

UNIVERSITÉ DE PARIS DESCARTES

2015–2016

FACULTÉ DE PHARMACIE  
DE PARIS

N°

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**  
**De Biologie Médicale**  
**Soutenu le vendredi 22 avril 2016**  
**Par Gwénolé PRIGENT**

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de :

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

---

**ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ÉCHINOCANDINES DE  
*CANDIDA* SPP. CHEZ DES TRANSPLANTÉS HÉPATIQUES À  
L'HÔPITAL HENRI MONDOR**

---

**JURY**

**Président : Pr Sandrine HOUZÉ**

**Membres : Pr Françoise BOTTEREL**

**Dr Éric DANNAOUI**

**Dr Arnaud FEKKAR**

**Dr Nawel AÏT-AMMAR**



# Préambule

Ce travail a été effectué au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Henri Mondor à Créteil sous la direction de Madame le Professeur Françoise Botterel. Il a fait l'objet d'une collaboration étroite avec le service de Réanimation Chirurgicale et Digestive du Professeur Gilles Dhonneur, en particulier avec le Docteur Eric Levesque.

Ce travail a fait l'objet des travaux suivants :

- Prigent G, Aït-Ammar N, Levesque E, Fekkar A, Costa JM, El Anbassi S, Merle JC, Dannaoui E, Botterel F. Résistance de *Candida* spp. aux échinocandines chez des transplantés hépatiques à l'hôpital Henri Mondor, communication orale au congrès de la **Société Française de Microbiologie** (SFM), Mars 2016, Paris ;
- Prigent G, Aït-Ammar N, Levesque E, Fekkar A, Costa JM, El Anbassi S, Merle JC, Dannaoui E, Botterel F. Emergence de *Candida* spp. résistants aux échinocandines chez des transplantés hépatiques, communication orale au congrès de la **Société Française de Mycologie Médicale** (SFMM), Mars 2016, Grenoble ;
- Prigent G, Aït-Ammar N, Levesque E, Fekkar A, Costa JM, El Anbassi S, Merle JC, Dannaoui E, Botterel F. Echinocandin resistance in *Candida* spp. isolated from liver transplant recipients, communication affichée au congrès de l'**European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** (ECCMID), Avril 2016, Amsterdam ;
- Prigent G, Aït-Ammar N, Levesque E, Fekkar A, Costa JM, El Anbassi S, Merle JC, Dannaoui E, Botterel F. Echinocandin resistance in *Candida* spp. isolated from liver transplant recipients, **Antimicrob Agents Chemother**, 2016 Nov 14. pii: AAC. 01229-16.

# Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement,

Madame le Professeur Sandrine Houzé, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Veuillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance.

Messieurs les Docteurs Eric Dannaoui et Arnaud Fekkar, pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir d'accepter de faire partie du jury et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Ma directrice de thèse, le Professeur Françoise Botterel. Ce fut un réel plaisir et une expérience enrichissante de travailler dans votre service. Merci pour vos conseils avisés, votre bonne humeur et votre soutien tout au long de ce travail.

Madame le Docteur Nawel Aït-Ammar, pour m'avoir encadré et aidé pendant ce travail. Je retiendrai notamment ta rigueur et tes qualités professionnelles. Merci pour ton immense gentillesse et ta disponibilité.

Messieurs les Docteurs Eric Levesque et Jean-Claude Merle du service de Réanimation Chirurgicale et Digestive, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Henri Mondor, avec qui j'ai passé de très bons moments pendant mon semestre d'internat.

Toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, en particulier Isabelle, Martine et le Dr Arnaud Fekkar, pour l'accueil chaleureux que vous m'avez réservé et vos conseils lors de mes venues.

Toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Européen Georges Pompidou, en particulier Adrien et le Dr Eric Dannaoui, pour l'accueil chaleureux que vous m'avez réservé et votre aide lors de mes venues.

Je tiens aussi à remercier,

Mes parents, pour avoir toujours su m'encourager et me soutenir pendant toutes ces années. Rien n'aurait été possible sans vous.

Mon frère Kévin et ma soeur Aurélie. Merci pour votre intarissable soutien. Kévin, c'est à mon tour de t'encourager pour la suite de tes études de médecine. Aurélie, je te souhaite le meilleur pour l'avenir. Je suis fier de vous, de votre parcours et de ce que vous êtes.

Mes grands parents, merci pour votre soutien pendant toutes ces années.

Tous mes amis rennais de la Faculté de Pharmacie et tous mes co-internes parisiens avec qui j'ai partagé de bons moments.

Julie, tu m'as accompagné et supporté pendant ces longues années. Merci pour ta patience et ton soutien si précieux.

