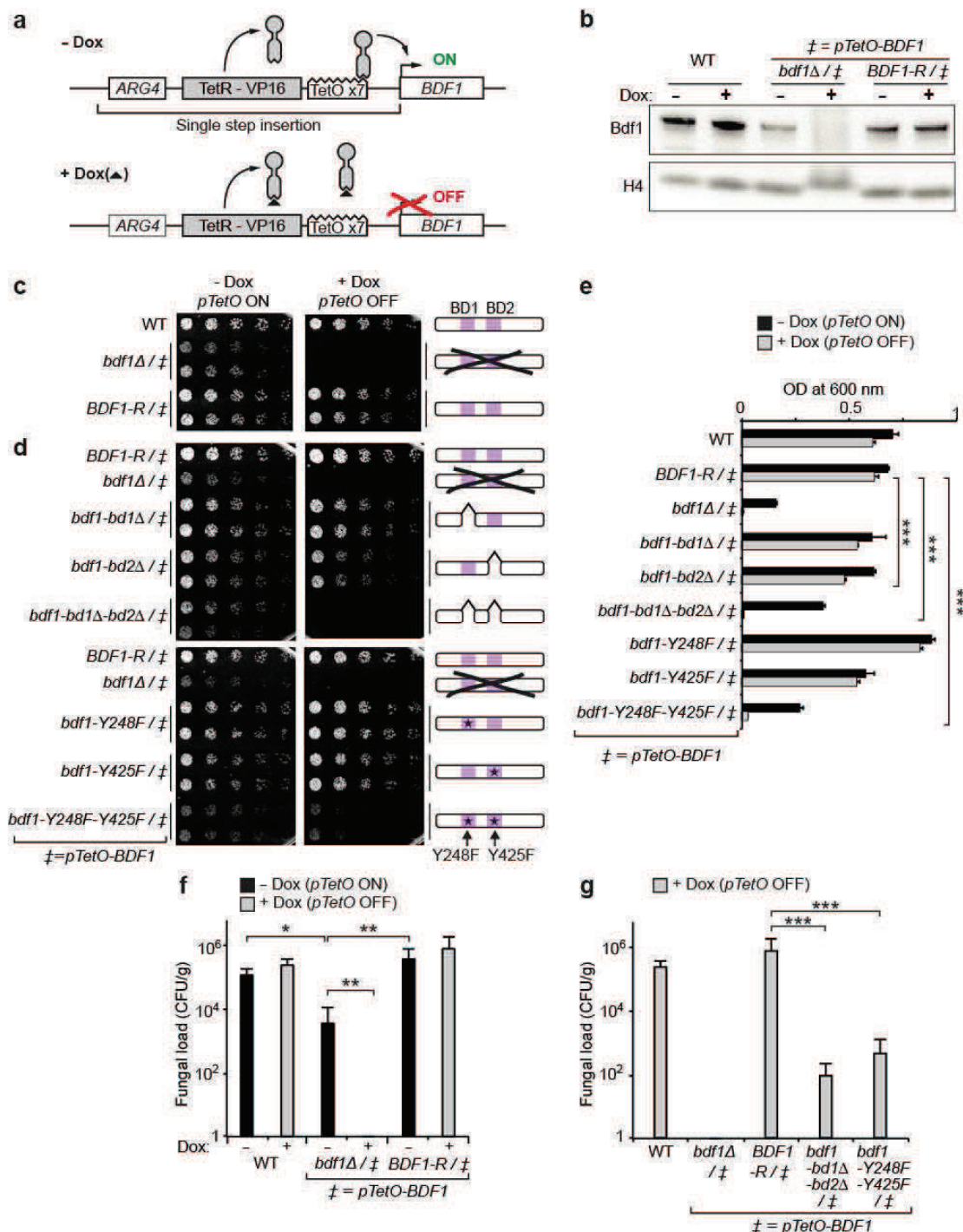
767

768



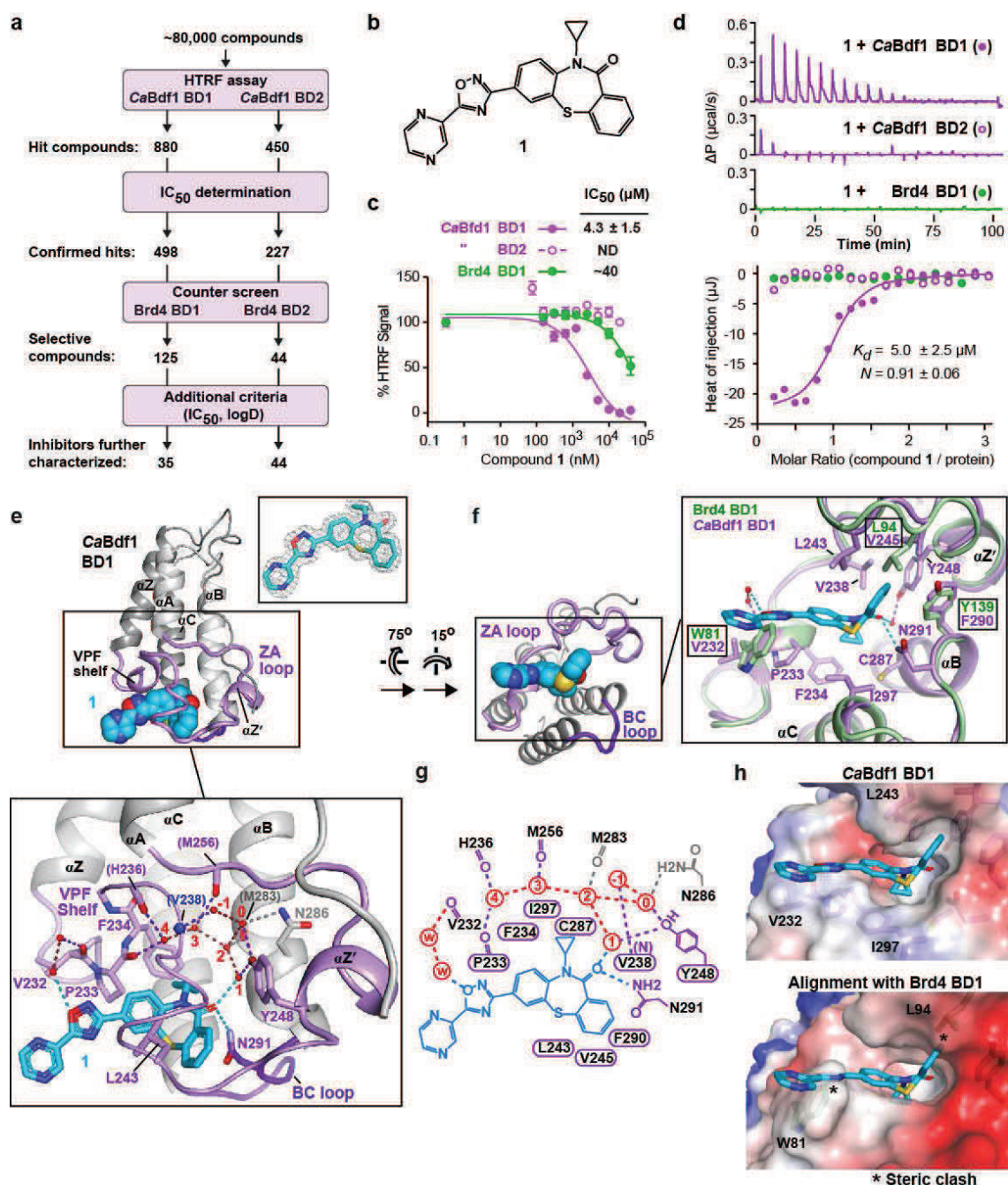
769

770 **Figure 1. *CaBdf1* BDs bind multi-acetylated histone tails.** (a) Phylogeny and domain organization of fungal
 771 Bdf1 and human BET proteins. The neighbour-joining tree based on an alignment of BET protein sequences
 772 was generated using programs ClustalX and NJPlot. (b) Sequence identity among human and fungal BET BDs.
 773 (c) Human (*Hs*) and *C. albicans* (*Ca*) histone tail sequences. (d) Binding of WT and mutant (YF) *CaBdf1* BDs to a
 774 histone peptide microarray. The array comprised control peptides (gray outline) or N-terminal peptides from
 775 histones H3, H4, H2A and H2B (blue, cyan, dark orange and light orange outlines, respectively). Signals for
 776 background and positive binding controls (boxed in light and dark green) or for H4ac0 and H4ac4 peptides
 777 (boxed in magenta and purple) are shown magnified below the array. Microarray data are summarized in
 778 **Supplementary File 1.** (e) Binding intensities for H3 and H4 peptides. Peptides are shown as blue (H3) and cyan
 779 (H4) rectangles, with acetylation marks indicated by black boxes. (f) Pull-down assay. Immobilized H4ac0 and
 780 H4ac4 peptides were incubated with GST-tagged *CaBdf1* BDs or with the corresponding YF mutants. After
 781 washing, bound proteins were eluted and visualized by Western blotting with an anti-GST antibody.



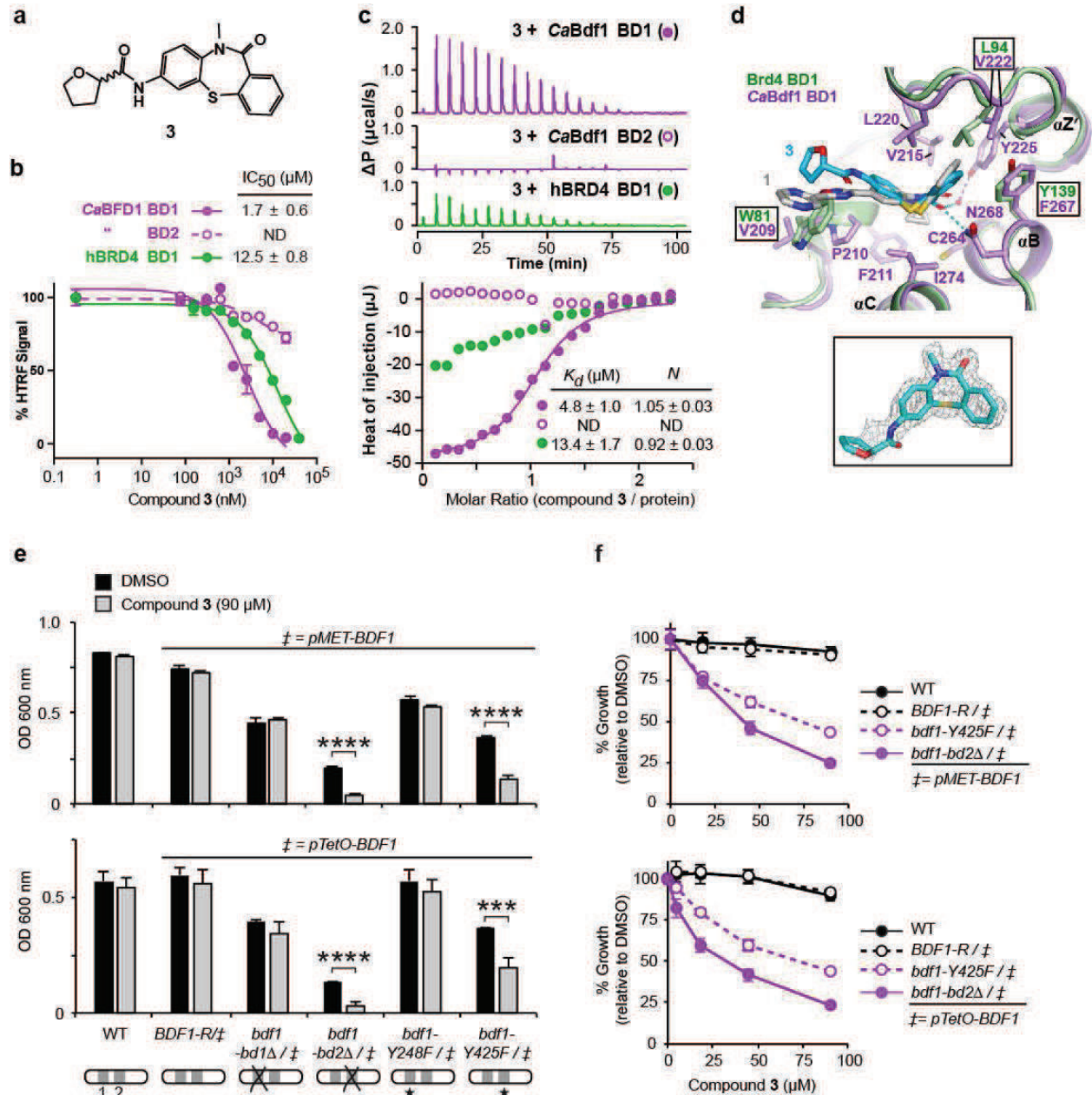
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796

Figure 2. Bdf1 BDs are essential for *C. albicans* viability and virulence. (a) Tet-OFF construct used in this study. Doxycycline (Dox) inhibits the binding of TetR-VP16 to the Tet Operator (TetO), preventing *BDF1* transcription. (b) Bdf1 protein expression in different strains. (c, d) Colony formation assays showing the effect of (c) Bdf1 repression and (d) Bdf1 BD inactivation on growth. This experiment has been repeated three times with similar results. (e) Growth assays in liquid media. An equal fungal load was seeded for each strain and growth monitored by optical density at 600 nm. Mean and s.d. values are shown from three independent experiments. ***, $P \leq 0.01$. P -values were determined in a two-sided Welch t -test. (f) Kidney fungal load of mice injected with strains shown in (c) measured 7 days post-infection, showing that Bdf1 is required for virulence. Data shown are mean and s.d. values ($n=6$). *, $P \leq 0.07$; **, $P \leq 0.05$. P -values were determined using a two-sided Wilcoxon rank sum test with continuity correction. (g) Kidney fungal load of mice infected with strains shown in (d), showing the loss of virulence upon BD inactivation. Data shown are mean and s.d. values ($n=6$). ***, $P \leq 0.01$; P -values were determined using a two-sided Wilcoxon rank sum test with continuity correction.



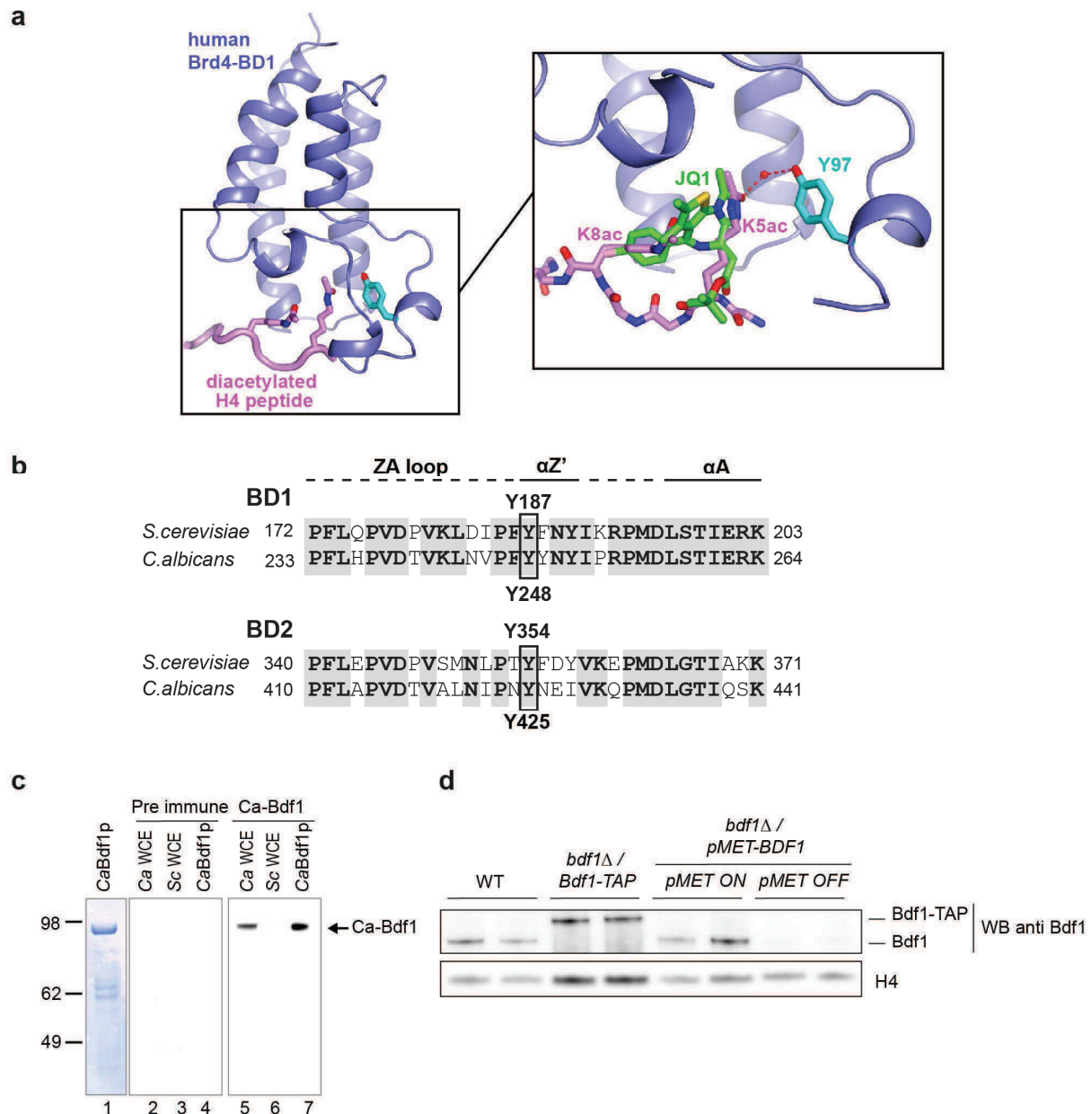
797

798 **Figure 3. Identification of a selective *CaBdf1* BD1 inhibitor.** (a) Screening strategy to identify selective *CaBdf1*
 799 BD1 and BD2 inhibitors. Following the counter-screen step, most compounds yielded at least a 20-fold
 800 difference in IC₅₀ value relative to the human BD, although a few exhibited only a 3- to 4-fold difference. (b)
 801 Chemical structure of **1**. (c) HTRF assays showing selective inhibition of *CaBdf1* BD1 by **1**. (d) ITC experiment
 802 showing selective binding of **1** to *CaBdf1* BD1. (e) Structure of *CaBdf1* BD1 bound to **1**. *Upper inset*. Simulated-
 803 annealing omit $F_o - F_c$ density for **1** contoured at 3σ . *Lower inset*. Conserved water structure and hydrogen
 804 bonding interactions in the binding site. Residues interacting with **1** through direct and water-mediated
 805 hydrogen bonds (dashed lines) are shown in stick representation. Residues interacting through backbone
 806 atoms are labelled in parentheses. Water molecules are numbered as in ref.⁷⁰. (f) Alignment of *CaBdf1* BD1
 807 (violet) with *Brd4* BD1 (green; PDB code 3UVW). Side chains are shown for *CaBdf1* residues in contact with **1**
 808 and for the corresponding *Brd4* residues if divergent from *CaBdf1*. (g) Schematic summary of ligand
 809 interactions. Hydrogen bonds are shown as dashed lines. Residues mediating van der Waals contacts with **1**
 810 are indicated by labels within a cartouche. Water molecules are indicated in red. (h) Surface representation
 811 showing the binding pocket of *CaBdf1* BD1 bound to compound **1** (*top*) and that of *Brd4* BD1 (*bottom*)
 812 superimposed on the fungal complex. Asterisks indicate steric overlap between compound **1** and *Brd4* BD1
 813 residues.

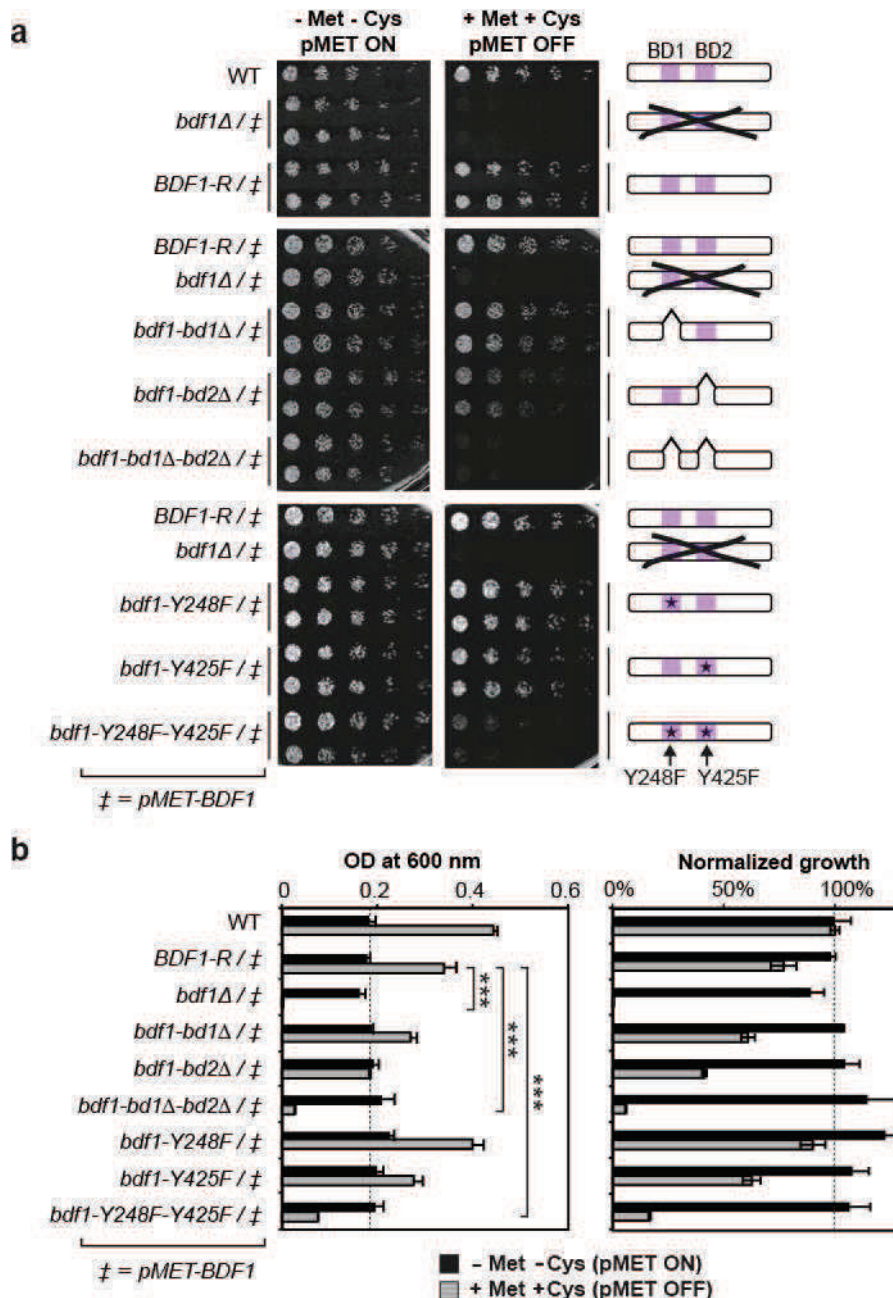
815
816

817 **Figure 4. A CaBdf1 BD1 inhibitor phenocopies the effect of BD1 inactivation on *C. albicans* growth.** (a)
 818 Chemical structure of compound **3**. (b) HTRF assay showing that **3** inhibits CaBdf1 BD1 preferentially over
 819 CaBdf1 BD2 and with modest selectivity over Brd4 BD1. (c) ITC experiment showing binding of **3** towards the
 820 indicated BD. (d) Crystal structure of CaBdf1 BD1 (violet) bound to **3** (S enantiomer) and alignment with CaBdf1
 821 BD1 bound to **1** and with human Brd4 BD1 (green). Side chains are shown for CaBdf1 residues in contact with **3**
 822 and for the corresponding Brd4 residues if divergent from CaBdf1. *Inset*, simulated-annealing omit $F_o - F_c$
 823 density for compound **3** contoured at 3σ . (e) Compound **3** compromises the *in vitro* growth of *C. albicans*
 824 when CaBdf1 BD2 is inactivated by deletion or point-mutation. Strains were grown in the presence of
 825 methionine/cysteine or doxycycline to repress expression of the WT allele from the *pMET* (top) or *pTetO*
 826 promoter, respectively. Data represent mean and s.d. values from three independent experiments.
 827 ***, $P \leq 0.01$; ****, $P \leq 10^{-3}$. *P*-values were determined in a two-sided Welch *t*-test. (f) Dose-response
 828 experiments showing the effect of **3** on Bdf1 mutant strains. Met/Cys or doxycycline were added to repress
 829 expression from the *pMET* (top) or *pTetO* (bottom) promoter, respectively. Data represent mean and s.d.
 830 values from three independent experiments.

