# Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

# 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, Rapporteur 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-Mycologie 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 reconnaitront, 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**

PAR	TIE 1	: INTRODUCTION	. 7
1.	Canc	dida spp	7
	1.1.	Généralités	7
	1.2.	Candida albicans	8
	1.2.1	1. Caractéristiques génétiques	8
	1.2.2	2. Caractéristiques morphologiques	9
	1.3.	Candida glabrata	11
	1.3.1	1. Caractéristiques génétiques	12
	1.3.2	2. Caractéristiques morphologiques	12
	1.4.	Pouvoir pathogène/facteurs de pathogénicité de Candida spp	12
	1.4.1	1. C. albicans	12
	1.4.2	2. C. glabrata	14
2.	Cano	didoses invasives	15
	2.1.	Définition	15
	2.2.	Epidémiologie	16
	2.3.	Facteurs de risque	17
3.	Anti	ifongiques	18
	3.1.	Antifongiques azolés	18
	3.1.1	1. Molécules	18
	3.1.2	2. Mécanisme d'action	20
	3.2.	Echinocandines	21
	3.2.1	1. Molécules	21
	3.2.2	2. Mécanisme d'action	22
	3.3.	Autres antifongiques	22
	3.4.	Traitement et prophylaxie des candidoses invasives	23
4.	Résis	istance aux antifongiques	25
	4.1.	Mécanismes de résistance aux antifongiques azolés	26
	4.1.1	1. Diminution de la concentration intracellulaire en antifongique	26
	4.1.2	2. Modification de la cible	28
	4.1.3	3. Surproduction de la cible	28
	4.1.4	4. Contournement métabolique	28
	4.1.5	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	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	. То	olérance 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	. Vo	oie de signalisation du pH : voie Rim	44
7	. Pr	rotéines BET fongiques	48
PA	RTIE	2 : OBJECTIFS ET TRAVAIL DE THESE	50
1 a	. Id ntifor	lentification de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance a ngiques chez <i>Candida</i> spp	ux 51
2	. In	nplication de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échinocandin	es
C	hez <i>C.</i>	albicans	51
3	. Id 51	lentification d'une nouvelle cible antifongique potentielle chez <i>C. glabrata</i> : la protéine Bd 1	1.
PA	RTIE	3 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	53
1	. Re	ésistance aux antifongiques chez <i>Candida</i> spp. en réanimation	53
	1.1.	Résumé	53
	1.2.	Revue	54
2	. Hi	istone déacétylases (HDACs) et leur inhibition chez <i>Candida</i> spp	75
	2.1.	Résumé	75
	2.2.	Revue	76
PA	RTIF	4 : BESULTATS	)5
	L	entification de nouveaux mécanismes notentiellement impliqués dans la résistance a	UY
a	ntifor	ngiques chez Candida spp	95
	1.1.	Résumé	95
	1.2.	Article	<del>9</del> 6

2. Im chez <i>C.</i> (	plicatio <i>albicai</i>	on de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échin	ocandines
2.1.	Résu	ımé	120
2.2.	Mar	nuscrit	121
3. Bd <sup>-</sup>	f1, noı	uvelle cible antifongique ?	158
3.1.	Inhil	bition de la protéine BET Bdf1 chez <i>C. albicans</i>	158
3.1	1.	Contexte	158
3.1	2.	Article	158
3.2.	Inhil	bition de la protéine BET Bdf1 chez <i>C. glabrata</i>	198
3.2	.1.	Contexte et objectifs	198
3.2	.2.	Résultats	198
	3.2.2.1	. BDF1 est essentiel chez C. glabrata	198
3	3.2.2.2	. Les bromodomaines BD1 et BD2 de BDF1 sont essentiels chez C. glabra	ta 201
3	3.2.2.3	Conclusion	203
3.2	.3.	Matériel et méthodes	203
3	3.2.3.1	. Souches et plasmides	203
3	3.2.3.2	Conditions de culture	205
3	3.2.3.3	. Test de croissance en milieu solide	205
	3.2.3.4	Extraction des protéines totales, SDS-page et western-blot	205
ARTIE	5 : DI	SCUSSION	206
1. Ide antifon	entifica giques	tion de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la résis chez Candida spp	tance aux 206
1.1.	Mut	ations associées à la résistance aux échinocandines	207
1.2.	Mut	ations associées à la résistance aux antifongiques azolés	207
1.3.	Inté	rêt d'une approche multigénique pour l'étude de la résistance aux antifong	iques. 208
1.4.	Con	clusion	209
2. Im chez <i>C</i> .	plicatio <i>albicai</i>	on de la voie Rim dans la tolérance aux antifongiques azolés et aux échin	ocandines
2.1.	La v	oie Rim est impliquée dans la tolérance aux antifongiques chez C. albicans.	210
2.2.	Plus	ieurs gènes impliqués dans la tolérance aux antifongiques sont Rim-dépend	dants . 211
2.3.	L'inł	nibition de la voie Rim est une nouvelle stratégie antifongique d'intérêt	212
2.4.	Con	clusion	213
3. Bd	f1 : no	uvelle cible antifongique ?	213
3.1.	Bdf1	et Candida albicans	214
3.2.	Bdf1	et Candida glabrata	214
3.2 in v	.1. vivo	Etude de l'implication de BDF1 et des bromodomaines BD1 et BD2 dans la 214	a virulence
3.2	.2.	Recherche d'inhibiteurs des bromodomaines de Bdf1	215
3.3.	Bdf1	Let résistance aux antifongiques	216

3.4. Conclusio	on : inhibition des protéines BET chez d'autres espèce	es fongiques 216
PARTIE 6 : CONCL	LUSION	
PARTIE 7 : BIBLIO	GRAPHIE	

# 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>	204
Tableau 4 : Liste des souches utilisées pour le projet Bdf1 C. glabrata	204

# Liste des figures

igure 1 : Phylogénie des principales espèces pathogènes du genre <i>Candida</i> spp
Figure 2 : <i>C. albicans</i> : reproductions asexuée et parasexuée10
Figure 3 : Morphologie de <i>C. albicans</i>
Figure 4 : Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la morphogénèse chez C. albicans 14
Figure 5 : Structure des antifongiques triazolés19
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
igure 8 : Principaux mécanismes de résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines 32
Figure 9 : Concepts de résistance et tolérance aux antifongiques
igure 10 : Interactions entre Hsp90, la voie de la calcineurine et la voie des MAP kinases médiée par
a PKC dans la tolérance aux antifongiques40
igure 11 : Voies de signalisation impliquées dans le remodelage de la paroi fongique
Figure 12 : Voie de signalisation du pH ou voie Rim ( <i>C. albicans</i> )
igure 13 : Pourcentages d'homologies entre les séquences des bromodomaines BD1 et BD2 des
protéines BET fongiques ( <i>S. cerevisiae, C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i> ) et humaines
-igure 14 : Caractérisation de la souche C. glabrata pMET-BDF1
Figure 15 : Restauration de l'expression de <i>BDF1</i>
igure 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

#### 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 ( $\beta$ -1,3-glucanes,  $\beta$ -1,6-glucanes +/-  $\alpha$ -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  $\alpha$ . Seules les cellules *opaque* homozygotes pour le locus MTL, a/a ou  $\alpha/\alpha$ , 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. <u>Caractéristiques morphologiques</u>

*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  $\mu$ m, 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 whiteopaque est majoritairement décrite pour les cellules homozygotes a/a ou  $\alpha/\alpha$  pour le locus MTL, et la capacité de reproduction des cellules opaque a/a ou  $\alpha/\alpha$  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 chlamydospores, 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  $\mu$ m, 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 ellesmêmes (19,37,38).

# 1.4.1. <u>C. albicans</u>

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 CO<sub>2</sub> 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 invasines (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. <u>C. glabrata</u>

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. guillermondii*, *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<sup>ème</sup> agent responsable de septicémies nosocomiales en réanimation (51). D'autres études suggèrent que *Candida* spp. se situerait plutôt entre le 7<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> 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 :

17

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  $14\alpha$ -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<sup>®</sup>, Pfizer), l'itraconazole (SPORANOX<sup>®</sup>, Janssen-Cilag), le voriconazole (VFEND<sup>®</sup>, Pfizer), le posaconazole (NOXAFIL<sup>®</sup>, MSD) et depuis peu, l'isavuconazole (CRESEMBA<sup>®</sup>, 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<sup>ère</sup> 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.

18



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  $14\alpha$ -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  $14\alpha$ -méthylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -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 fongistatiques 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.

20



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<sup>®</sup>, MSD), l'anidulafungine (ECALTA<sup>®</sup>, Pfizer) et la micafungine (MYCAMINE<sup>®</sup>, Astellas).

### 3.2.2. <u>Mécanisme d'action</u>

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  $\beta$ -1,3-glucane synthase, entraînant une altération de la paroi fongique par diminution de la synthèse d'un de ses constituants majeurs : les  $\beta$ -1,3-glucanes. La  $\beta$ -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 chaines linéaires de  $\beta$ -1,3-glucanes à partir d'UDP-glucose (73). Chez *C. albicans*, l'activité  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 extramembranaires 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).

23



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<sup>ère</sup> 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<sup>ère</sup> intention, en alternative aux échinocandines, chez les patients nonneutropéniques, non critiques et pour lesquels l'isolement d'une espèce résistante au fluconazole est peu probable, ainsi que chez les patients neutropéniques, non critiques 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<sup>ère</sup> 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<sup>ème</sup> 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. <u>Diminution de la concentration intracellulaire en antifongique</u>

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 Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>.

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).

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

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 $\alpha$ 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 $\alpha$ -méthylfecostérol (dérivé non toxique dont la biosynthèse fait intervenir Erg3p), au lieu du produit toxique 14 $\alpha$ -méthylergosta-8,24-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -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  $\beta$ -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 fluconzole (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 fongistatiques : 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  $\beta$ -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. <u>HSP90</u>

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 posttraductionnelles (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 sousunité 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 attenue 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  $\beta$ -1,3- et  $\beta$ -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  $\alpha$ -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).



Glucan and chitin synthesis, cell wall proteins, antifungal resistance, tolerance and paradoxical growth

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 chaine (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).

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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

pH physiologique
8,3-8,4
7,6-8,4
7,4
7,35-7,45
7,3
6,7-7,1
5,8
5,5
4-5
0,9-1,5

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

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<sup>3+</sup> 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  $\beta$ -(1,3)-glucanosyltransférases aux fonctions redondantes, sont différentiellement 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 apparait 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 méïose, 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 *CAGLOCO2541g*. 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				S.cer	C.alb	C.gla
		Brd2	Brd3	Brd4	Brdt	Bdf1	Bdf1	Bdf1
	Brd2		87	79	74	35	31	35
Ian	Brd3	82		81	74	32	31	33
Ĩ	Brd4	81	81	-	73	35	32	34
-	Brdt	72	71	74		33	31	31
S.cer Bdf1 C.alb Bdf1 C.gla Bdf1		39	38	40	41	22.2	66	84
		44	42	44	46	58		61
		40	38	37	38	71	57	



### 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<sup>ème</sup> 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. [et font l'objet d'une publication acceptée dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* en décembre 2017]

#### 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 bromodomaines 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*. [acceptée et publiée dans *Nature communications* en mai 2017] 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. <u>Résumé</u>

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<sup>®</sup> (Biomérieux) ou encore la technique Sensititre YeastOne<sup>®</sup> (Trek diagnostic systemes) 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<sup>ème</sup> 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.<u>Revue</u>

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 ESIĈM 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  $(\boxtimes) \cdot C$ . Garnaud  $\cdot M$ . Cornet Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France

#### Introduction

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

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

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, diagnostic tools for confirming the diagnosis remains 4]. Antifungal drug resistance was considered less problimited. Increasing numbers of ICU patients without lematic in *Candida* spp. than in other pathogens, but azoles have led to clinical failures [5, 6]. This is a matter of concern because of the limited number of drug classes targeting different fungal components and because the number of patients at risk receiving treatment is continually growing, thus further increasing antifungal drug pressure.

In this review, we firstly summarize the basis of the mechanisms of action and resistance concentrating on recent advances that improve our understanding of antifungal drugs. Then, we describe the current changes in the epidemiology of Candida spp. resistance. We enlighten their consequences for responses to antifungal treatments and for the optimal choice for empiric, preemptive and targeted strategies in ICU patients. The clinical relevance of the new developments for laboratory antifungal drug testing and for the detection of resistance-associated mutations is discussed with specific attention paid to practical approaches, to assess the risk of clinical treatment failure and to improve its prevention.

#### Targets and mechanisms of action of systemic antifungal drugs

Fungi are more closely related to humans than other pathogens, such as bacteria, limiting the number of available antifungal targets. Despite the introduction of a novel drug class exploiting a new target (echinocandins) and new azole drugs with a broader spectrum of activity (voriconazole, posaconazole), the antifungal arsenal still remains restricted.

Antifungal agents acting on the cell wall and/ or plasma membrane

#### **Echinocandins**

Caspofungin, micafungin and anidulafungin block cell wall synthesis by inhibiting (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase, which catalyses the first step in the elongation of (1,3)- $\beta$ -D-glucans, a major cell wall component together with chitin and mannoproteins. Echinocandins inhibit the catalytic subunit (Fksp) encoded by two or three FKS genes, depending on the fungal species (Fig. 1) [7].

#### Azoles

Triazoles-fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole-are the azoles most commonly used to treat invasive fungal infections. Isavuconazole (ISA;

recent increases in resistance to both echinocandins and BAL4815), is a novel triazole currently in global phase 3 clinical trials for treatment of invasive fungal infections. It showed good activity against Candida spp. with reduced susceptibility to currently used azoles (personal communications: Smart JI, P983, ECCMID, Berlin, 2013 and Maertens J., O230, ECCMID, Barcelona, 2014). Triazoles block the synthesis of the main sterol of fungal membranes, ergosterol, by targeting the lanosterol- $14\alpha$ demethylase, also called Erg11p or Cyp51p (Fig. 1). This blockade has three major effects: (a) ergosterol depletion and changes in membrane permeability, (b) changes in the activity of membrane-bound proteins, some of which are involved in cell wall synthesis and (c) synthesis of toxic sterols as a result of Erg3p activity and accumulation of  $14\alpha$ -methylated sterols (Fig. 1) [8]. Azoles have long been considered to act solely on the cell membrane, but there is growing evidence to suggest that they also act on the cell wall structure. Studies have demonstrated compensatory responses similar to those observed with cell wall-disrupting agents [9, 10].

#### Polyenes

Amphotericin B (AMB) and its lipid and liposomal derivatives bind ergosterol, causing pore formation and ion leakage, with fungicidal effects (Fig. 1). It has been suggested that pore formation is not required for the fungicidal effect, which is dependent only on ergosterol binding [11]. In addition, a recent study revealed that AMB is able to aggregate and to act like a "sponge", thus extracting this key component from cell membranes [12]. Cholesterol is the major sterol of the mammalian membranes. Ergosterol and cholesterol have different structures, but drug specificity is not absolute and AMB has also been shown to bind cholesterol [13]. New formulations involving liposome encapsulation (L-AMB), AMB colloidal dispersion (ABCD) and AMB lipid complex (ABLC) have increased drug specificity and delivery, greatly reducing toxicity without decreasing efficacy [14]. However, ABCD caused a similar number of infusion-related reactions to AMB, and is no longer available.

Antifungal agents acting on nucleic acids and protein synthesis

Flucytosine is a pyrimidine analogue that is converted to 5-fluorouracil, which inhibits both RNA and DNA synthesis. Cytosine permease (Fcy2p), cytosine deaminase (Fcy1p), and uracil phosphoribosyl transferase (Fur1p) activities are required for antifungal activity (Fig. 1).



Fig. 1 Targets and mechanisms of action of systemic antifungal drugs. Sites and modes of action of the current classes of systemic antifungal drugs used to treat invasive candidiasis. **a** Echinocandins target cell wall synthesis, inhibiting (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthesis, which occurs on the inner side of the plasma membrane. **b** Azoles target the ergosterol biosynthesis pathway in the endoplasmic reticulum. They block  $14\alpha$ -demethylase (also called Erg11p or

#### Antifungal drug resistance in Candida spp.

Tolerance and resistance due to cellular stress responses

An increase in cell wall chitin content has been shown to occur in response to the exposure to echinocandin and azoles in *C. albicans* [10, 15]. The blockade of this cell wall compensatory mechanism with calcineurin or protein kinase C (PKC) inhibitors restores the fungicidal activity of both azoles and echinocandins consistent with the hypothesis that chitin accumulation plays a role in tolerance to these drugs [16, 17]. Furthermore, a high chitin content has been associated with resistance to echinocandins in mice and in 'paradoxical growth', defined as the ability to develop in vitro at high, but not intermediate concentrations of a drug [18]. The clinical impact of this paradoxical growth in vitro remains unclear, as it is also related to lower virulence [19].

Molecular mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida* spp.

The molecular mechanisms of antifungal drug resistance are presented in Fig. 2 and Table S1 (electronic supplementary material).

Cyp51p), resulting in ergosterol depletion in the membrane and activation of the Erg3p alternative pathway, leading to the synthesis of toxic sterols. **c** Polyenes bind to cell membrane ergosterol creating pores and aggregate, to act as a "sponge", thus resulting in ion depletion. **d** Flucytosine acts in the nucleus, where its toxic metabolites inhibit nucleic acid synthesis

#### Echinocandins

Molecular resistance to echinocandins is mediated principally by mutations in *FKS* genes: *FKS1* in *Candida* spp., and *FKS1* and *FKS2* in *C. glabrata*. These mutations are located in two "hotspot" regions, HS1 and HS2 and are mostly S645F/P/Y and S629P in *FKS1* of *C. albicans* and *C. glabrata* respectively, and S663F/P in *C. glabrata FKS2* [7, 20]. These mutations confer cross-resistance to all three echinocandins, by modifying the catalytic and kinetic properties of the target enzyme.

#### Azoles

Decreased susceptibility or resistance to azoles in *Candida* spp. is mediated by various mechanisms, which may operate simultaneously in a given isolate, following sequential acquisition under drug pressure [21, 22]. Drug efflux is a major mechanism, mediated by mutations of genes encoding regulators of transporters of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily or the major facilitator superfamily (MFS) [22, 23]. ABC transporter overexpression is associated with cross-resistance to diverse azoles, whereas MFS transporter overexpression is limited to resistance to fewer



Fig. 2 Molecular mechanisms of echinocandin and azole resistance in *Candida* spp. **a** Regular  $\beta$ -1,3-glucan synthesis on the inner side of the fungal membrane. **b** Typical echinocandin activity. These compounds block cell wall synthesis by inhibiting the Fksp subunit of the  $\beta$ -1,3-glucan synthase. **c** Echinocandin resistance due to *FKS* mutations. The target enzyme is less sensitive to echinocandins, allowing the production of  $\beta$ -1,3-glucans. **d** Typical ergosterol synthesis at the endosplamic reticulum and uptake of azole antifungal drugs into the cytosol of the fungal cell. e Typical azole

activity. These molecules inhibit the lanosterol-14a-demethylase (Erg11p), leading to (1) membrane ergosterol depletion and (2) the production of toxic sterols via Erg3p. f Azole resistance due to (1) the overproduction of transporters, increasing azole efflux, (2) alteration of the target enzyme by mutations of ERG11, (3) Erg11p overproduction, (4) mutations of ERG3 preventing the azolemediated production of toxic sterols which are substituted by the non-toxic fecosterol

azoles (fluconazole, voriconazole) (Table S1). A second Polyenes major mechanism is overproduction of the target enzyme Erg11p [22]. Amino acid substitutions in Erg11p may also decrease the affinity of the drugs for this enzyme [24]. Finally, ERG3 mutations are associated with cross-resistance to azoles through a metabolic bypass leading to the synthesis of fecosterol which is able to replace ergosterol (Fig. 2) [25].

Other major genetic alterations may decrease azole susceptibility. Aneuploidy, through chromosomal duplication or loss of heterozygosity, increases the copy number of genes involved in azole resistance in C. albicans and C. glabrata [22, 23, 26]. Respiratory and mitochondrial deficiencies may also contribute to azole resistance in these species [27].

Polyene resistance has been little described and the exact mechanisms involved remain unclear, partly because of the small number of clinical isolates displaying altered susceptibility in vitro. Resistance is associated with changes in membrane sterol composition due to mutations in the genes of the ergosterol biosynthesis pathway: *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* and *ERG11* [28].

#### Flucytosine

Two main mechanisms of flucytosine resistance are known: (1) decreased uptake of the drug due to mutations

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 FUR1. Such mutations have been described in clinical isolates of *C. albicans* and *C. lusitaniae* [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 stressinduced 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)- $\beta$ -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<sup>®</sup> (bioMérieux), Sensititre YeastOne<sup>®</sup> (TREK diagnostic

systems), ATB fungus 2<sup>®</sup> (bioMérieux) and Vitek-2<sup>®</sup> (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 µg/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 mutations exhibiting potential resistance and mechanisms.

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

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/l)									
	C. albicans		C. glabrata		C. krusei		C. parapsilosis		C. tropicalis	
	$\leq S$	>R	$\leq S$	>R	$\leq S$	>R	$\leq S$	>R	$\leq S$	>R
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

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

Adapted from Arendrup et al. [20] drug resistance updates (doi:10.1016/j.drup.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 melt curve analysis or microarrays, or microsphere-based technologies, such as Luminex Mag Pix (Austin, TX)

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<sup>®</sup> (bioMérieux) on positive blood samples, has been evaluated. Agreement between direct and standard methods was high and falsepositive results for resistance to fluconazole and voriconazole were obtained for 7 % of isolates, with falsenegative 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 speciesspecific, 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.

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

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

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 mica-fungin, ANI anidulafungin

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],

<sup>a</sup> This slight decrease in susceptibility to AMB is more pronounced in North America than in Europe

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* 

are increasingly being reported and this new entity also needs to be closely monitored [54, 95–98].

Even if it remains uncommon, *Candida* spp. drug resistance is clearly becoming an 'every-day' concern in the mycology laboratory. Determining initial but also subsequent MICs is necessary to assess microbial resistance emergence.

#### **Clinical impact of antifungal resistance**

Clinical resistance

The failure of antifungal therapy or clinical resistance is defined as a steady-to-worse infectious syndrome with no improvement of attributable symptoms during the evaluation, death being the "ultimate" failure. However, it remains difficult to assess whether the patient dies with or of fungal infection. These criteria classify clinical outcome in trials, but can also be applied for bedside management [99]. Breakthrough infections are considered as clinical resistance and are microbiologically documented. They have frequently, but not exclusively, been described in cases of echinocandin exposure [5, 7, 75, 76, 86–90, 100, 101].

Despite its recent spread, microbiological resistance is not the major factor underlying clinical resistance. Indeed, underlying diseases, immunosuppression, complicated abdominal surgery, extreme age and renal failure, all frequently encountered in ICU patients, are known to be predictors of mortality in cases of invasive candidiasis [102, 103]. Clinical failure may also occur when the effective concentration of the chosen drug is not reached at the infected site. This situation frequently occurs for biofilms on prosthetic devices or catheters, abscesses, chorioretinitis or endophthalmitis, or other sanctuary foci. As a result of their multiple comorbidities and management strategies, ICU patients may display higher pharmacokinetic (PK) instability than other patients. Thus, regular, complete investigations of deep infections and assessments of the PK/pharmacodynamic properties of antifungal drugs are essential for correct appraisal of the clinical response. For example, given their poor penetration into the eye, echinocandins are not recommended in cases of suspected ocular secondary dissemination of Candida, whereas echinocandins or L-AMB are the drugs of choice when central catheters cannot be removed [104]. Given the lower frequency of primary resistance than initially thought and its beneficial penetration properties, 5-fluorocytosine may be administered in combination with other drugs to treat invasive candidiasis at deep secondary sites [105]. A recent review has provided a comprehensive analysis of the tissue penetration properties of current antifungal agents [106].

Clinical relevance of in vitro antifungal drug susceptibility testing and of the molecular detection of mutations

Crude MICs are not sufficient to predict clinical outcome. Candidemia due to C. tropicalis, for which the MICs of all antifungal agents are very low, has been associated with a higher mortality than for other species [102]. By contrast, C. parapsilosis isolates have high MICs for echinocandins, although treatment failure remains rare [104, 107]. These discrepancies between laboratory tests on antifungal drugs and clinical outcome have been extensively reported and are due to several factors, including a species-dependent virulence traits and patient-dependent conditions. The use of the revised CBPs, partly taking these factors into account, may improve the clinical predictive value of in vitro susceptibility tests. Thus, close monitoring of MICs together with accurate interpretation based on revised CBPs is always warranted to ensure appropriate specific treatment (Fig. 3). Antifungal susceptibility testing (AST) on Candida strains isolated from deep sites is recommended by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) [104]. Reference methods are preferred but commercial techniques can be used if verification has been made that the endpoint for each species mirrors those of reference methods [104].

There is growing evidence that the detection of mutations, and especially FKS mutations, could be used as a predictive marker of clinical failure. In one recent study, FKS mutations were found in 7.9 % of 313 C. glabrata isolates from blood samples, and up to 80 % of patients infected with strains with both FKS mutations and high MICs for caspofungin experienced clinical failure or recurrent infection [5]. Another study identified C. glabrata FKS mutation as the only independent risk factor associated with clinical failure and showed that the detection of FKS mutations was superior to MIC for predicting treatment response [108]. The same group subsequently showed that the Etest<sup>®</sup> method (bioMérieux, France) and a MIC greater than 0.25  $\mu$ l/ml for caspofungin provided 100 % sensitivity and 94 % specificity for the identification of FKS mutant isolates. Prior echinocandin exposure and MIC values greater than 0.25, 0.06 and 0.03 µl/ml for caspofungin, anidulafungin and micafungin, respectively, were found to be predictive of clinical failure in 91, 89 and 78 % of patients with treatment failure, respectively [6]. These findings have led to valuable, easy-to-use algorithms for predicting the outcome of echinocandin treatment from MIC levels and prior echinocandin exposure status. Not all mycology laboratories are equipped to detect FKS mutations and the Etest® method performs well for the detection of non-wild-type strains [109, 110]; this bedside strategy can therefore be used to identify patients at risk of treatment failure, for whom other antifungal treatments should be prescribed.