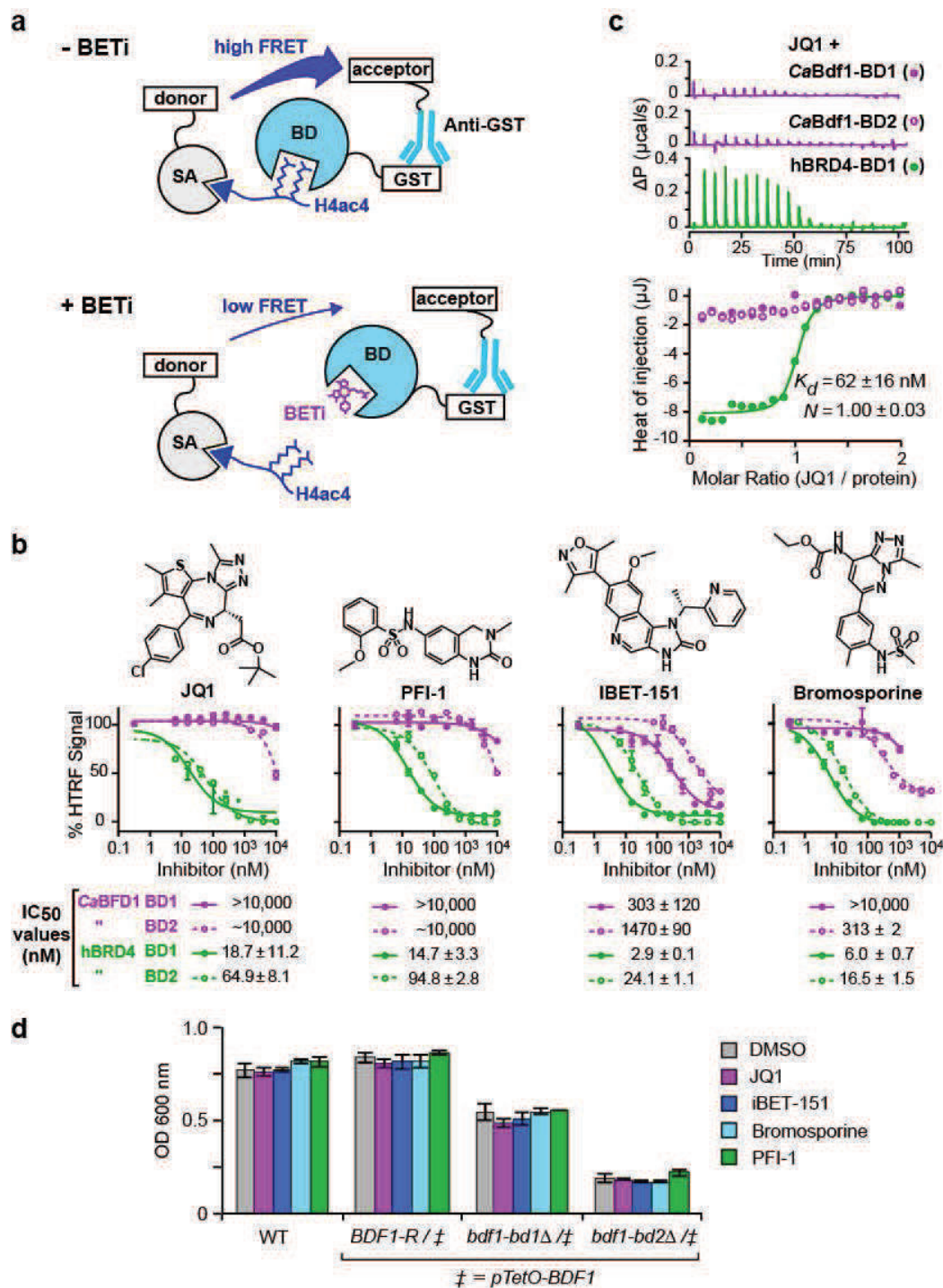
831



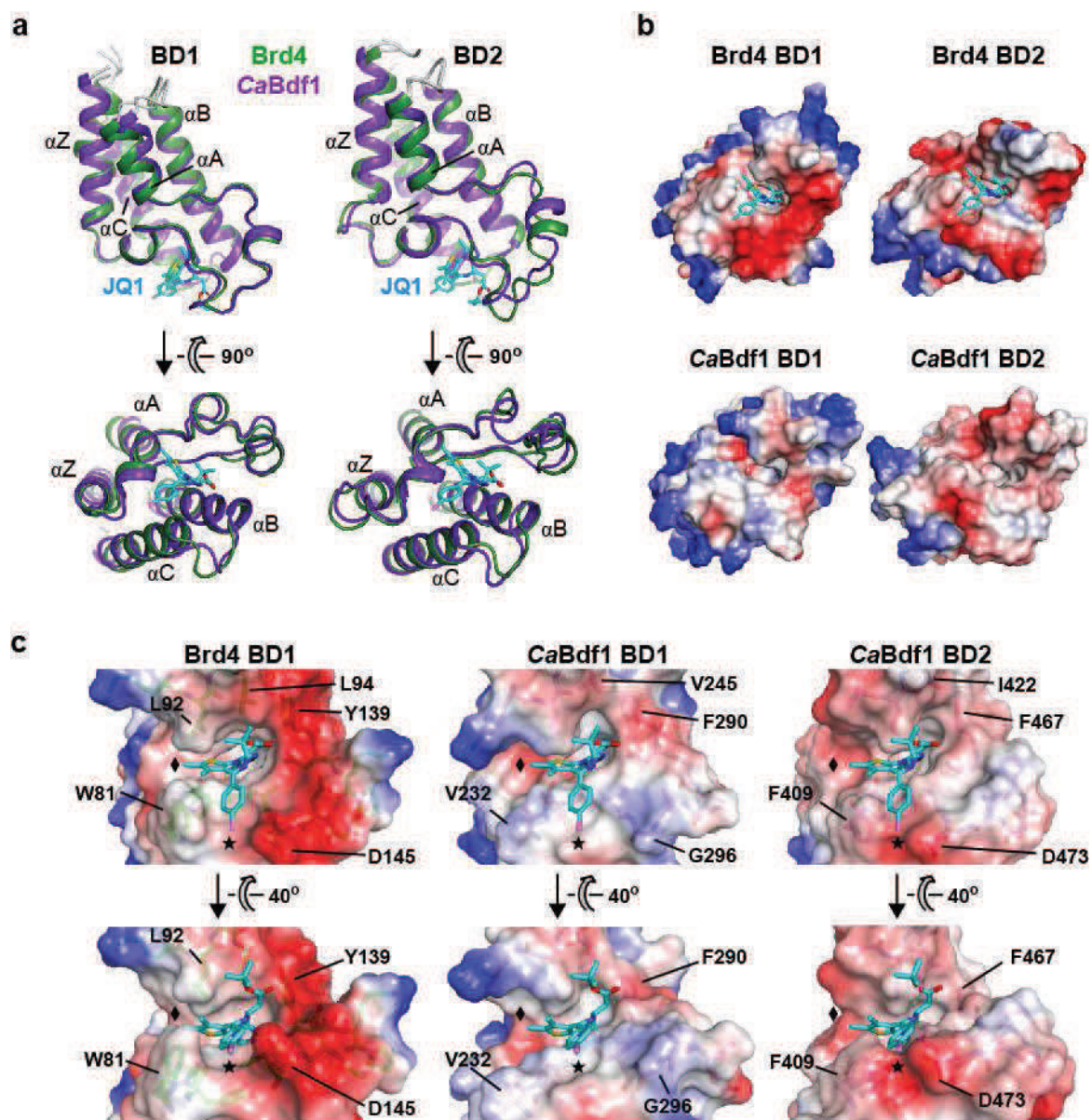
Supplementary Figure 1. BET BD structure, YF mutations and development of an anti-CaBdf1 antibody. (a) Structure of human Brd4-BD1 bound to an H4 peptide diacetylated on lysines 5 and 8 (PDB ID 3UVW)¹. The closeup view shows the superposition with Brd4-BD1 bound to JQ1 (PDB ID 3MXF)². Tyr97 forms a water-mediated hydrogen bond with the acetyl group of Lys5 and is critical for peptide ligand recognition. (b) Location of the YF point mutations used in this study. The mutated Tyr residues correspond to residue Tyr97 in Brd4-BD1. (c) Development of an antibody specific to *C. albicans* Bdf1. A band of the expected molecular weight is specifically detected after immunization of the rabbit. WCE, whole cell extracts. (d) Validation of antibody specificity. The antibody detected a shifted band when Bdf1 was TAP-tagged, whereas the signal was lost when Bdf1 expression was inhibited.



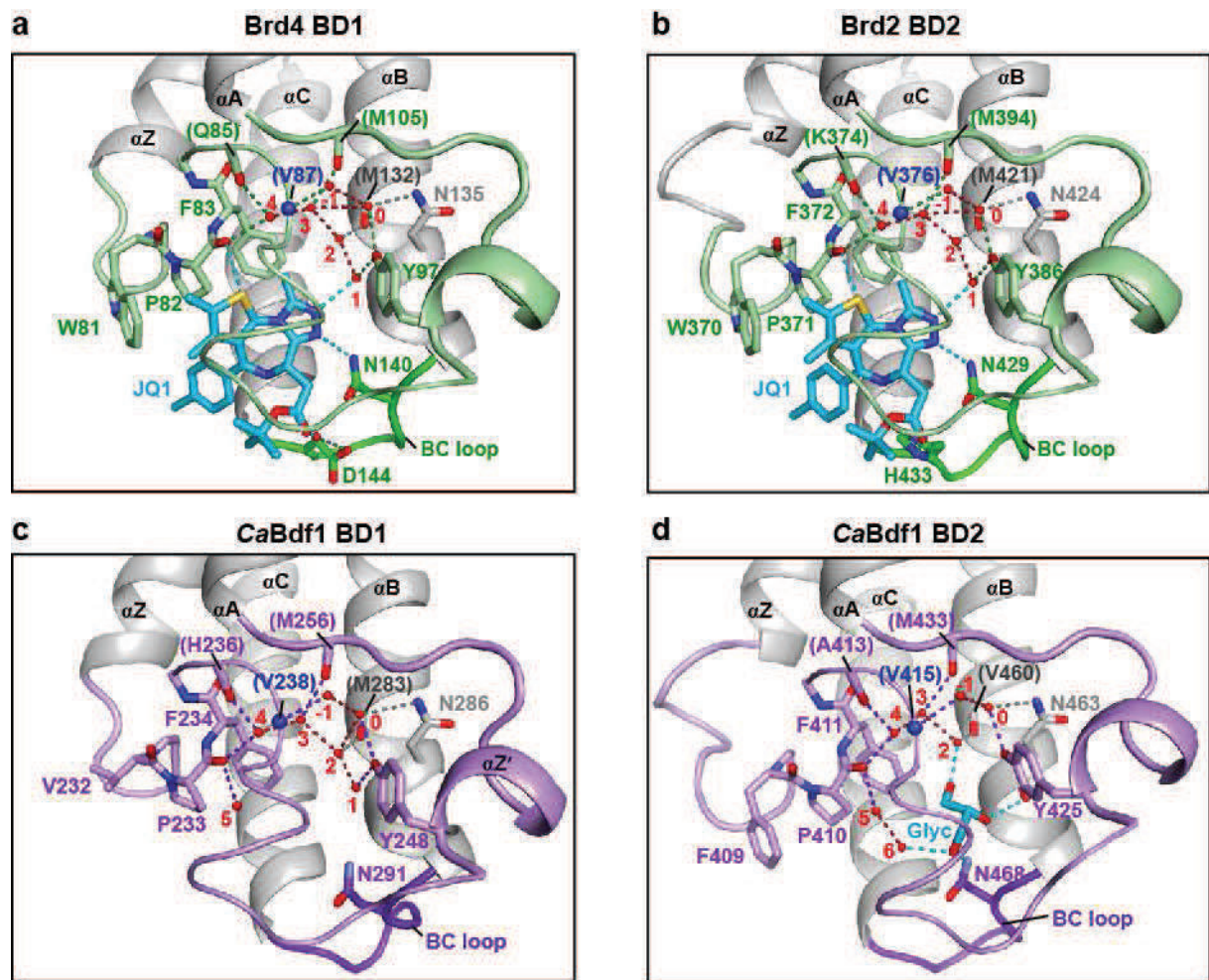
Supplementary Figure 2. Bdf1 BDs are essential in *C. albicans*. (a). Colony formation assay of strains in which Bdf1 expression is controlled by a methionine-sensitive promoter (*pMET*). The viability of *C. albicans* is lost when Bdf1 is absent or when both Bdf1 BDs are mutated. Met, methionine; Cys, cysteine. (b) Liquid growth assay using the strains shown in (a). *Left*, unnormalized OD. The repression of the *pMET* promoter requires the addition of high concentrations of methionine and cysteine, which affects the growth of *C. albicans* (WT, compare black and grey bars). Data represent the mean and s.d. values from three independent experiments. ***, $P \leq 0.01$. *P*-values were determined using a two-sided Welch *t*-test. *Right*, data were normalized to the WT growth (both black and grey bars are equal to 100% in the WT strain).



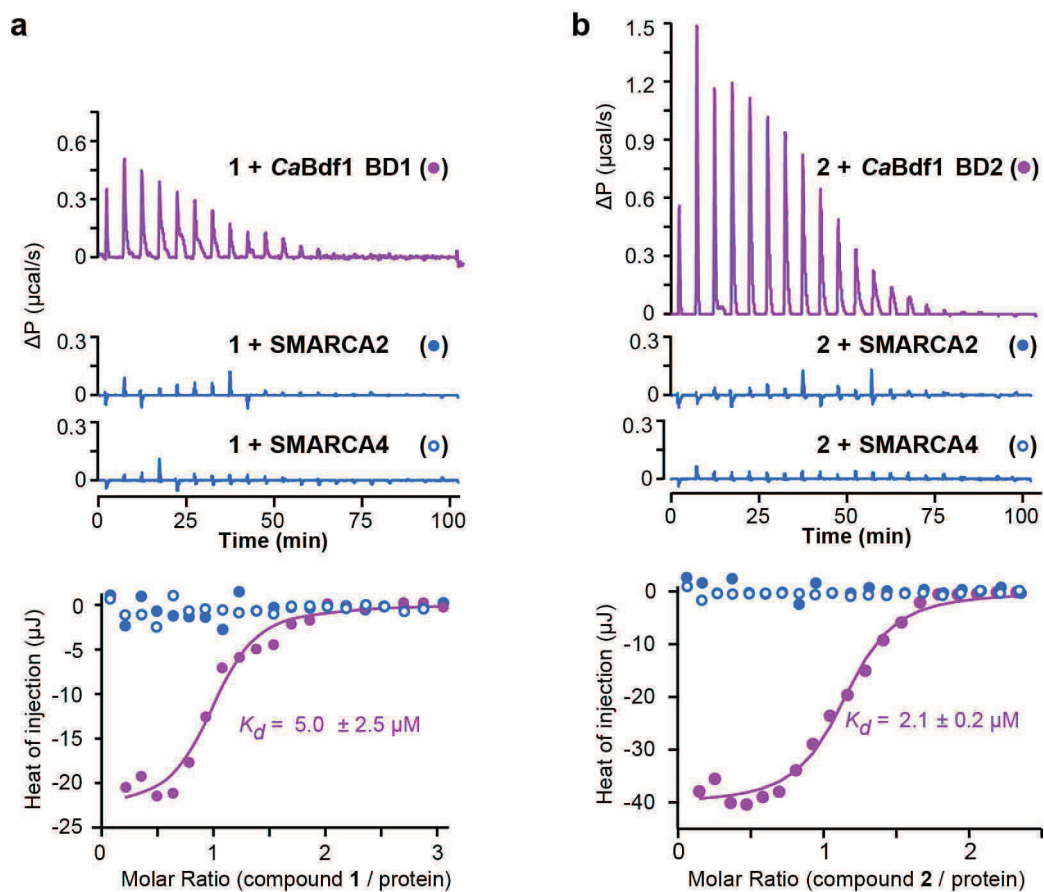
Supplementary Figure 3. *CaBdf1* BDs are resistant to human BET inhibitors. (a) HTRF assay. A biotinylated tetra-acetylated histone H4 peptide is bound to streptavidin (SA) beads coupled to the donor fluorophore. A GST-tagged bromodomain is bound by an anti-GST antibody coupled to the acceptor fluorophore. Peptide binding by the BD results in FRET. The addition of a BETi reduces FRET. (b) HTRF assays performed on BDs from *CaBdf1* and human Brd4 in the presence of the indicated BETi. Inhibition curves are shown as closed (BD1) and open (BD2) circles in green (Brd4) and magenta (Bdf1). IC_{50} values are listed below each graph. Data represent the mean and s.d. values from three independent experiments. (c) ITC experiment measuring the binding of JQ1 to *CaBDF1* BDs (magenta) and to human Brd4 BD1 (green). (d) BET inhibitors do not affect *C. albicans* growth, even when Bdf1 BD1 or BD2 is deleted. Inhibitors were tested at 10 μ M concentration. Experiments were performed in the presence of doxycycline to repress expression from the *pTetO-BDF1* allele. Data represent the mean and s.d. values from three independent experiments.



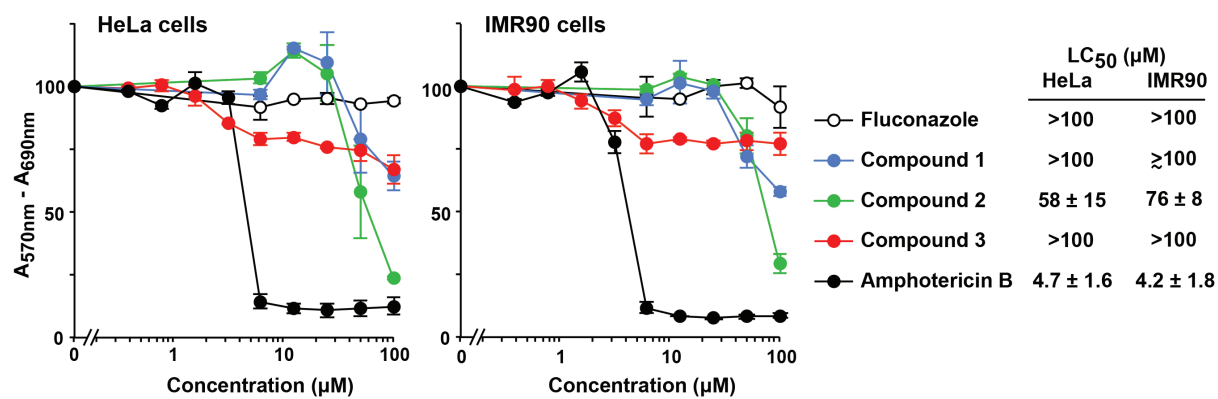
Supplementary Figure 4. Structural basis of BETi resistance by *CaBdf1* BD1 and BD2. (a) Alignment of BD1 (left) and BD2 (right) structures from human Brd4 (green; PDB codes 3MXF and 2OUO) and *CaBdf1* (magenta). For clarity, the 18 and 20 N-terminal residues preceding helix αZ are omitted from the Brd4 BD1 and *CaBdf1* BD1 structures, respectively. Brd4-bound JQ1 is shown in cyan. (b) Plots of electrostatic surface potential of BD1 (top) and BD2 (bottom) structures from human Brd4 and *CaBdf1*. Regions of negative and positive potential are shown in red and blue, respectively. JQ1 bound to Brd4 is shown in cyan. The binding surfaces of the fungal BDs are less negatively charged compared to human BET BDs, suggesting differences in the binding partners of these domains. (c) Comparison of the ligand binding pockets of *CaBdf1* BD1 and BD2 with that of Brd4 BD1. JQ1 was superimposed on the *CaBdf1* BDs via a structural alignment with Brd4 BD1. The diamond and asterisk indicate the ZA channel and surface groove which in Brd4 BD1 interact with the thieno and *p*-chlorophenyl groups of JQ1, respectively, and the corresponding positions in the *CaBdf1* BDs. The view in the upper panels is that of (b) rotated 50° counter-clockwise.



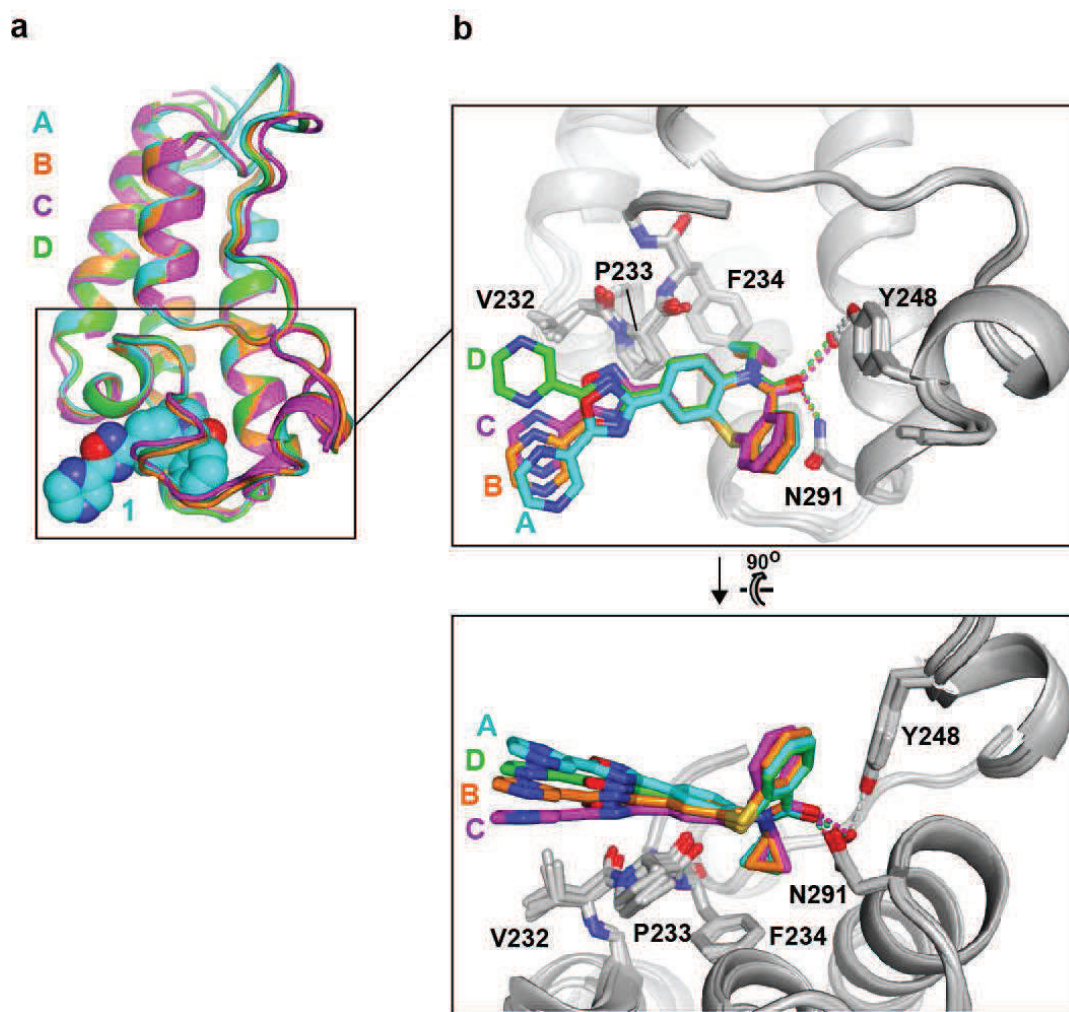
Supplementary Figure 5. Conserved water molecules in human and *C. albicans* BET BD active sites. Structures are shown for (a) human Brd4 BD1 bound to JQ1 (PDB code 3MXF), (b) human Brd2 BD2 bound to JQ1 (PDB code 3ONI), (c) *C. albicans* Bdf1 BD1 and (d) *C. albicans* Bdf1 BD2. ZA and BC loops are colored green (a,b) or violet (c,d). JQ1 bound to the human BDs and a glycerol (Glyc) molecule bound to *CaBdf1* BD2 are shown in cyan. Conserved water molecules are numbered as in ref.³. Water molecule 1 is missing from *CaBdf1* BD2, presumably dislodged by the bound glycerol molecule. The invariant Asn and Tyr residues, hydrophobic shelf and residues interacting with water molecules are shown in stick representation. Backbone atoms are labelled in parentheses. Hydrogen bonds to bound ligands are in cyan; those from water molecules to an amino acid residue are in the colour of the residue; and those between water molecules are in red.