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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Perlin DS (2011) Current perspectives on echinocandin class drugs. Future Microbiol 6:441–457. doi: 10.2217/fmb.11.19
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol 11:272–279

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Hamill RJ (2013) Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. Drugs 73:919–934. doi: 10.1007/s40265-013-0069-4
- Walker LA, Gow NAR, Munro CA (2010) Fungal echinocandin resistance. Fungal Genet Biol 47:117–126. doi: 10.1016/j.fgb.2009.09.003
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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 azoleresistant 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
- 25. Morio F, Pagniez F, Lacroix C et al (2012) 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 67:2131–2138. doi: 10.1093/jac/dks186
- 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
- 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

28. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R et al (2013) Fitness tradeoffs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. PLoS Biol 11:e1001692. doi:

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
- 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 lusitaniae*. Antimicrob Agents Chemother 53:2982–2990. doi: 10.1128/AAC.00880-08
- Delattin N, Cammue BPA, Thevissen K (2014) Reactive oxygen speciesinducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. Future Med Chem 6:77–90. doi: 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
- 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
- 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
- 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
- Mathé L, Van Dijck P (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. Curr Genet. doi:10.1007/s00294-013-0400-3

- 38. Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA et al (2013) Role of matrix  $\beta$ -1.3 glucan in antifungal resistance of nonalbicans Candida biofilms. Antimicrob Agents Chemother 57:1918-1920. doi: 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
- 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
- 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
- 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

- 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 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- 53. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA et al (2006) Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for Candida bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. Antimicrob Agents Chemother 50:1287-1292. doi: 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
- 55. Guinea J, Recio S, Escribano 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
- 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
- 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
- 58. Loeffler J, Hagmeyer 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
- Pham CD, Bolden CB, Kuykendall RJ, 60. 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
- 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

- 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
- 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
- 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.00000000000221
- 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
- 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
- 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
- Kanafani ZA, Perfect JR (2008) Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin Infect Dis 46:120–128. doi: 10.1086/524071
- Guinea J (2014) Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. Clin Microbiol Infect. doi:10.1111/1469-0691.12539
- 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

- 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
- 73. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S et al (2008) A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in *FKS*1p 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR et al (2012) Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazoleresistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 50:1199–1203. doi: 10.1128/JCM.06112-11

- Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH et al (2012) Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from populationbased laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. Clin Infect Dis 55:1352–1361. doi: 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Kontoyiannis DP, Lewis RE (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Lancet 359:1135–1144. doi: 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
- 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

- 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
- 101. Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ (2009) Liposomal amphotericin B. Drugs 69:361–392. doi: 10.2165/00003495-200969030-00010
- 10.2105/00003495-200905050-0010
   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
- 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.00000000000221
- 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
- 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
- 107. Glöckner A, Cornely OA (2013) Practical considerations on current guidelines for the management of nonneutropenic adult patients with candidaemia: practical considerations on current guidelines. Mycoses 56:11–20. doi: 10.1111/j.1439-0507.2012.02208.x
- 108. Shields ŘK, 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

- 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
- 110. Bourgeois N, Laurens C, Bertout S et al (2014) Assessment of caspofungin susceptibility of *Candida* glabrata by the Etest<sup>®</sup>, CLSI, and EUCAST methods, and detection of *FKS*1 and *FKS*2 mutations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. doi: 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
  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 113. Colombo AL, Guimarães T, Camargo
  - 15. Colombo AL, oumaraes T, Camago 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 118. Deshpande A, Gaur S, Bal AM (2013) 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
- 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
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
	Azolo antifungalo	<b>TAC1</b> *, <u>CDR1</u> , <u>CDR2 (</u> CA)	ABC transporters	(1 2)
Increased efflux	Azole antirungais	<b>CgPDR1</b> *, <u>CgCDR1</u> , <u>CgCDR2</u> , <u>CgSNQ2</u> (CG)	+ role in biofilms	(1-5)
	Fluconazole	<b>MRR1</b> * (CA), <u>MDR1</u> (CA)	MFS transporters	(3,4)
	Azole antifungals	<b>ERG11</b> (CA, CG, CT)	Lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase	(5–7)
Alteration of antifungal target	Echinoconding	<b>FKS1</b> (CA, CG, CK, CT, CP)	Poto 1.2 glucon synthese	(0)
	ECHIHOCAHUIIIS	<b>FKS2</b> (CG)	Beta-1,5-glucall synthase	(0)
Overexpression of antifungal target	Azole antifungals	<b>UPC2</b> * (CA), <u>ERG11</u> (CA, CT)		(3,9,10)
Metabolic by-pass	Azole antifungals	<b>ERG3</b> (CA)	Sterol ∆ <sup>5,6</sup> -desaturase	(11)
		<b>ERG2</b> (CG)		
Changes in storal composition of call		<b>ERG3</b> (CT, CG)	Decrease or absence of	(4 12 16)
	Amphotericin B	<b>ERG5</b> (CA)	ergosterol	(4,12-10)
membranes		<b>ERG6</b> (CG)	+ role in biofilms	
		<b>ERG11</b> in association with <b>ERG3</b> (CA)		
Chromosomic alterations	Azolo antifungalo		Increase of gene copy	(2)
	Azole antifungals	ETGII, TACI, CYPDTI (CA, CG)	number	(5)
Reduced drug uptake	Flucytosine	<i>FCY2</i> (CA)	/	(17 10)
Alteration of drug metabolism	Flucytosine	<b>FCY1, FUR1</b> (CA)	/	(17,10)

**Bold** = presence of mutations, <u>underlined</u> = 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.
- 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, Gygax 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, Miegeville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the Candida albicans sterol Δ5,6-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.

- 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 lusitaniae. 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.

Antifungal agent		MIC bi (mg/L)	reakpoint )												
		C. albi	cans	C. glab	orata	C. kru	sei	C. para	apsilosis	C. trop	picalis	C. guillier	mondii	Non-species i breakpoints <sup>1</sup>	related
		S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>								
Amphotericin B															
	EUCAST	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
	CLSI	ND	ND	ND	1										
Fluconazole															
	EUCAST	2	4	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	2	4
	CLSI	2	4	0.002	32	-	-	2	4	2	4	ND	ND	ND	ND
Voriconazole															
	EUCAST	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
	CLSI	0.12	0.5	-	-	0.5	1	0.12	0.5	0.12	0.5	ND	ND	ND	ND
Posaconazole															
	EUCAST	0.06	0.06	IE2	IE2	IE2	IE2	0.06	0.06	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
	CLSI	ND	ND	ND	ND	ND									
Itraconazole															
	EUCAST	IP	IP	IP	IP	IP									
	CLSI	ND	ND	ND	0.125	0.5									
Anidulafungin															
	EUCAST	0.03	0.03	0.06	0.06	0.06	0.06	0.002	4	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
	CLSI	0.25	0.5	0.12	0.25	0.25	0.5	2	4	0.25	0.5	2	4	ND	ND
Micafungin															
	EUCAST	0.016	0.016	0.03	0.03	$IE^4$	IE <sup>4</sup>	0.002	2	IE <sup>4</sup>	$IE^4$	$IE^4$	$IE^4$	IE	IE
	CLSI	0.25	0.5	0.06	0.125	0.25	0.5	2	4	0.25	0.5	2	4	ND	ND
Caspofungin															
	EUCAST	Note <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>									
	CLSI	0.25	0.5	0.12	0.25	0.25	0.5	2	4	0.25	0.5	2	4	ND	ND
Flucytosine															
	EUCAST	ND	ND	ND	ND	ND									
	CLSI	ND	ND	ND	4	16									

Table S2: EUCAST and CLSI antifungal breakpoints for *Candida* species adapted from Arendrup et al, 2014 Drug Resist Updates. doi: 10.1016/j.drup.2014.01.001, with permission

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

### Notes:

<sup>1</sup>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.

<sup>2</sup> The ECOFFs for these species are in general higher than for *C. albicans*.

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

<sup>4</sup> 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.

<sup>5</sup> 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<sup>ère</sup> 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 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<sup>ème</sup> 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 cancérologie. Un seul inhibiteur sélectif a été développé à ce jour : MGCD290, inhibiteur sélectif de

75

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. <u>Revue</u>





# Histone Deacetylases and Their Inhibition in *Candida* Species

Cécile Garnaud<sup>1,2†</sup>, Morgane Champleboux<sup>3†</sup>, Danièle Maubon<sup>1,2</sup>, Muriel Cornet<sup>1,2\*</sup> and Jérôme Govin<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie et de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Grenoble, France, <sup>2</sup> Laboratoire TIMC-IMAG-TheREx, UMR 5525 CNRS-UGA, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France, <sup>3</sup> 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 mcornet@chu-grenoble.fr Jérôme Govin jerome.govin@inserm.fr

<sup>†</sup>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 (Karthikevan 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-Benéitez et al., 2016). Interestingly, *SIR2* is not present in all *Candida* spp. Thus, for example in *C. lusitaniae*, 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
	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	Uhl et al., 2003; Maglott et al., 2007; Hnisz et al., 2009, 2010

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
	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  $rpd31\Delta$  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-toopaque 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 welldescribed 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  $\mu$ g/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 echinocandinresistance 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 nonselective 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 highthroughput 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 azoleand 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

### REFERENCES

- Al-Dhaheri, 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

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 trough 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

- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, 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-Benéitez, 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 lusitaniae* 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 lusitaniae* 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-phasespecific 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 NADdependent 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.00 618-09
- 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 acetylationassociated 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). Haploinsufficiencybased 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 trichostatins 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, Champleboux, 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 Material



## 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 ESPript 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
100	53	54	21	20	20
53	100	77	23	22	22
54	77	100	21	21	20
21	23	21	100	54	52
20	22	21	54	100	76
20	22	20	52	76	100
	Ca_Hda1 100 53 54 21 20 20	Ca_Hda1         Cg_Hda1           100         53           53         100           54         77           21         23           20         22           20         22	Ca_Hda1         Cg_Hda1         Sc_Hda1           100         53         54           53         100         77           54         77         100           21         23         21           20         22         21           20         22         20	Ca_Hda1         Cg_Hda1         Sc_Hda1         Ca_Hos3           100         53         54         21           53         100         77         23           54         77         100         21           21         23         21         100           20         22         21         54           20         22         20         52	Ca_Hda1         Cg_Hda1         Sc_Hda1         Ca_Hos3         Cg_Hos3           100         53         54         21         20           53         100         77         23         22           54         77         100         21         21           21         23         21         100         54           20         22         21         54         100           20         22         21         54         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 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 phylogenic 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 Garnaud, Morgane Champleboux, Danièle Maubon, Muriel Cornet\*, Jérôme Govin\*

\* Correspondence: Muriel Cornet mcornet@chu-grenoble.fr Jérôme Govin Jerome.Govin@inserm.fr

	Hst3_HDA	Sirt1_HDA	Hst1_HDA	Sir2_HDA	Hst2_HDA	Sirt2_HDA	Sirt3_HDA	Sirt6_HDA	Sirt7_HDA	Sirt4_HDA	Sirt5_HDA	Set3_HDA	Hos3_HDA	Hda1_HDA	Hdac7_HDA	Hdac9_HDA	Hdac4_HDA	Hdac5_HDA	Hdac6_HDA2	Hdac10_HDA	Hdac6_HDA2	Hos1_HDA	Hdac8_HDA	Hos2_HDA	Hdac3_HDA	Hdac1_HDA	Hdac2_HDA	Rpd31_HDA	Rpd32_HDA	C. alb	picans	H. sa	piens	
_	Ca	Hs	Ca	Ca	Ca	۳ ۲	Ч	۳ ۲	۳	ъ	ъ	Ga	Ca	Ca	ъ	۳	ъ	ъ	ъ	Чs	Чs	Ca	۳	Ca	ъ	Чs	ъ	Ca	Ca	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	11	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	16	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	14	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	13	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	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	14	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	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	16	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				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		100			46	40	42	21	24	25	24	25	25	24	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			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				100	47	39	42	19	23	26	26	26	26	25	25	12	42	12	100	Hs_HDAC5_HDA
Is_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
ls_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
Is_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		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		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			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 Material

### 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. <u>Résumé</u>

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 impliquées 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 CqPDR1 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<sup>1,2\*</sup>, Françoise Botterel<sup>3,4</sup>, Natacha Sertour<sup>5</sup>, Marie-Elisabeth Bougnoux<sup>5,6</sup>, Eric Dannaoui<sup>4,7</sup>, Sylvie Larrat<sup>8,9</sup>, Christophe Hennequin<sup>10,11</sup>, Jesus Guinea<sup>12</sup>, Muriel Cornet<sup>1,2</sup> and Danièle Maubon<sup>1,2</sup>

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

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

superfamily.<sup>4</sup> Overproduction of the target enzyme, Erg11p, or amino acid substitutions in Erg11p are also important mechanisms in azole resistance.<sup>5,6</sup> *ERG3* mutations are associated with cross-resistance to azoles through a metabolic bypass.<sup>7</sup> There is growing evidence that the presence of mutations, especially *FKS* mutations, may be a predictive marker of clinical failure.<sup>1,8</sup> 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.<sup>1,9,10</sup>

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,<sup>11–13</sup> 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<sup>®</sup> 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 antifunaal 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, CqPDR1, 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<sup>®</sup> 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  $1 \times 10^9$  molecules/ $\mu$ 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<sup>®</sup> 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).<sup>14,15</sup>

### Genotyping

Sequential isolates of *C. albicans* were subjected to an MLST genotyping analysis as previously described.<sup>16</sup> Sequential isolates of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* were typed using microsatellites according to the methods described by Sabino *et al.*<sup>17</sup> and Enache-Angoulvant *et al.*,<sup>18</sup> 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× (217×; 1667×). NGS analysis

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

Isolate	Species	Isolation site	Phenotype	ERG11	ERG3	TAC1	CgPDR1	FKS1	FKS2	Described in
ATCC <sup>®</sup> 90028 <sup>TMb</sup>	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. <sup>32</sup>
DSY292	CA	oropharynx	azole resistant	Y132H (50%), G464S (100%), R467K (100%)	WT	WT	—	WT	_	Sanglard et al. <sup>33</sup>
DSY296	CA	oropharynx	azole resistant	G129A (100%), G464S (100%), G450E (100%)	WT	N977D (100%)	—	WT	_	MacCallum <i>et al</i> . <sup>34</sup>
CAAL2	CA	respiratory tract	azole resistant	D116E (46%), D153E (46%)	L193R (100%)	WT	—	WT	_	Morio et al. <sup>6,7</sup>
CAAL74	CA	mouth	fluconazole resistant	Y132F (99.9%), E266D (98%), G448V (98%), V488I (97%)	H28Y (45%), L193R (95%)	WT	_	WT	_	Morio et al. <sup>6</sup>
ATCC <sup>®</sup> 2001 <sup>™Ь</sup>	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 <i>et al.</i> <sup>25</sup> (Isolate D)
4/Tg5	CG	blood culture	azole and echinocandin resistant	WT	_	_	WT	F1335L (100%)	S663P (100%), M1331I (100%)	Chapeland-Leclerc <i>et al.</i> <sup>31</sup> (Isolate 4)
АТСС <sup>®</sup> 22019 <sup>тмь</sup>	СР	faeces	WT	F132Y <sup>c</sup> (99.9%)	_	_	—	_	—	http://www.lgcstandards- atcc.org/

CA, C. albicans; CG, C. glabrata; CP, C. parapsilosis. <sup>a</sup>Limited to the proteins encoded by the genes or regions of genes analysed in the study.

<sup>b</sup>Reference strains.

<sup>c</sup>Known 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	of the isolates	displaying	antifungal	resistance in	n vitro and	l analysed in	Phase 2
----------	--------------------	-----------------	------------	------------	---------------	-------------	---------------	---------

			Underlying	Antifungal				MIC <sup>b</sup> (n	ng/L)			Clinical
Patient	Isolate	Species	condition(s)	pre-exposure <sup>a</sup>	Isolation site	CAS	ANF	MCF	FLC	VRC	AMB	outcome
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 <sup>c</sup>	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.

<sup>a</sup>During the past year.

<sup>b</sup>Determined by the EUCAST reference method (except for amphotericin B: Etest<sup>®</sup> method).

<sup>c</sup>Liposomal 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.<sup>6,19</sup>

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  $810 \times$ (215x; 2984x), 1150x (488x; 2648x) and 537x (58x; 1626x), 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).<sup>20</sup>

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

	Strain	1		Antifungal	<b>T</b>	Isolation				MIC <sup>b</sup> (mg	g/L)		
Patient	isolate	species	condition	exposure (days) (period) <sup>a</sup>	lype of antifungal treatment	site	daya	CAS	ANF	MCF	FLC	VRC	Clinical outcome
6	CP-GRE-RIV1	СР	acute pancreatitis	AMB <sup>c</sup> (7)	curative	peritoneal fluid	D1	2	2	1	4	0.125	favourable
	CP-GRE-RIV2		·	(D23; D30)		catheter	D24	2	2	1	4	0.125	
9	CP-GRE-LOR1	CP	colectomy surgery	FLC (30)	curative	blood culture	D1	2	2	1	4	0.125	NA
	CP-GRE-LOR2			(D2; D32)		blood culture	D19	2	2	1	8	0.25	
10	CA-GRE-VIG1	CA	acute pancreatitis	FLC (30)	pre-emptive	blood culture	D1	0.125	≤0.015	≤0.015	0.25	≤0.015	favourable
	CA-GRE-VIG2			(D4; D34)		drain fluid	D10	0.125	≤0.015	0.03	0.25	≤0.015	
	CA-GRE-VIG3					peritoneal fluid	D33	0.125	≤0.015	≤0.015	≤0.125	≤0.015	
11	CG-GRE-FAU1	CG	liver transplant	CAS (33)	curative	blood culture	D1	0.25	0.03	≤0.015	8	0.25	favourable
	CG-GRE-FAU2			(D2; D35)		blood culture	D13	0.5	0.03	0.06	8	0.25	
12	CA-HM-FON1	CA	liver transplant	CAS (65)	prophylactic	urine	D1	0.125	≤0.015	0.06	≤0.125	≤0.015	death
	CA-HM-FON2			(D-1; D64)		urine	D65	0.25	≤0.015	0.06	≤0.125	≤0.015	
	CG-HM-FON1	CG	liver transplant	CAS (65)	prophylactic	mouth	D1	0.25	0.03	0.06	16	0.25	
	CG-HM-FON2			(D-3; D62)		peritoneal fluid	D56	0.25	0.03	0.06	16	0.25	
13	CA-HM-MAC1	CA	liver transplant	CAS (60)	curative	mouth	D1	0.125	≤0.015	≤0.015	0.25	≤0.015	death
	CA-HM-MAC2			(D16; D76)		axillary sample	D42	0.25	≤0.015	≤0.015	0.25	≤0.015	
14	CA-HM-CHV1	CA	liver transplant	CAS (16)	prophylactic	catheter	D1	0.125	0.03	≤0.015	0.125	≤0.015	favourable
	CA-HM-CHV2			(D3; D19)		mouth	D13	0.125	≤0.015	≤0.015	≤0.125	≤0.015	
15	CA-HM-SOU1	CA	liver transplant	CAS (32)	prophylactic	mouth	D1	0.125	≤0.015	0.03	0.25	≤0.015	favourable
	CA-HM-SOU2			(D-1; D31)		bile	D49	0.25	≤0.015	0.03	0.25	≤0.015	
16	CG-HM-HAB1	CG	liver transplant	CAS (95)	prophylactic then	urine	D1	0.5	0.03	0.06	>64	4	favourable
	CG-HM-HAB2			(D-5; D90)	curative	urine	D70	2	2	1	>64	8	
17	CG-HM-BIL1	CG	liver transplant	CAS (17)	prophylactic	BAL	D1	0.25	0.03	0.06	8	0.25	favourable
	CG-HM-BIL2		·	(D-2; D15)		urine	D35	0.25	0.03	0.06	8	0.125	

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

CA, C. albicans; CG, C. glabrata; CP, C. parapsilosis; CAS, caspofungin; ANF, anidulafungin; MCF, micafungin; FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; D, day; NA, not available. <sup>a</sup>D1 is defined for each strain as the day of isolation of the first isolate. <sup>b</sup>Determined by the EUCAST reference method. <sup>c</sup>Liposomal amphotericin B.

Patient	Isolate	Gene	Nucleotide substitution	Depth	Frequency	Amino acid change	Interpretation
1	CA-GRE-TOP	ERG11	T348A	402	12.0	D116E	polymorphism <sup>a</sup>
		EKG3	G30/A	1584	51.0	DIU3N	may contribute to antifungal resistance
		FKSI (HSI)	<u>11933C</u>	<u>852</u>	100.0	<u>5645P</u>	Involved in echinocanains resistance
		TAC I	C28041	598	54.0	5935L	polymorphism <sup>2</sup>
10		TAC I	128220	598 1207	55.0	5941P	polymorphism
10	CA-GRE-VIGI	TAC I	12022C	1207	97.0	5941P 50/1D	polymorphism
	CA-GRE-VIGZ	TAC I	12022C	1110	96.0	5941P	polymorphism
10		TAC I	12022C	1190	99.0 62.0	5941P 50251	polymorphism
12		TAC I	C20041	149	62.0	5955L 50/1D	polymorphism
		TAC1	12022C	100	60.0	5941P	polymorphism
		TAC I	C20041	190	49.0 50.0	5955L 50/1D	polymorphism
13	СА-НМ-МАС1	FPG3	G684A	360	/0.0	3341F W/228Stop	involved in azole resistance in the homozyaous state
15	CATIMIMACI	TAC1	C2804T	156	49.0	<u>802203(0p</u>	nolvmorphism <sup>a</sup>
		TAC1	T2822C	156	49.0	5955L 59/1D	polymorphism <sup>a</sup>
	CA-HM-MAC2	FRG3	G684A	1313	49.0	W/228Ston	involved in azole resistance in the homozyaous state
	C/TIM M/CZ		C2804T	1260	53.0	<u>59351</u>	nolymorphism <sup>a</sup>
		TAC1	T2822C	1258	54.0	S941P	polymorphism <sup>a</sup>
14	CA-HM-CHV1	FRG11	T348A	58	21.0	D116F	polymorphism <sup>a</sup>
11	GATHAT CITY I	FRG3	C1052T	360	49.0	A351V	polymorphism <sup>a</sup>
	CA-HM-CHV2	FRG3	C1052T	182	60.0	A351V	polymorphism <sup>a</sup>
15	CA-HM-SOU1	ERG11	T348A	307	27.0	D116E	polymorphism <sup>a</sup>
15		ERG11	A798C	913	100.0	E266D	polymorphism <sup>a</sup>
		ERG3	C1052T	252	46.0	A351V	polymorphisma
		TAC1	T2822C	788	100.0	S941P	polymorphism <sup>a</sup>
	CA-HM-SOU2	ERG11	T348A	438	52.0	D116E	polymorphism <sup>a</sup>
		ERG11	A798C	355	100.0	E266D	polymorphism <sup>a</sup>
		ERG3	C1052T	414	50.0	A351V	polymorphism <sup>a</sup>
		TAC1	T2822C	483	100.0	S941P	polymorphism <sup>a</sup>

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

Bold formatting indicates newly described mutations and underlining indicates mutations involved in antifungal resistance. <sup>a</sup>Including allelic polymorphism.

Table 5.	С. д	labrata	non-syn	onymous	s mutations	found in	this	study
----------	------	---------	---------	---------	-------------	----------	------	-------

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

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

the known F659S mutation, but the other was a new S663A substitution. Similar to the observations for the echinocandin-

missense mutations in the hot spot (HS) 1 region of FKS2: one was 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 pheno-typic 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 The broad sequencing approach revealed that these mutations were found along with two different mutations in CaPDR1. 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 CqPdr1 protein<sup>21</sup> and thus a probably inactive CqPdr1p. 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 CqPDR1 -1020AG duplication is a loss-of-function (LOF) mutation, reminiscent of the phenotype of the constructed null mutant  $\Delta pdr1$ .<sup>22–24</sup> 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 CqPDR1 and FKS2 mutations in this C. qlabrata clinical isolate. A hypothesis could be the fitness cost due to the FKS mutation, as reported previously.<sup>25</sup> Thus, whether or not the CqPDR1 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

FKS2 mutations involved in echinocandin resistance (Table 5).

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).<sup>21</sup> 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.<sup>26</sup> 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.<sup>27</sup> 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.<sup>28</sup> (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 ( $\sim$ 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;<sup>20</sup> 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 CqERG11 is not the main gene involved in azole resistance, unlike the up-regulation of the ABC efflux transporters.<sup>29</sup> 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 *CqPDR1*.<sup>30</sup>

A growing number of clinical studies highlight the threat of MDR phenotypes, particularly in *C. glabrata*.<sup>1,9,10</sup> Pham et al.<sup>10</sup> 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.<sup>25,31</sup> 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,<sup>1</sup> although not in all such cases.<sup>10</sup> 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 CqPDR1 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 CqPDR1 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 Innothera, 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

**1** 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.

**2** 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.

**3** White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 382–402.

**4** Cannon RD, Lamping E, Holmes AR *et al*. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 291–321.

**5** 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.

**6** 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.

7 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.

**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.

**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.

**10** 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.

**11** 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.

**12** 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.

**13** 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.

**14** 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.

**15** 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.

**16** 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.

**17** 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.

**18** 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.

**19** 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.

**20** 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.

**21** Kolaczkowska A, Kolaczkowski M, Delahodde A *et al.* Functional dissection of Pdr1p, a regulator of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 2002; **267**: 96–106.

**22** 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.

**23** Schwarzmüller 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.

**24** Thakur JK, Arthanari H, Yang F *et al*. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* 2008; **452**: 604–9.