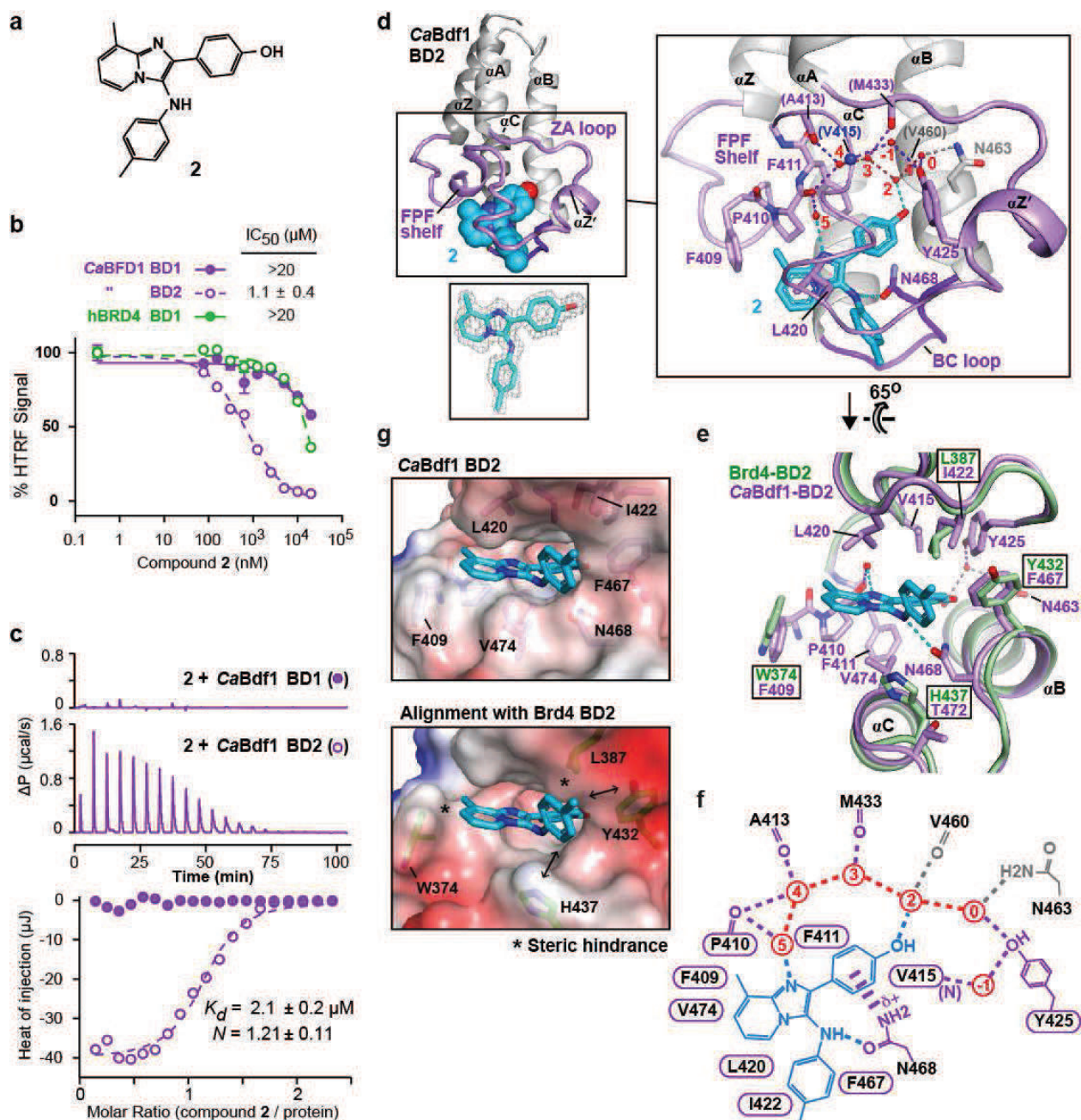
Supplementary Figure 8. ITC experiments measuring the binding of compounds 1 and 2 to human SMARCA BDs. The binding of (a) compound 1 by CaBdf1 BD1 and of (b) compound 2 by CaBdf1 BD2 is compared to the binding of these compounds by SMARCA2 and SMARCA4. The upper panels show the differential power (ΔP) time course of raw injection heats for CaBdf1 (magenta) and SMARCA (blue) BDs. The lower panels show normalized binding enthalpies corrected for the heat of dilution as a function of binding site saturation, with CaBdf1, SMARCA2 and SMARCA4 BDs indicated by magenta, solid blue and empty blue circles, respectively. The ITC data for the CaBdf1 BD1 and BD2 are those of Fig. 3d and Supplementary Fig. 11c, respectively.



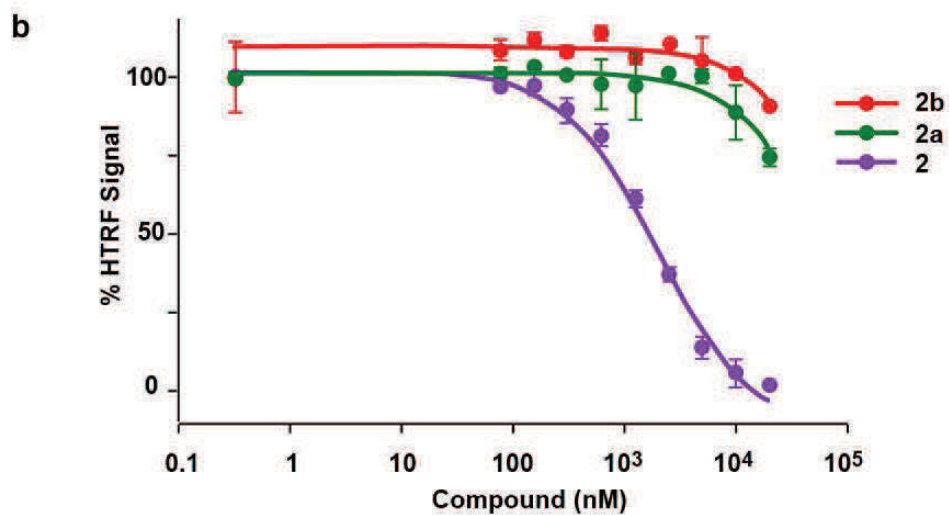
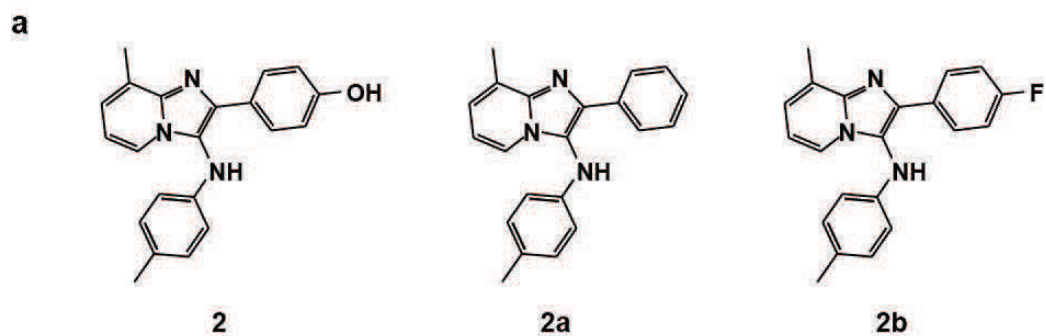
Supplementary Figure 9 MTT cytotoxicity assays on cultured (HeLa) and primary (IMR90) mammalian cells. Antifungal compounds fluconazole and amphotericin B were included as controls. Data represent the mean and s.d. values from three independent experiments. The values of LC₅₀ are summarized at the right.



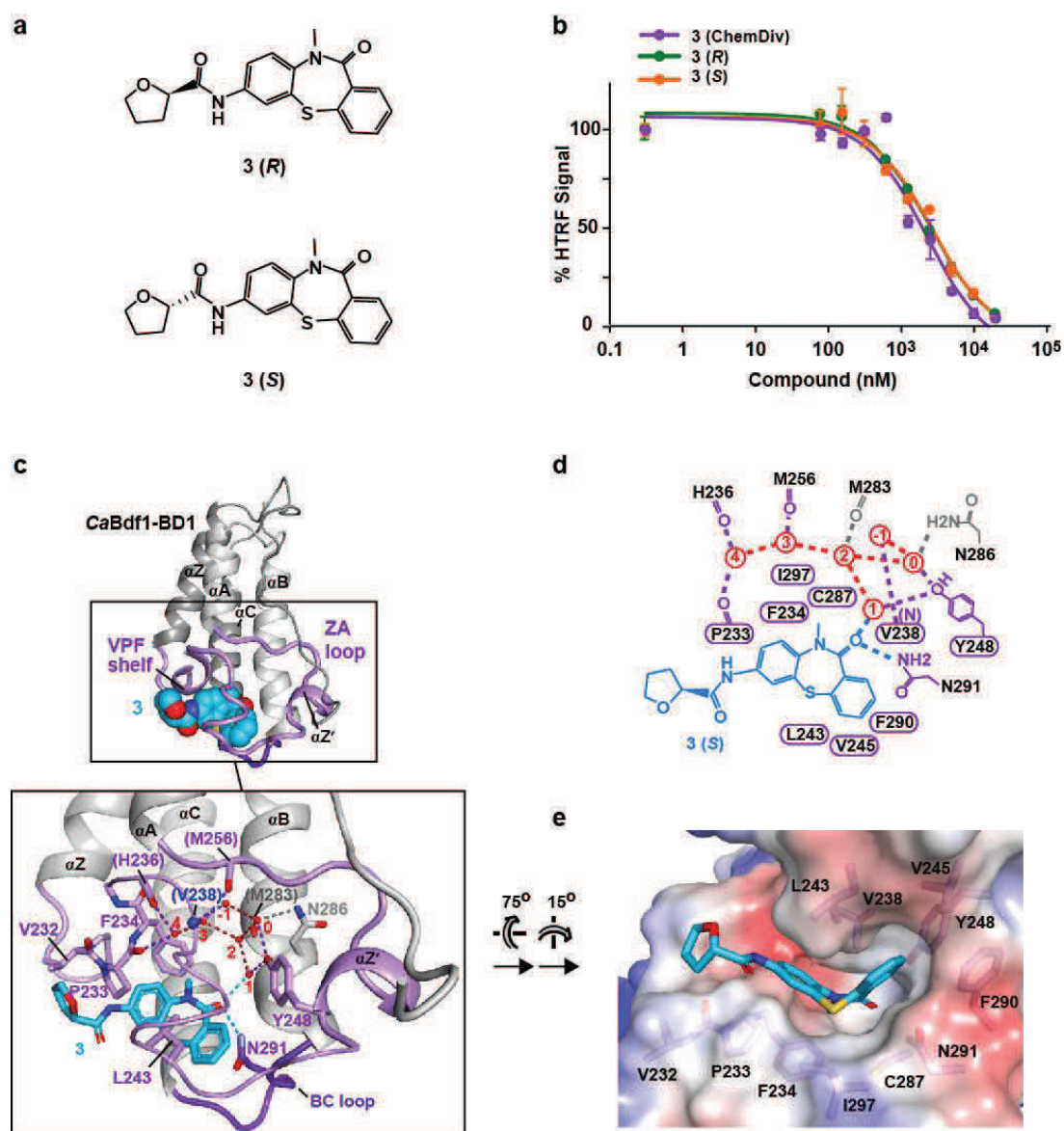
Supplementary Figure 10. Conformations of compound 1 observed in the *CaBdf1* BD1 crystal structure. (a) Structural alignment of the four *CaBdf1* BD1 polypeptide chains present in the asymmetric unit, each bound to a molecule of **1**. Chains A, B, C and D are coloured cyan, orange, magenta and green, respectively. (b) Orthogonal views of the binding site showing the different conformations of the bound ligand.



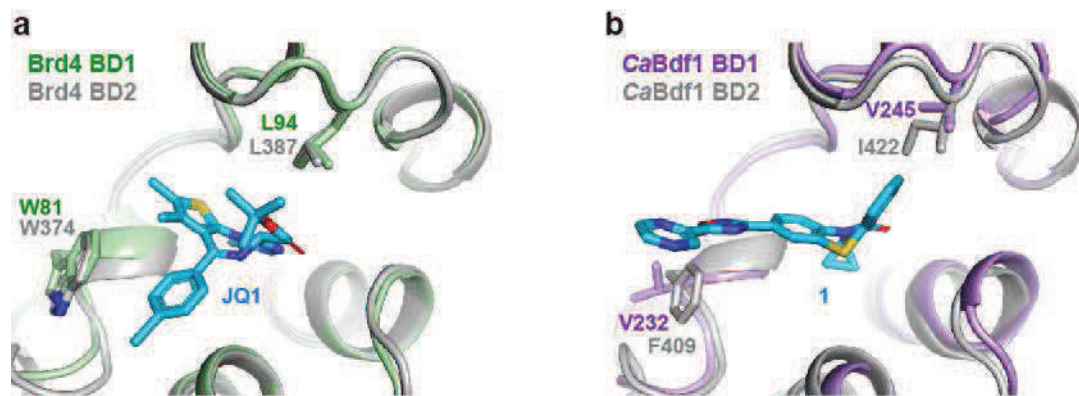
Supplementary Figure 11. Identification of a selective *CaBdf1* BD2 inhibitor. (a) Chemical structure of compound **2**. (b) HTRF assays showing selective inhibition of *CaBdf1* BD2 by **2**. (c) Binding of **2** to *CaBdf1* BDs measured by ITC. (d) Crystal structure of *CaBdf1* BD2 bound to **2**. *Lower inset*. Simulated-annealing omit $F_o - F_c$ density for **2** contoured at 3σ . *Right inset*. Details of the binding site. Residues interacting with **2** through direct and water-mediated hydrogen bonds (dashed lines) are shown in stick representation. Residues interacting through backbone atoms are labelled in parentheses. Water molecules are numbered as in ref.³. (e) Alignment of *CaBdf1* BD2 (violet) with Brd4 BD2 (green; PDB code 4Z93). Side chains are shown for *CaBdf1* residues in contact with **2** and for the corresponding Brd4 residues if divergent from *CaBdf1*. (f) Schematic summary of interactions. Hydrogen bonds are shown as dashed lines. Water molecules are in red. The cation-pi type interaction between the partially charged N468 amino group and the phenol ring is shown as a thick dashed line. Residues mediating van der Waals contacts with **2** are indicated by labels within a cartouche. (g) Surface representation showing the binding pocket of *CaBdf1* BD2 bound to compound **2** (*top*) and that of Brd4 BD2 (*bottom*) superimposed on the fungal complex. Asterisks indicate close contacts predicted to sterically inhibit the recognition of **2** by Brd4 BD2. Double arrows indicate short distances which may contribute additional steric hindrance.



Supplementary Figure 12. Importance of the hydroxyl group in 2 for inhibition of *CaBdf1* BD2. (a) Chemical structure of compound 2 and analogs in which the hydroxyl group is replaced by hydrogen or fluorine. (b) HTRF assays showing the effect of analogs of 2 on the acetylpeptide binding activity of *CaBdf1* BD2. Data represent the mean and s.d. from three independent experiments.



Supplementary Figure 13. Recognition of compound 3 by *CaBdf1* BD1. (a) Chemical structure of *R* and *S* enantiomers of **3**. (b) HTRF assays showing that both enantiomers of **3** inhibit *CaBdf1* BD1 with similar activity. The compound from ChemDiv used in the primary screen is a mix of *R* and *S* enantiomers. Data represent the mean and s.d. from three independent experiments. (c) Crystal structure of *CaBdf1* BD1 bound to **3(S)**. *Inset*, Details of the active site. Residues interacting with **3** through direct and water-mediated hydrogen bonds (dashed lines) are shown. The two hydrogen bonds to atoms of compound **3** are shown in cyan. Hydrogen bonds from water molecules to the ZA loop, to helix B or to other water molecules are in purple, gray, and red, respectively. Residues interacting through backbone atoms are labelled in parentheses. (d) Schematic summary of interactions. Hydrogen bonds are shown as dashed lines and coloured as in (c). (e) Electrostatic surface representation of *CaBdf1* BD1 showing the region surrounding the bound inhibitor. The view is that of Fig. 4d.



Supplementary Figure 14. Signature positions 1 and 3 in the BD1 and BD2 binding pockets. (a) Binding pocket of human Brd4 BD1 (green) and BD2 (green) showing conservation of the Trp and Leu residues at signature positions 1 and 3. (b) Binding pocket of *CaBdf1* BD1 (violet) and BD2 (gray) showing divergence at signature positions 1 (Val232 and Phe409) and 3 (Val245 and Ile422).

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. ITC data for Brd4 and CaBdf1 BDs with JQ1 and compounds 1-3.

Inhibitor	Protein	[Inhibitor] (μM)	[Protein] (μM)	K_D (μM)	ΔH (kJ/mol)	N	$T\Delta S$ (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
JQ1	Brd4 BD1	10	60	0.062 ± 0.016	-53.4 ± 0.5	1.00 ± 0.03	-12.28	-41.12
JQ1	CaBdf1 BD1	10	60	nd ¹	nd	nd	nd	nd
JQ1	CaBdf1 BD2	10	60	nd	nd	nd	nd	nd
1	Brd4 BD1	100	908	nd	nd	nd	nd	nd
1	CaBdf1 BD1	100	908	5.0 ± 2.5	-9.8 ± 2.6	0.91 ± 0.06	20.44	-30.24
1	CaBdf1 BD2	100	908	nd	nd	nd	nd	nd
1	SMARCA2 BD	100	908	nd	nd	nd	nd	nd
1	SMARCA4A BD	100	908	nd	nd	nd	nd	nd
2	CaBdf1 BD1	80	560	nd	nd	nd	nd	nd
2	CaBdf1 BD2	80	560	2.1 ± 0.2	-24 ± 4	1.21 ± 0.11	8.39	-32.39
2	SMARCA2 BD	80	560	nd	nd	nd	nd	nd
2	SMARCA4A BD	80	560	nd	nd	nd	nd	nd
3	Brd4 BD1	100	700	13.4 ± 1.7	-14.8 ± 1.9	0.92 ± 0.03	13.00	-27.80
3	CaBdf1 BD1	100	700	4.8 ± 0.2	-28.5 ± 0.5	1.05 ± 0.03	1.84	-30.34
3	CaBdf1 BD2	100	700	nd	nd	nd	nd	nd

¹nd, not determined (weak binding).

Supplementary Table 2. Crystallographic data collection and refinement statistics.

Bromodomain:	CaBdf1 BD1	CaBdf1 BD1	CaBdf1 BD1	CaBdf1 BD2	CaBdf1 BD2
	(unbound)	+ compound 1	+ compound 3	(unbound)	+ compound 2
PDB ID	XXXX	XXXX	XXX	XXX	XXXX
Data Collection¹					
ESRF beamline	ID23-2	ID30A-1	ID30A-1	ID29	ID-30A-1
Wavelength (Å)	0.8726	0.9650	0.9660	0.9724	0.9660
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2
Unit cell dimensions	a=50.63 Å, b=67.57 Å, c=188.54 Å	a=75.44 Å, b=77.29 Å, c=102.59 Å	a=b=70.41 Å, c=124.17 Å	a=38.75 Å, b=45.20 Å, c=71.83 Å	a=46.49 Å, b=36.00 Å, c=64.50 Å, β=107.61
Molecules in asym. unit	4	4	2	1	2
Resolution range (Å)	54.9 – 2.37	54.1 – 1.76	49.8 – 1.60	45.2 – 1.20	44.3 – 1.45
(outer shell)	(2.45 – 2.37)	(1.82 – 1.76)	(1.66 – 1.60)	(1.24 – 1.20)	(1.50 – 1.45)
No. of measured reflections	132,375 (13,158)	266,479 (25,764)	313,833 (26,686)	229,797 (9523)	84,954 (8522)
No. of unique reflections	27,138 (2644)	59,921 (5873)	41,446 (4131)	39,415 (3330)	34,661 (3549)
Multiplicity	4.9 (5.0)	4.4 (4.4)	7.6 (6.5)	5.8 (2.9)	2.45 (2.40)
Completeness (%)	99.8 (99.9)	99.5 (99.3)	98.3 (99.6)	97.9 (83.8)	95.2 (97.3)
Mean I/sigma(I)	14.5 (2.3)	12.1 (2.3)	16.1 (2.5)	17.0 (3.0)	12.1 (2.6)
R _{merge}	0.088 (0.789)	0.070 (0.626)	0.067 (0.689)	0.050 (0.263)	0.047 (0.442)
R _{meas}	0.098 (0.881)	0.080 (0.708)	0.072 (0.748)	0.055 (0.321)	0.059 (0.549)
R _{pim}	0.044 (0.388)	0.037 (0.324)	0.025 (0.285)	0.022 (0.180)	0.035 (0.321)
CC _{1/2}	0.998 (0.761)	0.998 (0.759)	0.998 (0.812)	0.999 (0.918)	0.998 (0.805)
Refinement					
Resolution used for refinement	48.9 – 2.37	42.7 – 1.76	49.8 – 1.60	38.3 – 1.20	44.3 – 1.45
Reflections used (total/R _{free})	25,719 / 1369	56,817 / 3041	39,332 / 2092	37,375 / 1980	32,851 / 1790
R _{work} /R _{free}	0.2027 / 0.2464	0.1785 / 0.2148	0.2131 / 0.2352	0.1426 / 0.1560	0.1593 / 0.1978
Number of atoms/Mean B-factor (Å ²)					
Protein	4193 / 49.5	4110 / 26.2	2062 / 35.8	877 / 13.4	1736 / 17.3
Water	126 / 42.0	648 / 36.7	259 / 39.3	194 / 30.8	273 / 30.4
Inhibitor	0 / --	120 / 19.5	86 / 38.6	0 / --	25 / 15.9
Other	44 / 100.6	11 / 33.8	10 / 70.3	12 / 18.2	6 / 67.8
RMS deviations:					
Bond distances (Å)	0.002	0.006	0.0038	0.004	0.004
Bond angles (°)	0.454	0.979	0.857	0.763	0.801
Ramachandran analysis (%)					
Favored/ outliers	98.1 / 0.0	99.8 / 0.0	97.3 / 0.0	98.1 / 0.0	100.0 / 0.0
Molprobrity analysis					
Clash Score / Overall score	2.34 / 1.03	2.96 / 1.09	3.71 / 1.30	1.14 / 0.82	2.60 / 1.05

¹ Numbers in parentheses refer to the outer resolution shell.

Supplementary Table 3. RMSD values between human BET and CaBdf1 BD structures.

	RMSD (Å) with CaBdf1	
	Entire BD (100 C α atoms)	Binding pocket (46 C α atoms)
BD1		
Brd2	1.79	0.53
Brd3	1.41	0.39
Brd4	1.36	0.56
Brdt	1.28	0.53
Mean	1.46	0.50
	± 0.23	± 0.08
BD2		
Brd2	1.12	1.36
Brd3	1.10	1.38
Brd4	1.19	1.50
Brdt	1.09	1.39
Mean	1.13	1.41
	± 0.05	± 0.06

Supplementary Table 4. Plasmids used in this study.

Name	Number	Parent	Description	Cassette to transform
5'BDF1-HIS1-3'BDF1	pJG197		pCR2.1 TOPO containing HIS1 marker flanked by upstream and downstream BDF1 sequence	PCR
bdf1-LEU2	pJG214		pCR2.1 TOPO containing BDF1 ORF fused to LEU2 marker and <i>BDF1</i> downstream region	Digestion with Apal
bdf1-bd1Δ-LEU2	pJG224		Identical to pJG214 with a bdf1-bd1Δ ORF	" " "
bdf1-bd2Δ-LEU2	pJG225		Identical to pJG214 with a bdf1-bd2Δ ORF	" " "
bdf1-bd1Δ-bd2Δ-LEU2	pJG226		Identical to pJG214 with a bdf1-bd1Δ-bd2Δ ORF	" " "
bdf1-bd1Y248F-LEU2	pJG215	pJG214	Identical to pJG214 with a bdf1-bd1Y248F ORF	" " "
bdf1-bd2Y425F-LEU2	pJG216	pJG214	Identical to pJG214 with a bdf1-bd2Y425F ORF	" " "
bdf1-bd1Y248F-bd2Y425F-LEU2	pJG217	pJG215	Identical to pJG214 with a bdf1-bd1Y248F-bd2Y425F sequence	" " "
ARG4-pTetO-bdf1	pJG254		pCR2.1 TOPO containing ARG4 marker, tTA-TetR-VP16, Tet operator and flanking regions for integration in <i>BDF1</i> promoter	Digestion with XhoI

Supplementary Table 5. Strains used in this study.

Name ¹	Number	Parent	Genotype
SN152	SN152	SC5314	<i>ura3::imm434::URA3/ura3::imm434 iro1::IRO1/iro1::imm434 his1::hisG/his1::hisG leu2/leu2 arg4/arg4</i>
<i>bdf1</i> Δ / pTetO-BDF1	yCaJG105	SN152	<i>SN152 + bdf1::pTetO-BDF1-ARG4/bdf1Δ::HIS1</i>
BDF1-R / pTetO-BDF1	yCaJG108	yCaJG105	<i>SN152 + bdf1::pTetO-BDF1-ARG4/bdf1::BDF1-R-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd1</i> Δ / pTetO-BDF1	yCaJG120	"	<i>SN152 + bdf1::pTetO-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd1D-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd2</i> Δ / pTetO-BDF1	yCaJG123	"	<i>SN152 + bdf1::pTetO-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd2D-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd1</i> Δ- <i>bd2</i> Δ / pTetO-BDF1	yCaJG127	"	<i>SN152 + bdf1::pTetO-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd1D-bd2D-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd1</i> Y248F / pTetO-BDF1	yCaJG111	"	<i>SN152 + bdf1::pTetO-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd1Y248F-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>Bd2Y425F</i> / pTetO-BDF1	yCaJG114	"	<i>SN152 + bdf1::pTetO-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd2Y425F-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd1</i> Y248F- <i>bd2Y425F</i> / pTetO-BDF1	yCaJG117	"	<i>SN152 + bdf1::pTetO-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd1Y248F-bd2Y425F-LEU2</i>
<i>bdf1</i> Δ/BDF1-TAP	yCaJG49	SN152	<i>SN152 + BDF1::BDF1-TAP-LEU2/bdf1Δ::HIS1</i>
<i>bdf1</i> Δ / pMET-BDF1	yCaJG31	SN152	<i>SN152 + bdf1::pMET-BDF1-ARG4/bdf1Δ::HIS1</i>
BDF1-R / pMET-BDF1	yCaJG37	yCaJG31	<i>SN152 + bdf1::pMET-BDF1-ARG4/bdf1::BDF1-R-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd1</i> Δ / pMET-BDF1	yCaJG81	"	<i>SN152 + bdf1::pMET-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd1D-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd2</i> Δ / pMET-BDF1	yCaJG84	"	<i>SN152 + bdf1::pMET-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd2D-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd1</i> Δ- <i>bd2</i> Δ / pMET-BDF1	yCaJG87	"	<i>SN152 + bdf1::pMET-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd1D-bd2D-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd1</i> Y248F / pMET-BDF1	yCaJG40	"	<i>SN152 + bdf1::pMET-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd1Y248F-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>Bd2Y425F</i> / pMET-BDF1	yCaJG43	"	<i>SN152 + bdf1::pMET-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd2Y425F-LEU2</i>
<i>bdf1</i> - <i>bd1</i> Y248F- <i>bd2Y425F</i> / pMET-BDF1	yCaJG46	"	<i>SN152 + bdf1::pMET-BDF1-ARG4/bdf1::bdf1-bd1Y248F-bd2Y425F-LEU2</i>

¹ Strain SN152 is from ref.⁶. All other strains are from this study

SUPPLEMENTARY DATA FILE 1. Summary of peptide microarray data (Excel spreadsheet).

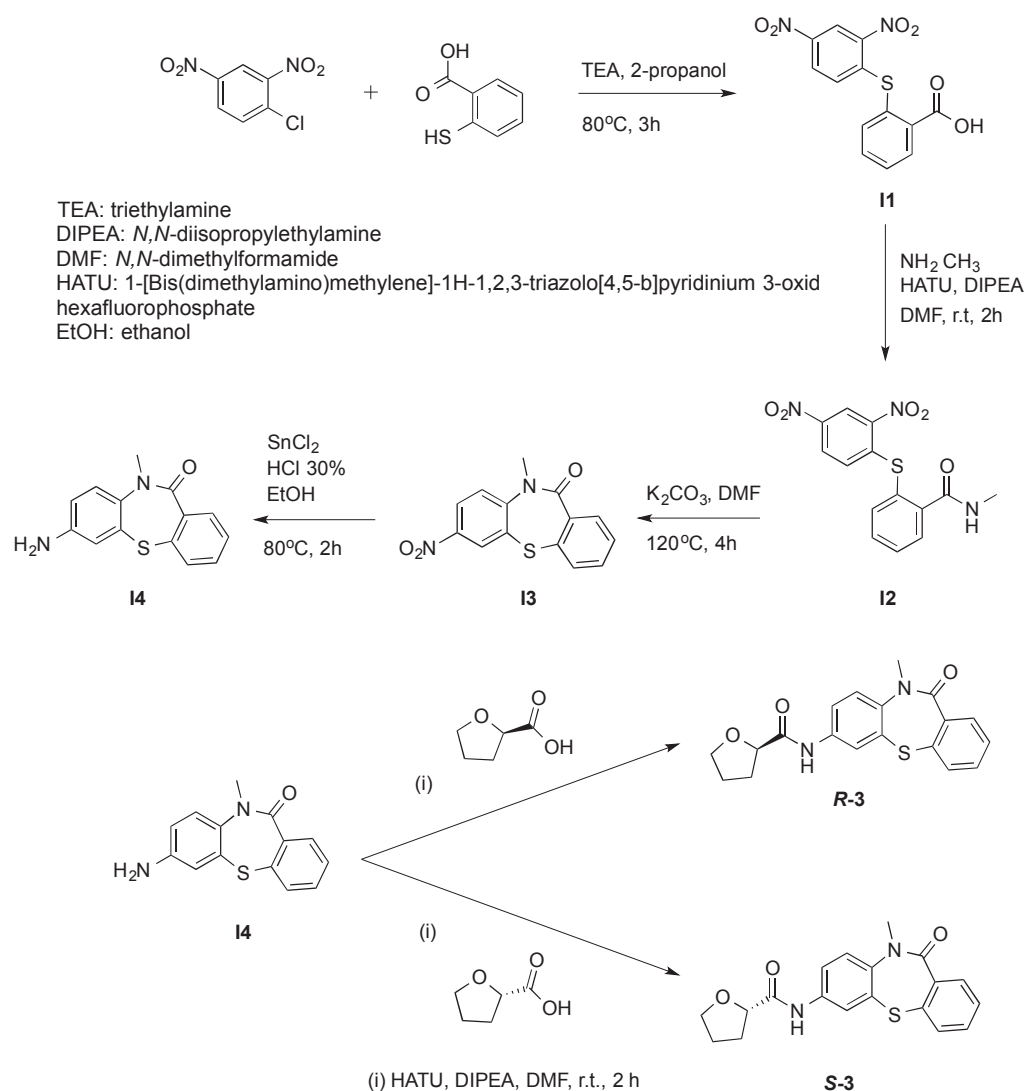
SUPPLEMENTARY METHODS

Synthesis of inhibitors

1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 2-mercaptobenzoic acid, (*R*)-tetrahydrofuran-2-carboxylic acid and (*S*)-tetrahydrofuran-2-carboxylic acid were purchased from Sigma-Aldrich. 2-bromo-1-(4-hydroxyphenyl)ethan-1-one, 2-bromo-1-(4-fluorophenyl)ethan-1-one and 3-methylpyridin-2-amine were purchased from TCI America. *p*-toluidine was purchased from Alfa Aesar. 2-bromo-1-phenylethan-1-one was purchased from Oxchem Corp. All other reagents were purchased from commercial sources and used as obtained. Compounds were synthesized as described below. ¹H, ¹⁹F NMR spectra were obtained on Varian 400-MR and VNMRS-600 NMR Spectrometers. The chemical shifts are relative to external hexafluorobenzene, C₆F₆ (δ - 164.9, ¹⁹F NMR). Multiplicities are quoted as singlet (s), doublet (d), triplet (t) unresolved multiplet (m), doublet of doublets (dd), doublet of doublets (ddd), doublet of triplets (dt) or broad signal (br). All chemical shifts are given on the δ-scale in parts per million (ppm) relative to internal CD₂HOD (δ 3.34, ¹H NMR), CHCl₃ (δ 7.26, ¹H NMR). ¹H, ¹⁹F coupling constants (J value) are given in Hz. The concentration of the NMR samples was in the range of 4-6 mg/mL. Normal phase chromatography was performed using ISCO Combiflash Lumen+. UV and ELS detectors were used. Mass Spectrometry (MS) was performed on a Finnigan LCQ Deca XP Max mass spectrometer equipped with an ESI source in the negative ion mode. The IUPAC names of compounds were assigned using MarvinSketch. All the NMRs were processed and interpreted using MestReNova 9.0.0.

Synthesis of Enantiomers of 3

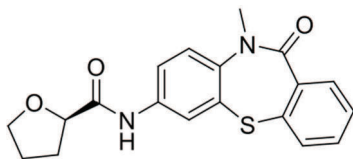
The individual enantiomers of **3** were synthesized by a modification of the method previously reported by Smirnov *et al.*⁷.



0.5 g (2.5 mmol, 1 equiv.) 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 0.38 g (2.5 mmol, 1 equiv.) 2-mercaptobenzoic acid were added to a mixture of 0.68 mL TEA and 3.7 mL 2-propanol. The mixture was heated to 80°C with vigorous stirring for 3 hr. The product was extracted with EtOAc (5 mL x 3). The solvent was then removed under vacuum to get intermediate **I1** (2-((2,4-dinitrophenyl)thio)benzoic acid, 90% yield) for the next step. 0.5 g (1.6 mmol, 1 equiv.) 2-((2,4-dinitrophenyl)thio)benzoic acid **I1** was added to 8.25 mL DMF. 0.713 g (1.2 equiv.) HATU and 0.404 g (2 equiv.) DIPEA were then added to the solution. 0.0586 g (1.1 equiv.) NH₂CH₃ was also added to the mixture. The reaction mixture was stirred vigorously at RT for 2 hr. Intermediate **I2** was extracted with EtOAc (5 mL x 3) and dried under vacuum. The resulting product was further purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc 0-100%) (70% yield). 0.26 g (1 equiv.) of the product and 0.04 g (2 equiv.) K₂CO₃ were then placed in a 10 mL round bottom flask with 2 mL DMF. The mixture was kept at 120°C (oil bath) with vigorous stirring for 4 hr. After solvent removal in vacuum the resulting compound **I3** was washed with DI water and EtOH and dried to get the product (49% yield). 95 mg (1 equiv.) of **I3** was dissolved in EtOAc (3 mL) and mixture of 1 mL EtOH and 300 μL (7 equiv.) 30% HCl was then added to the solution. Finally, 0.262 g (3.5 equiv.) SnCl₂ was added to the reaction mixture. The mixture was heated at 80°C with vigorous stirring for 2 hr. After reaction completion (monitored by TLC) the pH was adjusted to 11 with NaOH. Formed precipitate **I4** was washed 3 times with water and dried under vacuum. Yield 42%. Then 32 mg (1 equiv.) of **I4** and 15.44 mg (1.1 equiv.) of (*R*)- tetrahydrofuran-2-carboxylic acid (or (*S*)-tetrahydrofuran-2-carboxylic acid) were dissolved in 1 mL DMF. 54.75 mg (1.2 equiv.) HATU and 31.02 mg (2 equiv.) DIPEA were then added to the solution. The reaction was vigorously stirred at RT for 2 hr. Product was extracted by EtOAc (5 mL x 3) and dried under vacuum. The resulting product was further purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc 0-100%) and the final compound [**3(R)** or **S-3(S)**]

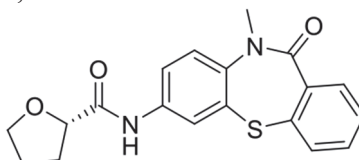
was obtained with 42% yield (18.4 mg).

(*R*)-*N*-(10-methyl-11-oxo-10,11-dihydrodibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-7-yl)tetrahydrofuran-2-carboxamide, the **R-enantiomer of 3**, structure:



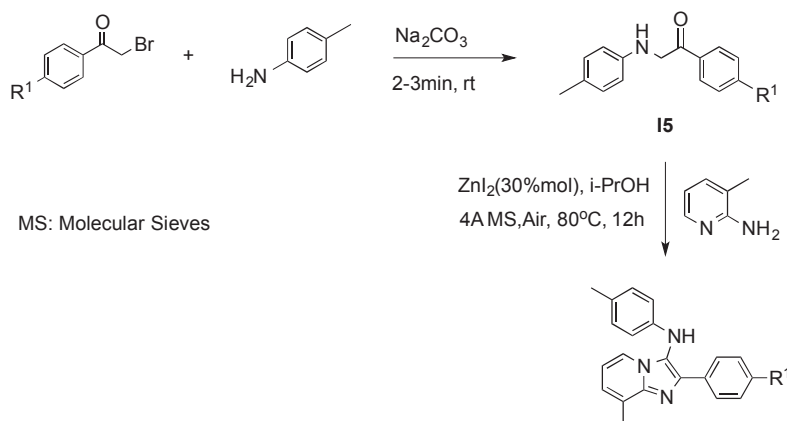
¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.47 (s, 1H), 7.81 (dd, *J* = 46.3, 2.5 Hz, 1H), 7.75 – 7.69 (m, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 49.7, 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.42 (dt, *J* = 7.3, 2.1 Hz, 1H), 7.34 – 7.27 (m, 2H), 7.25 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 8.4, 5.9 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.94 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.35 (dd, *J* = 13.4, 7.3 Hz, 1H), 2.13 (tt, *J* = 8.2, 2.9 Hz, 1H), 2.00 – 1.83 (m, 2H). Calculated for C₁₉H₁₈N₂O₃S: 354.10, Mass found: 355.3 (M+H⁺); 709.0 (2M+H⁺); 731.1 (2M+Na⁺).

(*S*)-*N*-(10-methyl-11-oxo-10,11-dihydrodibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-7-yl)tetrahydrofuran-2-carboxamide, the **S-enantiomer of 3**, structure:



¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.51 (s, 1H), 7.83 (dd, *J* = 30.2, 2.5 Hz, 1H), 7.77 – 7.68 (m, 1H), 7.60 (ddd, *J* = 32.9, 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.47 – 7.40 (m, 1H), 7.34 – 7.25 (m, 3H), 4.44 (dd, *J* = 8.4, 5.9 Hz, 1H), 4.02 (qd, *J* = 7.1, 1.1 Hz, 1H), 3.98 – 3.89 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.85 (s, 2H), 2.42 – 2.30 (m, 1H), 2.20 – 2.08 (m, 1H), 1.94 (dtt, *J* = 19.6, 12.6, 6.7 Hz, 2H). Calculated for C₁₉H₁₈N₂O₃S: Mass found: 355.6 (M+H⁺); 377.4 (M+Na⁺); 730.9 (2M+Na⁺).

Synthesis of 2, 2a and 2b

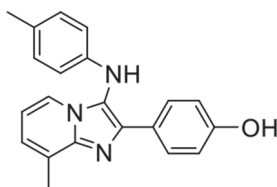


R¹ = OH (**2**), H (**2a**), F (**2b**)

2 mmol (1 equiv) of corresponding 2-bromoacetophenone and 0.235 g (2.2 mmol, 1.1 equiv.) *p*-toluidine were added to a mortar. 0.1 g Na₂CO₃ was added and the mixture was grinded for 2 min at RT until it became yellow⁸. The crude material was washed 3 times with water and dried under the vacuum giving solid material **15** with yields 80-90%. 1 mmol (1 equiv.) of **15** was then dissolved in 6 mL isopropyl alcohol and 0.108 g 3-methylpyridin-2-amine (1 mmol, 1 equiv.) was added dropwise to the solution. Finally, 0.1 g ZnI₂ and 0.5 g 4 Å molecular sieves were added. The mixture was heated at 80°C with vigorous stirring for 12 hr⁹. After reaction completion (monitored by TLC), the product was extracted with EtOAc (5 mL x 3) and washed with DI water (5 mL x 3). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under vacuum. The resulting product was further purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc 0-90%), giving target

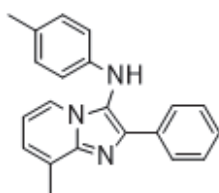
compounds **2**, **2a** or **2b** with yields 18-24%.

4-(8-methyl-3-(*p*-tolylamino)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)phenol, **2**, structure:



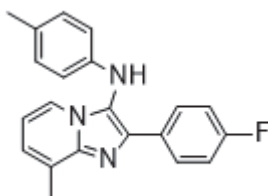
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.79 (d, J = 8.5 Hz, 3H), 7.11 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.81 – 6.75 (m, 3H), 6.42 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.20 (s, 3H). Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$: 329.15 Mass found: 330.4 ($\text{M}+\text{H}^+$).

8-methyl-2-phenyl-N-(*p*-tolyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine, **2a**, structure:



^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.97 – 7.91 (m, 2H), 7.88 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 7.41 – 7.35 (m, 2H), 7.34 – 7.30 (m, 1H), 7.23 (dt, J = 6.9, 1.1 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.89 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 6.48 – 6.36 (m, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.20 (s, 3H). Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3$: 313.16 Mass found: 314.5 ($\text{M}+\text{H}^+$).

2-(4-fluorophenyl)-8-methyl-N-(*p*-tolyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine, **2b**, structure:



^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.01 (dd, J = 8.8, 5.5 Hz, 2H), 7.69 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 7.06 – 6.95 (m, 5H), 6.69 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.25 (s, 3H). ^{19}F NMR (564 MHz, Chloroform- d) δ -105.23, -106.62, -114.35. Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{FN}_3$: 331.15 Mass found: 332.3 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Supplementary References

- 1 Filippakopoulos, P. *et al.* Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* **149**, 214-231 (2012).
- 2 Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067-1073 (2010).
- 3 Flynn, E. M. *et al.* A Subset of Human Bromodomains Recognizes Butyryllysine and Crotonyllysine Histone Peptide Modifications. *Structure* **23**, 1801-1814 (2015).

- 4 Vidler, L. R., Brown, N., Knapp, S. & Hoelder, S. Druggability analysis and structural classification of bromodomain acetyl-lysine binding sites. *J Med Chem* **55**, 7346-7359 (2012).
- 5 Winter, G. E. *et al.* DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* **348**, 1376-1381 (2015).
- 6 Noble, S. M. & Johnson, A. D. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**, 298-309 (2005).
- 7 Smirnov, A. V., Kalandadze, L. S., Sakharov, V. N., Dorogov, M. V. & Ivachtchenko, A. V. Denitrocyclization in synthesis of dibenzo[b,f][1,4]thiazepin-11(10h)-ones and their derivatives. *J Heterocycl Chem* **44**, 1247-1251 (2007).
- 8 Gupta, G. K., Saini, V., Khare, R. & Kumar, V. 1,4-Diaryl-2-mercaptoimidazoles derivatives as a novel class of antimicrobial agents: design, synthesis, and computational studies. *Med Chem Res* **23**, 4209-4220 (2014).
- 9 Han, X., Ma, C. W., Wu, Z. Y. & Huang, G. S. Zinc Iodide Catalyzed Synthesis of 3-Aminoimidazo[1,2-a]pyridines from 2-Aminopyridines and α -Amino Carbonyl Compounds. *Synthesis* **48**, 351-356 (2016).

3.2. Inhibition de la protéine BET Bdf1 chez *C. glabrata*

3.2.1. Contexte et objectifs

Du fait des résultats intéressants obtenus chez *C. albicans*, l'intérêt de l'inhibition des protéines BET est en cours d'évaluation chez d'autres espèces fongiques pathogènes. Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis intéressée à l'étude de Bdf1 chez *C. glabrata*.

C. glabrata est la 2^{ème} espèce du genre *Candida* la plus fréquemment isolée en pathologie humaine en Europe et en Amérique du Nord. Cette espèce présente la particularité d'être génétiquement plus proche de *S. cerevisiae*, espèce considérée comme peu pathogène, que de *C. albicans*. Elle est intrinsèquement peu sensible au fluconazole. De plus, la résistance acquise aux antifongiques, et en particulier aux échinocandines, est relativement fréquente pour cette espèce du fait de son génome haploïde, et associée à des échecs cliniques. Des souches multi-résistantes aux échinocandines et aux antifongiques azolés ont également été récemment décrites chez *C. glabrata*. Le développement de nouvelles stratégies antifongiques efficaces sur cette espèce est donc nécessaire.

L'objectif de ce travail était de démontrer que le gène *BDF1* et ses bromodomains BD1 et BD2 sont essentiels chez *C. glabrata*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Morgane Champleboux et Kaiyao Wei, respectivement étudiante en thèse et étudiant en Master 2 dans l'équipe EDyP du laboratoire BGE (*Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble*).

3.2.2. Résultats

3.2.2.1. *BDF1* est essentiel chez *C. glabrata*

Dans un premier temps a été évalué l'impact de la délétion du gène *BDF1* chez *C. glabrata*. Pour rappel, la délétion des gènes *BDF1* et *BDF2* chez *S. cerevisiae* et du gène *BDF1* chez *C. albicans* est létale : il était donc fortement probable que la délétion de *BDF1* chez *C. glabrata* le soit également. Pour cette raison, plutôt que de construire une souche délétée pour le gène *BDF1* (*bdf1Δ*) potentiellement non viable, le gène *BDF1* a été placé sous le contrôle d'un promoteur inductible pMET, réprimé en présence de méthionine et de cystéine et activé en l'absence de ces acides aminés. Une souche dans laquelle le gène *BDF1* a été remplacé par la cassette pMET-*BDF1* a ainsi été générée.

La capacité de croissance de cette souche a été évaluée en milieu solide, dans des conditions d'activation ou de répression du promoteur pMET. En présence de ces deux acides aminés, la croissance de la souche pMET-*BDF1* est totalement inhibée, suggérant que le gène *BDF1* est essentiel à la croissance de *C. glabrata* (Figure 14A).

Le taux d'expression de la protéine Bdf1 a également été étudié au sein de cette souche par *western-blot*. En l'absence d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine Bdf1 de *C. glabrata* (CgBdf1) a été utilisé un anticorps anti-*S. cerevisiae* Bdf1 (ScBdf1). Cet anticorps reconnaît la protéine CgBdf1, malgré quelques contaminations (données non montrées). Comme attendu, la répression de l'expression de *BDF1* en milieu contenant de la méthionine et de la cystéine entraîne une diminution de la production de CgBdf1 (Figure 14B).