**25** 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.

**26** 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.

**27** Garcia-Effron G, Lee S, Park S *et al*. Effect of *Candida glabrata FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of  $1,3-\beta$ -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 azoleresistant *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)
		CaERG11 R1	413	-71 ; 342	/
	50.014	CaERG11 R2	392	272 ; 664	R1/R2 : 70
	ERG11 (1507 mb)	CaERG11 R3	377	597 ; 974	R2/R3 : 67
	(1287 pp)	CaERG11 R4	375	912 ; 1287	R3/R4 : 62
		CaERG11 R5	435	1174 ; +22	R4/R5 : 113
-	TAC1	CaTAC1 R1	375	1878 ; 2253	/
C. albicans	(2946 pb)	CaTAC1 R2	393	2719 ; +166	/
-		CaERG3 R1	388	-33 ; 355	/
	ERG3	CaERG3 R2	371	291 ; 662	R1/R2 : 64
	(1161 pb)	CaERG3 R3	420	509 ; 929	R2/R3 : 153
		CaERG3 R4	419	770 ; +28	R3/R4 : 159
-	FKS1	CaFKS1 HS1	379	1751 ; 2130	/
	(5694 pb)	CaFKS1 HS2	389	3884 ; 4273	/
	FKS1	CgFKS1 HS1	383	1692 ; 2075	/
-	(5592 pb)	CgFKS1 HS2	395	2830 ; 4225	/
	FKS2	CgFKS1 HS1	396	1781 ; 2177	/
-	(5694 pb)	CgFKS1 HS2	392	3934 ; 4326	/
		CgERG11 R1	443	-89 ; 354	/
	FRG11	CgERG11 R2	436	249 ; 685	R1/R2 : 105
C. glabrata	(1602  nb)	CgERG11 R3	435	560 ; 995	R2/R3 : 125
	(1002 pb)	CgERG11 R4	434	887 ; 1321	R3/R4 : 108
-		CgERG11 R5	449	1198 ; +45	R4/R5 : 123
		CgPDR1 R1	365	803 ; 1168	/
	CgPDR1	CgPDR1 R2	397	1525 ; 1922	/
	(3324 pb)	CgPDR1 R3	399	2354 ; 2753	/
		CgPDR1 R4	388	2967 ; +31	/
		CpERG11 R1	399	-48 ; 351	/
	FRG11	CpERG11 R2	404	291 ; 695	R1/R2:60
C. parapsilosis	(1569 pb)	CpERG11 R3	410	636 ; 1049	R2/R3 : 59
	(1909 bb)	CpERG11 R4	417	958 ; 1375	R3/R4 : 91
		CpERG11 R5	386	1267 ; +84	R4/R5 : 108

## Table S2. List of primers used for PCR1

		R1	Forward Reverse	TGTAAAACGACGGCCAGTATTCTTTCCATATTACTTGTCTTC
			Forward	
		R2	Povorso	
			Ferryard	
	ERG11	R3	Forward	
			Reverse	
		R4	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTCIIAIGGGIGGICAACAIAC
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGTATCCCATCTAGTTGGATC
		R5	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTCCAATTATATTGTTCCAAAAGGTC
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCGAAAGAAAGTTGCCGTTT
		R1	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTTAGCAGATGAGGCCAAACC
sui	TAC1		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCAAATTGGTTCCTGACTCTGGT
ica	TACI	D٦	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTTTGCTATGCTCAGTCACCAA
alb		ΠZ	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTATTGGACTCGGGGTTTTCC
с;		D1	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTTTCGGATTCGGTTTAGC
		KI	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTTTCTCTGAAAATGTTTGATCTGG
			Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTTTTTCCCAGCTACTGATTTCAT
		R2	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCCACAATCGGTGAAAAGAATG
	ERG3		Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTIGCCATTCCAGTTATGGTTTT
		R3	Reverse	
			Forward	
		R4	Reverse	
			Forward	
FKS1		HS1	Polivaru	
	FKS1		Reverse Famula	
		HS2	Forward	
			Reverse	
		R1	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTCCCTTCATGTCCATTGTCTT
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCAACTTGGCGTTGAAGATGA
		R2	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTGCCAAAAGAAATACGGTGA
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGTAAGCGAAGTCGGTGTCC
	FRG11	<b>B</b> 3	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTCAACGAAAACAACTCCGGTA
	LNOII		Reverse	<b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> GCCAAATGCAATAGACACCA
		D/	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTGGTACTAAGATGACCGACCAA
		R5	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCACTGGAAGAAGCAGCATCA
			Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTTGTCCCAAGGGACTACCAC
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTGACCATTGATTATTGGAAGAAAA
		<b>D</b> 4	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTGAAAGTGCCACCACTAAGTCA
ţ		R1	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCGACTCTTCATTGATATGGTGA
La			Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTGTGAAGCGGAAGAAATGCTC
lat		R2	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGAAACTCCACCCTATCCAGA
പ്	CgPDR1		Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTCATGAAGGGGCATCTTAACAG
U		R3	Reverse	
			Forward	
		R4	Reverse	
			Eorward	
		HS1	Polwaru	
	FKS1		Reverse Famula	
		HS2	Forward	
			Reverse	
		HS1	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTGGCCACTGTTTTATTCTTCTCG
	FKS2		Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCCAACAGAGAAGACAGTGTTGA
	11.52	нс2	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTACTATGCGCATCCTGGTTTC
		1132	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCACCACCACAGTCATGTCAC
S.		D1	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTCCCTACCTTCGTTCATCCA
osi		KT	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGGCGTCTTCAGCAGAAACAT
isa	50.044	<b>D</b> 2	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTCCCAAGGGTCATGAATTTGT
ra	ERG11	R2	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTTGATTGGGGTGAATCCTTT
bd			Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTTTGATGCTTCATTTGCTCA
Ċ		R3	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCATCCAAGTTGCCACCTTTACC
		-		

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

D.4	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTTGTTGCATTTGGCTGAGAAG
K4	Reverse	<b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> CACCAAATGGCAAATACGAA
DE	Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTACCCTCACAGATGGGATGAA
КЭ	Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTCTGCATTAAACCCCATTGA

## Table S3. List of primers used for PCR2

	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGAGTGCGTTGTAAAACGACGGCCAGT
PCR 2 - MID 1	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCGTCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCTCGACATGTAAAACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACACAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCCCGCCATCAGAGACGCACTCTGTAAAACGACGGCCAGT
PCR 2 - IVIID 5	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGACGCACTCCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAGTGTAAAACGACGGCCAGT
PCR 2 - MID 4	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCACTGTAGCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGTGTAAAACGACGGCCAGT
PCR 2 - IVIID 5	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCCCGCCCATCAGATATCGCGAGTGTAAAACGACGGCCAGT
PCK 2 - WID 0	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTGTCTCTATGTAAAACGACGGCCAGT
PCR 2 - IVIID 7	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCGCTCAGCGTGTCTCTACAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCCCCCATCAGCTCGCGTGTCTGTAAAACGACGGCCAGT
PCR 2 - MID 8	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCGCGTGTCCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCCCGCCCATCAGTAGTATCAGCTGTAAAACGACGGCCAGT
PCK 2 - IVIID 9	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAGTATCAGCCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTATGCGTGTAAAACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTATGCGCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCCCGCGCCATCAGTGATACGTCTTGTAAAACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATACGTCTCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCCCGCCCATCAGTACTGAGCTATGTAAAACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACTGAGCTACAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCCCGCCCATCAGCATAGTAGTGTGTAAAACGACGGCCAGT
PCK Z - WID 15	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATAGTAGTGCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCCCGCGCCATCAGCGAGAGATACTGTAAAACGACGGCCAGT
	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAGAGATACCAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATACGACGTATGTAAAACGACGGCCAGT
PCR 2 - MID 15	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATACGACGTACAGGAAACAGCTATGACC
	Forward	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCACGTACTATGTAAAACGACGGCCAGT
PCK 2 - MID 16	Reverse	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCACGTACTACAGGAAACAGCTATGACC

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

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

Strain	Gene	Coordinates		
	ERG11/C5_00660C_A (orf19.922)	Ca22chr5A_C_albicans_SC5314: 149701-148115		
<i>C. albicans</i> SC5314 Assembly 22	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		
	FKS1/CAGL0G01034g	ChrG_C_glabrata_CBS138 : 93468-99059		
C alabrata CDS120	FKS2/CAGL0K04037g	ChrK_C_glabrata_CBS138 : 373375-379068		
C. YIUDI ULU CBS156	ERG11/CAGL0E04334g	ChrE_C_glabrata_CBS138 : 417189-415588		
	PDR1/CAGL0A00451g	ChrA_C_glabrata_CBS138 : 47557-50880		
C. parapsilosis CDC137	ERG11/CPAR2_303740	Contig005806_C_parapsilosis_CDC317 : 870311-868743		

		_	Nucleotide			Amino-acid
Patient	Strain	Gene	substitution	Depth	Frequency	substitution
		ERG11	T315C	677	64.0	
		ERG11	T348A	402	12.0	D116E
		ERG11	A357G	402	11.0	
		ERG11	C658T	420	54.0	
		ERG11	A1020G	901	55.0	
		ERG11	C1110T	899	49.0	
		ERG11	A1440G	544	58.0	
		ERG11	T1470C	544	56.0	
1	CA-GRE-TOP	ERG3	G307A	1584	51.0	D103N
		FKS1 (HS1)	A19291	852	100.0	CC 4ED
		FKS1 (HS1)	C4220T	852 752	100.0	3043P
		TAC1	A2202G	8/3	54.0	
		TAC1	T2214C	845	54.0	
		TAC1	C2804T	598	54.0	59351
		TAC1	T2822C	598	55.0	S941P
		TAC1	G2874A	598	57.0	
		ERG11	T549C	896	62.0	
		ERG11	C658T	1739	98.0	
		ERG11	T996C	1401	98.0	
		FRG11	C1110T	1401	99.0	
		ERG11	T1140C	1401	98.0	
			T1140C	1401	98.0	
			112030	1598	98.0	
		ERGII	C12961	1598	98.0	
		ERG11	T1302C	1598	98.0	
	CA-GRE-VIG1	ERG3	C306T	749	100.0	
		FKS1 (HS1)	A1929T	1091	45.0	
		TAC1	T1977C	1020	46.0	
		TAC1	G1998A	1020	49.0	
		TAC1	C2040T	1020	49.0	
		TAC1	A2202G	1020	54.0	
		TAC1	T2214C	1020	55.0	
		TAC1	T2822C	1287	97.0	S941P
		TAC1	G2874A	1287	97.0	
10		ERG11	T5/19C	1082	79.0	
		FRG11	C658T	1647	99.0	
		ERG11	T996C	1691	99.0	
		ERG11	C1110T	1691	100.0	
		ERG11	T1140C	1691	98.0	
		ERG11	T1203C	1690	99.0	
		ERG11	C1296T	988	100.0	
		ERG11	T1302C	988	100.0	
	CA-GRE-VIG2	ERG3	C306T	1001	100.0	
		FKS1 (HS1)	A1929T	677	51.0	
		TAC1	11977C	1710	46.0	
		IAC1	G1998A	1/10	47.0	
		TACI	L2U4U1	1710	48.U	
		TACI TACI	AZZUZG T221/C	1710	55.U 55.0	
		TAC1	T2822C	1110	98 N	S941P
		TAC1	G2874A	1110	98.0	
		ERG11	T549C	878	100.0	
	CA-GRE-VIG3	ERG11	C658T	855	100.0	
		ERG11	T996C	1414	100.0	

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

		ERG11	C1110T	1414	100.0	
		FRG11	T1140C	1414	100.0	
		ERG11	T1203C	1413	100.0	
		ERG11	C1296T	923	100.0	
			T1202C	022	100.0	
			C206T	925	100.0	
			C3001	1044	100.0	
		FKSI (HSI)	A19291	/1/	51.0	
		TAC1	119770	488	47.0	
		TAC1	G1998A	488	51.0	
		TAC1	C2040T	488	53.0	
		TAC1	A2202G	488	49.0	
		TAC1	T2214C	489	51.0	
		TAC1	T2822C	1190	99.0	S941P
		TAC1	G2874A	1190	99.0	
		ERG11	A1020G	419	49.0	
		ERG11	C1110T	417	49.0	
		ERG11	A1440G	299	57.0	
		ERG11	T1470C	299	50.0	
	04 UN 4 50N/4	ERG3	C306T	352	61.0	
	CA-HM-FON1	FKS1 (HS1)	A1929T	423	52.0	
		FKS1 (HS2)	C4230T	292	49.0	
		TAC1	C2804T	149	62.0	S935L
		TAC1	T2822C	150	63.0	S941P
		TAC1	G2874A	151	64.0	00.121
12		ERG11	A1020G	671	/8.0	
		ERC11	C1110T	660	48.0	
			A1440C	275	40.0	
			A1440G	375	57.0	
		ERGII	114/0C	375	51.0	
	CA-HM-FON2	ERG3	C3061	401	58.0	
		FKS1 (HS1)	A19291	331	48.0	
		FKS1 (HS2)	C42301	660	52.0	
		TAC1	C2804T	198	49.0	S935L
		TAC1	T2822C	198	50.0	S941P
		TAC1	G2874A	198	52.0	
		ERG11	T315C	261	57.0	
		ERG11	C658T	479	50.0	
		ERG11	A1020G	1271	51.0	
		FRG11	C1110T	1270	51.0	
		ERG11	A1440G	286	55.0	
		ERG11	T1470C	286	57.0	
		ERG2	C306T	755	52.0	
	<b>CΔ-HM-MΔC1</b>	ERCO	66944	260	J2.0	W2295top
	er min miner		41020T	309	49.0	vv2265t0p
		FKS1 (HS1)	A19291	400	47.0	
		FKSI (HSZ)	C42301	1433	46.0	
		TACI	A2202G	1615	100.0	
		TAC1	12214C	1614	100.0	
		TAC1	C2804T	156	49.0	S935L
13		TAC1	T2822C	156	49.0	S941P
		TAC1	G2874A	157	52.0	
		ERG11	T315C	223	60.0	
		ERG11	C658T	1230	51.0	
		ERG11	A1020G	1159	51.0	
		ERG11	C1110T	1154	53.0	
		ERG11	A1440G	736	57.0	
		ERG11	T1470C	736	54.0	
	CA-HM-MAC2	ERG3	C306T	1626	56.0	
		ERG3	G684A	1313	48.0	W228Stop
		FKS1 (HS1)	A1929T	247	46.0	
		FKS1 (HS2)	C4230T	252	48.0	
		ΤΛΓ1	A2201	<u>a</u> 80		
		TACI	T22020	980	100.0	
		TACI	12214C	1260	E3 U	C02E1
		IACI	C28041	1200	55.0	2232L

		TAC1	T2822C	1258	54.0	S941P
		TAC1	G2874A	1262	55.0	
		ERG11	T348A	58	21.0	D116E
		FRG11	A357G	59	19.0	
		FRG11	C411T	59	47.0	
		FRG11	T549C	59	24.0	
		FRG11	T996C	1414	100.0	
		ERG11	A1083G	1414	100.0	
		ERG11	C1110T	1/1/	100.0	
		ERG11	T1203C	1/12	100.0	
		ERG11	T1203C	1415	100.0	
		ERG11	A1440G	474	100.0	
		ERG11	T1470C	473	100.0	
	CA-IIIVI-CIIVI	ERG2	T51C	473	27.0	
		ERCO	C206T	1020	100.0	
		ERCO	T291C	1020	100.0	
			T422C	1030	49.0	
			1452C	1050	100.0	A 2 E 1 V
			C10521	300	49.0	A351V
		FK31 (H31)	A19291	207	100.0	
			42301	597	100.0	
14		TACI	A2202G	639	51.0	
		TACI	122140	039	50.0	
-		TACI EDC11	G2874A	551	53.0	
		ERGII	19960	552	100.0	
		ERGII	A1083G	551	100.0	
		ERG11	C11101	551	100.0	
		ERG11	T1203C	551	100.0	
		ERG11	11284C	267	100.0	
		ERG11	A1440G	267	100.0	
		ERG11	T1470C	267	100.0	
		ERG3	T51C	387	36.0	
	CA-HM-CHV2	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	
		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	
15	CA-HM-SOU1	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	

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

			Nucleatide			
Patient	Strain	Gene	substitution	Depth	Frequency	Amino-acid substitution
		<b>FDC11</b>	CC70T	0.01	100.0	
				025	100.0	
		ERGII	1768C	825	100.0	
		ERGII	18340	825	100.0	
		ERG11	A1023G	631	100.0	
		ERG11	112750	631	100.0	
		ERG11	T1275C	565	100.0	
2	CG-GRE-DUC	ERG11	T1557A	564	100.0	
		FKS1(HS1)	T1874C/C1875T	614	100.0	F625S
		FKS1(HS2)	C3870T	699	100.0	
		FKS2 (HS1)	A1956G	489	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2010A	489	100.0	
		FKS2 (HS1)	C2025T	489	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2119C	489	100.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	383	100.0	
		ERG11	T768C	1730	100.0	
		ERG11	G927A	1730	100.0	
		ERG11	A1023G	803	100.0	
		ERG11	T1557A	256	100.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	648	100.0	
3	CG-GRE-AHR	CgPDR1	C837T	683	100.0	
		CgPDR1	T871C	683	100.0	
		CgPDR1	C1749T	543	100.0	
		CgPDR1	T2578C	810	100.0	
		CgPDR1	T2994C	1318	100.0	
		CgPDR1	G3156A	1317	100.0	
		ERG11	T768C	434	100.0	
		ERG11	T834C	434	100.0	
		ERG11	A1023G	963	100.0	
		ERG11	T1557A	754	100.0	
		FKS2 (HS1)	A1956G	215	100.0	
		FKS2 (HS1)	C1959T	215	100.0	
		FKS2 (HS1)	T1987C	215	99.0	S663P
		FKS2 (HS1)	T2046C	215	100.0	
4	CG-GRE-CAP	FKS2 (HS1)	T2119C	215	100.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	549	100.0	
		CgPDR1	T871C	492	100.0	
		CaPDR1	-1020AG	492	100.0	Frameshift and
		og. 2112	1010/10		200.0	premature stop codon
		CgPDR1	C1749T	642	100.0	
		CgPDR1	T2578C	674	100.0	
		CgPDR1	T2994C	782	100.0	
		CgPDR1	G3156A	782	100.0	
		ERG11	T768C	1154	100.0	
		ERG11	G927A	1154	100.0	
		ERG11	A1023G	1012	100.0	
		ERG11	T1557A	773	100.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	1293	100.0	
5	CG-GRE-ALF	CgPDR1	C837T	564	100.0	
-		CgPDR1	T871C	564	100.0	
		CgPDR1	C1749T	560	100.0	
		CgPDR1	T2578C	398	100.0	
		CgPDR1	T2994C	606	100.0	
		CgPDR1	G3156A	607	100.0	
		ERG11	G87A	724	100.0	
11	CG-GRE-FAU1	ERG11	C192T	724	100.0	
		FRG11	T768C	778	100.0	

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

		FRG11	T834C	778	100.0	
		FRG11	A1023G	712	100.0	
		ERG11	T1557A	643	100.0	
			A1041T	1022	100.0	
		FK52 (H51)	A19411	1033	100.0	
		FKSZ (HSL)	A1956G	1032	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2119C	1032	100.0	
		FKS2 (HS2)	G4093T	979	100.0	G1365C
		FKS2 (HS2)	C4104T	979	100.0	
		CgPDR1	T871C	1144	100.0	
		CgPDR1	C1749T	913	100.0	
		CgPDR1	T2578C	964	100.0	
		CaPDR1	T2994C	1187	100.0	
		CaPDR1	G3156A	1186	100.0	
			G87A	2435	100.0	
		ERG11	C192T	2/35	100.0	
		ERG11	77690	1140	100.0	
			T708C	1140	100.0	
		ERGII	18340	1140	100.0	
		ERGII	A1023G	986	100.0	
		ERG11	1155/A	//4	100.0	
		FKS2 (HS1)	A1941T	777	100.0	
	CG-GRE-FAU2	FKS2 (HS1)	A1956G	776	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2119C	776	100.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	1006	100.0	
		CgPDR1	T871C	1135	100.0	
		CqPDR1	C1749T	1137	100.0	
		CaPDR1	T2578C	931	100.0	
		CaPDR1	T2994C	957	100.0	
		CaPDR1	G3156A	954	100.0	
		ERG11	C588T	711	100.0	
		ERG11	T768C	711	100.0	
		ERG11	C018T	711	100.0	
		ERG11	A1023G	364	100.0	
		ERG11	T1557A	214	100.0	
		EK\$2 (H\$1)	A1956G	/10	100.0	
		FK32 (1151) EVS2 (4151)	T2010A	419	100.0	
		EVC2 (1151)	C2025T	419	100.0	
		FK32 (H31)	T2110C	419	100.0	
		FK32 (HS1)	12119C	419 E12	100.0	
		FK32 (H32)	C41041	512	100.0	
		CyPDR1	18/10	574	100.0	
		CYPDR1	C17491	232	100.0	
		CgPDR1	12578C	436	100.0	
		CGPDR1	129940	272	100.0	
12		CGPDRI	G3156A	272	100.0	
		ERG11	C5881	432	100.0	
		ERG11	17680	275	100.0	
		ERG11	C9181	435	100.0	
		ERG11	A1023G	435	100.0	
		ERG11	T1557A	636	100.0	
		FKS2 (HS1)	A1956G	486	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2010A	486	100.0	
	CG-HM-FON2	FKS2 (HS1)	C2025T	486	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2119C	486	100.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	237	100.0	
		CgPDR1	T871C	517	100.0	
		CgPDR1	C1749T	562	100.0	
		CgPDR1	T2578C	484	100.0	
		CgPDR1	T2994C	270	100.0	
		CgPDR1	G3156A	270	100.0	
		ERG11	C588T	475	100.0	
10		ERG11	T768C	474	100.0	
16	CG-HIVI-HAB1	ERG11	C918T	474	100.0	
		ERG11	A1023G	314	100.0	
	-					

	-	ERG11	T1557A	1095	100.0	
		FKS2 (HS1)	A1956G	496	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2010A	496	100.0	
		FKS2 (HS1)	C2025T	496	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2119C	496	100.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	900	100.0	
		CqPDR1	T871C	298	100.0	
		CaPDR1	C1109T	298	100.0	T370I
		CaPDR1	C1749T	1037	100.0	
		CaPDR1	T2578C	329	100.0	
		CaPDR1	T2994C	409	100.0	
		CaPDR1	G3156A	409	100.0	
			C588T	604	100.0	
		FRG11	T768C	424	100.0	
		FRG11	C918T	474	100.0	
		ERG11	A1023G	327	100.0	
		ERG11	T1557A	256	100.0	
		EK\$2 (H\$1)	A1956G	660	100.0	
		EKS2 (HS1)	T1076C	660	100.0	EGEOS
		EKS2 (HS1)	T1970C	660	80.0	56630
		EVC2 (HS1)	T2010A	660	100.0	3003A
	CG-HM-HAB2	FK32 (1151)	C2025T	660	100.0	
		FK32 (HS1)	C20251	660	100.0	
			12119C	1542	100.0	
		FKSZ (HSZ)	C41041	1542	100.0	
		CgPDR1	18/10	861	100.0	<b>T</b> 270
		CGPDRI	C11091	861	100.0	13701
		CgPDR1	C17491	821	100.0	
		CGPDR1	12578C	604	100.0	
		CgPDR1	T2994C	1109	100.0	
		CgPDR1	G3156A	1109	100.0	
		ERG11	T300C	992	100.0	
		ERG11	T768C	835	100.0	
		ERG11	T834C	835	100.0	
		ERG11	A1023G	333	100.0	
		ERG11	C1194T	333	100.0	
		ERG11	T1557A	270	100.0	
		FKS2 (HS1)	A1956G	923	100.0	
		FKS2 (HS1)	C1959T	923	100.0	
	CG-HM-BIL1	FKS2 (HS1)	T2046C	923	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2119C	923	100.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	490	100.0	
		FKS2 (HS2)	T4195C	490	100.0	
		CgPDR1	T871C	409	100.0	
		CgPDR1	C1749T	358	100.0	
17		CgPDR1	T2578C	430	100.0	
17		CgPDR1	T2994C	874	100.0	
		CgPDR1	G3156A	874	100.0	
		ERG11	T300C	327	100.0	
		ERG11	T768C	367	100.0	
		ERG11	T834C	367	100.0	
		ERG11	A1023G	267	100.0	
		ERG11	C1194T	267	100.0	
		ERG11	T1557A	139	100.0	
	CG-HM-BIL2	FKS2 (HS1)	A1956G	292	100.0	
		FKS2 (HS1)	C1959T	292	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2046C	292	100.0	
		FKS2 (HS1)	T2119C	292	99.0	
		FKS2 (HS2)	C4104T	309	100.0	
		FKS2 (HS2)	T4195C	309	100.0	
		CaPDR1	T871C	351	100.0	
-	-					

C	gPDR1	C1749T	304	100.0
C	gPDR1	T2578C	546	100.0
C	gPDR1	T2994C	307	100.0
C	gPDR1 (	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. <u>Résumé</u>

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

120

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

[Version révisée et acceptée dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy en décembre 2017]

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 tolerance
5	
6	Authors:
7	Cécile Garnaud <sup>a</sup> , Encar García-Oliver <sup>b*</sup> , Yan Wang <sup>a</sup> , Danièle Maubon <sup>a</sup> , Sébastien Bailly <sup>c</sup> , Quentin
8	Despinasse <sup>a</sup> , Morgane Champleboux <sup>b*</sup> , Jérôme Govin <sup>b</sup> , Muriel Cornet <sup>a#</sup>
9	
10	Authors' affiliations:
11	<sup>a</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC-IMAG, Grenoble, France
12	<sup>b</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1038, CEA, BIG-BGE, Grenoble , France
13	<sup>c</sup> Univ. Grenoble Alpes, INSERM, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, HP2, Grenoble, France
14	
15	Corresponding author:
16	Prof. Muriel Cornet. mcornet@chu-grenoble.fr
17	
18	*Present address:
19	Encar García-Oliver: Institute of Molecular Genetics of Montpellier (IGMM), UMR5535 CNRS, 34293
20	Montpellier, France.
21	Morgane Champleboux: Institute of Systems and Synthetic Biology (iSSB), Genopole, CNRS,
22	Université d'Evry-Val-d'Essonne, Evry, France
23	
24	
25	
26	

#### 27 ABSTRACT

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

46

47

#### 48 INTRODUCTION

Invasive candidiasis (IC) is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients and in other critically ill patients such as those hospitalized in intensive care units. Its incidence has increased over the past three decades, and, despite antifungal treatment, its mortality remains high, ranging from 46 to 75% (1). *Candida albicans* is responsible for approximately half of cases of
 invasive candidiasis worldwide (2).

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

64 Apart from microbiological resistance, which can be defined as an increase of the minimal inhibitory 65 concentration (MIC) of an antifungal compound for a given strain, tolerance has also been described 66 in Candida spp. Tolerance reflects the yeast's capacity to adapt to the presence of the antifungal 67 drug, and allows persistent growth at antifungal concentrations above the MIC (7). As a result, yeasts 68 are not completely eradicated in the presence of the drug, leading to a condition that enables the 69 selection of resistant mutants. Tolerance has been described for both fungistatic (azoles) and 70 fungicidal (echinocandins) drugs (8). Mechanisms underlying this phenomenon are not completely 71 elucidated. Multiple stress signaling pathways, activated in response to cell wall or membrane 72 damages, have been shown to contribute to azoles and/or echinocandin tolerance in C. albicans. 73 Among which are the calcium-calcineurin, Protein Kinase C cell integrity pathway, High Osmolarity 74 Glycerol and sphingolipid biosynthesis pathways (9–17). Hsp90, a molecular chaperone interacting 75 with about 10% of the C. albicans proteome, also plays a crucial role in antifungal tolerance: genetic 76 or pharmacological inhibition of Hsp90 enhance azole and echinocandin activities in C. albicans (11, 18–20). Lysine deacetylases, such as Hos2, Hda1, Rpd3 and Rpd31, have also been shown to play a
role in antifungal tolerance through Hsp90 deacetylation (21).

79 In addition to these mechanisms, a role of the environmental pH in tolerance to azole antifungal 80 drugs has been described. Trailing growth, consisting in persistent growth at azoles concentrations 81 above the MIC, is inhibited at acidic pH in Candida spp. (22). In yeasts, pH signaling is mediated by 82 the Rim pathway. This pathway is fungal specific and well-conserved in the fungal kingdom (23). In C. albicans, external pH is sensed by a complex of 2 transmembrane proteins Rim9 and Rim21/Dfg16, 83 84 protein Rim8. In neutral-alkaline conditions, and the arrestin-like Rim8 becomes 85 hyperphosphorylated, leading to endocytosis of this membrane complex, and recruitment of the 86 Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) I, II and III. Two other Rim proteins, 87 Rim20 and the signaling protease Rim13, are then recruited leading to the cleavage of the C-terminal 88 inhibitory domain of *RIM101*, the final transcription factor of the Rim pathway. Once activated, 89 *RIM101* migrates to the nucleus and regulates expression of target genes involved in multiple cellular 90 processes, including growth, iron metabolism, cell wall structure, yeast-to-hyphae transition, 91 adhesion and biofilm formation (Figure 1) (23). As such, this pathway is involved in both 92 pathogenesis and virulence in C. albicans (24–27). The implication of the Rim pathway in tolerance to 93 antifungal drugs was first investigated in the model yeast Saccharomyces cerevisiae: all Rim proteins mutants were found to be hypersensitive to azoles (28). In C. albicans, genetic disruption of RIM101 94 95 leads to hypersusceptibility to both echinocandins and azoles, but implication of other Rim proteins 96 in antifungal tolerance has not been assessed yet (29).

97

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

101

102 **RESULTS** 

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

To investigate whether all the Rim factors were involved in response to antifungal drugs, rim mutants, as well as complemented strains and strains constitutively overexpressing *RIM101* (Table 1) were subjected to colony-forming assays at alkaline pH (7.6) in presence of fluconazole (FLC), voriconazole (VRC), posaconazole (POS), micafungin (MFG) or anidulafungin (AFG). As shown in Figure 2A, all the rim mutants were hypersensitive to the five antifungal drugs tested, whereas complemented and *RIM101*-overexpressing strains displayed phenotypes similar to the one of the control strains.

111 To further characterize the hypersensitive phenotype of the rim mutants, time-kill curves 112 experiments were performed, albeit only for azoles as previous studies reported that these assays 113 were unsuitable for echinocandins because of clumping effect (11). Yeasts were cultured in liquid 114 medium in presence of azole antifungal drugs and sampled at different time points on solid agar 115 medium to quantify colony-forming-units (CFU). As depicted in Figure 2B, the growth of the rim 116 mutants after 48h of incubation was significantly reduced in presence of azole antifungal drugs as 117 compared to the growth of the control strain for the three compounds tested: FLC, VRC and POS 118 (p<0.001). By contrast, growth of complemented strains was similar to the one of the control strain 119 (data not shown). In our experiments, using a lower initial inoculum, no significant reduction of initial 120 inoculum was evidenced for any mutant strain, impeding the confirmation that Rim inhibition 121 restores a fungicidal effect.

122

Finally, azole and echinocandin MICs were determined as recommended by the EUCAST microdilution method at neutral pH (30, 31). MICs did not differ between control and mutant strains, suggesting that the Rim factors are rather involved in tolerance than resistance to echinocandins and azoles (Table S1). Taken together, these data show that the genetic inhibition of all the Rim factors enhances the antifungal activity of the azoles and the echinocandins in *C. albicans*, which appears to result from inhibition of tolerance to these antifungal drugs.

130

#### 131 Transcriptomic analysis reveals new Rim-dependent genes involved in antifungal tolerance

132 In order to assess by which mechanism the Rim pathway contributes to antifungal tolerance, deep-133 sequencing transcriptomics (RNA-SEQ) of the SC5314 reference strain (wild-type), the DAY185 134 control strain, a rim101-/- disrupted strain (DAY25) and a strain constitutively overexpressing RIM101 135 (CGY1) were performed. Samples were collected after growth at pH 4 (Rim pathway inactivated) and 136 7.6 (Rim pathway activated). Analysis was performed using biological triplicates (Figure 3A). RNA was 137 extracted, prepared and sequenced using standard RNA-SEQ methods. Transcriptomic analysis was 138 performed following the pipeline described in the Method section and presented in Figure S1A. The 139 transcription programs of SC5314 and DAY185 control strains at alkaline and acidic pH did not 140 significantly differ (Figure S1B) and no differentially expressed genes could be identified. For this 141 reason, we chose to use the SC5314 strain as a reference in the following differential analysis.

142

143 Intersample distance clustering has been performed to assess the similarity between replicates 144 across each experimental condition (Figure 3B). Biological replicates clustered together, confirming 145 the reproducibility of the experimental conditions. Moreover, at pH 4, the transcription profiles were 146 similar between reference and mutant strains. The transcription programs of the reference strain and the RIM101-overexpressed strain also appeared clustered together at alkaline pH. By contrast, 147 148 rim101-/- transcription profile at pH 7.6 significantly differed from both previous clusters (Figure 3B). 149 These observations were confirmed using an other statistical analysis using principal component 150 analysis (Figure S1C). These data confirm that environmental pH crucially affects gene expression in 151 C. albicans, and that RIM101 expression is essential to the physiological adaptation of C. albicans to 152 alkaline pH conditions.

153

#### 154 Acidic pH-response

No statistically significant difference in transcription profiles was evidenced when comparing the 155 156 rim101∆-disrupted strain and the SC5314 reference strain at pH 4 (Figure S2), suggesting that 157 RIM101 is not required for the transcriptional response in acidic conditions. By contrast, 965 genes 158 were significantly differentially expressed between the RIM101-overexpressed strain and the wild-159 type strain in such conditions (log2 fold-change below -1.5 or above 1.5, adjusted p-value <0.05) 160 (Table S2). GO-term analysis of these genes identified a significant enrichment in three biological 161 processes categories: transmembrane transport, drug transport and serine family amino acid 162 metabolic process (Figure S3).

163

#### 164 Alkaline pH-response in the SC5314 reference strain

A total of 751 genes were differentially expressed at pH 7.6 versus pH 4 for the SC5314 reference strain, including 402 alkaline-upregulated and 349 alkaline-downregulated genes (Table S4 and Figure 3C). *RIM101* and *RIM13* were upregulated at alkaline pH, consistent with the activation of the Rim pathway in such alkaline conditions (Figure 4). By contrast, *RIM8* was downregulated, which is in accordance with its implication in the negative feedback of the Rim pathway and its preferential expression at acidic pH (23, 32) (Figure 4). Expression of the other *RIM* genes, were not significantly different at pH 7.6 compared to pH 4.

172 Interestingly, GO-term analysis revealed that the alkaline-upregulated genes were mostly enriched in 173 genes involved in pathogenesis, such as filamentous growth, biofilm formation, response to host and 174 response to stimulus. The alkaline-downregulated genes were significantly enriched in 175 transmembrane and drug transport, metabolic process, biosynthetic process and oxidation-reduction 176 process categories (Figure 3C).

Among genes potentially involved in antifungal tolerance and/or resistance (listed in Table S3), 33
were differentially expressed at alkaline and acidic pH. Among those with the highest fold-changes

179 were genes involved in membrane biosynthesis. Expression of *IPT1*, a gene coding for an enzyme 180 responsible for the synthesis of the most abundant sphingolipid, mannose-(inositol-P)2-ceramide, 181 was alkaline-induced (Figure 5A), whereas expression of ERG11, ERG1 and ERG3, genes involved in 182 ergosterol biosynthesis, a major component of fungal cell membrane, were alkaline-repressed 183 (Figure 4, Table S4). Expression of several genes involved in the cell wall biosynthesis was also pH-184 dependent. SKN1, coding for a protein involved in  $\beta$ -1,6-glucan synthesis, was strongly induced at 185 alkaline-pH (fold-change = 24.25). Similarly, PHR1 and PHR2, two genes coding for cell-wall 186 transglycosidases, were respectively alkaline-upregulated and alkaline-downregulated. In addition, 187 MNN1 and MNN22, both coding for mannosyltransferases, were down-regulated at alkaline pH. All 188 the above pH-dependent genes involved in cell wall synthesis but MNN22, are known to be regulated 189 by RIM101. Surprisingly, KRE6, known to be induced by RIM101, was found to be downregulated at 190 alkaline pH in our study. Interestingly, CDR1 and MDR1, genes coding for transporters involved in 191 azole antifungal drugs efflux, and BCR1, a transcription factor potentially involved in fluconazole 192 resistance, were alkaline-induced (Figure 4).

193

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

198

#### 199 Alkaline pH-response in the *rim101*Δ-disrupted strain

In order to identify *RIM101*-dependent genes, transcription profiles at pH 7.6 of the *rim101*∆disrupted strain and the SC5314 reference strain were compared. A total of 1002 differentially
expressed genes were retrieved, among which 462 were down-regulated and 540 were up-regulated
(Table S5 and Figure 3D).

Rim-dependent genes upregulated in the *rim101-/-* mutant at alkaline pH were mainly enriched in ion and transmembrane transport categories, whereas Rim-dependent downregulated genes were more diverse and mostly enriched in metabolic, cellular, biosynthesis and oxidation-reduction processes categories, as well as interaction and response to host (GO-term analysis, Figure 3D).

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 (Figure 4). 215 Many other genes coding for proteins involved in cell wall biosynthesis were upregulated in the 216  $rim101\Delta$ -disrupted strain. Consistent with our previous observation in the wild-type strain, KRE6 was 217 induced in the rim101-/- mutant (Figure 4), which confirms that this gene might be repressed rather 218 than induced by RIM101.

Interestingly, *IPT1*, involved in sphingolipid biosynthesis, was significantly lower expressed in the
 mutant compared to the wild-type (fold-change = 8.98, Figure 5A): its expression therefore appears
 to be both Rim- and pH-dependent.

Another gene, *HSP90*, was found to be significantly downregulated in the *rim101-/-* mutant (foldchange = 1.79) compared to the wild-type at alkaline pH (Figure 6A). This gene encodes a molecular chaperone, interacting with about 10% of the *C. albicans* proteome, which plays a key role in echinocandin and azole tolerance in this species (11, 18, 19). *HSP90* therefore appears to be a downstream effector of *RIM101*. Intriguingly, although *HSP90* seems to be upregulated at alkaline pH compared to acidic pH in the wild-type strain (Figure 6A), this difference was not statistically significant and *HSP90* was not identified as a pH-dependent gene by differential expression analysis.

229

#### 230 Hsp90 and lpt1 could participate to the Rim-dependent antifungal tolerance in *C. albicans*

Considering the RNA-SEQ results and that *IPT1* and *HSP90* and are known to be involved in antifungal
tolerance, we therefore hypothesized that the implication of the Rim pathway in antifungal tolerance
could be partly mediated by these genes.

In parallel to the RNA-SEQ analysis, expressions of *IPT1* and *HSP90* were assessed by RT-qPCR in the DAY185 control strain, the *rim101*Δ-disrupted strain (DAY25) and a complemented strain constitutively expressing the active form of *RIM101* (DAY5SL). These experiments confirmed the Rimand pH-dependent expression of *IPT1* shown in the RNA-SEQ analysis (Figure 5B). Considering *HSP90*, its expression was significantly reduced in the *rim101*Δ-disrupted strain compared to the control strain and the complemented strain at pH 7.6, whereas its expression was similar in all strains at pH 4 (Figure 6B). As for RNA-SEQ, these results suggest that *RIM101* acts upstream *HSP90*.

241

242 To further characterize the interaction between Hsp90 and the Rim pathway, susceptibility to 243 geldanamycin, a pharmacological inhibitor of Hsp90, was assessed by colony formation assays in rim 244 mutants, wild-type, RIM101-overexpressed and complemented strains. Geldanamycin binds to the N-245 terminal ATP/ADP-binding domain of Hsp90 and inhibits its ATPase activity which is essential for its 246 chaperone function (33, 34). Combination of both a high pH (7.6) and geldanamycin resulted in a high 247 stress which strikingly inhibited yeast growth of WT strains. For this reason, the experiment was 248 performed at a lower pH (7.2) than the previous experiments, yet sufficient to activate the Rim 249 pathway. As depicted in Figure 6C, all rim mutants were hypersensitive to geldanamycin, while the 250 *RIM101*-overexpressed or the complemented strains displayed a phenotype similar to the one of the 251 control strain. These data suggest that rim101 and Hsp90 are chemical-genetic interactors, which is 252 consistent with RNA-SEQ results. Taken together, the transcriptomic and phenotypic results 253 therefore differ from previous studies that suggested that rim101 was a client-protein of Hsp90 (20, 254 35).

255

256 The implication of Hsp90 in antifungal tolerance is known to be mediated by at least two client-257 proteins: calcineurin (Cmp1) and Mkc1 (11, 18, 19). As opposed to HSP90, CMP1 was upregulated in 258 the *rim101-/-* mutant compared to the wild-type (Figure 6A). In addition, no difference in sensitivity 259 to ciclosporin, a pharmacological calcineurin inhibitor, was noticed between the rim101-/- mutant, a 260 strain overexpressing RIM101 and the control strain (Figure S4). This suggests that Hsp90 may be 261 involved in Rim-dependent antifungal tolerance independently of calcineurin. In addition, no 262 difference in MKC1 level of expression was evidenced by RNA-sequencing analysis between the 263 mutant and the wild-type strain at alkaline pH (Figure 6A). Thus, implication of Hsp90 in antifungal 264 tolerance mediated by the Rim pathway may involve additional mechanisms and requires further 265 investigation.

266

#### 267 DISCUSSION

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

274

First, we showed that all rim mutants were hypersensitive to azoles and echinocandins by colonyforming assays, suggesting an involvement of the Rim pathway in tolerance and/or resistance to these antifungal drugs. We then performed time-kill curves experiments, recommended as a key method to explore antifungal tolerance, which confirmed the enhanced activity of azoles towards the rim mutants (8). However, this assay presents severe limitations in *C. albicans* due to clumping effect: it has previously been shown to be inaccurate for echinocandins, yet one of the most widely prescribed antifungal class (11). In this study, we showed that clumping effect also limits the use of this assay at alkaline pH, a condition known to induce filamentation. Indeed, severe clumping occurred when using the usual initial inoculum especially for the control strain, rendering CFU count on agar plates inaccurate. We therefore had to use a lower initial inoculum (10<sup>4</sup> CFU/mL) than the one recommended (at least 10<sup>5</sup> CFU/mL). Evaluation of antifungal tolerance at alkaline pH therefore remains challenging. However, azoles and echinocandins MICs, which did not differ between the control strain and the rim mutants, suggest that the Rim pathway is rather involved in tolerance than resistance to these antifungal drugs.

289

290 RNA-sequencing of both a wild-type and a strain disrupted for RIM101 was then performed at 291 alkaline and acidic pH to identify potential Candidates underlying involvement of the Rim pathway in 292 antifungal tolerance. Two previous studies performed transcriptomic profiling of a C. albicans wild-293 type strain in both alkaline (pH 8) and acidic (pH 4) conditions. Bensen et al. used microarrays and 294 described 514 pH-responsive genes in the DAY185 strain using a  $\geq 2$  fold-change criteria (36). More 295 recently, Bruno et al. performed RNA-sequencing analysis of the SC5314 reference strain at pH 4 and 296 pH 8, in order to proceed to the comprehensive annotation of the C. albicans transcriptome: 1381 297 genes were found to be differentially expressed at alkaline versus acidic pH (37). Using a  $\geq 2$  fold-298 change criteria, our study identified only 346 differentially expressed genes. Half of them were also 299 identified as such in the Bruno's study. However, direct comparison of results is not accurate as 300 different experimental conditions were used: notably, incubation time, media and pH conditions 301 varied between the 3 studies. Bensen et al. also studied the transcriptomic profiles of the DAY25 302 RIM101-/- mutant at acidic and alkaline pH. However, our study is the first to investigate it by RNA-303 sequencing.

304 Several genes potentially involved in antifungal tolerance and resistance were identified as Rim-305 dependent. Among them, two particularly retained our interest.

First, *HSP90* was identified as a Rim-dependent gene. Although the decrease of its expression in the  $rim101\Delta$ -disrupted strain compared to the SC5314 reference strain at alkaline pH is not drastic (1.79-

308 fold), it was statistically significant and confirmed by RT-qPCR (Figure 6B). In addition, HSP90 309 expression was also decreased in the rim101-/- mutant strain compared to the SC5314 reference 310 strain at alkaline pH in presence of fluconazole or anidulafungin (Figure S5). Moreover, rim mutants were hypersensitive to pharmacological Hsp90 inhibition. RIM101 has previously been identified as a 311 312 genetic interactor of HSP90 in C. albicans (38, 39). Another study suggested that rim101p was a 313 client-protein of the chaperone Hsp90 in yeasts, based on the results of a genome-wide genetic 314 screen in S. cerevisiae (20, 35). By contrast, our transcriptomic and phenotypic results rather support 315 that Rim101 acts upstream Hsp90.

316 Secondly, IPT1 was shown to be downregulated in the rim101-/- mutant compared to the wild-type 317 strain at alkaline pH. Importantly, this downregulation was conserved in presence of fluconazole or 318 anidulafungin (Figure S5). To our knowledge, this is the first study to identify this gene as Rim-319 dependent. *IPT1* is responsible for the biosynthesis of the more abundant membrane sphingolipid, 320 mannose-(inositol-P)2-ceramide (16). It has previously been shown that disruption of this gene was 321 associated with hypersensitivity to fluconazole in C. albicans (16). In addition, membrane 322 sphingolipids may influence the interaction between the echinocandins and their target, Fks1p, and 323 therefore modulate their antifungal activity (17). IPT1 was also identified as a pH-dependent gene: its 324 expression was significantly induced at alkaline pH versus acidic pH in the wild-type strain. All these 325 data suggest that *IPT1* could contribute to Rim-mediated antifungal tolerance.

326

These results open great perspectives. Hsp90 was shown to play a crucial role in antifungal tolerance in *C. albicans* (11, 18, 19). It has also been involved in development of resistance in this species (19). Moreover, under stress conditions, it has been shown to induce genetic instability, leading to aneuploidy and the occurrence of antifungal resistance in S. cerevisiae (40). Efungumab, a recombinant human antibody fragment targeting fungal Hsp90, has been evaluated as a new antifungal strategy in combination with amphotericin B in vitro and in vivo. In a phase III clinical trial in patients with invasive candidiasis, efungumab in combination with lipid-associated amphotericin B

decreased the Candida-attributable mortality, improved the overall clinical response rate and 334 335 increased the rate of culture-confirmed clearance of the infection (41). However, despite its good 336 antifungal activity, its development was stopped due to quality and safety issues. As Hsp90 is not a 337 fungal-specific protein, developing anti-Hsp90 antifungal strategies may expose to toxicity. By 338 contrast, the Rim pathway is fungal-specific and relatively well-conserved among the fungal kingdom. 339 As it appears to act upstream Hsp90, targeting this pathway would be an interesting way to indirectly 340 target Hsp90 and avoid toxicity in humans. Moreover, as this pathway is also involved in 341 pathogenesis and virulence, as well as in antifungal tolerance, inhibiting the Rim pathway in 342 combination with commercially available antifungal drugs would have a great potential as a new 343 therapeutic strategy. Such a strategy would therefore be limited to the treatment of infections in 344 anatomical sites displaying neutral or alkaline pH, that is to say conditions in which the Rim pathway 345 is activated. However, this is the case of most of the invasive candidiasis, and notably candidemia or 346 intra-abdominal candidiasis. It would also be interesting to investigate the Rim pathway in other 347 pathogenic Candida species, and especially in C. glabrata, which is the second most frequent agent 348 of invasive candidiasis and displays a high genetic distance to C. albicans. Indeed, resistance and 349 therapeutic failures are more challenging in C. glabrata than in C. albicans, although until now the 350 Rim pathway and the mechanisms of antifungal drug tolerance have been described more 351 thoroughly in this last species (2, 6).

352

In conclusion, this study showed that the 6 Rim proteins are involved in azoles and echinocandins tolerance in *C. albicans*. Transcriptomic and phenotypic analysis suggests that this implication in tolerance could be partly mediated through Hsp90 and Ipt1. Further studies are warranted to characterize the interactions between Rim101 and Hsp90, as well as to describe the role of Ipt1 in antifungal tolerance. Targeting the Rim pathway could therefore represent a promising antifungal strategy, in combination with existing antifungal drugs.

359

#### 360 MATERIALS AND METHODS

361

#### 362 Strains and antifungal drugs

All strains used in the study are listed in Table 1. pTDH3-*RIM101* overexpression strain was constructed from CAI4 strain using the Gateway<sup>®</sup> technology (Gateway<sup>®</sup> LR clonase kit, ThermoFisher Scientific) and a CIp-pTDH3-GTW expression vector, kindly given by Christophe d'Enfert.

366 Antifungal drugs powders were obtained from the following pharmaceutical companies: fluconazole,

367 voriconazole and anidulafungin from Pfizer, posaconazole from MSD and micafungin from Astellas.

368

#### 369 Time-kill curves experiments

370 Time-kill curves experiments were performed in RPMI medium buffered with HEPES at pH 7.6. 371 Fluconazole, voriconazole and posaconazole were used at 8, 5 and 2.5  $\mu$ g/mL respectively. 372 Anidulafungin and micafungin were used at 0.5 µg/mL. Controls without any antifungal drug were 373 performed in parallel. An initial inoculum of 10<sup>4</sup> or 10<sup>6</sup> CFU/mL, obtained from overnight pre-culture 374 of each strain in liquid YPD medium, was added to each tube, which was further incubated at 30°C under agitation for 48 hours. After 8, 24 and 48 hours of incubation, 10 µL of each suspension were 375 376 sampled, serially diluted in NaCl 0.9%, and 20 µL of the diluted-suspension were plated in duplicates 377 on YPD agar. When the growth was very limited after 24h or 48h of incubation, 100 µL of the 378 suspension were directly plated in duplicates on YPD agar. In these conditions, the minimal 379 accurately countable number of CFUs/mL was 10. Determination of CFUs was performed after 24 to 380 48 hours of incubation at 30°C. A minimum of 2 replicates was performed for each time-kill curve 381 experiment. A reduction of a  $\geq$ 3 log-fold ( $\geq$ 99.9%) of the initial inoculum defined a fungicidal activity. 382 The ability of such a protocol to evidence a fungicidal effect resulting from an inhibition of antifungal 383 tolerance was controlled by the use of a combination of ciclosporin A (0.6  $\mu$ g/mL) and fluconazole 384 compared to the use of fluconazole alone for the reference strain SC5314 (Figure 2B).

385

#### 386 **Colony formation assays**

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

392

#### 393 RNA extraction

394 Each strain (DAY185, DAY25 and CGY1 for RNA-SEQ; DAY185, DAY25 and DAY5SL for RT-qPCR (Table 395 1)) was pre-cultured overnight in liquid YPD medium at 30°C under agitation, then diluted to an 396 OD600 of 0.1 in SC medium buffered at pH 7.6 or pH 4 respectively with HEPES or citrate buffer. Cells 397 were then incubated at 30°C (to be consistent with the other experiments of the study and avoid 398 intense yeast-to-hyphae transition), under agitation until an  $OD_{600}$  of 0.6-0.8 was reached, and 399 collected by centrifugation. RNA extraction was performed on the pellet using the MasterPure™ 400 Yeast RNA Purification Kit (Epicentre), according to manufacturer's instructions. Three biological 401 replicates were performed for each strain and condition.

402

#### 403 **RT-qPCR**

404 RT-qPCR was performed using the KAPA Probe Fast qPCR Master Mix (Clinisciences). Primers and 405 probes are listed in Table S6. Gene expression levels were normalized to the *ACT1* ones.

406

#### 407 RNA-sequencing analysis

Library preparation and RNA-sequencing were performed by GATC Biotech (European Genome and Diagnostics Centre, Constance, Germany). The bioinformatics analysis pipeline can be summarized as follows (Figure S1 A): reads were quality-checked using FastQC before and after cleaning by Trimmomatic applying default parameters (42). Reads were then aligned to *C. albicans* genome Assembly 22 (allele A, available from *Candida* genome database) using Bowtie2 (43). Raw read counts for each gene were calculated using HTSeqCount using defaults parameters (44). Read count data was normalized using the DESeq2 R-package (45). DESeq2 normalized read counts were used to identify differentially expressed genes with an adjusted p-value <0.05 and a fold change below -1.5 or above 1.5 (or below -2 or above 2 for comparison with previously published data). Gene ontology analysis was performed using the GO slim mapper available from *Candida* genome database. Data from the RNA-SEQ analysis are currently deposited in GEO repository.

419

#### 420 Statistical analysis

421 Statistical analysis was performed by two-way ANOVA (antifungal and strain with interaction 422 antifungal-strain) and a Tukey-Kramer post-hoc analysis. A secondary analysis was performed for 423 each antifungal.

424

#### 425 FUNDING

This study was partly funded by a grant from the Grenoble Alpes University to MCo (Grant numberCSVSB 2011).

This work was supported by the Fond d'Intervention of the University Grenoble Alpes [to JG], the Agence Nationale de la Recherche [ANR-11-PDOC-0011 to JG]; the European Union FP7 Marie Curie Action "Career Integration Grant" [304003 to JG] and the Fondation pour la Recherche Médicale [SPF20140129159 to EGO] and the FINOVI program of the Région Rhone Alpes to MCh. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

434

#### 435 ACKNOWLEDGMENTS

436 We are grateful to Christophe d'Enfert, Murielle Chauvel and Aaron P. Mitchell for the generous gift

437 of strains and plasmid used in this study. We thank Rose-Laurence Bertini, Marie Arlotto and Marie

- 438 Courçon for technical help.
- 439

#### 440 **REFERENCES**

- Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden killers:
  human fungal infections. Sci Transl Med 4:165rv13.
- 443

445

455

459

462

466

470

444 2. Kullberg BJ, Arendrup MC. 2015. Invasive Candidiasis. N Engl J Med 373:1445–1456.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC,
Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. 2016. Executive Summary: 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 62:409–417.

- 4. Vallabhaneni S, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Schaffner W, Beldavs ZG, Derado G, 452 Pham CD, Lockhart SR, Smith RM. 2015. Epidemiology and Risk Factors for Echinocandin 453 Nonsusceptible *Candida glabrata* Bloodstream Infections: Data From a Large Multisite Population-454 Based Candidemia Surveillance Program, 2008-2014. Open Forum Infect Dis 2:ofv163.
- 456 5. Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. 2016. Antifungal susceptibility patterns
  457 of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013).
  458 Diagn Microbiol Infect Dis 85:200–204.
- 460 6. Shields RK, Nguyen MH, Clancy CJ. 2015. Clinical perspectives on echinocandin resistance
  461 among *Candida* species. Curr Opin Infect Dis 28:514–522.
- 7. Delarze E, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. 2015. Adaptation of a Gaussia princeps Luciferase
  reporter system in *Candida albicans* for in vivo detection in the *Galleria mellonella* infection model.
  Virulence 6:684–693.
- 467 8. Delarze E, Sanglard D. 2015. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance
  468 and the concept of persistence. Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother
  469 23:12–19.
- 9. Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. 2003. Ergosterol biosynthesis inhibitors
  become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans, Candida glabrata*, and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother 47:956–964.
- 474
- 475 10. Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. 2003. Calcineurin A of *Candida albicans*:
  476 involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. Mol Microbiol 48:959–976.
  477
- 478 11. Singh SD, Robbins N, Zaas AK, Schell WA, Perfect JR, Cowen LE. 2009. Hsp90 governs
  479 echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. PLoS Pathog
  480 5:e1000532.
- 481

482 12. Yu S-J, Chang Y-L, Chen Y-L. 2015. Calcineurin signaling: lessons from *Candida* species. FEMS
483 Yeast Res 15:fov016.

485 13. Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Prince RA, Lewis RE. 2005. Attenuation of the activity of
486 caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*: possible role of cell wall integrity and
487 calcineurin pathways. Antimicrob Agents Chemother 49:5146–5148.

14. Dichtl K, Samantaray S, Wagener J. 2016. Cell wall integrity signalling in human pathogenic
fungi. Cell Microbiol 18:1228–1238.

492 15. Rauceo JM, Blankenship JR, Fanning S, Hamaker JJ, Deneault J-S, Smith FJ, Nantel A, Mitchell
493 AP. 2008. Regulation of the *Candida albicans* cell wall damage response by transcription factor Sko1
494 and PAS kinase Psk1. Mol Biol Cell 19:2741–2751.

Prasad T, Saini P, Gaur NA, Vishwakarma RA, Khan LA, Haq QMR, Prasad R. 2005. Functional
Analysis of Ca*IPT1*, a Sphingolipid Biosynthetic Gene Involved in Multidrug Resistance and
Morphogenesis of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 49:3442.