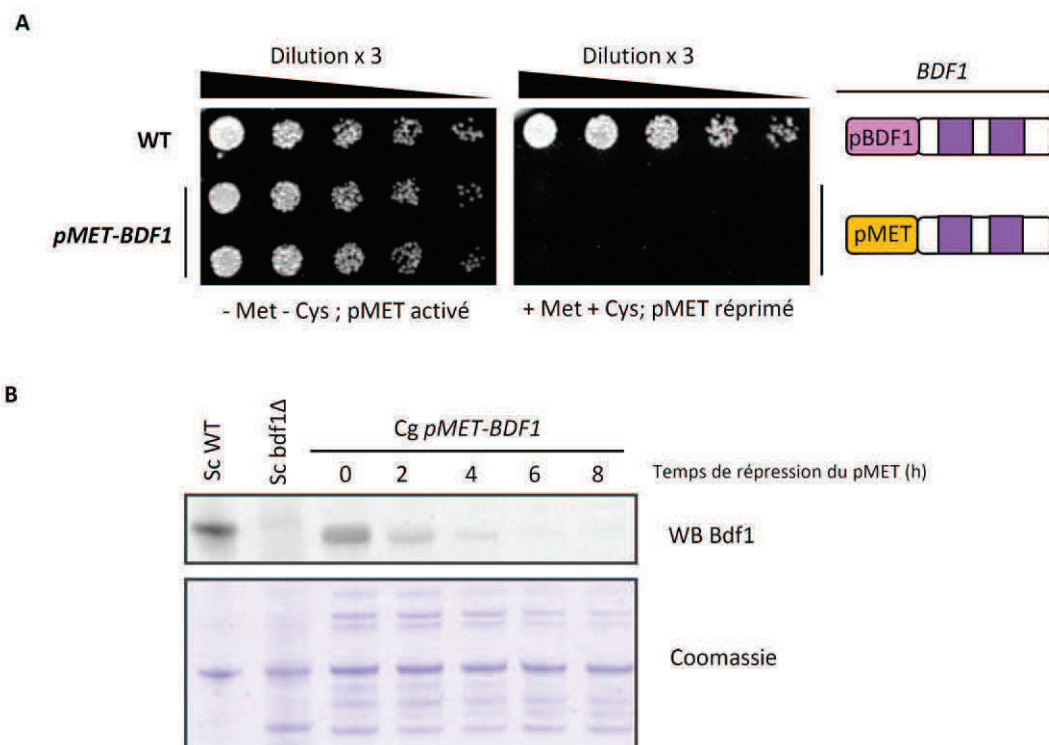


Figure 14 : Caractérisation de la souche *C. glabrata* pMET-*BDF1*

A. Test de croissance de la souche pMET-*BDF1* en milieu solide avec et sans répression du promoteur pMET. Des gouttes de volume égal sont déposées sur les différents milieux, à partir d'une DO initiale égale à 0,13, en respectant des dilutions successives d'un facteur 3. B. Mesure de l'expression de CgBdf1 par western-blot à différents temps de répression du promoteur pMET et extrait de protéines totales observé après coloration au Coomassie.

Par la suite, afin de confirmer que les défauts de croissance et de production de la protéine CgBdf1 sont bien liés à la répression du gène *BDF1* par le promoteur pMET, une souche complémentée pMET-*BDF1* + *BDF1*, dans laquelle le gène *BDF1* et son promoteur endogène ont été

ré-introduits, a été construite. Afin de permettre des comparaisons avec la souche sauvage et la souche pMET-BDF1, le plasmide vide a également été introduit dans ces deux souches. Comme le montre la Figure 15, la production de CgBdf1 et la croissance de *C. glabrata* est restaurée par le plasmide BDF1 et non par le plasmide vide en milieu répresseur. Ces données confirment que le gène *BDF1* est essentiel à la croissance chez *C. glabrata*.

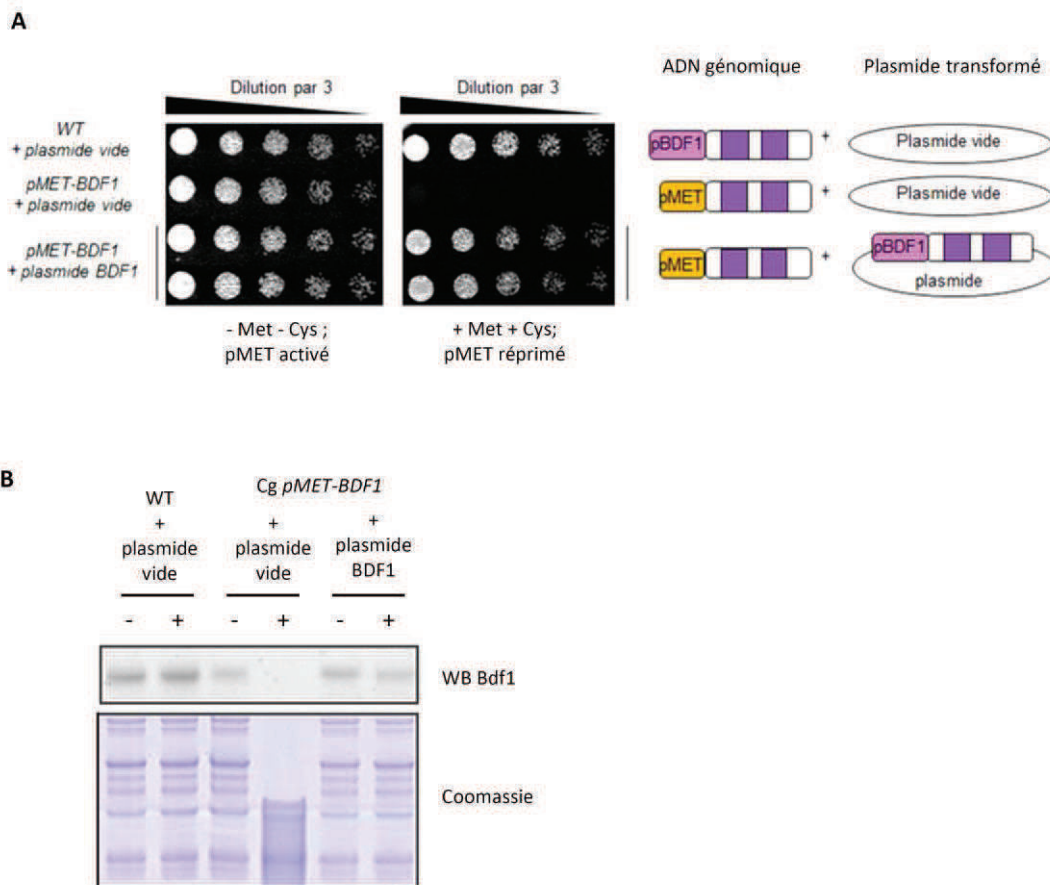


Figure 15 : Restauration de l'expression de *BDF1*

A. Test de croissance des *pMET-BDF1* et *pMET-BDF1* + plasmide BDF1 en milieu solide avec et sans répression du promoteur pMET. Des gouttes de volume égal sont déposées sur les différents milieux, à partir d'une DO initiale égale à 0,13, en respectant des dilutions successives d'un facteur 3. B. Mesure de l'expression de CgBdf1 par western-blot pour les souches *pMET-BDF1* + plasmide vide ou plasmide BDF1 avec (+) et sans (-) répression du promoteur pMET et extraits de protéines totales correspondants observés après coloration au Coomassie.

3.2.2.2. Les bromodomaines BD1 et BD2 de BDF1 sont essentiels chez *C. glabrata*

Dans un deuxième temps, comme pour *C. albicans*, a été investigué le rôle des bromodomaines BD1 et BD2 pour la fonctionnalité de Bdf1 chez *C. glabrata*. Trois souches ont été générées par introduction de plasmides contenant le gène *BDF1* délété pour BD1, BD2 ou les deux bromodomaines dans la souche pMET-BDF1.

La capacité de croissance en milieu solide ainsi que le taux de production et le poids moléculaire de CgBdf1 ont été étudiés pour ces trois souches en conditions d'activation et de répression du promoteur pMET. La délétion d'un ou des deux bromodomaines est associée à une modification du poids moléculaire de CgBdf1 lorsque le promoteur pMET est réprimé. De plus, la délétion des deux bromodomaines BD1 et BD2 (et non celle de BD1 ou BD2 uniquement) est associée à un défaut de croissance en conditions de répression, ce qui suggère que les deux bromodomaines de CgBdf1 sont essentiels (Figure 16).

Des mutations ponctuelles des bromodomaines BD1 et BD2 de CgBdf1 ont ensuite été générées afin d'évaluer si l'intégrité des bromodomaines est essentielle à la croissance de *C. glabrata*. Ces mutations ont été générées en position 186 et 383 de CgBdf1, par homologie aux mutations des bromodomaines décrites chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* et associées à une perte de liaison à la chromatine. Comme précédemment, trois souches ont été générées par introduction dans la souche pMET-BDF1 de plasmides contenant le gène *BDF1* muté dans BD1 (Y186F), BD2 (Y343F) ou les deux bromodomaines. En conditions de répression, la protéine CgBdf1 mutée est produite. La présence de mutations de BD1 et BD2 est associée à un défaut de croissance de *C. glabrata* lorsque le promoteur pMET est réprimé. Ce défaut de croissance n'est pas observé lorsque seule la mutation de BD1 ou la mutation de BD2 sont présentes. L'intégrité des deux bromodomaines de Bdf1 est donc essentielle chez *C. glabrata* (Figure 16).

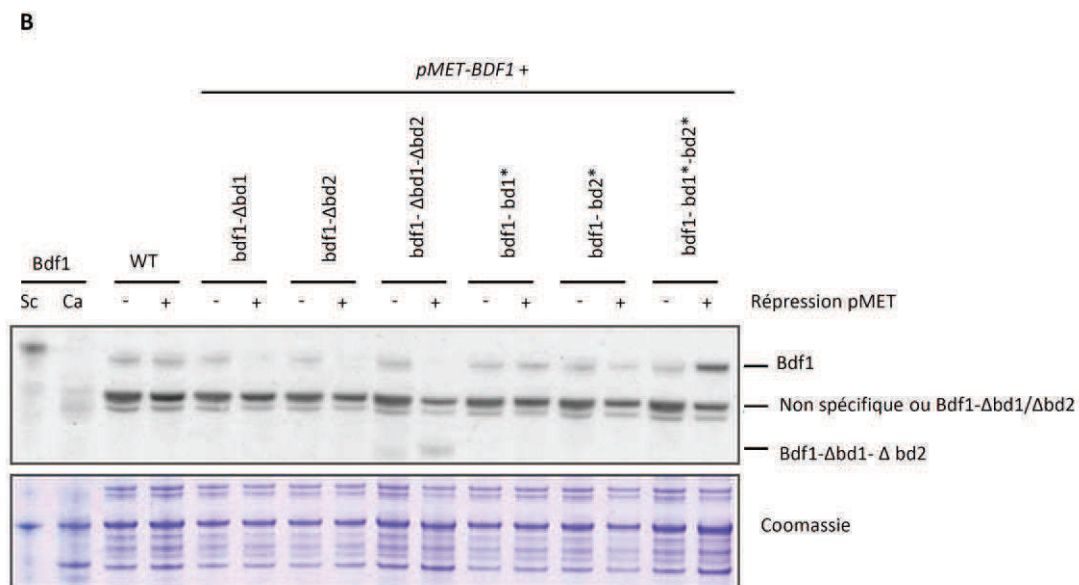
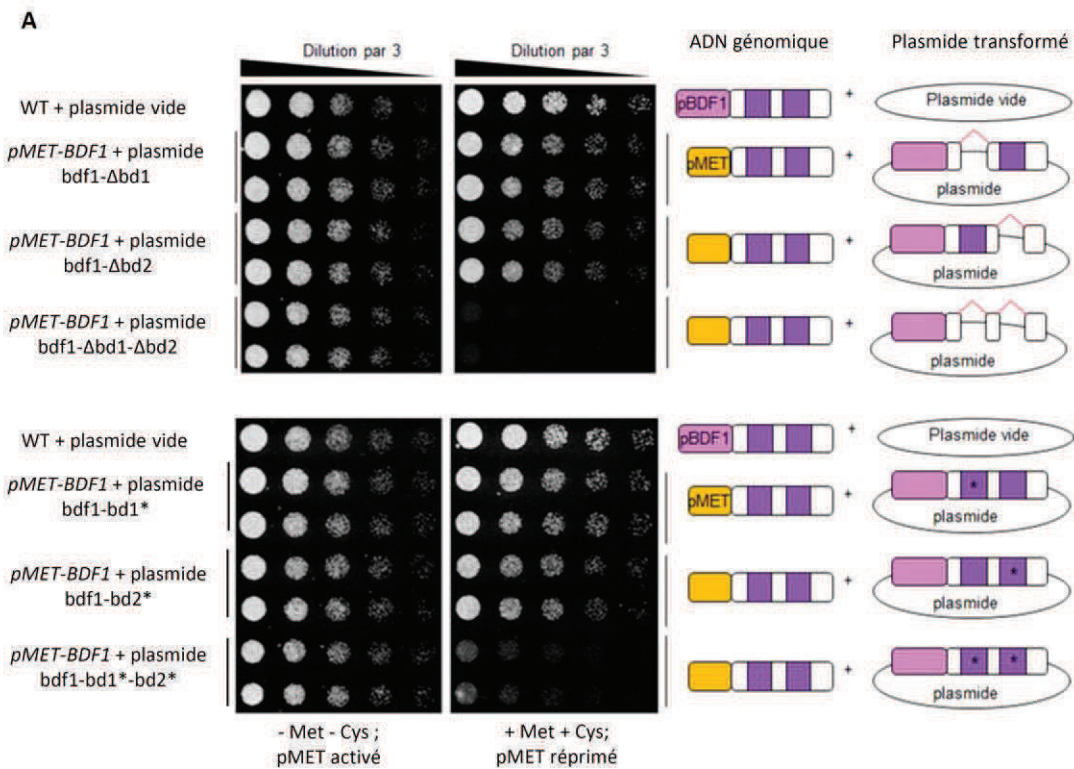


Figure 16 : Impact de la délétion ou de la mutation des bromodomaines BD1 et/ou BD2 de Bdf1 sur la croissance en milieu solide et la production de la protéine.

A. Test de croissance des différentes souches délétées ou mutées pour les bromodomaines BD1 et/ou BD2 de Bdf1 en milieu solide avec et sans répression du promoteur *pMET*. Des gouttes de volume égal sont déposées sur les différents milieux, à partir d'une DO initiale égale à 0,13, en respectant des dilutions successives d'un facteur 3. B. Mesure de l'expression de CgBdf1 par western-blot pour les différentes souches délétées ou mutées pour les bromodomaines BD1 et/ou BD2 avec (+) et sans (-) répression du promoteur *pMET* et extraits de protéines totales correspondants observés après coloration au Coomassie.

3.2.2.3. Conclusion

Ce travail a permis de démontrer que le gène *BDF1* et l'intégrité des deux bromodomains BD1 et BD2 de Bdf1 sont essentiels à la croissance chez *C. glabrata*. Comme chez *C. albicans*, et malgré une distance génétique importante entre ces deux espèces, la protéine Bdf1 pourrait donc représenter une cible antifongique intéressante chez *C. glabrata*. Cette perspective sera développée dans la partie 5 : Discussion.

3.2.3. Matériel et méthodes

3.2.3.1. Souches et plasmides

Les souches et plasmides utilisés dans ce travail sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

Le plasmide *pMET-BDF1* a été généré par fusion de la région 5' flanquante de *BDF1* (500 pb), du marqueur *HIS3* (amplifié à partir de la souche *C. glabrata* ATCC 2001), de la cassette pMET issue du plasmide pCU-MET3 et des 500 premières paires de base de *BDF1*, dans le plasmide PCR2.1-TOPO, à l'aide du kit Gibson Assembly (New England Biolabs).

Le plasmide *BDF1* a été généré par ajout du promoteur endogène de *BDF1* (600 pb) et du gène *BDF1* dans le plasmide pGRB2.0 (Addgene). Il en est de même pour les plasmides *bdf1-bd1Δ* (délétion des acides aminés 148 à 226), *bdf1-bd2Δ* (délétion des acides aminés 325 à 403) et *bdf1-bd1Δ-bd2Δ*. Les plasmides *bdf1-bd1** (mutation Y186F), *bdf1-bd2** (mutation Y343F) et *bdf1-bd1*-bd2** ont été construits à l'aide du kit Quickchange site directed mutagenesis (Agilent) à partir du plasmide *BDF1*.

La cassette *pMET-BDF1*, obtenue par digestion du plasmide *pMET-BDF1* par les enzymes XhoI et SacI, et les différents plasmides *BDF1* ont été transformés dans *C. glabrata* selon un protocole lithium-acétate adapté à partir des données de la littérature (179,218). Brièvement, les levures sont cultivées en milieu SC approprié jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ entre 0,5 et 0,8. Un aliquot (5 mL) de cette suspension est alors lavé trois fois et re-suspendu dans 200 µL de milieu LiOAc/TE (100 mM LiOAc, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL pH 7,5). Les levures sont ensuite incubées 30 minutes à 30°C en présence de 50 µL d'ADN de sperme de saumon dénaturé à 2 mg/mL, 4 µg de l'ADN à transformer et 1 mL de milieu PEG (40 % PEG-3350, 100 mM LiOAc, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL pH 7,5), puis soumises à un choc thermique de 15 minutes à 42°C. Les levures sont alors lavées trois fois à l'eau stérile, puis étalées sur le milieu SC approprié.

Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés pour le projet Bdf1 *C. glabrata*

Nom du plasmide	Plasmide parental	Fragments assemblés	Séquence des amorces utilisées
pMET-BDF1	pCR2.1 TOPO	5'BDF1	GACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCACCCGCCCTTTTTGC ATCTGATTACGATCTTGCCTGCATTGGTTCGAAGCTCCTCTTCAACTCC CACAAAGAGGAGTTGAAGAGGAGCTTCGACCAATGCACGCAAGATCGTAA CAATAACCTGCAGTCCCTACCTCCATCCTATATCGTGTTCGTGCGT AGAAAATACGCACGAACACGATATAGAGGATGGAGGTAGGGAAGTGCAGG CTGGGTGGCAGTTCACGTTTATTCTAGATTGTTAGGTGTTCTTTCTGG TCCAGAAAAGAAACACCTAACAATCTAGAATGAACGTTGAAGTCCACC GGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGTTGGCGTTCAGCTTG
		CgHIS3	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
		pMET	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TTGACGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTTTCAACTCTTGACAGCCTTG GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
		<i>BDF1</i>	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TTGACGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTTTCAACTCTTGACAGCCTTG GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
<i>bdf1-bd1Δ</i>	pGRB2.0 URA3	<i>bdf1</i> en amont de BD1	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TTGACGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTTTCAACTCTTGACAGCCTTG GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
		<i>bdf1</i> en aval de BD1	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TACAATGGTCTGTCGGCCATTTGTGTTTCGAGGCGTACTTCTTGCTCAT AGAGAGTTGATGAGCAAGAAGTACGCCTCGAACACAAAATGGGCCGACAG GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
<i>bdf1-bd2Δ</i>	pGRB2.0 URA3	<i>bdf1</i> en amont de BD2	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TACAATGGTCTGTCGGCCATTTGTGTTTCGAGGCGTACTTCTTGCTCAT AGAGAGTTGATGAGCAAGAAGTACGCCTCGAACACAAAATGGGCCGACAG GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
		<i>bdf1</i> en aval de BD2	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TTGACGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTTTCAACTCTTGACAGCCTTG GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC TACAATGGTCTGTCGGCCATTTGTGTTTCGAGGCGTACTTCTTGCTCAT AGAGAGTTGATGAGCAAGAAGTACGCCTCGAACACAAAATGGGCCGACAG GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
<i>bdf1-bd1Δ-bd2Δ</i>	pGRB2.0 URA3	<i>bdf1</i> en amont de BD1	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TTGACGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTTTCAACTCTTGACAGCCTTG GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC TACAATGGTCTGTCGGCCATTTGTGTTTCGAGGCGTACTTCTTGCTCAT AGAGAGTTGATGAGCAAGAAGTACGCCTCGAACACAAAATGGGCCGACAG GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
		<i>bdf1</i> entre BD1 et BD2	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TTGACGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTTTCAACTCTTGACAGCCTTG GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC TACAATGGTCTGTCGGCCATTTGTGTTTCGAGGCGTACTTCTTGCTCAT AGAGAGTTGATGAGCAAGAAGTACGCCTCGAACACAAAATGGGCCGACAG GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
		<i>bdf1</i> en aval de BD2	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCCCT TTGACGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTTTCAACTCTTGACAGCCTTG GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC TACAATGGTCTGTCGGCCATTTGTGTTTCGAGGCGTACTTCTTGCTCAT AGAGAGTTGATGAGCAAGAAGTACGCCTCGAACACAAAATGGGCCGACAG GGCCGCTCTAGAAGTAGTGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAAGTGC
<i>bdf1-bd1*</i>	<i>BDF1</i>	Quickchange	GTTGCCCTGAACATCCCCTTATTCTTCAACTTCATCAAGAGACC GGTCTCTTGATGAAGTTGAAGAATAAGGGGATGTTCCAGGGCAAC
<i>bdf1-bd2*</i>	<i>BDF1</i>	Quickchange	CGCATTGAACTGCCAACATTCTTTCGACTACGTCAAAG CTTTGACGTAGTCAAGAATGTTGGGCAGTTCATGCG
<i>bdf1-bd1*-bd2*</i>	<i>bdf1-bd1*</i>	Quickchange	GTTGCCCTGAACATCCCCTTATTCTTCAACTTCATCAAGAGACC GGTCTCTTGATGAAGTTGAAGAATAAGGGGATGTTCCAGGGCAAC

Tableau 4 : Liste des souches utilisées pour le projet Bdf1 *C. glabrata*

Souche	Souche parentale	Plasmide intégré	Génotype
WT (ATCC 200989)			ura3Δ, his3Δ, trp1Δ
WT + plasmide vide	WT	pGRB2.0 URA3	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, pGRB2.0 URA3
pMET-BDF1	WT		ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3
pMET-BDF1 + plasmide vide	pMET-BDF1		ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + pGRB2.0 URA3
pMET-BDF1 + BDF1	pMET-BDF1	<i>BDF1</i>	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide BDF1-URA3
pMET-BDF1 + <i>bdf1-bd1Δ</i>	pMET-BDF1	<i>bdf1-bd1Δ</i>	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide <i>bdf1-bd1Δ</i> -URA3
pMET-BDF1 + <i>bdf1-bd2Δ</i>	pMET-BDF1	<i>bdf1-bd2Δ</i>	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide <i>bdf1-bd2Δ</i> -URA3
pMET-BDF1 + <i>bdf1-bd1Δ-bd2Δ</i>	pMET-BDF1	<i>bdf1-bd1Δ-bd2Δ</i>	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide <i>bdf1-bd1Δ-bd2Δ</i> -URA3
pMET-BDF1 + <i>bdf1-bd1*</i>	pMET-BDF1	<i>bdf1-bd1*</i>	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide <i>bdf1-bd1*</i> -URA3
pMET-BDF1+<i>bdf1-Bd2*</i>	pMET-BDF1	<i>bdf1-bd2*</i>	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide <i>bdf1-bd2*</i> -URA3
pMET-BDF1+<i>bdf1-bd1*-bd2*</i>	pMET-BDF1	<i>bdf1-bd1*-bd2*</i>	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide <i>bdf1-bd1*-bd2*</i> -URA3

3.2.3.2. Conditions de culture

Les levures ont été cultivées à 30°C, en milieu YPD (yeast extract 0,5%, peptone 1% et glucose 2%) ou SC (Synthetic Complete : Yeast Nitrogen Base 0,17 %, ammonium sulfate 0,5 %, glucose 2 % et acides aminés 0,2 %), solide ou liquide. Les milieux SC-M-C (SC sans méthionine ni cystéine), SC+M+C (SC + méthionine 5mM + cystéine 0,25 mM) et SC+M+C-U (SC + méthionine 5mM + cystéine 0,25 mM sans uracile) ont également été utilisés pour permettre le contrôle de l'expression du promoteur pMET.