500 17. Healey KR, Challa KK, Edlind TD, Katiyar SK. 2015. Sphingolipids mediate differential 501 echinocandin susceptibility in *Candida albicans* and *Aspergillus nidulans*. Antimicrob Agents 502 Chemother 59:3377–3384.

18. LaFayette SL, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Betancourt-Quiroz M, Gunatilaka AAL, Perfect JR,
Cowen LE. 2010. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via
circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. PLoS Pathog 6:e1001069.

508 19. Cowen LE. 2013. The fungal Achilles' heel: targeting Hsp90 to cripple fungal pathogens. Curr
509 Opin Microbiol 16:377–384.

511 20. Leach MD, Klipp E, Cowen LE, Brown AJP. 2012. Fungal Hsp90: a biological transistor that 512 tunes cellular outputs to thermal inputs. Nat Rev Microbiol 10:693–704.

514 21. Li X, Cai Q, Mei H, Zhou X, Shen Y, Li D, Liu W. 2015. The Rpd3/Hda1 family of histone 515 deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother.

517 22. Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. 1999. The trailing end point phenotype in antifungal 518 susceptibility testing is pH dependent. Antimicrob Agents Chemother 43:1383–1386.

520 23. Cornet M, Gaillardin C. 2014. pH signaling in human fungal pathogens: a new target for 521 antifungal strategies. Eukaryot Cell 13:342–352.

522

526

530

484

488

491

495

499

503

510

513

516

519

523 24. Nobile CJ, Solis N, Myers CL, Fay AJ, Deneault J-S, Nantel A, Mitchell AP, Filler SG. 2008.
524 *Candida albicans* transcription factor *RIM101* mediates pathogenic interactions through cell wall
525 functions. Cell Microbiol 10:2180–2196.

527 25. Cheng S, Clancy CJ, Xu W, Schneider F, Hao B, Mitchell AP, Nguyen MH. 2013. Profiling of 528 *Candida albicans* gene expression during intra-abdominal candidiasis identifies biologic processes 529 involved in pathogenesis. J Infect Dis 208:1529–1537.

531 26. Mitchell BM, Wu TG, Jackson BE, Wilhelmus KR. 2007. *Candida albicans* strain-dependent 532 virulence and Rim13p-mediated filamentation in experimental keratomycosis. Invest Ophthalmol Vis 533 Sci 48:774–780. 534 27. Davis DA. 2009. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence.
535 Curr Opin Microbiol 12:365–370.

536

544

552

560

567

571

575

579

582

Parsons AB, Brost RL, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown GW, Kane PM, Hughes TR, Boone
C. 2004. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to
cellular target pathways. Nat Biotechnol 22:62–69.

- 540
  541 29. Cornet M, Gaillardin C, Richard ML. 2006. Deletions of the endocytic components VPS28 and
  542 VPS32 in *Candida albicans* lead to echinocandin and azole hypersensitivity. Antimicrob Agents
  543 Chemother 50:3492–3495.
- 54530.EUCAST. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth546dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect. 2008;14:398-405.
- 547
  548 31. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, EUCAST-AFST. 2012. EUCAST
  549 technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth
  550 dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST).
  551 Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 18:E246-247.
- 553 32. Gomez-Raja J, Davis DA. 2012. The  $\beta$ -arrestin-like protein Rim8 is hyperphosphorylated and 554 complexes with Rim21 and Rim101 to promote adaptation to neutral-alkaline pH. Eukaryot Cell 555 11:683–693.
- 556
  557 33. Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. 1999. Structural basis for
  558 inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and
  559 geldanamycin. J Med Chem 42:260–266.
- 34. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. 1994. Inhibition of heat shock
  protein Hsp90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential
  role for stress proteins in oncogenic transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 91:8324–8328.
- 35. Zhao R, Houry WA. 2005. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation.
  Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell 83:703–710.
- 568 36. Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J, Davis DA. 2004. Transcriptional profiling in *Candida* 569 *albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. Mol 570 Microbiol 54:1335–1351.
- 572 37. Bruno VM, Wang Z, Marjani SL, Euskirchen GM, Martin J, Sherlock G, Snyder M. 2010. 573 Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* 574 using RNA-seq. Genome Res 20:1451–1458.
- 38. O'Meara TR, Veri AO, Polvi EJ, Li X, Valaei SF, Diezmann S, Cowen LE. 2016. Mapping the
  Hsp90 Genetic Network Reveals Ergosterol Biosynthesis and Phosphatidylinositol-4-Kinase Signaling
  as Core Circuitry Governing Cellular Stress. PLoS Genet 12:e1006142.
- 39. O'Meara TR, Robbins N, Cowen LE. 2017. The Hsp90 Chaperone Network Modulates *Candida*Virulence Traits. Trends Microbiol.
- 583 40. Chen G, Bradford WD, Seidel CW, Li R. 2012. Hsp90 stress potentiates rapid cellular 584 adaptation through induction of aneuploidy. Nature 482:246–250.
Pachl J, Svoboda P, Jacobs F, Vandewoude K, van der Hoven B, Spronk P, Masterson G,
Malbrain M, Aoun M, Garbino J, Takala J, Drgona L, Burnie J, Matthews R, Mycograb Invasive
Candidiasis Study Group. 2006. 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 42:1404–1413.

591 42. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence 592 data. Bioinforma Oxf Engl 30:2114–2120.

43. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 9:357–359.

44. Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput
sequencing data. Bioinforma Oxf Engl 31:166–169.

45. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion forRNA-seq data with DESeq2. Genome Biol 15:550.

46. Fonzi WA, Irwin MY. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. Genetics 134:717–728.

606 47. Davis D, Edwards JE, Mitchell AP, Ibrahim AS. 2000. *Candida albicans RIM101* pH response 607 pathway is required for host-pathogen interactions. Infect Immun 68:5953–5959.

609 48. Davis DA, Bruno VM, Loza L, Filler SG, Mitchell AP. 2002. *Candida albicans* Mds3p, a
610 conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis.
611 Genetics 162:1573–1581.

49. Wilson RB, Davis D, Mitchell AP. 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans*through gene disruption with short homology regions. J Bacteriol 181:1868–1874.

50. Davis D, Wilson RB, Mitchell AP. 2000. Rim101-Dependent and -Independent Pathways
Govern pH Responses in *Candida albicans*. Mol Cell Biol 20:971–978.

51. Li M, Martin SJ, Bruno VM, Mitchell AP, Davis DA. 2004. *Candida albicans* Rim13p, a Protease
Required for Rim101p Processing at Acidic and Alkaline pHs. Eukaryot Cell 3:741–751.

621
622 52. Gigou Cornet M. 2006. Rôle des gènes RIM et VPS dans la signalisation du pH, la virulence et
623 la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans*. Biochimie, INAPG (AgroParisTech).

624
625 53. Cornet M, Bidard F, Schwarz P, Da Costa G, Blanchin-Roland S, Dromer F, Gaillardin C. 2005.
626 Deletions of endocytic components VPS28 and VPS32 affect growth at alkaline pH and virulence
627 through both RIM101-dependent and RIM101-independent pathways in *Candida albicans*. Infect
628 Immun 73:7977–7987.

629

590

593

596

599

602

605

608

612

615

618

630 FIGURES

Figure 1



# Figure 1: 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 is 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.

Α		SC pH 7.6	SC pH 7.6 + Posaconazole 2.5 μg/mL	SC pH 7.6 + Fluconazole 8 μg/mL	SC pH 7.6 + Anidulafungin 0.5 μg/mL	SC pH 7.6 + Micafungin 0.5 μg/mL
	Control strain					۵. کې کې کې کې
	rim101-/-	***	• • • • •		(b)	
<i>rim</i> mutants	rim20-/-				0 78	🔹 🐵 🕷 👘
	rim8-/-					
	rim21-/-		• •	00	• •	0 0 0 0 0
	rim9-/-	***				
	rim13-/-			• • * * *		
	Control strain				🕒 🌒 🗰 🕷 👘	🕒 🌒 🇰 🖮 👘
Overexpression and complemented strains	<i>rim101-/-</i> + RIM101SL				• • • •	• • * *
	pTDH3 RIM101		• • • • •	•••**	• • • •	🔴 🌒 🏶 🕸 👻
	rim8-/- + RIM8			🕒 🔿 🔿 🏘 🔊		🕒 🔴 🗮 d
	rim13-/- + RIM13		30 🛞 🔴 🔴		🗩 🏶 🏶 estati	
	rim21-/- + RIM21	90005	🕒 🌒 🌒 👘 👘			



Reference strain (WT)



Figure 2

# Figure 2: The rim pathway is involved in antifungal tolerance in C. albicans

(A) Colony forming assays. Cells were plated in ten-fold dilutions in presence of fluconazole (8  $\mu$ g/mL), posaconazole (2.5  $\mu$ g/mL), anidulafungin (0.5  $\mu$ g/mL) or micafungin (0.5  $\mu$ g/mL) in SC-medium buffered at pH 7.6. The 6 *rim* mutants were hypersensitive to the different antifungal drugs. (B) Upper panel: Time-kill curves of the SC5314 reference strain in presence of fluconazole (FLC, 8  $\mu$ g/mL) or a combination of fluconazole and the calcineurin inhibitor ciclosporin A (CsA, 0.6  $\mu$ g/mL) at pH 7.6. Inhibition of antifungal tolerance by CsA restored a fungicidal effect of FLC. Lower panel: Time-kill curves of the *rim* mutants and a control strain in presence of posaconazole (2.5  $\mu$ g/mL), voriconazole (5  $\mu$ g/mL) and fluconazole (8  $\mu$ g/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<0.001).

Figure 3

540

Multi-organism process 💻 Single-organism biosynthetic process

Single-organism cellular process

0

10

Single-organism metabolic process

Rim-dependent upregulated genes Ion transport Transmembrane transport

Oxidation-reduction process

....

\*\*\*

20 30 40 Number of genes

100

Number of genes

50

0

....

60

\*\*\*

50

150 200



120

# Figure 3: Transcriptomic analysis of a *rim101*Δ-disrupted strain (DAY25), a strain overexpressing *RIM101* (CGY1) and the SC5314 reference strain.

(A) Left panel: strain lineage, Right panel: experimental design of RNA-SEQ experiments. (B) Unsupervised hierarchical clustering of the distance between the SC5413 reference strain, the *rim101* $\Delta$ -disrupted strain (DAY25) and the *RIM101*-overexpressed strain samples (CGY1). All replicates are presented. (C) Alkaline upregulated and downregulated genes 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) Rim-dependent upregulated and downregulated genes in the *rim101* $\Delta$ -disrupted strain (DAY25) compared to the SC5413 reference strain at pH 7.6. 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. (D) Rim-dependent upregulated and downregulated genes in the *rim101* $\Delta$ -disrupted strain (DAY25) compared to the SC5413 reference strain at pH 7.6. 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 \*\*\* and \*\*\* respectively indicate p-values < 0.01 and p-values < 0.001.



### **Rim pathway**



# Cell wall biosynthesis



# Membrane biosynthesis



## Antifungal resistance



Figure 4: Normalized gene counts obtained from RNA-sequencing at both acidic and alkaline pH for various genes in the SC5413 reference strain, the *rim101*Δ-disrupted strain (DAY25) and the *RIM101*-overexpressed strain (CGY1).



# Figure 5: IPT1 is a pH- and Rim-dependent gene

(A) Normalized gene counts obtained from RNA-sequencing at both acidic and alkaline pH for *IPT1* in the SC5413 reference strain, the *rim101* $\Delta$ -disrupted strain (DAY25) and the *RIM101*-overexpressed strain (CGY1). (B) *IPT1* expression level normalized to *ACT1* obtained in RT-qPCR at acidic and alkaline pH in the DAY25 *rim101* $\Delta$ -disrupted strain, the DAY5SL complemented strain and the DAY185 control strain.





# Figure 6: HSP90 is a Rim-dependent gene

(A) Normalized gene counts obtained from RNA-sequencing at both acidic and alkaline pH for *HSP90*, *CMP1* and *MKC1* genes in the SC5413 reference strain, the *rim101* $\Delta$ -disrupted strain (DAY25) and the *RIM101*-overexpressed strain (CGY1). (B) *HSP90* expression level normalized to *ACT1* obtained in RT-qPCR at acidic and alkaline pH in the DAY25 *rim101* $\Delta$ -disrupted strain, the DAY5SL complemented strain and the DAY185 control strain. (C) Colony forming assays in presence of the pharmacological Hsp90 inhibitor geldanamycin. Cells were plated in ten-fold dilutions in presence of geldanamycin (10  $\mu$ M) in SC-medium buffered at pH 7.2. The *rim* mutants are hypersensitive to pharmacological inhibition of Hsp90.

# TABLES

# Table 1: Strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
SC5314	Reference strain	
CAI4	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434	(44)
DAY185	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pHIS1::his1::hisG/his1::hisG	(45)
	pARG4::URA3::arg4::hisG/arg4::hisG	
DAY25	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pHIS1::his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG	(45)
DAV20C	NIVITUL.AND4/NIVITUL.UNAS	(46)
DATZOD	uru3Δ.:ʌimim434/uru3Δ.:ʌimm434 ms1::msG/ms1::msG pARG4::URA3::ury4::msG/ury4::msG	(40)
DAY5	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG	(47)
5.4.400	RIVITUT::ARG4/RIVITUT::URA3	(
DAY23	ura3Δ::Aimm434/ura3Δ::Aimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim20::LIRA2/rim20::ARG4	(47)
DAV61	ura24Jimm424/ura24Jimm424 hic1hicC/hic1hicC ara4hicC/ara4hicC	(49)
DATUI	rim8::URA3/rim8::ARG4	(48)
GKO88	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG rim13::Tn7-	(49)
	UAU1/ rim13:: Tn7-URA3	
MC21	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG	(50)
	rim21::URA3/rim21::URA3	
MC23	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG	(50)
	rim9::URA3/rim9::ARG4	
MC21C	ura3Δ::\imm434/ura3Δ::\imm434 pHIS1::RIM21::his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG	(50)
	rim21::URA3/rim21::URA3	(= =)
MC23C	ura3Δ::Aimm434/ura3Δ::Aimm434 pHIS1::RIM9::his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG	(50)
	11113UNAS/11113ANU4	(45)
DATIO	rin8:··IIRA3/rin8:··ARG4···nRIM8··HIS1	(45)
DAY226	ura3A::\imm434/ura3A::\imm434_nHIS1::RIM13::his1::hisG/his1::hisG ara4::hisG/ara4::hisG	(49)
DATEE	rim13::URA3/ rim13::ARG4	(13)
DAY5SL	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 pRIM101SL::HIS'RIM101/RIM101 ara4::hisG/ara4::hisG	(51)
(MC13)	RIM101::ARG4/RIM101::URA3	
CGY1	ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 RPS1/RPS1::pTDH3-RIM101	This study

# SUPPLEMENTAL DATA

# Table S1 : MICs determined by the EUCAST reference technique

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

Tables S2, S3, S4 and S5: xlsx files (avalaible on request)

# Table S6: Primers and probes used for RT-qPCR

Gene	Primers and probes	Reference
ACT1	F-ACT1 : TTGGTGATGAAGCCCAATCC	(1)
	R-ACT1 : CATATCGTCCCAGTTGGAAACA	
	S-ACT1 : FAM-TTGACCTTGAGATACCCAATTGAACACGGTA-Tamra	
HSP90	F-HSP90 : GCTGACGTTTCTATGATTG	This study
	R-HSP90 : CATCCAAAGTAACAGTGAAC	
	S-HSP90 : FAM-TCTACTCCTTGTTCTTGGTTGCTGAT-Tamra	
IPT1	F-IPT1 : TGGAGAGAATGCTAATGC	This study
	R-IPT1 : CCATCTTGAATAATATCCAACA	
	S-IPT1 : FAM-ATTATGATACTCCAGGTTATGCCGCT-Tamra	
RIM101	F-RIM101 : CCCAATCACCTCACATTA	This study
	R-RIM101 : GCATCAGTGATAGGAGAA	
	S-RIM101 : FAM-CCATTCCTCATTCACTTCTCAATCTGC-Tamra	

# SUPPLEMENTAL FIGURES



adjp-value



# Figure S1: Transcriptomic analysis

(A) Schematic representation of the bioinformatic pipeline used for RNA-SEQ data analysis, (B) Left panel: unsupervised hierarchical clustering of the distance between SC5314 (WT) and DAY185 (control strain) samples at acidic and alkaline pH. All replicates are collapsed. Right panel: results of the differential analysis of DAY185 versus SC5314 transcriptomic programs at pH 4 and 7.6 expressed based on the adjusted p-value. No statistically significant difference was evidenced between these two strains. (C) 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;  $rim101\Delta$ -disrupted strain (DAY 25), triangle; *RIM101*-overexpressed strain (CGY1), square.





Figure S2: Results of the differential analysis of the *rim101*Δ-disrupted strain (DAY25) versus the SC5314 reference strain transcriptomic programs at pH 4 expressed based on the adjusted p-value



# Figure S3: 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.



# Figure S4: Pharmacological inhibition of calcineurin

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

A. RIM101



B. *IPT1* 



# C. HSP90



Figure S5: *RIM101, IPT1* and *HSP90* expression levels normalized to *ACT1* obtained in RT-qPCR at acidic and alkaline pH, under drug-stress conditions or not, in the DAY25 *rim101*Δ-disrupted strain, the DAY5SL complemented strain and the DAY185 control strain.

Each strain (DAY185, DAY25 and DAY5SL (Table 1)) was pre-cultured overnight in liquid YPD medium at 30°C under agitation, then diluted to an OD600 of 0.1 in SC medium buffered at pH 7.6 or pH 4 respectively with HEPES or citrate buffer, in presence or absence of fluconazole (0.1 µg/mL) or anidulafungin (0.001 µg/mL). Cells were then incubated at 30°C (to be consistent with the other experiments of the study and avoid intense yeast-to-hyphae transition), under agitation until an OD600 of 0.6-0.8 was reached, and collected by centrifugation. RNA extraction was performed on the pellet using the MasterPure<sup>TM</sup> Yeast RNA Purification Kit (Epicentre), according to manufacturer's instructions. Two biological replicates were performed for each strain and condition.

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

# REFERENCES

 Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegeville M, Le Pape P. 2012. Amino acid substitutions in the Candida albicans sterol Δ5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. J Antimicrob Chemother 67(9):2131–8.

# 3. Bdf1, nouvelle cible antifongique ?

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

# 3.1.1. <u>Contexte</u>

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 bromodomaines, 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 bromodomaines 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 bromodomaines des protéines BET humaines. (iii) un de ces composés de type dibenzothiazepinone phénocopie les effets des mutations des bromodomaines 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. <u>Article</u>

[Version publiée dans Nature Communications en mai 2017]



# ARTICLE

Received 4 Oct 2016 | Accepted 31 Mar 2017 | Published 18 May 2017

DOI: 10.1038/ncomms15482

**OPEN** 

# Selective BET bromodomain inhibition as an antifungal therapeutic strategy

Flore Mietton<sup>1,2,\*</sup>, Elena Ferri<sup>3,\*</sup>, Morgane Champleboux<sup>1,\*</sup>, Ninon Zala<sup>1</sup>, Danièle Maubon<sup>4,5</sup>, Yingsheng Zhou<sup>3</sup>, Mike Harbut<sup>6</sup>, Didier Spittler<sup>2</sup>, Cécile Garnaud<sup>4,5</sup>, Marie Courçon<sup>1</sup>, Murielle Chauvel<sup>7</sup>, Christophe d'Enfert<sup>7</sup>, Boris A. Kashemirov<sup>3</sup>, Mitchell Hull<sup>6</sup>, Muriel Cornet<sup>4,5</sup>, Charles E. McKenna<sup>3</sup>, Jérôme Govin<sup>1</sup> & Carlo Petosa<sup>2</sup>

Invasive fungal infections cause significant morbidity and mortality among immunocompromised individuals, posing an urgent need for new antifungal therapeutic strategies. Here we investigate a chromatin-interacting module, the bromodomain (BD) from the BET family of proteins, as a potential antifungal target in *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. We show that the BET protein Bdf1 is essential in *C. albicans* and that mutations inactivating its two BDs result in a loss of viability *in vitro* and decreased virulence in mice. We report small-molecule compounds that inhibit *C. albicans* Bdf1 with high selectivity over human BDs. Crystal structures of the Bdf1 BDs reveal binding modes for these inhibitors that are sterically incompatible with the human BET-binding pockets. Furthermore, we report a dibenzothiazepinone compound that phenocopies the effects of a Bdf1 BD-inactivating mutation on *C. albicans* viability. These findings establish BET inhibition as a promising antifungal therapeutic strategy and identify Bdf1 as an antifungal drug target that can be selectively inhibited without antagonizing human BET function.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, Laboratoire Biologie à Grande Échelle, Université de Grenoble Alpes, CEA, Inserm, 38000 Grenoble, France. <sup>2</sup> Institut de Biologie Structurale (IBS), Université de Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France. <sup>3</sup> Department of Chemistry, Dana and David Dornsife College of Letters, Arts and Sciences, University of Southern California, University Park Campus, Los Angeles, California 90089, USA. <sup>4</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes, 38043 Grenoble, France. <sup>5</sup> Laboratoire TIMC-IMAG-TheREx, UMR 5525 CNRS, Université Grenoble Alpes, 38058 Grenoble, France. <sup>6</sup> California Institute for Biomedical Research, 11119 N Torrey Pines Rd, La Jolla, California 92037, USA. <sup>7</sup> Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques, Institut Pasteur, INRA, 75015 Paris, France. \* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.E.M. (email: mckenna@usc.edu) or to J.G. (email: jerome.govin@inserm.fr) or to C.P. (email: carlo.petosa@ibs.fr).

nvasive fungal infections are a major global health concern, with  $\sim 2$  million cases and >800,000 deaths estimated annually worldwide<sup>1</sup>. Candida species such as C. albicans and C. glabrata are among the most significant human fungal pathogens, with invasive candidiasis yielding 30-40% mortality<sup>2,3</sup>. An increase in drug-resistant fungal strains and the limited repertoire of available drugs has led to an urgent need for novel therapeutic agents<sup>1,4-6</sup>. Promising results have emerged from the study of chromatin-interacting proteins as antifungal targets, including histone acetyltransferases and deacetylases<sup>7,8</sup>. Histone deacetylase inhibitors have weak antifungal activity when used alone but synergize with antifungal drugs such as azoles and echinocandins<sup>8,9</sup>. Deletion of either the histone deacetylase (HST3) or histone acetyltransferase (RTT109) regulating histone H3 Lys56 acetylation (H3K56ac) in C. albicans increases susceptibility to genotoxic and antifungal agents<sup>10</sup>. In a study of the Mediator complex subunit Med15, which interacts via its KIX domain with a transcription factor (Pdr1) implicated in pleiotropic drug resistance in C. glabrata, drug-resistant strains were re-sensitized to antifungals by a small-molecule inhibitor targeting the KIX domain-Pdr1 interface<sup>11</sup>. These findings point to an important role of chromatin-interacting proteins in fungal drug susceptibility.

Here we investigated an epigenetic reader module, the bromodomain (BD) from the bromo- and extra-terminal domain (BET) family, as a potential antifungal target in *C. albicans.* BET proteins are chromatin-associated factors that regulate transcription and chromatin remodelling<sup>12</sup>. Human BET family members are Brd2, Brd3, Brd4 and Brdt. BET proteins bind chromatin through their two BDs (BD1 and BD2), which specifically recognize histones acetylated on lysine residues. Whereas canonical BDs bind mono-acetylated histone peptides, BET BDs possess a wider ligand-binding pocket allowing them to recognize diacetylated peptides<sup>13,14</sup>. Small-molecule inhibitors, such as JQ1 and IBET, which selectively target BET BDs have been used to validate BET inhibition as a therapeutic strategy against cancer, cardiovascular disease, inflammatory disorders and other medical conditions, with several inhibitors currently in clinical trials<sup>12,15-21</sup>.

The fungal BET protein Bdf1 has been characterized as a global transcriptional regulator in Saccharomyces cerevisiae, where it regulates over 500 genes<sup>22</sup>. S. cerevisiae Bdf1 (ScBdf1) associates with acetylated histones H3 and H4 (refs 22-24) and with the general transcription factor TFIID<sup>25</sup>, and is a subunit of the SWR1 chromatin remodelling complex<sup>24,26,27</sup>. ScBdf1 is also important for chromatin compaction during sporulation<sup>28</sup> and for the salt stress response<sup>29</sup>. In addition to BDF1, S. cerevisiae possesses a second BET gene, BDF2, which is partly functionally redundant with BDF1 (refs 24,25,30,31). Disruption of BDF1 causes severe morphological and growth defects, while deletion of both *BDF1* and *BDF2* is lethal<sup>22,23</sup>. Point mutations that abolish ligand binding by ScBdf1 BD1 and BD2 cause growth and sporulation defects<sup>24</sup> and affect the majority of transcripts altered by disruption of the entire gene<sup>22</sup>. Many pathogenic fungal species (including C. albicans, C. glabrata, Aspergillus fumigatus, Cryptococcus neoformans and Pneumocystis jirovecii) lack BDF2, suggesting that inhibition of the sole BET family protein Bdf1 might significantly reduce viability and virulence<sup>32</sup>

Here we demonstrate that Bdf1 BD functionality is essential in *C. albicans* and identify small-molecule inhibitors that target Bdf1 BDs without inhibiting human BET proteins, establishing Bdf1 inhibition as a potential antifungal therapeutic strategy.

## Results

*C. albicans* Bdf1 BDs bind multi-acetylated histone tails. A phylogenetic tree of human and fungal BET proteins is shown

in Fig. 1a. The BDs from C. albicans Bdf1 (CaBdf1) share 31-46% sequence identity with human BET BDs and 58-66% identity with those from ScBdf1 and hence are likely to bind multiacetylated H3 and H4 tails (Fig. 1b). To verify this hypothesis, we purified recombinant CaBdf1 BD1 and BD2 and assessed binding to a microarray of human histone tail peptides bearing diverse post-translational modifications. While H2A and H2B tail sequences differ considerably between human and C. albicans, those of H3 and H4 are nearly perfectly conserved, justifying use of the array (Fig. 1c). As expected, CaBdf1 BDs showed weak binding to mono-acetylated peptides and stronger binding to peptides bearing two or more acetylation marks (Fig. 1d,e and Supplementary Data 1). Of the two BDs, BD1 exhibited more promiscuous binding, recognizing 14 distinct H3 and H4 acetylation patterns, versus only 7 for BD2. We replaced a conserved tyrosine residue in the binding pocket of each BD by phenylalanine, a mutation known to compromise ligand binding in ScBdf1 (refs 22,23) (Supplementary Fig. 1a,b). These two 'YF' mutations (Y248F and Y425F) abolished binding to all acetylated peptides, confirming interaction specificity (Fig. 1d,e). For both BD1 and BD2, the strongest binding was observed with an H4 peptide tetra-acetylated on lysines 5, 8, 12 and 16 (hereafter denoted H4ac4). A pull-down assay confirmed H4ac4 peptide recognition by both BDs, which was abolished by the YF mutation (Fig. 1f). Interestingly, CaBdf1 BD1 and BD2 bound tetra-acetylated H4 peptides with comparable strength (Fig. 1e), in contrast with mammalian Brd2, Brd4 and Brdt, which bind tetra-acetylated H4 more tightly through BD1 than through BD2 (refs 13,14), highlighting a certain redundancy in the ligandbinding activity of the two CaBdf1 BDs.

Bdf1 BD functionality is essential in C. albicans. We next asked whether Bdf1 BD function is important for the viability of C. albicans. Although a heterozygous BDF1 deletion mutant generated in strain SN152 (derived from SC5314) exhibited no significant phenotype, we were unable to obtain a homozygous  $bdf1\Delta/\Delta$  mutant, suggesting that BDF1 is essential. To confirm essentiality we placed the remaining allele of the BDF1 gene in the heterozygous strain under the control of a conditional promoter and evaluated survival under repressive conditions. We used either a methionine-repressible promoter or a newly engineered tetracycline (Tet)-regulatable cassette compatible with animal studies. Tet-dependent gene expression in C. albicans is usually achieved by integrating a chimeric transactivator protein and a Tet-responsive promoter independently into the genome<sup>33,34</sup>. Here we constructed a cassette allowing integration of all required components in a single step. The cassette contains the transactivator (TetR-VP16), a selective marker (ARG4) and seven tandem Tet-operator elements, which we inserted upstream of the BDF1 open reading frame (ORF) to generate strain *Abdf1/pTetO-BDF1* (Fig. 2a). Immunoblotting with a polyclonal antibody developed in this study to allow specific CaBdf1 detection (Supplementary Fig. 1c,d) confirmed that Bdf1 was expressed from the pTetO promoter in the absence of doxycycline (Dox), albeit at a weaker level than from the endogenous BDF1 promoter, and was effectively repressed in the presence of Dox (Fig. 2b). Strikingly, the growth of strain  $\Delta bdf1/$ pTetO-BDF1 mirrored these expression levels: compared to wild type (WT), growth was reduced in the absence of Dox and abrogated in its presence (Fig. 2c). The phenotype was rescued by re-introducing a functional copy of BDF1 (strain BDF1-R/pTetO-BDF1), confirming that BDF1 is essential in C. albicans.

To verify the importance of BD function for fungal growth, we generated strains in which one or both Bdf1 BDs were inactivated by domain deletion or by the YF point mutation while the other



**Figure 1** | *CaBdf1 BDs bind multi-acetylated histone tails. (a)* Phylogeny and domain organization of fungal Bdf1 and human BET proteins. The neighbourjoining tree based on an alignment of BET protein sequences was generated using programs ClustalX and NJPlot. (b) Sequence identity among human and fungal BET BDs. (c) Human (*Hs*) and *C. albicans* (*Ca*) histone tail sequences. (d) Binding of WT and mutant (YF) *CaBdf1* BDs to a histone peptide microarray. The array comprised control peptides (grey outline) or N-terminal peptides from histones H3, H4, H2A and H2B (blue, cyan, dark orange and light orange outlines, respectively). Signals for background and positive-binding controls (boxed in light and dark green) or for H4acO and H4ac4 peptides (boxed in magenta and purple) are shown magnified below the array. Microarray data are summarized in Supplementary Data 1. (e) Binding intensities for H3 and H4 peptides. Peptides are shown as blue (H3) and cyan (H4) rectangles, with acetylation marks indicated by black boxes. (f) Pull-down assay. Immobilized H4acO and H4ac4 peptides were incubated with GST-tagged *CaBdf1* BDs or with the corresponding YF mutants. After washing, bound proteins were eluted and visualized by western blotting with an anti-GST antibody. The full blots are shown in Supplementary Fig. 13a.



**Figure 2 | Bdf1 BDs are essential for** *C. albicans* **viability and virulence.** (a) Tet-OFF construct used in this study. Dox inhibits the binding of TetR-VP16 to the TetO, preventing *BDF1* transcription. (b) Bdf1 protein expression in different strains. The full blots are shown in Supplementary Fig. 13b. (c,d) Colony formation assays showing the effect of (c) Bdf1 repression and (d) Bdf1 BD inactivation on growth. This experiment was 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. \*\*\* $P \le 0.01$ . *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). \* $P \le 0.07$ ; \*\* $P \le 0.05$ . *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 on BD inactivation. Data shown are mean and s.d. values (n=6). \*\*\* $P \le 0.01$ ; *P* values were determined using a two-sided Wilcoxon rank sum test with continuity correction.

WT allele is expressed from the Dox-repressible promoter. Strains in which both BDs were inactivated grew as poorly as the conditional deletion mutant, whereas strains in which only BD1 or BD2 was inactivated displayed milder growth defects, with BD2 inactivation yielding the more pronounced defect (Fig. 2d). Additional assays evaluating stress resistance or cell wall integrity did not reveal any significant phenotype. Growth rates in liquid media recapitulated the phenotypes observed in the colony formation assay (Fig. 2e). Analogous results were obtained when *BDF1* expression was repressed using the methionine-regulatable promoter (Supplementary Fig. 2). Thus, *C. albicans* viability *in vitro* requires the presence of at least one functional BD within Bdf1.

Bdf1 BDs are required for virulence in a mouse model. Using our Tet-OFF system for Dox-repressible Bdf1 expression, we verified the role of Bdf1 in a murine model of invasive candidiasis. Initially, mice were injected with either WT C. albicans, the conditional BDF1 deletion strain ( $bdf1\Delta/pTetO-BDF1$ ) or the rescue strain (BDF1-R/pTetO-BDF1). Mice injected with the WT or rescue strains exhibited a high fungal load  $(>110,000 \text{ CFU g}^{-1})$  in the kidney 7 days post infection (Fig. 2f). The fungal load observed with strain  $bdf1\Delta/pTetO-BDF1$  was reduced by 30-fold ( $\sim$  3,500 CFU g<sup>-1</sup>) in the absence of Dox and was abolished in its presence, mirroring the growth phenotypes observed in vitro (Fig. 2c). Subsequently, we evaluated the virulence of strains in which both Bdf1 BDs were deleted or inactivated by the YF point mutations (Fig. 2g). These strains exhibited markedly reduced fungal loads (by ~8,800- and 1,600-fold, respectively), consistent with the in vitro growth rates associated with these mutations (Fig. 2d,e and Supplementary Fig. 2). Hence, Bdf1 BD functionality appears critical for the virulence of C. albicans in vivo.

CaBdf1 BDs are resistant to human BET inhibitors. For Bdf1 inhibition to be a feasible antifungal therapeutic strategy, smallmolecule inhibitors need to discriminate fungal from human BET BDs. To probe the similarity between the ligand-binding pockets of C. albicans and human BET BDs, we asked whether human BET inhibitors (BETi) could inhibit CaBdf1 BDs. We used a homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay to evaluate the ability of four chemically diverse BETi compounds (JQ1, PFI-1, IBET-151 and bromosporine) to inhibit BD binding to an H4ac4 peptide (Fig. 3a). The four compounds inhibited human Brd4 BD1 and BD2 with median inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub> values) in the low nM range (3–95 nM), consistent with previous reports<sup>16,35,36</sup>. In contrast, the *Ca*Bdf1 BDs were relatively insensitive to these inhibitors, with IC<sub>50</sub> values between 0.3 and  $>10\,\mu$ M, or approximately a two- to threefold logreduction in sensitivity (Fig. 3b). These results were confirmed for JQ1 by isothermal titration calorimetry (ITC): whereas JQ1 bound Brd4 BD1 tightly ( $K_d$  of 62 nM), no binding was detected for CaBdf1 BD1 or BD2 (Fig. 3c and Supplementary Table 1). None of the BETi compounds significantly inhibited growth of C. albicans in vitro at 10 µM concentration (Fig. 3d). This finding is consistent with the poor IC50 values observed for JQ1 and PFI-1 towards CaBdf1 BDs. It also indicates that IBET-151 and bromosporine, which display (sub)micromolar IC<sub>50</sub> values, have poor cellular potency, possibly due to mechanisms known to reduce drug potency in *C. albicans*, including cell wall and plasma membrane permeability barriers<sup>37,38</sup> and the activity of efflux pumps leading to rapid drug extrusion<sup>39,40</sup>. In summary, CaBdf1 and human BET BDs have distinct BETi-binding activity, supporting the feasibility of targeting CaBdf1 BDs with highly selective small-molecule inhibitors.

BETi resistance by CaBdf1 is due to smaller pocket residues. To identify features differentiating the ligand-binding pockets of human and fungal BET BDs, we determined crystal structures for CaBdf1 BD1 and BD2 (Supplementary Table 2). These structures exhibit the canonical BD fold (comprising helices Z,A,B and C, with the ZA and BC loops defining the ligand-binding pocket; Fig. 4a) and closely resemble those of their human BET counterparts (mean pairwise root-mean-square deviations (RMSDs)  $\leq$  1.5 Å; Supplementary Table 3). The ligand-binding loops are structurally well conserved, including nearly all water molecules implicated in ligand recognition (Supplementary Fig. 3), although the overall binding surfaces are less negatively charged in CaBdf1 (Fig. 4b). Superimposing the CaBdf1 BD structures onto that of JQ1-bound Brd4 BD1 reveals no major steric clashes between JQ1 and the fungal BDs. However, whereas JQ1 fits snugly into the Brd4-binding pocket, the fit with the CaBdf1-binding pockets is poor. In Brd4 the fused ring system of JQ1 is sandwiched between the 'WPF' shelf (Trp81, Pro82 and Phe83) and Leu residues 92 and 94, with the thiophene ring positioned within the 'ZA channel' defined by Trp81 and Leu92 (ref. 41). Replacement of Trp81 by a Val or Phe residue in CaBdf1 BD1 and BD2, respectively, widens the ZA channel, resulting in a poorer fit (black diamonds in Fig. 4c). Replacement of Brd4 residue Leu94 by a Val or Ile residue further contributes to the poor fit. In addition, the p-chlorophenyl group of JQ1 occupies a groove in Brd4, which is absent (BD1) or shallower (BD2) in CaBdf1 (asterisks in Fig. 4c). A similar lack of complementarity between the ligand and binding pocket explains the insensitivity of CaBdf1 BDs towards PFI-1, IBET-151 and bromosporine.

More generally, recognition of the four BETi compounds by human BET BDs involves 16 residues, including the eight signature residues previously used to classify human BD-binding sites<sup>42</sup> (Fig. 5). Five of these residues in BD1 and four in BD2 are invariant across human BET proteins but diverge in *Ca*Bdf1 (magenta arrows in Fig. 5), including the WPF-shelf Trp residue and the Leu residue opposite this shelf, at signature positions 1 and 3, respectively. Remarkably, nearly all of these residues have shorter side chains in *Ca*Bdf1 than in the human BET proteins, implying that selective *Ca*Bdf1 inhibition could conceivably be achieved via small molecules that clash sterically with the human, but not fungal, side chains. Interestingly, other pathogenic fungal Bdf1 sequences also diverge from human BET proteins at these residue positions, suggesting that selective chemical inhibition might also be feasible for these targets.

CaBdf1 BDs can be selectively targeted by small molecules. We next set out to identify small-molecule inhibitors that would target C. albicans Bdf1 BDs without inhibiting human BET BDs. We used our HTRF inhibition assay to screen a library of  $\sim$  80,000 chemically diverse compounds, resulting in several hundred hits for each BD (Fig. 6a). Dose-response curves measured for CaBdf1 and Brd4 BDs identified 125 and 44 compounds selective for the fungal BD1 and BD2, respectively. In particular, several compounds possessing a dibenzothiazepinone scaffold exhibited low-micromolar IC50 values towards CaBdf1 BD1 and no or only weak inhibition of Brd4 BD1 at the highest concentration (20 µM) tested. One such inhibitor was compound 1 (Fig. 6b). ITC measurements showed that 1 binds CaBdf1 BD1 with a  $K_d$  of 5  $\mu$ M, consistent with the IC<sub>50</sub> value (4.3  $\mu$ M) determined by HTRF, whereas no or only modest binding and inhibition were detected for Brd4 BD1 and CaBdf1 BD2 (Fig. 6c,d and Supplementary Table 1). Furthermore, a BROMOscan screen from DiscoverX revealed that compound 1 showed no significant activity against 32 representative human (BET and non-BET) BDs (Supplementary Fig. 4); indeed, an ITC experiment

# ARTICLE



**Figure 3** | *CaBdf1* BDs are resistant to BETi. (a) HTRF assay. A biotinylated tetra-acetylated histone H4 peptide is bound to streptavidin beads coupled to the donor fluorophore. A GST-tagged BD is bound by an anti-GST antibody coupled to the acceptor fluorophor. 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<sub>50</sub> values are listed below each graph. Data represent the mean and s.d. values from three independent experiments. (c) Representative ITC experiments measuring the binding of JQ1 to *CaBDF1* BDs (magenta) and to human Brd4 BD1 (green). The values indicated for  $K_d$  and N represent the mean and s.d. from three independent experiments. See also Supplementary Table 1. (d) BET inhibitors do not affect *C. albicans* growth, even when Bdf1 BD1 or BD2 is deleted. Inhibitors were tested at 10  $\mu$ M concentration. Experiments were performed in the presence of doxycyline to repress expression from the *pTetO*-BDF1 allele. Data represent the mean and s.d. values from three independent experiments.



**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 (left) and BD2 (right) 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.

confirmed that the two human BDs (SMARCA2 and SMARCA4) with the strongest BROMOscan response did not detectably bind compound **1** (Supplementary Fig. 5a). Compound **1** also exhibited low cytotoxicity towards HeLa and IMR90 (primary fibroblast) cells as measured in an MTT colorimetric assay  $(EC_{50} \ge 100 \,\mu\text{M};$  Supplementary Fig. 6).

To understand the molecular basis of selectivity we solved the crystal structure of *Ca*Bdf1 BD1 bound to 1. Compound 1 mimics the acetyllysine ligand by interacting with the conserved Tyr248 and Asn291 residues, forming direct and water-mediated hydrogen bonds via the thiazepinone carbonyl group (Fig. 6e–g). The dibenzothiazepinone ring system engages hydrophobic residues from the Val-Pro-Phe (VPF) shelf (Pro233), helix B (Phe290) and the ZZ' loop (Val238, Leu243 and Val245), while the cyclopropyl group interacts with the VPF shelf (Pro233 and Phe234), helix B (Cys287) and the gatekeeper residue on helix C (Ile297). In contrast, the oxadiazole and pyrazine groups point

away from the pocket, adopting different orientations in the four complexes present in the crystal's asymmetric unit (Supplementary Fig. 7). Superimposing the ligand-bound structure with that of Brd4 BD1 results in a steric overlap between the larger Brd4 side chains at signature positions 1 and 3 (Trp81 and Leu94) and the oxadiazole and distal benzene groups of compound 1, explaining why 1 fails to inhibit the human BD (Fig. 6f,h). Steric hindrance from the corresponding residues in *CaBdf1* BD2 (Phe409 and Ile422) also account for this domain's insensitivity to compound 1.

Similarly, we identified an imidazopyridine compound **2** (Fig. 7a), which inhibits *Ca*Bdf1 BD2 with high selectivity: HTRF and ITC assays yielded IC<sub>50</sub> and  $K_d$  values of 1.1 and 2.1  $\mu$ M, respectively, whereas human Brd4 BD2 and *Ca*Bdf1 BD1 were only weakly inhibited (IC<sub>50</sub>  $\geq$  40  $\mu$ M) (Fig. 7b,c and Supplementary Table 1). Moreover, no significant inhibition of any human BDs was observed for compound **2** by BROMOscan



**Figure 5** | **Structure-based sequence alignment of human and fungal BET proteins showing the ligand-binding region.** Residues highlighted in grey are conserved in at least three human BET sequences within each BD. The conserved Tyr and Asn residues involved in water-mediated and direct hydrogen bonds to the ligand are shown in inverse font. Human BET BD residues interacting with BETi compounds through direct or water-mediated hydrogen bonds or through van der Waals contacts are indicated by asterisks, arrowheads and green circles, respectively. Interactions are taken from the crystal structures of Brd4 BD1 bound to JQ1, IBET-762 or PFI-1 (PDB codes 3MXF, 3P5O and 4E96), from that of Brd2 BD1 bound to IBET-151 (PDB 4ALG), and from a structural alignment of Brd4 BD1 with human BRPF1 BD bound to bromosporine (PDB 4C7N). The signature residues used to classify human BD-binding sites are numbered 1-8 (ref. 42). Magenta arrows and boxes indicate BETi-contacting residues which are conserved in human BET proteins but differ in *CaBdf1* and other fungal sequences. Blue dots below the alignment indicate residues which are identical between BD1 and BD2 across human BET proteins or within *CaBdf1*.

profiling and by an ITC assay on the two most sensitive BDs identified by this screen (SMARCA2 and SMARCA4; Supplementary Figs 4 and 5b); while only mild cytotoxicity was observed towards mammalian cells (EC<sub>50</sub>  $\sim 60 \,\mu$ M; Supplementary Fig. 6). The crystal structure of CaBdf1 BD2 bound to 2 reveals that the compound forms a hydrogen bond via its amino group with the conserved Asn468 residue, as well as a cation-pi interaction involving the phenolic ring and the partial positive charge on Asn468 (Fig. 7d-f). However, unlike most BET inhibitors, a water-mediated hydrogen bond with Tyr425 is not observed for 2 (presumably because the ligand dislodges water molecule 1, consistent with the dislodgement of this water by a glycerol molecule in the unbound BD structure; Supplementary Fig. 3d). Instead, the compound's imidazolyl and hydroxyl groups form water-mediated hydrogen bonds with backbone atoms of the Phe-Pro-Phe (FPF) shelf (Pro410) and helix B (Val460). Replacement of the hydroxyl group in 2 by a hydrogen (2a) or fluorine (2b) atom severely reduces inhibitory activity, underscoring the importance of this group for high-affinity binding (Supplementary Fig. 8). The methylpyridinyl and phenolic groups are sandwiched between the FPF shelf and gatekeeper residue Val474 on one side, and residues Val415 and Leu420 on the other, while the tolyl group additionally contacts residues Ile422 and Phe467 (Fig. 7d-f). A structural alignment with Brd4 BD2

shows that larger Brd4 side chains at four of these contact positions, including signature positions 1,3 and 5 (Trp374, Leu387 and His437) and residue Tyr432 (Fig. 7e,g), reduces the volume available for compound 2, explaining the inability of 2 to inhibit the human BD. In contrast, the poor affinity for *Ca*Bdf1 BD1

is due to smaller side chains at signature positions 1 and 3 (Val232 and Val245), resulting in poor complementarity between the binding pocket and ligand. The above results establish proofof-principle that *Ca*Bdf1 BDs can be selectively targeted by small-molecule inhibitors *in vitro* without compromising the function of human BD-containing proteins.

A Bdf1 BD1 inhibitor phenocopies genetic inactivation of BD1. We next assessed the antifungal activity of compounds identified in our screen by evaluating their effect on *C. albicans* growth in liquid media. Not surprisingly, none of the compounds significantly inhibited growth of the WT strain, consistent with the fact that inactivating a single *Ca*Bdf1 BD only weakly affects growth (Fig. 2d,e) and that none of the compounds tested can individually inhibit both *Ca*Bdf1 BDs. Attempts to simultaneously inhibit both BDs by testing binary combinations of compounds also did not result in significant growth inhibition.

# ARTICLE



\*Steric clash

**Figure 6 | Identification of a selective CaBdf1 BD1 inhibitor.** (a) Screening strategy to identify selective CaBdf1 BD1 and BD2 inhibitors. Following the counter-screen step, most compounds yielded at least a 20-fold difference in IC<sub>50</sub> value relative to the human BD, although a few exhibited only a three- to fourfold difference. (b) Chemical structure of 1. (c) HTRF assays showing selective inhibition of CaBdf1 BD1 by 1. (d) Representative ITC experiments showing selective binding of 1 to CaBdf1 BD1. The values indicated for  $K_d$  and N represent the mean and s.d. from three independent experiments. See also Supplementary Table 1. (e) Crystal structure of CaBdf1 BD1 bound to 1. Upper inset. Simulated-annealing omit  $F_o$ - $F_c$  density for 1 contoured at  $3\sigma$ . Lower inset. Conserved water structure and hydrogen bonding interactions in the binding site. Residues interacting with 1 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. 70. (f) Alignment of CaBdf1 BD1 (violet) with Brd4 BD1 (green; PDB code 3UVW). Side chains are shown for CaBdf1 residues if divergent from CaBdf1. (g) Schematic summary of ligand interactions. Hydrogen bonds are shown as dashed lines. Residues mediating van der Waals contacts with 1 are indicated by labels within a cartouche. Water molecules are indicated in red. (h) Surface representation showing the binding pocket of CaBdf1 BD1 bound to compound 1 (top) and that of Brd4 BD1 (bottom) superimposed on the fungal complex. Asterisks indicate steric overlap between compound 1 and Brd4 BD1 residues.



**Figure 7 | 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. The values indicated for  $K_d$  and N represent the mean and s.d. from three independent experiments. See also Supplementary Table 1. (d) Crystal structure of CaBdf1 BD2 bound to **2**. Lower inset. Simulated-annealing omit  $F_0$ - $F_c$  density for **2** contoured at  $3\sigma$ . 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. 70. (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 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 (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.

We therefore tested individual compounds on mutant strains in which either BD1 or BD2 was inactivated. Most inhibitors, including compounds **1** and **2**, showed little antifungal activity against these strains. We speculate that the compounds failed to enter the fungal cell because of cellular permeability barriers<sup>37,38</sup>, or were extruded by efflux pumps<sup>39,40</sup> or metabolized before a



**Figure 8 | A CaBdf1 BD1 inhibitor phenocopies the effect of BD1 inactivation on** *C. albicans* **growth. (a)** Chemical structure of compound **3. (b)** HTRF assay showing that **3** inhibits CaBdf1 BD1 preferentially over CaBdf1 BD2 and with modest selectivity over Brd4 BD1. (c) Representative ITC experiments showing the binding of **3** towards the indicated BD. The values indicated for  $K_d$  and *N* represent the mean and s.d. from three independent experiments. See also Supplementary Table 1. (d) Crystal structure of CaBdf1 BD1 (violet) bound to **3** (*S* enantiomer) and alignment with CaBdf1 BD1 bound to **1** and with human Brd4 BD1 (green). Side chains are shown for CaBdf1 residues in contact with **3** and for the corresponding Brd4 residues if divergent from CaBdf1. Inset, simulated-annealing omit  $F_o$ - $F_c$  density for compound **3** contoured at  $3\sigma$ . (e) Compound **3** compromises the *in vitro* growth of *C. albicans* when CaBdf1 BD2 is inactivated by deletion or point mutation. Strains were grown in the presence of methionine/cysteine or Dox to repress expression of the WT allele from the *pMET* (top) or *pTetO* (bottom) promoter, respectively. Data represent mean and s.d. values from three independent experiments. \*\*\* $P \le 10^{-3}$ . *P* values were determined in a two-sided Welch *t*-test. (f) Dose-response experiments showing the effect of **3** on Bdf1 mutant strains. Met/Cys or doxycyline were added to repress expression from the *pMET* (top) or *pTetO* (bottom) promoter, respectively. Data represent mean and s.d. values from three independent experiments.

significant growth defect was detected. The most active compound was dibenzothiazepinone **3**, an analogue of **1** in which the cyclopropyl, oxadiazole and pyrazine groups are replaced by smaller methyl, carboxyamidyl and tetrahydrofuran groups, respectively (Fig. 8a). HTRF and ITC assays showed that **3** inhibits *Ca*Bdf1 BD1 with low-micromolar affinity and three- to fivefold selectivity relative to human Brd4 BD1 (Fig. 8b,c and Supplementary Table 1). The crystal structure of CaBdf1 BD1 bound to 3 shows that the compound is slightly rotated within the binding pocket compared to 1 (Fig. 8d). Consequently, in a structural alignment with Brd4 BD1, the steric hindrance observed for 1 due to the larger Trp81 and Leu94 side chains is largely relieved for compound 3, explaining the reduced selectivity of this compound. (Both enantiomers of 3 are equally active, consistent with the lack of interaction between the BD and the tetrahydrofuran ring; Supplementary Fig. 9). Liquid culture assays show that **3** has little effect on the growth of *C. albicans* strains expressing either WT Bdf1 or Bdf1 inactivated in BD1, but significantly inhibited the growth of strains inactivated in BD2 (Fig. 8e), consistent with the specificity of compound **3** for BD1. A dose–response curve revealed a cellular  $EC_{50}$  value of  $35 \pm 7 \,\mu$ M, corresponding to a 20-fold cell shift relative to the  $IC_{50}$  value determined by HTRF *in vitro* (or sevenfold relative to the  $K_d$  by ITC) (Fig. 8f). At this concentration, compound **3** showed relatively little cytotoxicity towards mammalian cells ( $EC_{50} > 100 \,\mu$ M; Supplementary Fig. 6). Taken together, these results demonstrate the feasibility of using a small-molecule inhibitor to antagonize *Ca*Bdf1 function in the fungal cell.

# Discussion

We have shown that C. albicans BDF1 deletion is lethal and that mutations abolishing BD-mediated ligand-binding activity severely compromise growth (Fig. 2c-e), validating BET BD inhibition as a potential antifungal strategy in C. albicans. Whereas the combined inactivation of both CaBdf1 BDs is lethal, that of a single BD leads to only a partial reduction in growth (Fig. 2d,e and Fig. 8e). This likely reflects functional redundancy between the two BDs, consistent with their similar binding profiles towards acetylated H4 tails (Fig. 1d,e). Growth inhibition appears slightly more pronounced on BD2 inactivation compared to that of BD1 (Fig. 2d,e). This contrasts with the finding that the selective inhibition of human BET BD2 in liver cancer cells induced only minor effects on transcriptional regulation<sup>43</sup> and that BD1 plays a more important role than BD2 in Brdt-mediated chromatin remodelling<sup>44</sup>, in recruiting Brd3 to acetylated sites on GATA1 (ref. 45), and in chromatin binding by Brd4 (ref. 46). This discrepancy may partly reflect differences between human and C. albicans BET BD selectivity towards acetylated histone peptides, as well as different histone acetylation patterns in these species.

Because *C. albicans* strains inactivated in only one Bdf1 BD remain viable, a chemotherapeutic strategy targeting *Ca*Bdf1 would likely require the inhibition of both BDs to be effective. Such inhibition could be achieved via a single compound, which targets both BDs or through the combined use of two compounds, supplied independently or covalently linked as a bivalent BD inhibitor. Indeed, dual-warhead BET inhibitors that simultaneously engage both BDs within a single BET protein have recently been described, which possess greatly enhanced biochemical and cellular potency as well as increased efficacy in animal disease models relative to monovalent inhibitors<sup>47-49</sup>. Alternatively, one could envisage a Proteolysis Targeting Chimera approach, whereby a single BD inhibitor conjugated to a ligand for an E3 ubiquitin ligase would trigger the degradation of *Ca*Bdf1, as recently demonstrated for human BET proteins<sup>50-53</sup>.