3.2.3.3. Test de croissance en milieu solide

Les levures ont été cultivées en milieu SC-M-C jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,8, puis récupérées par centrifugation et re-suspendues dans de l'eau stérile de façon à obtenir une DO₆₀₀ égale à 0,13. Des dilutions successives d'un facteur 3 ont ensuite été réalisées à partir de ces suspensions calibrées, et des gouttes de volume égal ont été déposées sur milieu approprié. Les boîtes ont été incubées 24h à 30°C.

3.2.3.4. Extraction des protéines totales, SDS-page et *western-blot*

Brièvement, les levures ont été cultivées en milieu SC approprié jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,8, puis récupérées par centrifugation, lavées dans du PBS et re-suspendues dans du tampon TENG 300 (Tris-Cl pH 7,5 50 mM ; NaCl 300 mM ; NP-40 0,5% ; EDTA 1 mM ; glycérol 10% ; PMSF 0,5 mM ; cComplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)). Les levures ont ensuite subi une lyse mécanique à l'aide de billes de zirconium de 0,7 mm de diamètre. Le surnageant a été collecté par centrifugation (15 min, 10000 g, 4°C), puis la concentration en protéines estimées par la méthode Bradford.

Cinq à 10 µg de l'extrait de protéines totales a ensuite été déposé sur gel (NuPAGE 8% Bis-Tris Midi Gel, Thermo Fisher Scientific Inc.) et suivi d'une migration de 1h30 à 6h à 110V. Les western-blot ont été réalisés par transfert semi-dry sur une membrane de PVDF (Biorad). La membrane a ensuite été incubée dans du PBS + Tween 0,1% + lait 5% pendant 45 minutes, puis en présence de l'anticorps primaire anti-ScBdf1 (1/1000) pendant une nuit. Après lavage, la membrane a alors été incubée en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin marqué à la HRP (1/5000), et révélée par la solution ECL (Biorad).

Après migration, le SDS-Page a été coloré par le Coomassie Bio-Safe (Biorad) pendant 90 minutes, puis décoloré à l'eau.

PARTIE 5 : DISCUSSION

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse a permis de répondre au moins partiellement aux objectifs initiaux de mon projet de thèse : l'étude de la tolérance et de la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. et la caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles impliquées dans ces processus.

Dans un premier temps, j'ai pu appréhender de nouveaux mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques chez *C. albicans* et *C. glabrata* par l'analyse par séquençage nouvelle génération d'isolats cliniques résistants ou évoluant vers la résistance aux antifongiques. Dans un second temps, j'ai pu démontrer le potentiel de l'inhibition de la voie de signalisation du pH ou voie Rim en tant que nouvelle cible thérapeutique chez *C. albicans*, en association avec les antifongiques actuellement commercialisés. Enfin, j'ai pu montrer le rôle essentiel de la protéine Bdf1 et de ses bromodomains chez *C. glabrata*, confirmant l'intérêt de l'inhibition des protéines BET fongiques comme nouvelle stratégie antifongique.

Je me suis focalisée sur les deux espèces les plus fréquemment responsables de candidoses invasives en Europe et aux Etats-unis : *C. albicans* et *C. glabrata*. Bien que toutes deux appartiennent au genre *Candida*, ces deux espèces diffèrent en de nombreux points. *C. glabrata* est génétiquement plus proche de *S. cerevisiae*, considérée comme peu pathogène, que de *C. albicans*. *C. glabrata* est une espèce haploïde, tandis que *C. albicans* est diploïde. Enfin, si la résistance aux antifongiques est encore rare chez *C. albicans*, contrairement à *C. glabrata*, il s'agit de l'espèce la plus étudiée sur les plans fondamental, moléculaire et fonctionnel. Il est donc important de mener des travaux scientifiques sur ces deux espèces.

1. Identification de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.

La première partie de mon travail de thèse concernait la détection de mutations associées à la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. par séquençage nouvelle génération.

Après validation de la technique, 6 gènes préalablement impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés ou aux échinocandines (*ERG11*, *ERG3*, *TAC1*, *CgPDR1*, *FKS1* et *FKS2*) ont été séquencés, intégralement ou partiellement, pour 31 isolats cliniques, dont 8 isolats résistants aux antifongiques azolés ou aux échinocandines, et 23 isolats sensibles ou résistants aux antifongiques prélevés à différents temps chez 10 patients, dans le but d'investiguer les mécanismes moléculaires de résistance à ces antifongiques.

1.1. Mutations associées à la résistance aux échinocandines

Une mutation des gènes *FKS* associée à la résistance aux échinocandines a été identifiée pour chacun des isolats résistants aux échinocandines analysés dans cette étude. La substitution S645P de *Fks1* mise en évidence pour l'isolat de *C. albicans* résistant aux échinocandines est l'une des plus fréquemment retrouvée chez cette espèce. De même, deux des trois mutations des gènes *FKS* détectées pour les isolats de *C. glabrata* résistants aux échinocandines sont parmi les plus fréquentes pour cette espèce, responsables des substitutions F659S et S663P (120). Ces isolats résistants étaient majoritairement issus de patients ayant été exposés aux échinocandines, confirmant le rôle de la pression antifongique dans la survenue de résistance acquise à ces antifongiques.

De manière surprenante, une mutation inédite du gène *FKS2* conduisant à la substitution S663A a été détectée pour un des isolats. Comme vu précédemment, cette position est l'une des plus fréquemment mutée chez *C. glabrata*, mais n'avaient jusqu'ici été décrites que les substitutions S663P et S663F. La substitution S663A résulte de la mutation T1987G, qui correspond au changement d'une purine (T) par une pyrimidine (G), évènement génétique peu fréquent. Il est fortement probable que cette mutation soit associée à la résistance aux échinocandines. Toutefois, dans notre étude, sa contribution à la résistance est difficile à évaluer car cette mutation a été détectée en association avec une autre mutation du gène *FKS2*, F659S, elle-même associée à la résistance. Il serait intéressant de construire une souche de *C. glabrata* possédant la seule mutation S663A afin d'étudier l'impact de cette substitution sur la sensibilité aux échinocandines et le *fitness* de cette espèce *in vitro*.

1.2. Mutations associées à la résistance aux antifongiques azolés

Contrairement aux isolats résistants aux échinocandines analysés dans cette étude pour lesquels une mutation des gènes *FKS* a systématiquement été détectée, aucune mutation associée à la résistance aux antifongiques azolés n'a été mise en évidence lors de l'analyse d'isolats résistants à ces antifongiques dans cette étude. Pour ces isolats, soit aucune mutation n'a été détectée dans les gènes étudiés en dehors de mutations de polymorphisme, soit des mutations inédites, dont l'implication dans la résistance reste à évaluer, ont été mises en évidence, à l'exemple des substitutions D103N du gène *ERG3* (*C. albicans*) et T370I du gène *CgPDR1* (*C. glabrata*). L'absence de détection de mutations pour la plupart des isolats résistants aux antifongiques azolés peut s'expliquer par le fait qu'un séquençage seulement partiel, ciblé sur les régions *hot spot*, a été réalisé pour certains gènes. Une autre hypothèse est l'occurrence de mutations dans d'autres gènes dont

l'implication dans la résistance aux antifongiques n'a pas encore été démontrée à ce jour, et qui n'ont donc pas été analysés dans cette étude.

Aucune mutation du gène *ERG11* codant pour la cible des antifongiques azolés n'a été détectée. Ce résultat n'est pas surprenant pour *C. parapsilosis* et *C. glabrata*, car ce mécanisme de résistance est aujourd'hui respectivement considéré comme minoritaire au profit de l'efflux pour *C. parapsilosis* et n'a jamais été décrit pour *C. glabrata* (219).

La mutation W228Stop du gène *ERG3* a été détectée à l'état hétérozygote pour deux isolats de *C. albicans*, sensibles aux antifongiques azolés. Cette mutation a déjà été associée à la résistance aux antifongiques azolés à l'état homozygote.

1.3. Intérêt d'une approche multigénique pour l'étude de la résistance aux antifongiques

L'analyse simultanée de plusieurs gènes d'un même isolat par séquençage nouvelle génération a permis de mettre en évidence des mutations dans des gènes impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés conjointement à des mutations dans des gènes impliqués dans la résistance aux échinocandines pour deux isolats de *C. glabrata*. L'un possédait une mutation S663P du gène *FKS2* ainsi qu'une duplication de deux nucléotides au sein du gène *CgPDR1*, à l'origine de l'apparition d'un codon-stop précoce et de la génération d'une protéine tronquée au niveau du domaine inhibiteur putatif. De manière surprenante, cette souche possède des CMI aux antifongiques azolés bien plus faibles que celles habituellement retrouvées pour cette espèce : fluconazole = 1 mg/L, voriconazole = 0,03 mg/L. Cette hypersensibilité aux antifongiques azolés pourrait s'expliquer par la mutation du gène *CgPDR1* présente pour cette souche : en effet, celle-ci serait associée à la production d'une protéine CgPdr1 non fonctionnelle, à l'origine d'une diminution de l'efflux des antifongiques. Il s'agirait alors de la première mutation perte de fonction décrite au sein de CgPdr1. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant par RT-qPCR le taux d'expression des gènes codant pour les transporteurs *CgCDR1*, *PDH1* et *CgSNQ2* dans cette souche par rapport à une souche contrôle. Un seul isolat étant disponible pour ce patient, il n'a pas été possible de déterminer l'ordre d'apparition de ces mutations au cours du temps.

Un autre isolat possédait à la fois deux mutations du gène *FKS2*, F659S et S663A, et une mutation inédite du gène *CgPDR1*. Cette souche est résistante aux antifongiques azolés : CMI fluconazole > 64 mg/L et CMI voriconazole >8 mg/L. Cette mutation pourrait donc être une mutation gain de fonction de CgPdr1, comme de nombreuses autres qui ont déjà été décrites chez cette espèce (92). Dans ce cas également, l'étude de l'influence de cette mutation sur le taux d'expression des transporteurs impliqués dans l'efflux serait intéressante. L'analyse de deux isolats pour ce patient a permis de mettre en évidence que la mutation du gène *CgPDR1* est apparue avant celles du gène *FKS2*.

Il serait également intéressant d'analyser l'impact de ces mutations sur le *fitness in vitro* et la virulence des souches *in vivo*. En effet, certaines mutations comme la mutation S663P du gène *FKS2* sont associées à une diminution du *fitness* et de la virulence, tandis que d'autres, comme les mutations GOF de *CgPDR1*, sont associées à une augmentation du *fitness* et de la virulence. Ces dernières pourraient donc être sélectionnées positivement, et plus à même d'être transmises d'un patient à un autre, directement ou par l'intermédiaire du personnel. Cela permettrait aussi d'évaluer s'il s'agit d'associations de mutations fortuites, ou si certaines mutations ont pu apparaître en compensation des premières mutations. Cette deuxième hypothèse est toutefois peu probable pour le second isolat possédant des mutations de *FKS2* et *CgPDR1*.

Une association de mutations du gène *FKS1*, gène impliqué dans la résistance aux échinocandines, et du gène *ERG3*, gène impliqué dans la résistance aux antifongiques azolés, a également été détectée pour un isolat de *C. albicans*, résistant aux échinocandines et sensibles aux azolés. La mutation du gène *ERG3*, D103N, a été retrouvée à l'état hétérozygote. L'implication de cette mutation dans la résistance aux antifongiques azolés pourrait être étudiée par exemple par détermination des CMI aux antifongiques azolés et analyse de la composition membranaire en stérols d'une souche présentant cette mutation à l'état homozygote.

1.4. Conclusion

Par la détection simultanée de mutations dans différents gènes, ces résultats confirment l'intérêt d'une approche multigénique, voire d'une approche génome entier, pour l'exploration des mécanismes associés à la résistance aux antifongiques.

Compte-tenu de la taille importante du génome des cellules fongiques, bien supérieure à celui des virus ou des bactéries, et des contraintes techniques des plateformes de séquençage, l'approche génome entier est aujourd'hui encore peu développée en mycologie. Deux études ont toutefois déjà évaluées l'intérêt d'une telle approche dans l'étude des mécanismes associés à la résistance aux antifongiques, l'une chez *C. glabrata*, l'autre chez *C. albicans* (111,123). Toutes deux ont permis d'identifier de nouveaux gènes ou mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance. Le développement des techniques de séquençage de 3^{ème} et aujourd'hui de 4^{ème} génération, permettant le séquençage de fragments d'ADN de grande taille, devrait permettre de faciliter de telles études chez *Candida* spp. et apporter de nouvelles connaissances indispensables à la compréhension des mécanismes associés à la résistance aux antifongiques.

2. Implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans*

Dans un second temps, mon travail de thèse a porté sur l'étude de l'implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines et des mécanismes associés. Cette voie est impliquée dans la signalisation du pH chez les levures, et est activée en réponse à un pH neutre ou alcalin.

2.1. La voie Rim est impliquée dans la tolérance aux antifongiques chez *C. albicans*

Dans un premier temps a été étudiée l'implication des différentes protéines de la voie Rim dans la réponse aux antifongiques chez *C. albicans*. Des tests de croissance en milieu solide, en conditions alcalines et en présence de divers antifongiques azolés ou échinocandines ont permis de montrer que l'ensemble des mutants *rim* est hypersensible à ces antifongiques. Ce résultat suggère une implication de la voie Rim dans la tolérance ou la résistance à ces molécules. Afin de préciser ce point ont été réalisés des tests de fongicidie en milieu liquide ou *time-kill curves*. Ces tests, qui permettent de différencier une activité fongistatique d'une activité fongicide d'une molécule donnée vis-à-vis d'une souche donnée, sont recommandés pour l'étude de la tolérance aux antifongiques (88). Toutefois, ces tests en milieu liquide favorisent la filamentation, et de ce fait leur utilisation s'est avérée impossible pour l'évaluation de l'activité des échinocandines, l'agglutination des filaments rendant inappropriée la détermination du nombre de colonies sur boîte (157). Dans ce travail, nous avons réalisé des tests de fongicidie en milieu liquide pour les antifongiques azolés en milieu alcalin : en effet, afin d'étudier l'implication de la voie Rim dans la tolérance à ces molécules, il était nécessaire de travailler dans des conditions de pH permettant une activation de cette voie de signalisation. Cependant, la filamentation étant induite à pH alcalin, ces tests se sont révélés ininterprétables, principalement en raison de la filamentation importante de la souche contrôle (les mutants *rim* présentant des défauts de filamentation, le problème était moindre pour ces souches). Ne pouvant agir sur le pH, nous avons diminué l'inoculum initial : cela a permis de confirmer l'hypersensibilité des mutants *rim* aux antifongiques azolés. Il n'a pas été mis en évidence de diminution significative de l'inoculum initial au cours du temps, suggérant que les antifongiques azolés restent fongistatiques vis-à-vis des mutants *rim*. Toutefois, un tel inoculum ne permet pas de démontrer une réelle activité fongicide (diminution de 3 log de l'inoculum initial) avec le protocole utilisé. L'interprétation de ces tests de fongicidie en milieu alcalin reste donc délicate. Les CMI des mutants *rim* et des souches contrôles pour les antifongiques azolés et les échinocandines, déterminées par la technique de référence EUCAST à pH neutre, ne différaient pas entre les souches.

Ceci suggère que l'hypersensibilité aux antifongiques azolés et aux échinocandines des mutants *rim* pourrait s'expliquer par l'implication de la voie Rim dans la tolérance plutôt que dans la résistance à ces antifongiques. Les deux termes hypersensibilité et implication dans la tolérance sont donc utilisés indifféremment dans ce document et le manuscrit. Il sera toutefois intéressant de réaliser ces CMI également à pH alcalin afin de confirmer ce résultat.

2.2. Plusieurs gènes impliqués dans la tolérance aux antifongiques sont Rim-dépendants

L'analyse par RNA-SEQ d'une souche disruptée pour le gène *RIM101* codant pour le facteur de transcription terminal de la voie et d'une souche contrôle a permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines comme des gènes Rim-dépendants. Parmi eux se trouve le gène *IPT1*, codant pour une enzyme responsable de la synthèse du principal sphingolipide membranaire, dont l'expression est fortement diminuée dans le mutant *rim101-/-* par rapport à la souche contrôle à pH alcalin. Ce gène a été préalablement impliqué dans la tolérance au fluconazole chez *C. albicans*. De plus, la modification de la composition membranaire en sphingolipides influencerait également l'activité des échinocandines, en modulant l'interaction entre les échinocandines et leur cible, la β -1,3-glucane synthase (181). Le gène *IPT1* pourrait donc être impliqué dans la tolérance aux antifongiques médiée par la voie Rim. Il serait intéressant, dans un premier temps, de confirmer ce résultat au niveau protéomique en mesurant le taux d'expression de la protéine *Ipt1* dans le mutant *rim101-/-* et la souche contrôle par *western-blot*.

Un deuxième gène pourrait être impliqué dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines médiée par la voie Rim : le gène *HSP90*. L'expression de ce gène est significativement plus faible dans le mutant *rim101-/-* que dans la souche contrôle à pH alcalin. De plus, les souches mutées pour les différentes protéines Rim sont hypersensibles à la geldanamycine, un inhibiteur pharmacologique de Hsp90, ce phénotype étant restauré dans les souches complémentées. Il serait intéressant d'étudier le taux d'expression de la protéine Hsp90 dans le mutant *rim101-/-* par rapport à la souche contrôle par *western-blot*. Ces expériences seront réalisées prochainement. Toutefois, compte-tenu de la faible diminution de l'expression de *HSP90* dans le mutant *rim101-/-* par rapport à la souche contrôle (-1,8 fois), il est possible que le *western-blot* ne soit pas assez sensible pour mettre en évidence une telle différence de production de la protéine dans le mutant par rapport à la souche témoin.

Les résultats de l'étude transcriptomique et des tests phénotypiques suggèrent que Rim101 agirait en amont de Hsp90. Des interactions génétiques entre *RIM101* et *HSP90* ont déjà été mises en évidence dans la littérature, sans que le sens de l'interaction ait été clairement établi (166). Il était

cependant plutôt suggéré jusqu'ici que Rim101 était une protéine-client de Hsp90 chez les levures (220,221). Afin de confirmer que *RIM101* agit bien en amont de *HSP90*, des sites de liaison de Rim101p ont été recherchés au niveau du promoteur de *HSP90*. Plusieurs séquences de ce type ont été décrites : GCCAAG, CCAAGA et (G/A)CCAAGAA (203). Cependant, aucune n'a été retrouvée dans le promoteur de *HSP90*. Il semblerait toutefois que d'autres sites de liaison de Rim101 à l'ADN existent (203). Une analyse par *ChiP-sequencing* permettrait d'identifier les zones d'interaction entre Rim101 et l'ADN et de confirmer la régulation de *HSP90* par cette protéine à pH alcalin. Il serait également intéressant de surexprimer *HSP90* dans le mutant *rim101-/-*, et d'étudier le profil de sensibilité de cette souche aux antifongiques azolés et aux échinocandines.

Si l'implication de Hsp90 dans la tolérance aux antifongiques médiée par la voie Rim est confirmée, cela ouvre des perspectives intéressantes pour le développement de nouvelles stratégies antifongiques.

2.3. L'inhibition de la voie Rim est une nouvelle stratégie antifongique d'intérêt

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail ont permis de mettre en évidence que toutes les protéines de la voie Rim sont impliquées dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans*. Ces données suggèrent qu'en ciblant une de ces 6 protéines, il est possible de potentialiser l'activité des antifongiques déjà disponibles. Ceci est d'autant plus intéressant que la voie Rim est spécifique et relativement bien conservée au sein du règne fongique, et qu'elle intervient également dans la pathogénicité et la virulence de *C. albicans*. Cibler la voie Rim, en association aux antifongiques déjà disponibles, apparaît donc comme une nouvelle stratégie antifongique d'intérêt.

De plus, Hsp90 semble impliquée dans la tolérance aux antifongiques médiée par la voie Rim. En ciblant cette voie, il serait donc possible de cibler indirectement Hsp90. Cette protéine chaperone interagit avec environ 10% du protéome de *C. albicans*. Elle est notamment impliquée dans la tolérance aux antifongiques et au développement de la résistance chez cette espèce. Chez *S. cerevisiae*, elle est également impliquée dans la génération d'instabilité génétique en conditions de stress, à l'origine d'aneuploïdies qui peuvent participer à la résistance aux antifongiques (222). L'intérêt de l'inhibition de Hsp90, en association avec des antifongiques déjà disponibles, comme nouvelle stratégie antifongique a été démontré par le développement de l'efungumab, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine Hsp90 de *C. albicans*. L'association de l'efungumab à l'amphotéricine B liposomale dans le traitement des candidoses invasives dans le cadre d'un essai clinique de phase III a permis de diminuer la mortalité attribuable, d'améliorer le taux de réponse clinique global et d'augmenter le nombre de cultures négatives confirmant la guérison (223).

Cependant, malgré une activité antifongique intéressante, le développement de cet anticorps a été arrêté suite à des problèmes de qualité inconstante et de toxicité. Hsp90 n'étant pas une protéine strictement fongique, cibler directement cette protéine expose en effet à un risque de toxicité par action sur la protéine Hsp90 humaine. A l'inverse, cibler Hsp90 par l'intermédiaire de la voie Rim permettrait de s'affranchir de ces problèmes de toxicité.

Quelques limites à l'association d'inhibiteurs de la voie Rim et d'antifongiques déjà disponibles en tant que nouvelle stratégie antifongique peuvent toutefois être soulevées. D'une part, la voie Rim n'étant activée qu'en conditions neutres ou alcalines, cette stratégie ne présenterait un intérêt que pour le traitement des infections à *Candida* spp. touchant des sites dont le pH physiologique est neutre ou alcalin. Cela est toutefois le cas des candidémies ou des candidoses intra-abdominales, qui représentent une part importante des candidoses invasives (202). D'autre part, l'implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques n'a à ce jour été démontrée que pour *C. albicans*. Il serait intéressant d'étudier l'implication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques pour d'autres espèces fréquemment responsables de candidoses invasives, comme *C. glabrata* et *C. parapsilosis*. Si le rôle de Hsp90 dans la tolérance aux antifongiques médiée par la voie Rim est confirmé, il est possible qu'aucun effet de la voie Rim dans la tolérance aux échinocandines ne soit mis en évidence chez *C. glabrata*, ce qui limiterait le spectre d'activité d'une association inhibiteurs de la voie Rim - échinocandines.

2.4. Conclusion

Un des principaux freins au développement de nouvelles molécules antifongiques est la proximité entre les cellules fongiques et les cellules humaines, toutes deux eucaryotes. La stratégie thérapeutique proposée dans les perspectives de ce travail, soit l'association d'inhibiteurs de la voie Rim aux antifongiques déjà disponibles, permettrait de s'affranchir de ce problème, la voie Rim étant spécifique du règne fongique. De plus, cette voie étant conservée au sein du règne fongique, une telle stratégie pourrait avoir un large spectre d'activité, agissant à la fois sur les levures et les champignons filamenteux.

3. **Bdf1 : nouvelle cible antifongique ?**

Le dernier axe de ma thèse portait sur l'étude de la protéine BET fongique Bdf1 en tant que nouvelle cible antifongique. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition des protéines BET

fongiques est une stratégie antifongique prometteuse chez *C. albicans*, mais également chez *C. glabrata*, ouvrant de nombreuses perspectives.

3.1. Bdf1 et *Candida albicans*

La délétion de *BDF1* ou de ses bromodomains, ainsi que la présence de mutations empêchant la liaison des bromodomains de Bdf1 à leur ligand, sont impliquées dans la viabilité et la virulence de *C. albicans*. Un inhibiteur sélectif de BD1 possédant une activité antifongique sur cette espèce a pu être identifié, confirmant l'intérêt de l'inhibition des protéines BET fongiques comme nouvelle stratégie thérapeutique chez *C. albicans*.

D'autres inhibiteurs sélectifs de BD1 ou BD2 ont été identifiés, mais aucun actif à la fois sur BD1 et BD2. En effet, contrairement aux bromodomains BD1 et BD2 des protéines BET humaines, les séquences de BD1 et BD2 sont moins conservées chez *C. albicans*. Or, les défauts de croissance les plus sévères sont observés avec les souches mutées ou délétées pour les deux bromodomains de Bdf1. La recherche de composés actifs sur les deux bromodomains de CaBdf1, et sélectifs vis-à-vis des protéines BET fongiques, pourrait constituer un nouvel axe de recherche.