Compounds 1 and 2 target *CaB*df1 BD1 and BD2, respectively, with low-micromolar affinity, yet do not significantly inhibit human BET or non-BET BDs, demonstrating that small-molecule inhibition of *CaB*df1 BDs can be achieved with high selectivity. The selectivity of 1 and 2 for *CaB*df1 results from steric incompatibility with bulkier side chains in the human BET BD-binding pockets, particularly at signature positions 1 and 3. Remarkably, all 169 *CaB*df1-selective hits identified in our screen target either *CaB*df1 BD1 or BD2, but not both, in contrast with many BETi compounds, which inhibit both BD1 and BD2 in human BET proteins. A likely explanation is that, whereas residues at signature positions 1 and 3 are conserved between human BET BD1 and BD2, they diverge between *CaB*df1 BD1

and BD2, facilitating the identification of CaBdf1 inhibitors with single BD selectivity (Supplementary Fig. 10). Nevertheless, an inhibitor that targets both CaBdf1 BDs without inhibiting human BET BDs is in principle achievable, because the WPF-shelf Trp residue at signature position 3 in human BET BDs is bulkier than the corresponding (Val and Phe) residues in both CaBdf1 BD1 and BD2. For example, medicinal chemistry optimization of compound **2** could conceivably yield an analogue that would inhibit both CaBdf1 BD1 and BD2 without losing selectivity against human BET BDs.

Our chemical screen identified a dibenzothiazepinone compound, 3, that selectively inhibited CaBdf1 BD1 and displayed antifungal activity against susceptible strains. Although we were unable to obtain biochemical evidence for a direct interaction between 3 and Bdf1 in C. albicans cells, the different susceptibility of Bdf1 mutant strains provides compelling evidence that Bdf1 BD1 is the intracellular target (Fig. 8e,f). Specifically, strains expressing Bdf1 mutants in which BD1 was the lone functional BD (mutants bdf1-bd2 $\Delta$  and bdf1-Y425F) were sensitive to 3, consistent with this compound's selectivity for CaBdf1 BD1, whereas all other strains with a functional BD2 were insensitive, arguing strongly against a potential off-target effect. Strikingly, compound 1 did not significantly inhibit growth, despite being an analogue of 3 with nearly identical binding affinity for CaBdf1 BD1. This makes the dibenzothiazepinone an attractive scaffold for structure-activity relationship studies, as these may reveal the molecular determinants of a compound's ability to reach its intracellular target and thereby lead to analogues with improved cellular potency.

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

## Methods

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

Protein expression and purification. Proteins used for crystallization and for ITC. DNA fragments encoding CaBdf1 BD1 (residues 193-327) or BD2 (residues 386-491) and human Brd4 BD1 (residues 22-204) were PCR amplified from genomic or cDNA libraries and cloned into a pETM11 vector as fusion constructs bearing an N-terminal His tag followed by a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site. (Primer sequences are listed in Supplementary Table 4.) Transformed E. coli strain BL21(DE3) (New England Biolabs, ref. C2527I) cells were grown in LB medium containing kanamycin (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) at 37 °C until reaching an OD<sub>600</sub> of 1, induced with 0.5 mM IPTG and further incubated at 16 °C for 12-20 h before collecting. Cells were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 25 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoethanol and protease inhibitors) and lysed by sonication. The cleared lysate was incubated with Ni-NTA resin (Qiagen) and washed with buffer A containing 0.5 M NaCl. Proteins were eluted with 250 mM imidazole, dialysed overnight in the presence of His-tagged TEV protease against buffer A containing no imidazole and incubated with Ni-NTA resin to remove His-tagged species. Proteins were further purified on a Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) column in 50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT). Proteins were concentrated to > 20 mg ml<sup>-1</sup> on a Centricon device (Millipore) and used for ITC, TSA and crystallization experiments. Human SMARCA2 and SMARCA4 BD plasmids bearing an N-terminal His tag and TEV protease site were purchased from Addgene (plasmid no. 73250 and 74664, respectively). Expression and purification were performed as above, except that buffer A was replaced by buffer B (50 mM Hepes pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole and protease inhibitors) and gel filtration was performed in 10 mM Hepes pH 7.5, 500 mM NaCl and 5% glycerol.

Proteins used for HTRF assays. GST-tagged human Brd4 BD2 (residues 349-460) was purchased from Reaction Biology Corp. Human Brd4 BD1 (residues

22–204) and *Ca*Bdf1 BD1 (residues 193–327) and BD2 (residues 361–501) were cloned into a pGEX4t1 vector as GST-tagged fusion proteins. Expression in *E. coli* strain BL21(DE3) cells was performed as for His-tagged constructs. Collected cells resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and protease inhibitors were lysed by sonication. The clarified lysate was incubated with glutathione sepharose (GE Healthcare) and then washed with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl and 1% NP-40. Proteins were eluted with 10 mM glutathione and further purified on a Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) column in 50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT.

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

Histone peptide arrays were obtained from Active Motif (ref. 13005) and used in accordance with the supplier's recommendations. In short, arrays were blocked and incubated with 1  $\mu$ M of purified *CaB*df1 BD1 or BD2. Arrays were incubated with recombinant BDs for 2 h at 4 °C in binding buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NP-40 0.1%, NaCl 150 mM, glycerol 10%). They were then washed in the same buffer and binding detected by a standard western blot procedure using an anti-GST antibody (Dutscher, ref. 27-4577-01). An antibody directed against a spotted c-myc peptide (supplied with the MODified Array Labeling Kit (Active Motif, ref. 13006) and used following the manufacturers' instructions at 1/2,000 dilution) was used as a positive control and its signal intensity was used for normalization. Assays were performed in duplicate. Images were acquired on a Bio-Rad ChemiDoc XRS Imaging machine and data were quantified using the array analyser software provided by Active Motif. The results of the quantification are summarized in Supplementary Data 1.

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

HTRF assay. Biotinylated and non-biotinylated tetra-acetylated H4 peptides (H4K5acK8acK12acK16ac; denoted H4ac4) were synthetized by Covalab (Villeurbanne, France). HTRF reagents and buffers were purchased from Cisbio Bioassays and the assay performed according to the manufacturer's instructions. Specifically, the assay used a terbium(III) cryptate donor reagent conjugated to an anti-GST antibody (MAb anti-GST-Tb; ref. 61GSTTLA), a streptavidin-conjugated acceptor reagent (streptavidin-d2; ref. 610SADLA) and Cisbio proprietary buffers (EPIgeneous Binding Domain Diluent and Detection buffer; refs. 62DLBDDF and 62DB2FDG, respectively). Incubation with GST-tagged BDs and biotinylated H4ac4 brings the donor and acceptor into close proximity and allows FRET. The non-biotinylated H4ac4 peptide competes for binding and was used as a positive control for inhibition. GST-tagged proteins in 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT were assayed at 5 nM final concentration. Biotinylated H4ac4 peptides were used at a final concentration of 50, 600, 300 or 400 nM in assays involving Brd4 BD1, Brd4 BD2, CaBdf1 BD1 and CaBdf1 BD2, respectively. The antibody-conjugated donor was used at 0.5 nM and the streptavidin-conjugated acceptor was used at 1/8 of the H4ac4 peptide concentration. Inhibitors were tested by performing a nine-point dilution series with a maximal final concentration of 10  $\mu M$  (JQ1, IBET-151, PFI-1, bromosporine), 20  $\mu M$  (1,3) or 40  $\mu M$  (2). These concentrations allowed the DMSO concentration to remain below the limit (1% for CaBdf1 BD1 and Brd4 BD1, and 0.4% for CaBdf1 BD2 and Brd4 BD2) that allowed the assay to maintain a Z' factor<sup>54</sup>  $\geq$  0.8. Components were incubated at room temperature for 1 h (CaBdf1 BD1 and Brd4 BD1) or at 4 °C for 6-24 h (CaBdf1 BD2 and Brd4 BD2). Experiments were performed in 384-well white plates (Greiner 781080) in a volume of 20 µl and analysed in a ClarioStar plate reader (BMG LABTECH). Excitation was at 330 nm and emission intensities were measured at 620 and 665 nm (corresponding to the donor and acceptor emission peaks, respectively; the 665/620 ratio is used to calculate the specific HTRF signal) with an integration delay of 60 µs and an integration time of 400 µs.

**High-throughput chemical screening.** The HTRF assay described above was miniaturized for performance in a 5 µl reaction volume in 1,536-well black plates. Approximately 80,000 compounds comprising the soluble diversity (ChemDiv), targeted diversity (ChemDiv) and 30 K diversity (LifeChem) collections were dispensed into wells by an Echo acoustic liquid dispenser. A master mix comprising MAb anti-GST-Tb donor, streptavidin-d2 acceptor, GST-tagged BD protein, biotinylated H4ac4 peptide was then added and the plates incubated for 6–24 h prior to reading. The primary screen was performed with compounds at a final concentration of 20  $\mu$ M (*CaB*df1 BD1) or 8  $\mu$ M (*CaB*df1 BD2), corresponding to a final DMSO concentration of 1% and 0.4%, respectively. Hits were initially confirmed by repeating the assay at a single concentration in triplicate, and subsequently by dose-response curves constructed using eight-point dilutions between 0 and 20 (or 8)  $\mu$ M.

BROMOscan profiling. BROMOscan profiling was performed by DiscoverX (Fremont, CA, USA). T7 phage strains displaying BDs were grown in parallel 24-well blocks in an E. coli host derived from the BL21 strain as described<sup>55</sup>. E. coli were grown to log-phase and infected with T7 phage from a frozen stock (multiplicity of infection = 0.4) and incubated with shaking at 32 °C until lysis (90–150 min). The lysates were centrifuged (5,000g) and filtered (0.2  $\mu$ m) to remove cell debris. Streptavidin-coated magnetic beads were treated with biotinylated small molecule or acetylated peptide ligands for 30 min at room temperature to generate affinity resins for BD assays. Ligand-loading densities were optimized as described<sup>56</sup>. The liganded beads were blocked with excess biotin and washed with blocking buffer (SeaBlock (Pierce), 1% BSA, 0.05% Tween 20, 1 mM DTT) to remove unbound ligand and to reduce non-specific phage binding. Binding reactions were assembled by combining BDs, liganded affinity beads and test compounds in 1 × binding buffer (16% SeaBlock, 0.32 × PBS, 0.02% BSA 0.04% Tween 20, 7.9 mM DTT). Test compounds were prepared as  $1,000 \times$  stocks in 100% DMSO and subsequently diluted 1:25 in monoethylene glycol. The compounds were then diluted directly into the assays such that the final concentrations of DMSO and monoethylene glycol were 0.1% and 2.4%, respectively. All reactions were performed in polypropylene 384-well plates in a final volume of 20 µl. The assay plates were incubated at room temperature with shaking for 1 h and the affinity beads were washed with wash buffer (1  $\times$  PBS, 0.05% Tween 20). The beads were then resuspended in elution buffer (1  $\times$  PBS, 0.05% Tween 20, 2 µM non-biotinylated affinity ligand) and incubated at room temperature with shaking for 30 min. The BD concentration in the eluates was determined by qPCR. Compounds 1 and 2 were screened at 10 µM concentration in duplicate. DMSO was used as a negative control and a small-molecule or peptide ligand specific for each BD in the screen was used as a positive control. Results are reported as percent control, where lower values indicate stronger inhibition. Percent control was calculated as  $100 \times (t-p)/(n-p)$ , where t is the test compound signal and p and n are the positive and negative control signals, respectively.

Crystallization and crystal structure determination. Initial crystallization conditions were identified by the sitting drop vapour diffusion method at 4 °C using a Cartesian PixSys 4200 crystallization robot at the high-throughput crystallization laboratory of the EMBL Grenoble Outstation (https://htxlab.embl.fr). Crystals used for data collection were obtained by the hanging drop method at 4 °C by mixing 1 µl of the protein or protein/inhibitor sample with 1 µl of the reservoir solution, as follows. Unbound *CaB*df1 BD1 (40 mg ml<sup>-1</sup>) was mixed with 0.2 M ammonium iodide (pH 6.5) and 26% (w/v) PEG 3350. Unbound CaBdf1 BD2 (40 mg mlwas mixed with 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) and 1 M ammonium phosphate. CaBdf1 BD1 bound to compound 1 was crystallized by mixing a solution of 20 mg ml protein and 0.4 mM inhibitor with 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 23% (w/v) PEG MME 2000 and 10 mM NiCl<sub>2</sub>. CaBdf1 BD1 bound to compound 3 was crystallized by mixing a solution of 25 mg ml  $^{-1}$  protein and 1.5 mM inhibitor with 0.1 M sodium acetate (pH 4.6) and 2.4 M ammonium sulfate. CaBdf1 BD2 bound to compound 2 was crystallized by mixing a solution of 22 mg ml<sup>-1</sup> protein and 1.5 mM inhibitor with 0.1 M sodium acetate (pH 4.6) and 25% (w/v) PEG 3000. Crystals were flashcooled in liquid nitrogen after being transferred into the well solution supplemented with the following cryo-protectants: unbound CaBdf1 BD1, unbound CaBdf1 BD2 and CaBdf1 BD1 bound to 1, 30% (v/v) glycerol; CaBdf1 BD1 bound to 3(S), 3.2 M ammonium sulfate; CaBdf1 BD2 bound to 2, 25% (v/v) glycerol.

Diffraction data were collected at beamlines of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), as indicated in Supplementary Table 2. Data collected on MarMOSAIC (ID23-2), Pilatus 6M (ID29) and Pilatus3 2M (ID30A-1) detectors were processed using X-ray Detector Software (XDS)<sup>57</sup> and programmes of the CCP4 suite<sup>58</sup>. Structures were solved by molecular replacement using Phaser<sup>59</sup>. Structures 2OSS and 2OUO (human Brd4 BD1 and BD2, respectively) were used as search models to solve the structures of *CaB*df1 BD1 and BD2, respectively. Initial solutions were improved by automated protein chain tracing with ARP/WARP<sup>60</sup>, followed by further manual building using Coot<sup>61</sup>. Inhibitor coordinates and .cif restraints files were generated using the Cactus online SMILES translator (https://cactus.nci.nih.gov/translate/) and JLigand<sup>62</sup>, respectively. Structures were refined with Phenix<sup>63</sup> and validated using MolProbity<sup>64</sup> and the built-in tools in Coot. Examples of final 2F<sub>0</sub>-F<sub>c</sub> electron density are provided in Supplementary Figs 11 and 12. Data collection and refinement statistics are summarized in Supplementary Table 2.

Cytotoxicity assays on human cells. Proliferation of human cells was assessed using an MTT colorimetric assay (Cell Proliferation Kit I, Roche). HeLa (epithelial cells, ATCC number CCL-2) and IMR90 (primary fibroblasts cells, ATCC number CCL-186) cells were cultured in humidified atmosphere (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>) in DMEM medium containing 10% heat inactivated foetal calf serum and 2 mM glutamine. Cells were seeded at a concentration of 5,000 HeLa cells per well or 15,000 IMR90 cells per well in 100 µl culture medium containing the test compound (compounds 1,2,3, amphotericin B or fluconazole) into 96 wells microplates (Falcon ref. 353072). Plates were incubated at 37 °C and 5% CO2 for 28 h before adding 10 µl of MTT labelling reagent (final concentration 0.5 mg ml  $^{-1}$ ) to each well. After incubating for a further 4 h, 100 µl of the solubilization solution were added in each well. Plates were allowed to stand overnight in the incubator before measuring the spectrophotometrical absorbance at 570 nm and at the reference wavelength of 690 nm in a ClarioStar plate reader. The values of A570 nm-A690 nm were normalized relative to that obtained with vehicle (0.2% DMSO) and plotted against compound concentration.

Generation of C. albicans mutant strains. Plasmids used in this study to incorporate different mutations into the BDF1 gene are listed in Supplementary Table 5. All DNA fragments were fused in a pCR2.1-TOPO vector using a Gibson assembly kit (New England Biolabs) and validated by sequencing. The pMET3 promoter sequence was recycled from the plasmid pFA-ARG4-MET3p (ref. 65). The pTetO cassette (Fig. 2a) was generated by assembling the following fragments with the Gibson assembly kit (New England Biolabs) in a pCR2.1-TOPO vector: (i) ARG4 gene from the plasmid pFA-ARG4-MET3p (ref. 65); (ii) a Tet-dependenttransactivation protein (TetR-VP16) obtained by gene synthesis with corrections for the genetic code of the CTU clade (Thermo), flanked by the promoter (500 bp) and terminator (500 bp) of the C. albicans TDH3 gene; (iii) the repressible Tet-operator (pTetO) from the plasmid pCM184 (ref. 66). In this study, ~ 500 bp homologous regions were used to integrate the pTet cassette upstream of the BDF1 ORF. The BDF1 point mutant cassettes were obtained using the QuikChange sitedirected kit (Agilent) with the BDF1 plasmid pJG214 or pJG215. All cassettes were obtained by digesting 4 µg of the pCR2.1-TOPO plasmids and were transformed in C. albicans by a lithium acetate procedure, as previously described<sup>67</sup>. Mutations introduced in the BDF1 gene in C. albicans were confirmed by PCR, sequencing of the mutated region in the genomic DNA and western blot. C. albicans strains used in this study are listed in Supplementary Table 6.

**Growth assays.** Growth on solid media. C. albicans strains were grown in SC media to an OD<sub>600</sub> of 0.5–0.8, pelleted and resuspended in sterile water at a final OD<sub>600</sub> of 0.13. Cells were spotted on solid media in a threefold dilution series starting at an OD<sub>600</sub> of 0.13. Plates were incubated at 30 °C for 1 day before imaging. Stress resistance was tested using the following conditions:  $H_2O_2$  (4.5 and 6 mM), methylmethanesulfonate (0.005 and 0.02%), hydroxyurea (10 mM), nictinamide (0.5, 1, and 4 mM), caffeine (15 mM), sorbitol (1, 1.5 and 2 M), Congo red (50 µg ml<sup>-1</sup>), calcofluor white (20 µM), SDS (0.04%) and heat shock at 42 °C.

Growth on liquid media. C. albicans strains were grown at 30 °C in SC medium to an OD<sub>600</sub> of 0.5–0.8. For the evaluation of growth defects related to Bdf1 mutations, log-phase growing cells were counted using a Neubauer chamber and diluted in liquid media to a final concentration of 5,400 cells per ml per well in a sterile 96-well plate. Dox ( $50 \,\mu g \,ml^{-1}$ ) or methionine ( $5 \,mM$ )/cysteine (0.25 mM) were added to the media if required. Plates were incubated at 30 °C and OD<sub>600</sub> was measured using a Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Fisher). For the evaluation of chemical compounds, strains were grown in SC medium supplemented with  $50 \,\mu g \,ml^{-1}$  Dox or 5 mM methionine/0.25 mM cysteine 24 h before counting and then seeded in 96-well plates at the same concentration as mentioned above, with or without chemical compounds. Statistical tests were performed using two-sided Welch *t*-tests.

**Analysis of whole-cell extracts and antibodies.** *C. albicans* strains were grown at 30 °C in SC media to an  $OD_{600}$  of 0.5–0.8. Cells were lysed in FastprepTM (MPBiologicals) twice at 6.5 m s<sup>-1</sup> for 1 min with intermediate incubation on ice. Histone H4 antibody was purchased from Active Motif (ref. 39269) and the *CaBd*f1 antibody was developed in house using a full-length recombinant protein injected in rabbits (Covalab).

**Mouse experiments.** A mouse model of hematogenously disseminated candidiasis was used, as approved by the French National Animal Experimentation Ethics Committee (reference B385161006) under the file reference 2015042015338706 v4 (AFAPIS#644). *Candida* strains were inoculated from an overnight subculture in liquid yeast extract peptone dextrose (YPD). In each condition, six female BALB/c mice (8 weeks old) were injected in the lateral caudal vein with  $2 \times 10^5$  cells of a *C. albicans* suspension. If necessary, Dox repression was added to the drinking water starting at 48 h before the injection until the day of killing. To limit severity and duration of pain, a pilot experiment established an end point 7 days post infection, when the virulence of each strain was assessed by kidney fungal burden evaluation, as described before<sup>68,69</sup>. Briefly, mice were killed, left kidneys were removed aseptically and weighed, and homogenized suspensions were cultured to evaluate colony-forming units (CFU). The final results were expressed as log CFUs per gram

of tissue and statistically tested using two-sided Wilcoxon rank sum tests with continuity correction.

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

**Data availability.** Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession codes 5N15 (unbound *CaBdf1 BD1*), 5N16 (*CaBdf1 BD1* bound to 1), 5N17 (*CaBdf1 BD1* bound to 3), 5N13 (unbound *CaBdf1 BD2*) and 5N18 (*CaBdf1 BD2* bound to 2). The authors declare that all other data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files, or from the corresponding authors on request.

### References

- Brown, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. Sci. Transl. Med. 4, 165rv113 (2012).
- Moran, C., Grussemeyer, C. A., Spalding, J. R., Benjamin, Jr D. K. & Reed, S. D. Candida albicans and non-albicans bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr. Infect. Dis. J* 28, 433–435 (2009).
- Arendrup, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. Curr. Opin. Crit. Care 16, 445–452 (2010).
- 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.* 40, 1241–1255 (2014).
- Denning, D. W. & Bromley, M. J. Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science* 347, 1414–1416 (2015).
- Sanglard, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. Front. Med. 3, 11 (2016).
- Hnisz, D., Tscherner, M. & Kuchler, K. Targeting chromatin in fungal pathogens as a novel therapeutic strategy: histone modification gets infectious. *Epigenomics* 3, 129–132 (2011).
- Garnaud, C., Champleboux, M., Maubon, D., Cornet, M. & Govin, J. Histone deacetylases and their inhibition in *Candida* species. *Front. Microbiol.* 7, 1238 (2016).
- 9. Kmetzsch, L. Histone deacetylases: targets for antifungal drug development. *Virulence* **6**, 535–536 (2015).
- 10. Wurtele, H. *et al.* Modulation of histone H3 lysine 56 acetylation as an antifungal therapeutic strategy. *Nat. Med.* **16**, 774–780 (2010).
- 11. Nishikawa, J. L. *et al.* Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator-mediator interaction. *Nature* **530**, 485–489 (2016).
- Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. Nat. Rev. Drug Discov. 13, 337–356 (2014).
- 13. Moriniere, J. *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**, 664–668 (2009).
- 14. Filippakopoulos, P. et al. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. Cell 149, 214–231 (2012).
- Nicodeme, E. et al. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. Nature 468, 1119–1123 (2010).
- Filippakopoulos, P. et al. Selective inhibition of BET bromodomains. Nature 468, 1067–1073 (2010).
- 17. Schaefer, U. Pharmacological inhibition of bromodomain-containing proteins in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**:a018671, 1–4 (2014).
- Brand, M. et al. Small molecule inhibitors of bromodomain-acetyl-lysine interactions. ACS Chem. Biol. 10, 22–39 (2015).
- 19. Wang, C. Y. & Filippakopoulos, P. Beating the odds: BETs in disease. *Trends Biochem. Sci.* 40, 468-479 (2015).
- Ferri, E., Petosa, C. & McKenna, C. E. Bromodomains: structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 106, 1–18 (2016).
- Romero, F. A. et al. Disrupting acetyl-lysine recognition: progress in the development of bromodomain inhibitors. J. Med. Chem. 59, 1271–1298 (2016).
- 22. Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R. & Tjian, R. Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol. Cell* **11**, 365–376 (2003).
- Matangkasombut, O. & Buratowski, S. Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol. Cell* 11, 353–363 (2003).
- 24. Garcia-Oliver, E. *et al.* Bdf1 bromodomains are essential for meiosis and the expression of meiotic-specific genes. *PLoS Genet.* **13**, e1006541 (2017).
- Matangkasombut, O., Buratowski, R. M., Swilling, N. W. & Buratowski, S. Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev.* 14, 951–962 (2000).
- Krogan, N. J. et al. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. Mol. Cell 12, 1565–1576 (2003).

- Mizuguchi, G. *et al.* ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343–348 (2004).
- Govin, J. et al. Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. Genes Dev. 24, 1772–1786 (2010).
- 29. Fu, J. et al. The yeast BDF1 regulates endocytosis via LSP1 under salt stress. Curr. Microbiol. **70**, 671–678 (2015).
- Liu, X. *et al.* Genetic and comparative transcriptome analysis of bromodomain factor 1 in the salt stress response of *Saccharomyces cerevisiae. Curr. Microbiol.* 54, 325–330 (2007).
- Durant, M. & Pugh, B. F. NuA4-directed chromatin transactions throughout the Saccharomyces cerevisiae genome. Mol. Cell Biol. 27, 5327–5335 (2007).
- Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N. & Regev, A. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature* 449, 54–61 (2007).
- 33. Roemer, T. *et al.* Large-scale essential gene identification in Candida albicans and applications to antifungal drug discovery. *Mol. Microbiol.* **50**, 167–181 (2003).
- 34. Xu, Q. R. et al. Molecular genetic techniques for gene manipulation in *Candida* albicans. Virulence 5, 507–520 (2014).
- Dawson, M. A. *et al.* Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature* 478, 529–533 (2011).
- 36. Fish, P. V. *et al.* Identification of a chemical probe for bromo and extra C-terminal bromodomain inhibition through optimization of a fragmentderived hit. *J. Med. Chem.* 55, 9831–9837 (2012).
- Douglas, L. M. & Konopka, J. B. Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans. J. Microbiol.* 54, 178–191 (2016).
- Francois, J. M. Cell surface interference with plasma membrane and transport processes in yeasts. Adv. Exp. Med. Biol. 892, 11–31 (2016).
- Prasad, R., Rawal, M. K. & Shah, A. H. Candida efflux ATPases and antiporters in clinical drug resistance. Adv. Exp. Med. Biol. 892, 351–376 (2016).
- Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D. & Perlin, D. S. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, a019752 (2014).
- 41. Chung, C. W. et al. Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET family bromodomains. J. Med. Chem. 54, 3827–3838 (2011).
- 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).
- Picaud, S. et al. RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. Proc. Natl Acad. Sci. USA 110, 19754–19759 (2013).
- Pivot-Pajot, C. *et al.* Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell Biol.* 23, 5354–5365 (2003).
- 45. Lamonica, J. M. et al. Bromodomain protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to promote its chromatin occupancy at erythroid target genes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 108, E159–E168 (2011).
- Baud, M. G. *et al.* Chemical biology. A bump-and-hole approach to engineer controlled selectivity of BET bromodomain chemical probes. *Science* 346, 638–641 (2014).
- 47. Tanaka, M. et al. Design and characterization of bivalent BET inhibitors. Nat. Chem. Biol. 12, 1089–1096 (2016).
- Waring, M. J. et al. Potent and selective bivalent inhibitors of BET bromodomains. Nat. Chem. Biol. 12, 1097–1104 (2016).
- Rhyasen, G. W. et al. AZD5153: a novel bivalent BET bromodomain inhibitor highly active against hematologic malignancies. *Mol. Cancer Ther.* 15, 2563–2574 (2016).
- Winter, G. E. et al. Drug development. Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation. Science 348, 1376–1381 (2015).
- Lu, J. et al. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4. Chem. Biol. 22, 755–763 (2015).
- Zengerle, M., Chan, K. H. & Ciulli, A. Selective small molecule induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4. ACS Chem. Biol. 10, 1770–1777 (2015).
- Raina, K. *et al.* PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, 7124–7129 (2016).
- Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen* 4, 67–73 (1999).
- Fabian, M. A. et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. Nat. Biotechnol. 23, 329–336 (2005).
- Wodicka, L. M. *et al.* Activation state-dependent binding of small molecule kinase inhibitors: structural insights from biochemistry. *Chem. Biol.* 17, 1241–1249 (2010).
- 57. Kabsch, W. Xds. Acta Crystallogr. D 66, 125-132 (2010).
- Winn, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr. D 67, 235–242 (2011).
- McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40, 658–674 (2007).

- Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* 3, 1171–1179 (2008).
- Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D 60, 2126–2132 (2004).
- Lebedev, A. A. et al. JLigand: a graphical tool for the CCP4 template-restraint library. Acta Crystallogr. D 68, 431–440 (2012).
- Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr. D 66, 213–221 (2010).
- Chen, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallogr. D 66, 12–21 (2010).
- 65. Gola, S., Martin, R., Walther, A., Dunkler, A. & Wendland, J. New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast* **20**, 1339–1347 (2003).
- 66. Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* 13, 837–848 (1997).
- 67. Walther, A. & Wendland, J. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans. Curr. Genet.* **42**, 339–343 (2003).
- Spellberg, B., Ibrahim, A. S., Edwards, Jr J. E. & Filler, S. G. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. J. Infect. Dis. 192, 336–343 (2005).
- 69. LaFayette, S. L. *et al.* PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog.* **6**, e1001069 (2010).
- Flynn, E. M. et al. A subset of human bromodomains recognizes butyryllysine and crotonyllysine histone peptide modifications. Structure 23, 1801–1814 (2015).

### Acknowledgements

This work used the platforms of the Grenoble Instruct Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities and thank EMBL and ESRF staff for assistance at beamlines ID23-2, ID29 and ID30A-1, particularly M. Bowler and D. de Sanctis. We thank Myriam Ferro and Christophe Bruley for their general support, Sandrine Miesch-Fremy and Marie Arlotto for technical support, Joanna Timmins for access to and help with the CLARIOstar plate reader, Inah Kang for administrative support and EDyP team members for scientific discussions. This work was supported by grants from the FACE foundation (Partner University Fund to C.E.M. and C.P.), the National Institutes of Health (1R21AI113704 to C.E.M.), the Agence Nationale de Recherche (ANR-14-CE16-0027-01 (FungiBET) to C.P., J.G. and M.Co.; ANR-11-PDOC-011-01 (EpiGam) to J.G.; ANR-10-INBS-08 (ProFI) to J.G.; ANR-10-LABX-62-IBEID to C.D.), the EU FP7 Marie Curie Action (Career Integration Grant 304003 to J.G.) as well as by the USC Dornsife College of Letters, Arts and Sciences (E.F. and C.E.M.), a Chateaubriand Fellowship (E.F.) and a FINOVI fellowship from the Région Rhône Alpes, France (M.Cham.).

### **Author contributions**

F.M., C.E.M., J.G. and C.P. conceived and designed the study. F.M., E.F., M.Cham., N.Z., D.M., Y.Z., M.Ha., D.S., C.G., M.Cou., M.Chau, C.D., B.A.K., M.Hu., M.Cor., J.G. and C.P. performed experiments and analysed data. C.E.M., J.G. and C.P. wrote the manuscript. All authors discussed results and commented on the manuscript.

### Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/ naturecommunications

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at http://npg.nature.com/ reprintsandpermissions/

How to cite this article: Mietton, F. et al. Selective BET bromodomain inhibition as an antifungal therapeutic strategy. *Nat. Commun.* **8**, 15482 doi: 10.1038/ncomms15482 (2017).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017



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)<sup>1</sup>. The closeup view shows the superposition with Brd4-BD1 bound to JQ1 (PDB ID 3MXF)<sup>2</sup>. 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.** *Ca*Bdf1 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 fluorophor. Peptide binding by the BD results in FRET. The addition of a BETi reduces FRET. (b) HTRF assays performed on BDs from *Ca*Bdf1 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<sub>50</sub> 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 *Ca*BDF1 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  $\mu$ M concentration. Experiments were performed in the presence of doxycyline to repress expression from the *pTetO*-BDF1 allele. Data represent the mean and s.d. values from three independent experiments from three independent experiments.



Supplementary Figure 4. Structural basis of BETi resistance by *Ca*Bdf1 BD1 and BD2. (a) Alignment of BD1 (left) and BD2 (right) structures from human Brd4 (green; PDB codes 3MXF and 2OUO) and *Ca*Bdf1 (magenta). For clarity, the 18 and 20 N-terminal residues preceding helix  $\alpha$ Z are omitted from the Brd4 BD1 and *Ca*Bdf1 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 *Ca*Bdf1. 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 *Ca*Bdf1 BD1 and BD2 with that of Brd4 BD1. JQ1 was superimposed on the *Ca*Bdf1 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 *Ca*Bdf1 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 *Ca*Bdf1 BD2 are shown in cyan. Conserved water molecules are numbered as in ref.<sup>3</sup>. Water molecule 1 is missing from *Ca*Bdf1 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.

		Signa	ature res.	1			2	3				4	567	8	•	VdW contact
		Brom	osporine		*		•	•	•		•	•*	•		*	H-bond
		PFI-1				•			•		•	•*		•	-	
		IBET-	-151		•	•		•	•		•	•*			1.	H bond
		JQ1,	IBET-762			•	•	•	V		•	•*		•	¥	Divergent
BD1			αZ	¥				¥	αZ'	30 res	αΒ	+	++	αC		
	Brd4	75	WKHQ	FAWP	FOC	PVDA	VKL	LPD	YKII	++	MFTNCY	IY	REGDDI	ZLMA	EAL	153
Human	Brd3	51	WKHQ-	FAWPI	Ϋ́́	PVDA	IKL	LPD	THKII		MFTNCY	IYN	PTDDI	TIMA	OAL	129
BET	Brd2	91	WKHQ-	FAWPI	TRC	PVDA	VKL	LPD	HKII		MFTNCY	IYN	(PTDDI	TIMA	OTL	169
DET	Brdt	44	WKHS-	-FSWPI	OF	PVDA	VKL	LPD	YTTI		MESNCY	LYNE	REGDDIV	AMIN	OAL	124
i	C. albicans	226	KRNR-	-EAVPI	FLH	PVDT	VKL	VPF	YNYI		MVKNCK	KFNO	SEAAGIS	SKMA	TNI	304
	S. cerevisiae	165	KRLK-	-DARPI	TLC	PVDP	VKL	I PF	FNYI		MVNNSI	KFNO	FINAGIS	SQMA	RNI	243
Fundal	C. glabrata	152	KRLK-	-DARPI	TLC	PVDP	VAL	IPI	YFNFI		MVENSA	KFNO	FTAVI	r <b>om</b> gi	RNI	230
Bdf1	A. fumigatus	296	KRMN-	-DARF	(RE	PVDP	IKM	IPH	PQII		MVQNAV	TFNO	PDHLV:	SQEG.	LK <b>L</b>	374
	H. capsulatum	294	KRVH-	-DSRF1	RE	PVDP	VKL	VI PN	YPLII		MVDNSV	TENO	FEHVV:	SMEG	ANL	371
	C. neoformans	223	K <b>K</b> RLI	PDAYNI	LV	<b>PVD</b> T	VRF	(I <b>P</b> H	TATA		IWENSR	KFNO	KEHPV:	5QMA	TRL	322
	P. jirovecii	105	RKNR-	-DARPI	TNC	PVDP	VKL	I PI	YPSVI		VFSNCF	TFNO	GEESAI:	5G <b>MA</b>	KTL	183
BD2				+				+				+	+			
002	Brd4	365	FAKKHA	AYAWPI	TYP	PVDV	EAL	LHD	CDII		MESNCY	KY I	PDHEV	VAMA	RKL	446
Human	Brd3	325	LSKKHAZ	AYAWPI	TYP	PVDA	EAL	LHD	HDII		MESNCY	KY I	PDHEVY	VAMA	RKL	404
BET	Brd2	361	LSKKHAZ	AYAWPI	FYF	PVDA	SAL	LHD	HDII		MESNCY	KY I	PDHDV	VAMA	RKL	442
	Brdt	284	LAKKHES	YAWPI	TYN	PVDV	NAL	<b>LH</b> N	YDVV		MEMNCY	KY I	PDHEVY	TMA	RML	365
- 1	C. albicans	400	MSKKHYN	VYNF PI	TLA	PVDT	VAL	IPN	NEIV		VFKNCY	LFNI	EGTDVI	MMG	HRL	481
	S. cerevisiae	329	MAKKHAS	S <b>Y</b> NY <b>P</b> I	LE	PVDP	VSM	LPT	YFDYV	<u>,</u>	VFKNCY	TFNI	DGTIV	M <b>M</b> GI	HRL	410
Fungal Bdf1	C. glabrata	324	MSKKYAS	SENYPI	LE	PVDP	VAL	CPT	FDYV	t i	IFQNCY	AFNI	DGTIVI	MMG	HRL	407
	A. fumigatus	489	HKPKHY	WAAPI	FYE	PVDP	VAL	IPT	HSII		IFKNCF	KFN]	PGDPT:	MAG	QRF	570
	H. capsulatum	493	HK <b>KK</b> YES	SIAIPI	<b>FY</b> Y	PVDP	VAL	IPT	YHSII		IFKNCY	<b>K</b> FN I	E PGDPT	INSG	KSL	574
	C. neoformans	414	SSNKYYI	IAVSPI	TLY	PVEK	IIE	<b>VPD</b>	ATVI		MVANAQ	<b>K</b> E <b>N</b> I	PERHEV	TSA	TQL	495
4	P. jirovecii	271	QK <b>K</b> T <b>H</b> ES	SYAFPI	FYH	PVDA	VAL	IPD	YKIV		MFRNCY	<b>k</b> en i	PVGTPV	YN <b>M</b> GI	KRL	347
Identica	l between BD1	& BD2	2:					_				-				
	Hum	an BE	Т 🧧				•	• •	•				•		•	
		CaBdf	f1						•		•		•	•		

**Supplementary Figure 6. Structure-based sequence alignment of human and fungal BET proteins showing the ligand binding region.** Residues highlighted in grey are conserved in at least three human BET sequences within each BD. The conserved Tyr and Asn residues involved in water-mediated and direct hydrogen bonds to the ligand are shown in inverse font. Human BET BD residues interacting with BETi compounds through direct or water-mediated hydrogen bonds or through van der Waals contacts are indicated by asterisks, arrowheads and green circles, respectively. Interactions are taken from the crystal structures of Brd4 BD1 bound to JQ1, IBET-762 or PFI-1 (PDB codes 3MXF, 3P5O and 4E96), from that of Brd2 BD1 bound to IBET-151 (PDB 4ALG), and from a structural alignment of Brd4 BD1 with human BRPF1 BD bound to bromosporine (PDB 4C7N). The signature residues used to classify human BD binding sites are numbered 1-8 (ref.<sup>4</sup>). Magenta arrows and boxes indicate BETi-contacting residues which are conserved in human BET proteins but differ in *Ca*Bdf1 and other fungal sequences. Blue dots below the alignment indicate residues which are identical between BD1 and BD2 across human BET proteins or within *Ca*Bdf1.



**Supplementary Figure 7.** BROMOscan profiling of compounds **1** and **2** at 10  $\mu$ M concentration. (a) TREEspot interaction map. Roman numerals indicate human BD families as defined in ref.<sup>1</sup>. The 32 BDs used in the screen are shown in black. Results of the BROMOscan are plotted as percent of control, where lower values indicate stronger inhibition. No spots appear on the plot because no significant inhibition was detected. (Plots are identical for compounds **1** and **2**). For comparison, the BET-selective inhibitor dBET1 (a derivative of JQ1), was reported to yield signals of 0% for six BET BDs (0.25% and 1.6% for the other two), 25-35% for CREBBP, EP300, FALZ and SMARCA4, and >35% for the remaining BDs<sup>5</sup>. (b) Histogram of BROMOscan data. Results show mean and s.d. from two independent experiments. The red dashed line indicates the 35% threshold used as a cutoff for significant inhibition.



Supplementary Figure 8. ITC experiments measuring the binding of compounds 1 and 2 to human SMARCA BDs. The binding of (a) compound 1 by *Ca*Bdf1 BD1 and of (b) compound 2 by *Ca*Bdf1 BD2 is compared to the binding of these compounds by SMARCA2 and SMARCA4. The upper panels show the differential power ( $\Delta P$ ) time course of raw injection heats for *Ca*Bdf1 (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 *Ca*Bdf1, SMARCA2 and SMARCA4 BDs indicated by magenta, solid blue and empty blue circles, respectively. The ITC data for the *Ca*Bdf1 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  $LC_{50}$  are summarized at the right.



**Supplementary Figure 10. Conformations of compound 1 observed in the** *Ca*Bdf1 BD1 crystal structure. (a) Structural alignment of the four *Ca*Bdf1 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  $3\sigma$ . 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.<sup>3</sup>. (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 *Ca*Bdf1 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 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 *Ca*Bdf1 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]	[Protein]	K <sub>D</sub>	⊿н	N	T∆S	⊿G
		(μM)	(µM)	(μM)	(kJ/mol)		(kJ/mol)	(kJ/mol)
JQ1	Brd4 BD1	10	60	0.062 ± 0.016	-53.4 ± 0.5	$1.00 \pm 0.03$	-12.28	-41.12
JQ1	CaBdf1 BD1	10	60	nd <sup>1</sup>	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	$0.91 \pm 0.06$	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	$1.21 \pm 0.11$	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	$13.4 \pm 1.7$	-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	$1.05 \pm 0.03$	1.84	-30.34
3	CaBdf1 BD2	100	700	nd	nd	nd	nd	nd

<sup>1</sup>nd, not determined (weak binding).

	Supp	plementary	y Table 2. Cr	ystallographic	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	<mark>xxxx</mark>	<mark>xxxx</mark>	<mark>xxx</mark>	<mark>xxx</mark>	<mark>xxxx</mark>
Data Collection <sup>1</sup>					
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	P212121	P212121	P41212	P212121	P2
Unit cell dimensions	<i>a</i> =50.63 Å,	a=75.44 Å,	<i>a=b=</i> 70.41 Å,	a=38.75 Å,	<i>a</i> =46.49 Å,
	<i>b</i> =67.57 Å,	<i>b</i> =77.29 Å,	<i>c</i> =124.17 Å	<i>b</i> =45.20 Å,	<i>b</i> =36.00 Å,
	<i>c</i> =188.54 Å	<i>c</i> =102.59 Å		<i>c</i> =71.83 Å	<i>c</i> =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	266,479	313,833		
	(13,158)	(25,764)	(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 <sub>merge</sub>	0.088 (0.789)	0.070 (0.626)	0.067 (0.689)	0.050 (0.263)	0.047 (0.442)
R <sub>meas</sub>	0.098 (0.881)	0.080 (0.708)	0.072 (0.748)	0.055 (0.321)	0.059 (0.549)
R <sub>pim</sub>	0.044 (0.388)	0.037 (0.324)	0.025 (0.285)	0.022 (0.180)	0.035 (0.321)
CC <sub>1/2</sub>	0.998 (0.761)	0.998 (0.759)	0.998 (0.812)	0.999 (0.918)	0.998 (0.805)
Refinement					
Resolution used for	100 227	127 176	40.9 1.60	20 2 1 20	44.2 1.45
refinement	40.9 - 2.37	42.7 - 1.70	49.8 - 1.00	58.5 - 1.20	44.5 - 1.45
Reflections used (total/R <sub>free</sub> )	25,719 / 1369	56,817 / 3041	39,332 / 2092	37,375 / 1980	32,851 / 1790
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	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 (Ų)					
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
Molprobity 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

<sup>1</sup>Numbers in parentheses refer to the outer resolution shell.

	RMSD (Å) with <i>Ca</i> Bdf1							
	Entire BD (100 Cα atoms)	Binding pocket (46 Cα atoms)						
BD1	<i>i</i>							
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 3. RMSD values between human BET and *Ca*Bdf1 BD structures.

## Supplementary Table 4. Plasmids used in this study.

Name	Number	Parent	Description	Cassette	to tra	nsform
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	n with	Apal
bdf1-bd1∆-LEU2	pJG224		Identical to pJG214 with a bdf1-bd1 $\Delta$ ORF	"	"	"
bdf1-bd2∆-LEU2	pJG225		Identical to pJG214 with a bdf1-bd2∆ ORF	"	"	"
$bdf1-bd1\Delta-bd2\Delta-LEU2$	pJG226		Identical to pJG214 with a bdf1-bd1 $\Delta$ -bd2 $\Delta$ ORF	п	II	"
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	п	II	II
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	n with	Xhol

## Supplementary Table 5. Strains used in this study.

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

<sup>1</sup> Strain SN152 is from ref.<sup>6</sup>. 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-(4hydroxyphenyl)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-1phenylethan-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. <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F NMR spectra were obtained on Varian 400-MR and VNMRS-600 NMR Spectrometers. The chemical shifts are relative to external hexafluorobenzene,  $C_6F_6$  ( $\delta$  - 164.9, <sup>19</sup>F NMR). Multiplicities are quoted as singlet (s), doublet (d), triplet (t) unresolved multiplet (m), doublet of doublets (dd), doublet of doublet of doublets (ddd), doublet of triplets (dt) or broad signal (br). All chemical shifts are given on the  $\delta$ -scale in parts per million (ppm) relative to internal CD<sub>2</sub>HOD ( $\delta$  3.34, <sup>1</sup>H NMR), CHCl<sub>3</sub> ( $\delta$  7.26, <sup>1</sup>H NMR). <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F 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.*<sup>7</sup>.



(i) HATU, DIPEA, DMF, r.t., 2 h

0.5 g (2.5 mmol, 1 equiv.) 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 0.38 g (2.5 mmol, 1 equiv.) 2mercaptobenzoic 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). solvent was then removed under vacuum to get intermediate I1 The (2-((2,4dinitrophenyl)thio)benzoic acid, 90% yield) for the next step. 0.5 g (1.6 mmol, 1 equiv.) 2-((2,4dinitrophenyl)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.) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 1mL EtOH and 300µL (7 equiv.) 30% HCl was then added to the solution. Finally, 0.262 g (3.5 equiv.) SnCl<sub>2</sub> 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 (1equiv.) 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:



<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  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<sup>+</sup>); 709.0 (2M+H<sup>+</sup>); 731.1 (2M+Na<sup>+</sup>).

(*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:



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  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<sup>+</sup>); 377.4 (M+Na<sup>+</sup>); 730.9 (2M+Na<sup>+</sup>).

Synthesis of 2, 2a and 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added and the mixture was grinded for 2 min at RT until it became yellow<sup>8</sup>. The crude material was washed 3 times with water and dried under the vacuum giving solid material **I5** with yields 80-90%. 1 mmol (1 equiv.) of **I5** 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 ZnI<sub>2</sub> and 0.5 g 4 Å molecular sieves were added. The mixture was heated at 80°C with vigorous stirring for 12 hr<sup>9</sup>. 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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:



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Methanol-d4)  $\delta$  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 C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O: 329.15 Mass found: 330.4 (M+H<sup>+</sup>).

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



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Methanol-d4)  $\delta$  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 C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>: 313.16 Mass found: 314.5 (M+H<sup>+</sup>).

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



<sup>1</sup>H 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). <sup>19</sup>F NMR (564 MHz, Chloroform-d) δ -105.23 , -106.62 , -114.35. Calculated for  $C_{21}H_{18}FN_3$ : 331.15 Mass found: 332.3 (M+H<sup>+</sup>).

## **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).
- 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. <u>Contexte et objectifs</u>

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<sup>ème</sup> 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 bromodomaines 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. <u>Résultats</u>

#### 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* (*bdf1* $\Delta$ ) 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 *westernblot*. 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 reconnait 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).

201



В



## 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.

Ce travail a permis de démontrer que le gène *BDF1* et l'intégrité des deux bromodomaines 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-bd1* $\Delta$  (délétion des acides aminés 148 à 226), *bdf1-bd2* $\Delta$  (délétion des acides aminés 325 à 403) et *bdf1-bd1* $\Delta$ - *bd2* $\Delta$ . 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 Xhol et Sacl, 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 DO<sub>600</sub> 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.

Nom du plasmide	Plasmide parental	Fragments assemblés	Séquence des amorces utilisées
			GACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCACCCGCCCTTTTTTGC
		2 PDLT	ATCTGATTTACGATCTTGCGTGCATTGGTCGAAGCTCCTCTTCAACTCC
			CACAAGAGGAGTTGAAGAGGAGCTTCGACCAATGCACGCAAGATCGTAA
NAET POET	PCP2 1 TODO	Cgniss	CAATAACCTGCAGTTCCCTACCTCCATCCTCTATATCGTGTTCGTGCGT
pivie i <i>-buri</i>	ρεκ2.1 1090	pMET	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGGATGGAGGTAGGGAACTGCAGG
		PIVIET	CTGGGTGGCAGTTCAACGTTCATTCTAGATTGTTAGGTGTTTCTTTC
			TCCAGAAAAGAAACACCTAACAATCTAGAATGAACGTTGAACTGCCACC
		BDF1	GGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGTTGGCGTTCAGCTTG
	DCDD2 011042		CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCC
BDF1	μακδ2.0 υκας	BUFI	GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAACTGC
		hdf1 on amont do BD1	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCC
bdf1-bd1∆	pGRB2.0 URA3	buji en amont de BDI	TTGCAGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTCTTTCAACCTCTTGACAGCCTTG
		hdf1 on aval do PD1	GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC
		DUJI Ell'aval de BDI	GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAACTGC
<i>bdf</i> 1-bd2∆	pGRB2.0 URA3	hdf1 en amont de BD2	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCC
		buji en amont de bbz	TACAATGGTCTGTCGGCCCATTTTGTGTTCGAGGCGTACTTCTTGCTCAT
		hdf1 en aval de BD2	AGAGAGTTGATGAGCAAGAAGTACGCCTCGAACACAAAATGGGCCGACAG
			GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAACTGC
		<i>hdf1</i> en amont de BD1	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCTTTCTTTCATGCCTGCC
	pGRB2.0 URA3	buji ch amont de bbi	TTGCAGGCATGTTAAGCATGTGCTTCTCTTTCAACCTCTTGACAGCCTTG
bdf1-bd1∆-		hdf1 entre BD1 et BD2	GCTATCAAGGCTGTCAAGAGGTTGAAAGAGAAGCACATGCTTAACATGCC
bd2∆		buji chile bbi el bbz	TACAATGGTCTGTCGGCCCATTTTGTGTTCGAGGCGTACTTCTTGCTCAT
		<i>bdf1</i> en aval de BD2	AGAGAGTTGATGAGCAAGAAGTACGCCTCGAACACAAAATGGGCCGACAG
			GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCTAGTTAAGCCTAATCCTTCAAACTGC
hdf1_hd1*	BDF1	Quickchange	GTTGCCCTGAACATCCCCTTATTCTTCAACTTCATCAAGAGACC
54)1 541		Quickendinge	GGTCTCTTGATGAAGTTGAAGAATAAGGGGATGTTCAGGGCAAC
hdf1-hd2*	RDF1	Quickchange	CGCATTGAACTGCCCAACATTCTTCGACTACGTCAAAG
54)1 542	0011	Quickendinge	CTTTGACGTAGTCGAAGAATGTTGGGCAGTTCAATGCG
bdf1-bd1*-	hdf1-hd1*	Quickchange	GTTGCCCTGAACATCCCCTTATTCTTCAACTTCATCAAGAGACC
bd2*	5011-001	Quickenange	GGTCTCTTGATGAAGTTGAAGAATAAGGGGATGTTCAGGGCAAC

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

## 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	BDF1	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide BDF1-URA3
pMET-BDF1 + bdf1-bd1Δ	pMET-BDF1	bdf1-bd1∆	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide bdf1-bd1Δ-URA3
pMET-BDF1 + bdf1-bd2∆	pMET-BDF1	bdf1-bd2∆	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide bdf1-bd2Δ-URA3
pMET-BDF1 + bdf1-bd1∆-bd2∆	pMET-BDF1	bdf1-bd1∆-bd2∆	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide bdf1-bd1Δ-bd2Δ-URA3
pMET-BDF1 + bdf1-bd1*	pMET-BDF1	bdf1-bd1*	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide bdf1-bd1*-URA3
pMET-BDF1+bdf1-Bd2*	pMET-BDF1	bdf1-bd2*	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide bdf1-bd2*-URA3
pMET-BDF1+bdf1-bd1*-bd2*	pMET-BDF1	bdf1-bd1*-bd2*	ura3Δ, his3Δ, trp1Δ, BDF1::pMET-BDF1-HIS3 + plasmide bdf1-bd1*-bd2*-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  $DO_{600}$  comprise entre 0,5 et 0,8, puis récupérées par centrifugation et re-suspendues dans de l'eau stérile de façon à obtenir une  $DO_{600}$  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 boites 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 DO<sub>600</sub> 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 ; cOmplete<sup>™</sup> 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 bromodomaines chez *C. glabrata*, confirmant l'intérêt de l'inhibition des protéines BET fongiques

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 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 CqPDR1 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*.

208

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 apparaitre 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<sup>ème</sup> et aujourd'hui de 4<sup>ème</sup> 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 boite (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.

210

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 Rimdépendants. 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  $\beta$ -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 lpt1 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, apparait 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 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

213
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 bromodomaines, ainsi que la présence de mutations empêchant la liaison des bromodomaines 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 bromodomaines 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 bromodomaines de Bdf1. La recherche de composés actifs sur les deux bromodomaines 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<sup>ème</sup> 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 bromodomaines BD1 et BD2, responsables de la liaison à la chromatine, sont indispensables à la croissance de *C. glabrata in vitro*.

#### 3.2.1. <u>Etude de l'implication de BDF1 et des bromodomaines BD1 et BD2 dans la virulence in vivo</u>

Une des premières perspectives de ce travail est l'évaluation du rôle de Bdf1 et des bromodomaines 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 bromodomaines, ou *BDF1* avec des mutations ponctuelles de l'un et/ou l'autre des bromodomaines, 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 bromodomaines *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. <u>Recherche d'inhibiteurs des bromodomaines de Bdf1</u>

Les bromodomaines 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 bromodomaines pour *C. glabrata* et *S. cerevisiae* (71 et 84%, Figure 13), et de la faible homologie de séquence entre les bromodomaines des protéines BET humaines et ceux de CgBdf1, il devrait en être de même pour *C. glabrata*. L'obtention de la structure tridimensionnelle des bromodomaines de CgBdf1 par cristallographie pourra permettre de confirmer cette hypothèse.

Par la suite, un criblage d'inhibiteurs potentiels des bromodomaines 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 bromodomaines 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 bromodomaines, 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 bromodomaines 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 *Candida*ts potentiels devront présenter une activité sur les deux bromodomaines. 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 bromodomaines 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 bromodomaines 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 bromodomaines 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 neorformans* 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 bromodomaines 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

218

*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<sup>ème</sup> 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 MTLa/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-Ortíz 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 nonimmunosuppressed 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 Medicale. 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.
- 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, 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.
- 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 metaanalysis. 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, Arikan-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.
- 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, Boeszoermenyi 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 14alpha-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, Gygax 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, Miegeville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol Δ5,6-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\_definiti ons\_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 juin;10(6):e1004211.
- 180. Prasad T, Saini P, Gaur NA, Vishwakarma RA, Khan LA, Haq QMR, et al. Functional Analysis of *CaIPT1*, 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, Mühlschlegel 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, Nedea 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. Pachl 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 bromodomaines 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