3.2. Bdf1 et *Candida glabrata*

C. glabrata est la 2^{ème} espèce responsable de candidoses invasives la plus fréquemment isolée en Europe et en Amérique du Nord. Comme cela a été montré chez *C. albicans*, la protéine Bdf1 et l'intégrité de ses deux bromodomains BD1 et BD2, responsables de la liaison à la chromatine, sont indispensables à la croissance de *C. glabrata in vitro*.

3.2.1. Etude de l'implication de *BDF1* et des bromodomains BD1 et BD2 dans la virulence *in vivo*

Une des premières perspectives de ce travail est l'évaluation du rôle de Bdf1 et des bromodomains BD1 et BD2 dans la virulence *in vivo*, en modèle murin. Cependant, le promoteur pMET utilisé pour la caractérisation du rôle de *BDF1 in vitro* n'est pas adapté à l'utilisation en modèle murin. De même, les plasmides générés pour restaurer l'expression de *BDF1*, ou permettre l'expression de *BDF1* délété pour l'un et/ou l'autre bromodomains, ou *BDF1* avec des mutations ponctuelles de l'un et/ou l'autre des bromodomains, ne sont pas utilisables en modèle murin. La pression de sélection du milieu de culture *in vitro* permet de maintenir les plasmides dans les levures : *in vivo*, un risque de fuite plasmidique est à craindre.

Un système compatible avec le modèle murin de type Tet-off pourra être développé chez *C. glabrata* pour investiguer le rôle de *BDF1* et de ses bromodomains *in vivo*, comme cela a été le cas pour *C. albicans*. Ce système permet d'étudier l'impact de la répression d'un gène. Il est constitué d'un transactivateur, lui-même composé de la protéine TetR (répresseur de la tétracycline) et du domaine activateur Vp16 (protéine virale), et du promoteur pTetO. En l'absence de tétracycline, le transactivateur se lie au promoteur pTetO, entraînant ainsi son activation. A l'inverse, en présence de molécules de la famille des tétracyclines comme la doxycycline, la liaison transactivateur-pTetO n'est pas possible et le promoteur pTetO est limité. Un système Tet-off à insertion unique comme celui développé pour *C. albicans* permettrait de diminuer le nombre de marqueurs de sélection à utiliser, par l'insertion en une fois, à un locus donné, du système transactivateur-pTetO couplé à une copie du gène *BDF1*. La copie endogène de *BDF1* serait ensuite délétée.

Le modèle invertébré *Galleria mellonella* pourrait également être utilisé pour étudier le rôle de *BDF1* dans la virulence chez *C. glabrata*. Bien que plus éloigné de l'homme que le modèle murin, ce modèle larvaire constitue une alternative intéressante pour l'étude de la virulence ou de la colonisation chez *C. albicans* (224,225). *G. mellonella* peut être cultivé entre 30 et 37°C, températures optimales de croissance de *C. albicans* et *C. glabrata*. Il présente également l'intérêt d'un coût plus faible, d'une facilité d'utilisation et de l'absence de considérations éthiques par rapport au modèle murin (226). Si ce modèle a largement été décrit pour *C. albicans*, il paraît également adapté à l'étude de la virulence chez *C. glabrata* (227,228).

3.2.2. Recherche d'inhibiteurs des bromodomains de Bdf1

Les bromodomains BD1 et BD2 de Bdf1 peuvent être inhibés de manière sélective chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* (voir article Mietton *et coll.*, 2017, partie 4 3.1.2). Compte-tenu des pourcentages d'homologie importants entre la séquence des deux bromodomains pour *C. glabrata* et *S. cerevisiae* (71 et 84%, Figure 13), et de la faible homologie de séquence entre les bromodomains des protéines BET humaines et ceux de CgBdf1, il devrait en être de même pour *C. glabrata*. L'obtention de la structure tridimensionnelle des bromodomains de CgBdf1 par cristallographie pourra permettre de confirmer cette hypothèse.

Par la suite, un criblage d'inhibiteurs potentiels des bromodomains de CgBdf1 sera effectué. Ce criblage pourra être effectué à partir de la technique HTRF (*homogeneous time-resolved fluorescence*) développée pour *C. albicans*, après adaptation à *C. glabrata*. Brièvement, un peptide histone H4 tétra-acétylé et biotinylé, reconnu par BD1 ou BD2, est lié à des billes de streptavidine, elles-mêmes couplées à un fluorophore donneur. Les bromodomains BD1 ou BD2 de Bdf1 sont

marqués au GST et liés à un anticorps anti-GST couplé à un fluorophore accepteur. En l'absence d'inhibiteur des bromodomains, ceux-ci se lient au peptide histone H4 tétra-acétylé, à l'origine de l'émission de fluorescence par proximité des fluorophores donneurs et accepteurs. En présence d'inhibiteur, l'émission de fluorescence est réduite (voir Supplementary Figure 3, article Mietton *et coll.*, 2017). D'après les données obtenues *in vitro*, l'inhibition des deux bromodomains de CgBdf1 est nécessaire pour obtenir un effet significatif sur la croissance de *C. glabrata*. Le criblage de molécules chimiques devra donc être effectué pour BD1 et BD2, et les *Candidats* potentiels devront présenter une activité sur les deux bromodomains. Le développement d'une technique de criblage permettant le screening d'inhibiteurs de BD1 et BD2 en parallèle serait une alternative intéressante.

La spécificité de ces inhibiteurs, leur activité sur *C. glabrata* et leur éventuelle toxicité sur les cellules eucaryotes humaines seront bien sûr à évaluer.

3.3. Bdf1 et résistance aux antifongiques

Une équipe a montré que le gène *BDF1* est surexprimé au sein d'isolats résistants aux antifongiques chez *C. albicans*, suggérant une possible implication dans la résistance. Une des perspectives pourrait donc être l'utilisation d'inhibiteurs des bromodomains de Bdf1 en association avec les antifongiques déjà disponibles, à l'exemple des antifongiques azolés.

Toutefois, des données préliminaires (non montrées dans ce travail) suggèrent qu'il n'existe pas de différence significative de sensibilité aux antifongiques azolés entre des souches mutées ou délétées pour les bromodomains BD1 et BD2 de Bdf1 et des souches contrôles, chez *C. albicans* et *C. glabrata*. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer ces résultats. Il serait également intéressant d'étudier l'implication de BDF1 dans la tolérance aux antifongiques azolés, par exemple par la réalisation de *time-kill curves* ou la mise en évidence d'un effet de traîne. Ces expériences ne peuvent pas cependant pas être réalisées pour les souches délétées pour *BDF1* ou les deux bromodomains BD1 et BD2, en raison de défauts de croissance trop sévères.

3.4. Conclusion : inhibition des protéines BET chez d'autres espèces fongiques

A plus long terme, l'intérêt de l'inhibition des protéines BET fongiques comme nouvelle stratégie thérapeutique sera également à étudier chez espèces fongiques pathogènes fréquentes, à l'exemple de *Cryptococcus neoformans* ou encore d'*Aspergillus fumigatus*, espèces pour lesquelles ont été décrits des homologues de Bdf1. Si celui-ci est démontré, et que les séquences des bromodomains

des protéines BET fongiques sont suffisamment conservées entre les différentes espèces, un axe de recherche intéressant serait l'identification et le développement d'inhibiteurs panfongiques des bromodomaines des protéines BET.

PARTIE 6 : CONCLUSION

L'incidence des candidoses invasives a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, et ces pathologies sont associées à une morbi-mortalité élevée. Ce pronostic peut toutefois être amélioré par l'instauration d'un traitement antifongique précoce. Seules quatre classes de molécules antifongiques sont aujourd'hui disponibles pour la prévention et le traitement des candidoses invasives. Du fait d'une efficacité importante et d'une meilleure tolérance, les antifongiques azolés et les échinocandines sont les plus utilisés. L'utilisation massive de ces molécules a conduit à une modification de l'épidémiologie des candidoses invasives, avec l'émergence d'espèces non-*albicans* intrinsèquement moins sensibles à ces antifongiques, comme *C. glabrata* ou *C. parapsilosis*. De plus, des souches résistantes voire multi-résistantes aux échinocandines et aux antifongiques azolés sont de plus en plus fréquemment isolées, et associées à des échecs thérapeutiques. L'activité de ces antifongiques est également limitée par le phénomène de tolérance, résultant de la capacité d'adaptation des levures aux stress membranaires et pariétaux induits par ces molécules.

Pour toutes ces raisons, l'identification et le développement de nouvelles stratégies antifongiques sont nécessaires. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette optique, avec pour objectifs l'étude de la tolérance et de la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. et la caractérisation de nouvelles cibles antifongiques impliquées dans ces processus.

La première partie de ce travail a permis de démontrer l'intérêt du séquençage nouvelle génération et d'une approche multigénique pour l'étude des mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *Candida* spp. Par ce biais, il a été possible d'appréhender de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques, qui nécessitent toutefois d'être confirmés.

Dans un deuxième temps, ce travail a permis de démontrer que l'ensemble des protéines de la voie de signalisation du pH (ou voie Rim) est impliqué dans la tolérance aux antifongiques chez *C. albicans*. De plus, il semblerait que la protéine chaperone Hsp90, impliquée dans la régulation de multiples processus biologiques, participe à la tolérance aux antifongiques médiée par la voie Rim. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes : en effet, en ciblant la voie Rim, il pourrait être possible de potentialiser l'activité des antifongiques déjà existants et de cibler indirectement Hsp90 tout en s'affranchissant des problèmes de toxicité car cette voie de signalisation est spécifique du règne fongique.

Enfin, dans le cadre du partenariat de l'ANR FungiBET, j'ai pu montrer que la protéine BET Bdf1 de *C. glabrata*, impliquée dans la régulation épigénétique de la transcription, est essentielle à la croissance

in vitro. Plus précisément, l'intégrité des deux bromodomaines BD1 et BD2 de Bdf1, responsables de la liaison de cette protéine aux histones, est essentielle chez cette espèce, qui est la 2^{ème} la plus fréquemment isolée dans les candidoses invasives en Europe et aux Etats-Unis. Ce résultat confirme les premières données obtenues chez *C. albicans*, et l'intérêt de l'inhibition des protéines BET fongiques comme nouvelle stratégie antifongique.

PARTIE 7 : BIBLIOGRAPHIE

1. Bouchara J-P, Pihet M, de Gentile L, Cimon B, Chabasse D. Levures et levuroses. Cah Form Biol Médicale. 2010;(44).
2. Latgé J-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Mol Microbiol. 2007 Oct;66(2):279–90.
3. Aimanianda V, Latgé J-P. Problems and hopes in the development of drugs targeting the fungal cell wall. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010 Apr;8(4):359–64.
4. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature. 2006 Oct 19;443(7113):818–22.
5. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):288–305.
6. Bennett RJ. Coming of age—sexual reproduction in *Candida* species. PLoS Pathog. 2010;6(12):e1001155.
7. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MAS, Sakthikumar S, Munro CA, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. Nature. 2009 juin;459(7247):657–62.
8. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. PLoS Pathog. 2013;9(9):e1003550.
9. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Crit Rev Microbiol. 2010;36(1):1–53.
10. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. Sci Transl Med. 2012 Dec 19;4(165):165rv13.
11. Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 May 11;101(19):7329–34.
12. Skrzypek MS, Binkley J, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Sherlock G. The *Candida* Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. Nucleic Acids Res. 2017 Jan 4;45(D1):D592–6.
13. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. Nat Genet. 2001 Mar 1;27(3):234–6.
14. Ene IV, Bennett RJ. The cryptic sexual strategies of human fungal pathogens. Nat Rev Microbiol. 2014 Apr;12(4):239–51.
15. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. Nat Rev Microbiol. 2017 Feb;15(2):96–108.
16. Sheltzer JM, Blank HM, Pfau SJ, Tange Y, George BM, Humpton TJ, et al. Aneuploidy drives genomic instability in yeast. Science. 2011 Aug 19;333(6045):1026–30.

17. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Oct;9(10):737–48.
18. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004 Jul;12(7):317–24.
19. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Feb;10(2):112–22.
20. Xie J, Tao L, Nobile CJ, Tong Y, Guan G, Sun Y, et al. White-opaque switching in natural MTL α isolates of *Candida albicans*: evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. *PLoS Biol*. 2013;11(3):e1001525.
21. Mallick EM, Bergeron AC, Jones SK, Newman ZR, Brothers KM, Creton R, et al. Phenotypic Plasticity Regulates *Candida albicans* Interactions and Virulence in the Vertebrate Host. *Front Microbiol*. 2016;7:780.
22. Morschhäuser J. Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2010 Aug;199(3):165–72.
23. Tao L, Du H, Guan G, Dai Y, Nobile CJ, Liang W, et al. Discovery of a “white-gray-opaque” tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. *PLoS Biol*. 2014 Apr;12(4):e1001830.
24. Pande K, Chen C, Noble SM. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat Genet*. 2013 Sep;45(9):1088–91.
25. Gow NAR. A developmental program for *Candida* commensalism. *Nat Genet*. 2013 Sep;45(9):967–8.
26. Al-Yasiri MH, Normand A-C, L’Ollivier C, Lachaud L, Bourgeois N, Rebaudet S, et al. Opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* circulates between humans and yellow-legged gulls. *Sci Rep*. 2016 Oct 26;6:36157.
27. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*. 2009 May;52(3):197–205.
28. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 2010 Oct;16(5):445–52.
29. Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J Clin Microbiol*. 2008 Mar;46(3):933–8.
30. Glöckner A, Cornely OA. *Candida glabrata*: unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. *Mycoses*. 2015 Aug;58(8):445–50.
31. Wong S, Fares MA, Zimmermann W, Butler G, Wolfe KH. Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the “asexual” pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol*. 2003;4(2):R10.
32. Gabaldón T, Martin T, Marcet-Houben M, Durrens P, Bolotin-Fukuhara M, Lespinet O, et al. Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*. 2013 Sep 14;14:623.

33. Linde J, Duggan S, Weber M, Horn F, Sieber P, Hellwig D, et al. Defining the transcriptomic landscape of *Candida glabrata* by RNA-Seq. *Nucleic Acids Res.* 2015 Feb 18;43(3):1392–406.
34. Gabaldón T, Naranjo-Ortiz MA, Marcet-Houben M. Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina. *FEMS Yeast Res.* 2016 Sep;16(6).
35. Csank C, Haynes K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Aug 1;189(1):115–20.
36. Brunke S, Seider K, Fischer D, Jacobsen ID, Kasper L, Jablonowski N, et al. One small step for a yeast--microevolution within macrophages renders *Candida glabrata* hypervirulent due to a single point mutation. *PLoS Pathog.* 2014 Oct;10(10):e1004478.
37. Lionakis MS, Netea MG. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathog.* 2013 Jan;9(1):e1003079.
38. Gow NAR, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol.* 2012 Aug;15(4):406–12.
39. Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol.* 2015;91:139–235.
40. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Hsp21 Potentiates Antifungal Drug Tolerance in *Candida albicans*. *PLoS ONE.* 2013 Mar 22;8(3).
41. Toubas D. Epidémiologie des candidoses invasives. *Rev Fr Lab.* 2013 Mar;(450):27–36.
42. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2016 Oct 20;
43. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):685–702.
44. Strollo S, Lionakis MS, Adjemian J, Steiner CA, Prevots DR. Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002-2012(1). *Emerg Infect Dis.* 2016 Jan;23(1):7–13.
45. Cleveland AA, Harrison LH, Farley MM, Hollick R, Stein B, Chiller TM, et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120452.
46. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med.* 2015 Oct 8;373(15):1445–56.
47. Bitar D, Lortholary O, Dromer F, Coignard B, Che D. Bulletin épidémiologique hebdomadaire - BEH n°12-13/2013.
48. Gangneux J-P, Bougnoux M-E, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, et al. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med.* 2016 Dec;26(4):385–90.
49. <http://www.gaffi.org>.

50. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 May;73(1):45–8.
51. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004 Aug 1;39(3):309–17.
52. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol*. 2011 Jan;49(1):396–9.
53. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent J-L, Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med*. 2011 Apr;39(4):665–70.
54. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Nov;68(3):278–83.
55. Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK Jr, Reed SD. *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 May;28(5):433–5.
56. Tragiannidis A, Tsoulas C, Kerl K, Groll AH. Invasive candidiasis: update on current pharmacotherapy options and future perspectives. *Expert Opin Pharmacother*. 2013 Aug;14(11):1515–28.
57. Marriott DJE, Playford EG, Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Ellis D, et al. Determinants of mortality in non-neutropenic ICU patients with candidaemia. *Crit Care Lond Engl*. 2009;13(4):R115.
58. Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*. 2009 May;37(5):1612–8.
59. Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3300–8.
60. Bougnoux M-E, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon J-Y, CandiRea Study Group. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med*. 2008 Feb;34(2):292–9.
61. Blyth CC, Chen SCA, Slavin MA, Serena C, Nguyen Q, Marriott D, et al. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics*. 2009 May;123(5):1360–8.

62. Holley A, Dulhunty J, Blot S, Lipman J, Lobo S, Dancer C, et al. Temporal trends, risk factors and outcomes in albicans and non-albicans candidaemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Jun;33(6):554.e1-7.
63. Moriyama B, Gordon LA, McCarthy M, Henning SA, Walsh TJ, Penzak SR. Emerging drugs and vaccines for candidemia. *Mycoses*. 2014 Dec;57(12):718–33.
64. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Sep;9(9):719–27.
65. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*. 2012;2012:713687.
66. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003 Jun;11(6):272–9.
67. Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN, Castanheira M. *In vitro* activities of isavuconazole and comparator antifungal agents tested against a global collection of opportunistic yeasts and molds. *J Clin Microbiol*. 2013 Aug;51(8):2608–16.
68. Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Aug;82(4):303–13.
69. Marty FM, Ostrosky-Zeichner L, Cornely OA, Mullane KM, Perfect JR, Thompson GR, et al. Isavuconazole treatment for mucormycosis: a single-arm open-label trial and case-control analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016 Jul;16(7):828–37.
70. Maertens JA, Raad II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2016 Feb 20;387(10020):760–9.
71. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*. 2009 Oct;9(7):1029–50.
72. Hull CM, Bader O, Parker JE, Weig M, Gross U, Warrillow AGS, et al. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6417–21.
73. Perlin DS. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol*. 2011 Apr;6(4):441–57.
74. Katiyar SK, Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, Johnson ME, Perlin DS, Edlind TD. Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6304–9.
75. Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):146–54.

76. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, Diaz KA, Hisao GS, Tuttle MD, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol*. 2014 May;10(5):400–6.
77. Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment. *Intensive Care Med*. 2009 Feb;35(2):206–14.
78. Eggimann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care*. 2011 Sep 1;1:37.
79. Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med*. 2014 Sep;40(9):1241–55.
80. Ziakas PD, Kourbeti IS, Mylonakis E. Systemic antifungal prophylaxis after hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis. *Clin Ther*. 2014 Feb 1;36(2):292–306.e1.
81. Xu S-X, Shen J-L, Tang X-F, Feng B, Xu H-Q. Newer antifungal agents micafungin and voriconazole for fungal infection prevention during hematopoietic cell transplantation: a meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(2):381–90.
82. Timsit J-F, Azoulay E, Schwebel C, Charles PE, Cornet M, Souweine B, et al. Empirical Micafungin Treatment and Survival Without Invasive Fungal Infection in Adults With ICU-Acquired Sepsis, *Candida* Colonization, and Multiple Organ Failure: The EMPIRICUS Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Oct 18;316(15):1555–64.
83. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Dec;18 Suppl 7:19–37.
84. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arkan-Akdagli S, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Dec;18 Suppl 7:53–67.
85. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016 Feb 15;62(4):e1-50.
86. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Feb;49 Suppl 1:7–10.
87. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Mar 1;48(5):503–35.
88. Delarze E, Sanglard D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. 2015 Nov;23:12–9.
89. Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux M-E, d'Enfert C, et al. Genotypic Evolution of Azole Resistance Mechanisms in Sequential *Candida albicans* Isolates. *Eukaryot Cell*. 2007 Oct;6(10):1889–904.

90. Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, et al. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*. 2006 Apr;172(4):2139–56.
91. Torelli R, Posteraro B, Ferrari S, La Sorda M, Fadda G, Sanglard D, et al. The ATP-binding cassette transporter-encoding gene *CgSNQ2* is contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol Microbiol*. 2008 Apr;68(1):186–201.
92. Ferrari S, Ischer F, Calabrese D, Posteraro B, Sanguinetti M, Fadda G, et al. Gain of function mutations in *CgPDR1* of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog*. 2009 Jan;5(1):e1000268.
93. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. 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*. 2004 Dec;3(6):1639–52.
94. Lohberger A, Coste AT, Sanglard D. Distinct Roles of *Candida albicans* Drug Resistance Transcription Factors TAC1, MRR1, and UPC2 in Virulence. *Eukaryot Cell*. 2014 Jan;13(1):127.
95. Wang Y, Liu J-Y, Shi C, Li W-J, Zhao Y, Yan L, et al. Mutations in transcription factor Mrr2p contribute to fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Nov;46(5):552–9.
96. Thakur JK, Arthanari H, Yang F, Pan S-J, Fan X, Breger J, et al. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature*. 2008 avril;452(7187):604–9.
97. Borah S, Shivarathri R, Srivastava VK, Ferrari S, Sanglard D, Kaur R. Pivotal role for a tail subunit of the RNA polymerase II mediator complex CgMed2 in azole tolerance and adherence in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct;58(10):5976–86.
98. Nishikawa JL, Boeszoermyeni A, Vale-Silva LA, Torelli R, Posteraro B, Sohn Y-J, et al. Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator-Mediator interaction. *Nature*. 2016 Feb 25;530(7591):485–9.
99. Sanglard D, Coste AT. Activity of Isavuconazole and Other Azoles against *Candida* Clinical Isolates and Yeast Model Systems with Known Azole Resistance Mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct 19;60(1):229–38.
100. Cheng S, Clancy CJ, Nguyen KT, Clapp W, Nguyen MH. A *Candida albicans* petite mutant strain with uncoupled oxidative phosphorylation overexpresses MDR1 and has diminished susceptibility to fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 May;51(5):1855–8.
101. Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA, Coste A, Ischer F, Kelly S, et al. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jul;57(7):3182–93.
102. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Apr;66(4):373–84.

103. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiol Read Engl*. 1999 Oct;145 (Pt 10):2701–13.
104. Nabili M, Abdollahi Gohar A, Badali H, Mohammadi R, Moazeni M. Amino acid substitutions in Erg11p of azole-resistant *Candida glabrata*: Possible effective substitutions and homology modelling. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016 Jun;5:42–6.
105. Berila N, Borecka S, Dzugasova V, Bojnansky J, Subik J. Mutations in the CgPDR1 and CgERG11 genes in azole-resistant *Candida glabrata* clinical isolates from Slovakia. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Jun;33(6):574–8.
106. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, Toner G, Chadwick SG, Gyax SE, et al. Gain-of-function mutations in *UPC2* are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2012 Oct;11(10):1289–99.
107. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002 Feb;2(2):73–85.
108. Nagi M, Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Aoyama T, Okano M, et al. Transcription factors CgUPC2A and CgUPC2B regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 2011 Jan;16(1):80–9.
109. Whaley SG, Caudle KE, Vermitsky J-P, Chadwick SG, Toner G, Barker KS, et al. UPC2A is required for high-level azole antifungal resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Aug;58(8):4543–54.
110. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegerville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol Δ 5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Sep;67(9):2131–8.
111. Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *eLife*. 2015 Feb 3;4:e00662.
112. Poláková S, Blume C, Zárate JA, Mentel M, Jørck-Ramberg D, Stenderup J, et al. Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2688–93.
113. Healey KR, Zhao Y, Perez WB, Lockhart SR, Sobel JD, Farmakiotis D, et al. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nat Commun*. 2016 Mar 29;7:11128.
114. Dellière S, Healey K, Gits-Muselli M, Carrara B, Barbaro A, Guigue N, et al. Fluconazole and Echinocandin Resistance of *Candida glabrata* Correlates Better with Antifungal Drug Exposure Rather than with *MSH2* Mutator Genotype in a French Cohort of Patients Harboring Low Rates of Resistance. *Front Microbiol*. 2016;7:2038.
115. Sanglard D, Ischer F, Bille J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr;45(4):1174–83.

116. Tsai H-F, Krol AA, Sarti KE, Bennett JE. *Candida glabrata PDR1*, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1384–92.
117. Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F, Torelli R, Posteraro B, Vandeputte P, et al. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May;55(5):1852–60.
118. Brun S, Dalle F, Saulnier P, Renier G, Bonnin A, Chabasse D, et al. Biological consequences of petite mutations in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Aug;56(2):307–14.
119. Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol FG B*. 2010 Feb;47(2):117–26.
120. Perlin DS. Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2015 Dec 1;61(Suppl 6):S612.
121. Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *F1000 Biol Rep*. 2010;2:66.
122. Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS. Effect of *Candida glabrata FKS1* and *FKS2* Mutations on Echinocandin Sensitivity and Kinetics of 1,3- β -d-Glucan Synthase: Implication for the Existing Susceptibility Breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Sep;53(9):3690–9.
123. Singh-Babak SD, Babak T, Diezmann S, Hill JA, Xie JL, Chen Y-L, et al. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002718.
124. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2006 May;12(5):418–25.
125. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. 2011 Jun;14(3):164–76.
126. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):391–408, table of contents.
127. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUCAST_definitions_of_clinical_breakpoints_and_ECOFFs.pdf.
128. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*. 2012 Jan;125(1 Suppl):S3-13.
129. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol*. 2012 Sep;50(9):2846–56.
130. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
131. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With

- Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013 Jun;56(12):1724–32.
132. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Updike CL, Clancy CJ. Caspofungin MICs Correlate with Treatment Outcomes among Patients with *Candida glabrata* Invasive Candidiasis and Prior Echinocandin Exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Aug;57(8):3528–35.
 133. Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, Rex JH, Alexander BD, Andes D, et al. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol.* 2009 Oct;47(10):3142–6.
 134. Arendrup MC, Pfaller MA, Danish Fungaemia Study Group. Caspofungin Etest susceptibility testing of *Candida* species: risk of misclassification of susceptible isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* when adopting the revised CLSI caspofungin breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jul;56(7):3965–8.
 135. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Kwa AL, Cheng S, Du C, et al. The presence of an FKS mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep;56(9):4862–9.
 136. Bailly S, Maubon D, Fournier P, Pelloux H, Schwebel C, Chapuis C, et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. - Trends over 10 years. *J Infect.* 2016 Jan;72(1):103–11.
 137. Fekkar A, Dannaoui E, Meyer I, Imbert S, Brossas JY, Uzunov M, et al. Emergence of echinocandin-resistant *Candida* spp. in a hospital setting: a consequence of 10 years of increasing use of antifungal therapy? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2014 Sep;33(9):1489–96.
 138. Vallabhaneni S, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Schaffner W, Beldavs ZG, et al. Epidemiology and Risk Factors for Echinocandin Nonsusceptible *Candida glabrata* Bloodstream Infections: Data From a Large Multisite Population-Based Candidemia Surveillance Program, 2008-2014. *Open Forum Infect Dis.* 2015 Dec;2(4):ofv163.
 139. Shields RK, Nguyen MH, Clancy CJ. Clinical perspectives on echinocandin resistance among *Candida* species. *Curr Opin Infect Dis.* 2015 Dec;28(6):514–22.
 140. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection.* 2013 Jun;41(3):645–53.
 141. Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Jun;85(2):200–4.
 142. Chapeland-Leclerc F, Hennequin C, Papon N, Noël T, Girard A, Socié G, et al. Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):1360–2.

143. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2012 Apr;50(4):1199–203.
144. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2012 Nov 15;55(10):1352–61.
145. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Candida bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):561–6.
146. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2012 Apr;50(4):1199–203.
147. Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Fontanet A, Bretagne S, Lortholary O, et al. Candidémies en Île-de-France : données de l'Observatoire des levures (2002-2010). BEH. 2013 Avril;(12–13).
148. Baixench M-T, Aoun N, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Ramires S, et al. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. J Antimicrob Chemother. 2007 Jun;59(6):1076–83.
149. InVS. Dernières données et tendances sur la résistance aux anti-infectieux - Candida spp. 2013.
150. Liu W, Tan J, Sun J, Xu Z, Li M, Yang Q, et al. Invasive candidiasis in intensive care units in China: in vitro antifungal susceptibility in the China-SCAN study. J Antimicrob Chemother. 2014 Jan;69(1):162–7.
151. Steinbach WJ, Lamoth F, Juvvadi PR. Potential Microbiological Effects of Higher Dosing of Echinocandins. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2015 Dec 1;61 Suppl 6:S669-677.
152. Lee KK, Maccallum DM, Jacobsen MD, Walker LA, Odds FC, Gow NAR, et al. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jan;56(1):208–17.
153. Munro CA. Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy. Adv Appl Microbiol. 2013;83:145–72.
154. Rueda C, Puig-Asensio M, Guinea J, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O, et al. Evaluation of the possible influence of trailing and paradoxical effects on the clinical outcome of patients with candidemia. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2017 Jan;23(1):49.e1-49.e8.
155. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2011 Jun;75(2):213–67.
156. Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. Mol Microbiol. 2003 May;48(4):959–76.

157. Singh SD, Robbins N, Zaas AK, Schell WA, Perfect JR, Cowen LE. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS Pathog.* 2009 Jul;5(7):e1000532.
158. Yu S-J, Chang Y-L, Chen Y-L. Calcineurin signaling: lessons from *Candida* species. *FEMS Yeast Res.* 2015 Jun;15(4):fov016.
159. Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Mar;47(3):956–64.
160. Cruz MC, Goldstein AL, Blankenship JR, Del Poeta M, Davis D, Cardenas ME, et al. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *EMBO J.* 2002 Feb 15;21(4):546–59.
161. Chen Y-L, Konieczka JH, Springer DJ, Bowen SE, Zhang J, Silao FGS, et al. Convergent Evolution of Calcineurin Pathway Roles in Thermotolerance and Virulence in *Candida glabrata*. *G3 Bethesda Md.* 2012 Jun;2(6):675–91.
162. Cowen LE. The fungal Achilles' heel: targeting Hsp90 to cripple fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Aug;16(4):377–84.
163. Li X, Robbins N, O'Meara TR, Cowen LE. Extensive functional redundancy in the regulation of *Candida albicans* drug resistance and morphogenesis by lysine deacetylases Hos2, Hda1, Rpd3 and Rpd31. *Mol Microbiol.* 2016 Nov 21;
164. LaFayette SL, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Betancourt-Quiroz M, Gunatilaka AAL, et al. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001069.
165. Diezmann S, Michaut M, Shapiro RS, Bader GD, Cowen LE. Mapping the Hsp90 genetic interaction network in *Candida albicans* reveals environmental contingency and rewired circuitry. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002562.
166. O'Meara TR, Veri AO, Polvi EJ, Li X, Valaei SF, Diezmann S, et al. Mapping the Hsp90 Genetic Network Reveals Ergosterol Biosynthesis and Phosphatidylinositol-4-Kinase Signaling as Core Circuitry Governing Cellular Stress. *PLoS Genet.* 2016 Jun;12(6):e1006142.
167. Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, et al. Role of the Slt2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 2010 May;10(3):343–52.
168. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Minematsu A, Yamauchi S, Takazono T, Nakamura S, et al. Contribution of the Slt2-regulated transcription factors to echinocandin tolerance in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 2014 Nov;14(7):1128–31.
169. Popolo L, Gualtieri T, Ragni E. The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol.* 2001;39 Suppl 1:111–21.
170. Dichtl K, Samantaray S, Wagener J. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cell Microbiol.* 2016 Sep;18(9):1228–38.

171. Heilmann CJ, Sorgo AG, Mohammadi S, Sosinska GJ, de Koster CG, Brul S, et al. Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2013 Feb;12(2):254–64.
172. Borah S, Shivarathri R, Kaur R. The Rho1 GTPase-activating protein CgBem2 is required for survival of azole stress in *Candida glabrata*. *J Biol Chem*. 2011 Sep 30;286(39):34311–24.
173. Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Prince RA, Lewis RE. Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*: possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec;49(12):5146–8.
174. Cota JM, Grabinski JL, Talbert RL, Burgess DS, Rogers PD, Edlind TD, et al. Increases in SLT2 Expression and Chitin Content Are Associated with Incomplete Killing of *Candida glabrata* by Caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Mar;52(3):1144–6.
175. Diez-Orejas R, Molero G, Navarro-García F, Pla J, Nombela C, Sanchez-Pérez M. Reduced virulence of *Candida albicans* *MKC1* mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun*. 1997 Feb;65(2):833–7.
176. Beese-Sims SE, Pan S-J, Lee J, Hwang-Wong E, Cormack BP, Levin DE. Mutants in the *Candida glabrata* glycerol channels are sensitized to cell wall stress. *Eukaryot Cell*. 2012 Dec;11(12):1512–9.
177. Rauceo JM, Blankenship JR, Fanning S, Hamaker JJ, Deneault J-S, Smith FJ, et al. Regulation of the *Candida albicans* cell wall damage response by transcription factor Sko1 and PAS kinase Psk1. *Mol Biol Cell*. 2008 Jul;19(7):2741–51.
178. Munro CA, Selvaggini S, de Bruijn I, Walker L, Lenardon MD, Gerssen B, et al. The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2007 Mar;63(5):1399–413.
179. Schwarzmüller T, Ma B, Hiller E, Istel F, Tscherner M, Brunke S, et al. Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes. *PLoS Pathog*. 2014 Jun;10(6):e1004211.
180. Prasad T, Saini P, Gaur NA, Vishwakarma RA, Khan LA, Haq QMR, et al. Functional Analysis of *CalPT1*, a Sphingolipid Biosynthetic Gene Involved in Multidrug Resistance and Morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Aug;49(8):3442.
181. Healey KR, Challa KK, Edlind TD, Katiyar SK. Sphingolipids mediate differential echinocandin susceptibility in *Candida albicans* and *Aspergillus nidulans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3377–84.
182. Healey KR, Katiyar SK, Raj S, Edlind TD. CRS-MIS in *Candida glabrata*: sphingolipids modulate echinocandin-Fks interaction. *Mol Microbiol*. 2012 Oct;86(2):303–13.
183. Tscherner M, Zwolanek F, Jenull S, Sedlazeck FJ, Petryshyn A, Frohner IE, et al. The *Candida albicans* Histone Acetyltransferase Hat1 Regulates Stress Resistance and Virulence via Distinct Chromatin Assembly Pathways. *PLoS Pathog*. 2015 Oct;11(10).
184. Wurtele H, Tsao S, Lépine G, Mullick A, Tremblay J, Drogaris P, et al. Modulation of histone H3 lysine 56 acetylation as an antifungal therapeutic strategy. *Nat Med*. 2010 Jul;16(7):774–80.

185. Sellam A, Askew C, Epp E, Lavoie H, Whiteway M, Nantel A. Genome-wide mapping of the coactivator Ada2p yields insight into the functional roles of SAGA/ADA complex in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2009 May;20(9):2389–400.
186. Li X, Cai Q, Mei H, Zhou X, Shen Y, Li D, et al. The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Mar 29;
187. Robbins N, Leach MD, Cowen LE. Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance. *Cell Rep*. 2012 Oct 25;2(4):878–88.
188. Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, Castanheira M. In vitro activity of a Hos2 deacetylase inhibitor, MGCD290, in combination with echinocandins against echinocandin-resistant *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Apr;81(4):259–63.
189. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jun;46(6):1773–80.
190. Kawai A, Yamagishi Y, Mikamo H. In vitro efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non-albicans *Candida* species biofilms. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. 2015 Sep;21(9):647–53.
191. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 2013 Oct;8(10):1325–37.
192. Song JW, Shin JH, Kee SJ, Kim SH, Shin MG, Suh SP, et al. Expression of *CgCDR1*, *CgCDR2*, and *CgERG11* in *Candida glabrata* biofilms formed by bloodstream isolates. *Med Mycol*. 2009;47(5):545–8.
193. Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet*. 2013 Aug 25;
194. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses*. 2012 Jan;55(1):80–5.
195. Parsons AB, Brost RL, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, et al. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol*. 2004 Jan;22(1):62–9.
196. Davis DA. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Aug;12(4):365–70.
197. Gomez-Raja J, Davis DA. The β -arrestin-like protein Rim8 is hyperphosphorylated and complexes with Rim21 and Rim101 to promote adaptation to neutral-alkaline pH. *Eukaryot Cell*. 2012 May;11(5):683–93.
198. Li M, Martin SJ, Bruno VM, Mitchell AP, Davis DA. *Candida albicans* Rim13p, a Protease Required for Rim101p Processing at Acidic and Alkaline pHs. *Eukaryot Cell*. 2004 Jun 1;3(3):741–51.
199. Davis D, Edwards JE, Mitchell AP, Ibrahim AS. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5953–9.

200. Mitchell BM, Wu TG, Jackson BE, Wilhelmus KR. *Candida albicans* strain-dependent virulence and Rim13p-mediated filamentation in experimental keratomycosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Feb;48(2):774–80.
201. Nobile CJ, Solis N, Myers CL, Fay AJ, Deneault J-S, Nantel A, et al. *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol*. 2008 Nov;10(11):2180–96.
202. Cheng S, Clancy CJ, Xu W, Schneider F, Hao B, Mitchell AP, et al. Profiling of *Candida albicans* gene expression during intra-abdominal candidiasis identifies biologic processes involved in pathogenesis. *J Infect Dis*. 2013 Nov 1;208(9):1529–37.
203. Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J, Davis DA. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol*. 2004 Dec;54(5):1335–51.
204. Cornet M, Gaillardin C. pH Signaling in Human Fungal Pathogens: a New Target for Antifungal Strategies. *Eukaryot Cell*. 2014 Mar 1;13(3):342–52.
205. De Bernardis F, Mühlischlegel FA, Cassone A, Fonzi WA. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1998 Jul;66(7):3317–25.
206. Sun Y, Cao C, Jia W, Tao L, Guan G, Huang G. pH Regulates White-Opaque Switching and Sexual Mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2015 Nov;14(11):1127–34.
207. Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jun;43(6):1383–6.
208. Cornet M, Gaillardin C, Richard ML. Deletions of the endocytic components VPS28 and VPS32 in *Candida albicans* lead to echinocandin and azole hypersensitivity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Oct;50(10):3492–5.
209. Homann OR, Dea J, Noble SM, Johnson AD. A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS Genet*. 2009 Dec;5(12):e1000783.
210. Hollomon JM, Grahl N, Willger SD, Koeppen K, Hogan DA. Global Role of Cyclic AMP Signaling in pH-Dependent Responses in *Candida albicans*. *mSphere*. 2016 Dec;1(6).
211. Chua P, Roeder GS. Bdf1, a yeast chromosomal protein required for sporulation. *Mol Cell Biol*. 1995 Jul;15(7):3685–96.
212. Govin J, Dorsey J, Gaucher J, Rousseaux S, Khochbin S, Berger SL. Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes Dev*. 2010 Aug 15;24(16):1772–86.
213. Fu J, Hou J, Liu L, Chen L, Wang M, Shen Y, et al. Interplay between BDF1 and BDF2 and their roles in regulating the yeast salt stress response. *FEBS J*. 2013 May;280(9):1991–2001.
214. Josling GA, Selvarajah SA, Petter M, Duffy MF. The role of bromodomain proteins in regulating gene expression. *Genes*. 2012 May 29;3(2):320–43.
215. Sawa C, Nedeia E, Krogan N, Wada T, Handa H, Greenblatt J, et al. Bromodomain factor 1 (Bdf1) is phosphorylated by protein kinase CK2. *Mol Cell Biol*. 2004 Jun;24(11):4734–42.

216. Ladurner AG, Inouye C, Jain R, Tjian R. Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell*. 2003 Feb;11(2):365–76.
217. Xu Z, Cao Y, Zhang J, Cao Y, Gao P, Wang D, et al. cDNA array analysis of the differential expression change in virulence-related genes during the development of resistance in *Candida albicans*. *Acta Biochim Biophys Sin Shanghai*. 2005;37(7):463–72.
218. Noble SM, Johnson AD. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2005 Feb;4(2):298–309.
219. Branco J, Silva AP, Silva RM, Silva-Dias A, Pina-Vaz C, Butler G, et al. Fluconazole and Voriconazole Resistance in *Candida parapsilosis* Is Conferred by Gain-of-Function Mutations in MRR1 Transcription Factor Gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct;59(10):6629–33.
220. Leach MD, Klipp E, Cowen LE, Brown AJP. Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Oct;10(10):693–704.
221. Zhao R, Houry WA. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. 2005 Dec;83(6):703–10.
222. Chen G, Bradford WD, Seidel CW, Li R. Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. *Nature*. 2012 Jan 29;482(7384):246–50.
223. Pacht J, Svoboda P, Jacobs F, Vandewoude K, van der Hoven B, Spronk P, et al. A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2006 May 15;42(10):1404–13.
224. Amorim-Vaz S, Delarze E, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. *Front Microbiol*. 2015;6:367.
225. Li D-D, Deng L, Hu G-H, Zhao L-X, Hu D-D, Jiang Y-Y, et al. Using *Galleria mellonella-Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(9):1482–7.
226. Delarze E, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. Adaptation of a *Gaussia princeps* Luciferase reporter system in *Candida albicans* for in vivo detection in the *Galleria mellonella* infection model. *Virulence*. 2015;6(7):684–93.
227. Santos R, Costa C, Mil-Homens D, Romão D, de Carvalho CCCR, Pais P, et al. The multidrug resistance transporters CgTpo1_1 and CgTpo1_2 play a role in virulence and biofilm formation in the human pathogen *Candida glabrata*. *Cell Microbiol*. 2016 Oct 25;
228. Staniszewska M, Bondaryk M, Wieczorek M, Estrada-Mata E, Mora-Montes HM, Ochal Z. Antifungal Effect of Novel 2-Bromo-2-Chloro-2-(4-Chlorophenylsulfonyl)-1-Phenylethanone against *Candida* Strains. *Front Microbiol*. 2016;7:1309.

Résumé

L'incidence des candidoses invasives a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, parallèlement à l'augmentation du nombre de patients à risque. Ces pathologies sont associées à une morbi-mortalité élevée. Ce pronostic peut toutefois être amélioré par l'instauration d'un traitement antifongique précoce. Quatre classes de molécules antifongiques sont aujourd'hui disponibles pour la prévention et le traitement des candidoses invasives : échinocandines, antifongiques azolés, polyènes et pyrimidines. Du fait d'une efficacité importante et d'une meilleure tolérance, les échinocandines et les antifongiques azolés sont les plus largement utilisés. L'utilisation massive de ces molécules a conduit à une modification de l'épidémiologie des candidoses invasives, avec l'émergence d'espèces non-*albicans* intrinsèquement moins sensibles à ces antifongiques, à l'exemple de *C. glabrata* ou *C. parapsilosis*. De plus, des souches résistantes voire multi-résistantes aux échinocandines et aux antifongiques azolés sont de plus en plus fréquemment isolées, et associées à des échecs thérapeutiques. L'activité de ces antifongiques est également limitée par le phénomène de tolérance, résultant de la capacité d'adaptation des levures aux stress membranaires et pariétaux induits par ces molécules.

Pour toutes ces raisons, l'identification et le développement de nouvelles stratégies antifongiques sont nécessaires. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette optique, avec pour objectifs l'étude de la tolérance et de la résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. et la caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans ces processus.

La première partie de ce travail a permis de démontrer l'intérêt du séquençage nouvelle génération et d'une approche multigénique pour l'étude des mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *Candida* spp. Par ce biais, il a été possible d'appréhender de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux antifongiques, qui nécessitent toutefois d'être confirmés.

Dans un deuxième temps, ce travail a permis de mettre en évidence que l'ensemble des protéines de la voie de signalisation du pH ou voie Rim chez les levures est impliqué dans la tolérance aux antifongiques chez *C. albicans*, l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine. De plus, de nouveaux gènes Rim-dépendants ont été identifiés par *RNA-sequencing*, à l'exemple de *HSP90*, codant pour une protéine chaperone responsable de la régulation de multiples processus biologiques, et *IPT1*, responsable de la biosynthèse du principal sphingolipide membranaire. Ces deux gènes ont précédemment été impliqués dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandines chez *C. albicans* et pourraient participer à la tolérance aux antifongiques médiée par la voie Rim. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes : en effet, en ciblant la voie Rim, il pourrait être possible de potentialiser l'activité des molécules antifongiques actuellement commercialisées et de cibler indirectement Hsp90 tout en s'affranchissant des problèmes de toxicité car cette voie de signalisation est spécifique du règne fongique.

Enfin, une dernière partie de ce travail réalisée dans le cadre du partenariat de l'ANR FungiBET a permis de montrer que la protéine BET (*Bromodomain and Extra-Terminal*) Bdf1 de *C. glabrata*, impliquée dans la régulation épigénétique de la transcription, est essentielle à la croissance *in vitro*. Plus précisément, l'intégrité des deux bromodomains BD1 et BD2 de Bdf1, responsables de la liaison de cette protéine aux histones, est essentielle chez cette espèce, qui est la deuxième la plus fréquemment isolée dans les candidoses invasives en Europe et aux Etats-Unis. Ce résultat confirme les premières données obtenues chez *C. albicans*, et l'intérêt de l'inhibition des protéines BET fongiques comme nouvelle stratégie antifongique.

Mots-clés : *Candida* spp., antifongiques, tolérance, résistance, pH, protéines BET

Abstract

The incidence of invasive candidiasis (IC) has dramatically increased over the past decades, partly due to the increasing number of at-risk patients. IC is associated with high mortality rates: however, its prognosis can be improved by early treatment. Four antifungal classes are available today for the prevention and treatment of IC: echinocandins, azoles, polyenes and pyrimidines. Due to their high efficacy and interesting safety profile, echinocandins and azoles are more commonly used. Massive use of these compounds has led to epidemiological changes in IC, with the emergence of non-*albicans* species which are intrinsically less susceptible to these antifungals, such as *C. glabrata* or *C. parapsilosis*. In addition, *Candida* spp. strains resistant, or even multiresistant, to azoles and echinocandins are increasingly isolated and associated with therapeutic failures. Antifungal activity is also limited by tolerance, a reversible phenomenon resulting from the yeast's adaptation to membrane and cell wall stresses caused by these molecules.

For these reasons, identification and development of new antifungal strategies are needed. This work aimed at studying antifungal resistance and tolerance in *Candida* spp. and characterizing new therapeutic targets involved in these process.

First, this work showed the interest of next-generation sequencing and multigene approaches to study mechanisms involved in resistance to echinocandins and azoles antifungals in *Candida* spp. It notably allowed to identify new mechanisms involved in antifungal resistance, which still need to be confirmed.

In a second part, this work allowed to show that all the proteins of the pH-signaling pathway, known as the Rim pathway in yeasts, are involved in antifungal tolerance in *C. albicans*, the most frequent species responsible for IC in humans. In addition, new Rim-dependent genes were identified through RNA-sequencing, such as *HSP90*, coding for a major chaperone involved in the regulation of multiple cellular process, as well as *IPT1*, responsible for the synthesis of the main membrane sphingolipid.

Both genes were previously shown to be involved in azoles and echinocandins tolerance in *C. albicans*, and could therefore play a role in antifungal tolerance mediated by the Rim pathway. These results offer great perspectives. Indeed, targeting the Rim pathway would allow to enhance the activity of commercially available antifungals and to indirectly target Hsp90, with no or limited toxicity as this signaling pathway is fungal-specific.

Thirdly, a last part of this work performed in the context of the ANR FungiBET consortium, allowed to show that the BET protein Bdf1 in *C. glabrata*, which is involved in epigenetic regulation of transcription, is required for *in vitro* growth. More precisely, the integrity of both BD1 and BD2 Bdf1 bromodomains are essential in this species, which ranks second among causes of IC. This result confirms the first data obtained in *C. albicans* and the interest of inhibiting fungal BET proteins as a new antifungal strategy.

Keywords: *Candida* spp., antifungal, tolerance, resistance, pH, BET proteins