# Table des matières

Préambule .....	3
Remerciements .....	4
Table des matières .....	5
Liste des figures .....	7
Liste des tableaux .....	8
Liste des abréviations.....	10
Introduction .....	12
Généralités .....	13
<b>I. Infections fongiques invasives en post-transplantation hépatique.....</b>	<b>13</b>
A. La transplantation hépatique .....	13
B. Infections non fongiques en post-transplantation hépatique .....	16
C. Infections fongiques invasives en post-transplantation hépatique .....	16
1. Généralités .....	16
2. Incidence .....	17
3. Délai de survenue.....	17
4. Facteurs de risque.....	18
5. Epidémiologie .....	19
6. Diagnostic .....	20
a. Critères diagnostiques .....	21
b. Tests sériques .....	22
c. Tests génotypiques .....	25
d. Bilan de colonisation.....	26
e. Recommandations internationales .....	27
7. Candidoses invasives .....	27
8. Autres infections fongiques invasives.....	27
a. Aspergillose.....	27
b. Cryptococcose .....	28
c. Pneumocystose .....	29
d. Histoplasmosse .....	29
D. Traitements des candidoses invasives en post-transplantation hépatique.....	30
1. Les molécules disponibles .....	30
a. Polyènes.....	30
b. 5-fluorocytosine .....	31
c. Azolés.....	31
d. Echinocandines .....	31
2. Les différentes stratégies thérapeutiques.....	32
a. Traitement préventif .....	33
b. Traitements préemptif et empirique .....	34
c. Traitement curatif.....	36
d. Autres données sur les traitements chez les transplantés hépatiques.....	36
<b>II. Résistance aux antifongiques chez <i>Candida</i> spp.....</b>	<b>38</b>
A. Les différents types de résistances .....	38
1. La résistance microbiologique .....	38
2. La résistance clinique.....	39
B. Epidémiologie de la résistance.....	39
1. Généralités .....	39
2. Epidémiologie de la résistance pour les échinocandines.....	41
3. Epidémiologie de la résistance pour les azolés .....	42
4. Epidémiologie de la résistance croisée.....	42
C. Méthodes de détection.....	43
1. Méthodes phénotypiques.....	43
a. Méthodes de référence.....	43
b. Tests commerciaux.....	45
2. Méthodes moléculaires .....	45
3. Autres méthodes.....	47

D.	Mécanismes de résistance .....	48
1.	Résistance aux échinocandines .....	48
a.	Mutations dans les gènes <i>FKS</i> .....	49
b.	Réponse adaptative au stress .....	52
2.	Résistance aux autres classes d'antifongiques .....	54
a.	Résistance aux polyènes .....	54
b.	Résistance à la 5-fluorocytosine .....	54
c.	Résistance aux azolés .....	54
3.	Autres mécanismes de résistance .....	57
a.	Perte de l'hétérozygotie .....	57
b.	Production de biofilms .....	57
E.	Impacts microbiologiques .....	60
<b>Matériel et méthodes .....</b>		<b>61</b>
I.	Sélection des patients .....	61
II.	Prélèvements .....	61
A.	Prélèvements reçus .....	61
B.	Mise en culture .....	61
C.	Souchage .....	62
D.	Identification .....	62
III.	Détermination de la sensibilité aux antifongiques .....	62
A.	Méthode Etest® .....	62
1.	Sélection des isolats à tester .....	62
2.	Technique .....	63
B.	Méthode EUCAST .....	64
1.	Préparation du milieu liquide RPMI .....	64
2.	Préparation des différentes dilutions d'antifongiques et de la solution de travail .....	64
3.	Préparation de l'inoculum .....	65
4.	Inoculation des plaques .....	65
5.	Lecture et interprétation des résultats .....	65
IV.	Séquençage des gènes <i>FKS</i> .....	66
A.	Extraction et dosage de l'ADN .....	67
B.	Amplification de l'ADN .....	67
C.	Visualisation de l'amplification .....	67
D.	Purification et dosage de l'ADN .....	67
E.	Séquençage des amplicons .....	68
V.	Génotypage des isolats .....	68
VI.	Données cliniques et thérapeutiques .....	69
<b>Résultats .....</b>		<b>70</b>
I.	Patients .....	70
A.	Caractéristiques .....	70
B.	Classification clinique .....	71
II.	Prélèvements reçus .....	72
A.	Groupe 1 .....	72
B.	Groupe 2 .....	73
C.	Groupe 3 .....	73
III.	Résistance aux échinocandines .....	73
A.	Dépistage de la résistance .....	74
B.	Confirmation par la méthode EUCAST .....	75
IV.	Séquençage des gènes <i>FKS</i> .....	78
V.	Génotypage des isolats .....	81
<b>Discussion .....</b>		<b>82</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>		<b>86</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>87</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>91</b>

# Liste des figures

Figure 1. Evolution du nombre de TH en France (1990-2013).....	13
Figure 2. Survie globale du receveur après TH (1993-2012).....	15
Figure 3. Facteurs de risque de CI chez les transplantés hépatiques, d'après Gavaldà <i>et al.</i> ...	19
Figure 4. Capacité du BDG à activer la cascade de la coagulation au sein d'un lysat d'amœbocytes issu de l'hémolymphe de <i>Limulus polyphemus</i> .....	24
Figure 5. Mécanismes d'action des différents antifongiques, d'après Maubon <i>et al.</i> .....	30
Figure 6. Les différents types de traitements antifongiques,.....	32
Figure 7. Répartition des espèces de <i>Candida</i> non rares responsables d'un premier épisode de fongémie, selon l'exposition dans les 30 jours précédents au fluconazole (n = 135), à la CS (n = 53) ou à aucun antifongique (n = 2383), d'après l'Observatoire des levures d'Ile-de-France (2002-2010).....	40
Figure 8. Intérêt de la détection des mutants <i>FKS</i> chez <i>C. glabrata</i> pour la prédiction des échecs cliniques.....	46
Figure 9. Mécanismes de résistance aux échinocandines chez <i>Candida</i> spp.....	48
Figure 10. Fréquences relatives des substitutions d'acides aminés pour le gène <i>FKS1</i> causant des résistances aux échinocandines chez <i>C. albicans</i> .....	49
Figure 11. Distribution des CMI pour les échinocandines selon la méthode de référence du CLSI chez 119 <i>C. glabrata</i> et mutations <i>FKS</i> associées.....	51
Figure 12. Impacts de la CS et du Calcofluor White sur la synthèse de chitine chez <i>C. albicans</i> .....	52
Figure 13. Mécanismes de réponse au stress chez <i>C. albicans</i> .....	53
Figure 14. Différentes étapes pouvant mener à l'apparition de mutations <i>FKS</i> chez <i>Candida</i> spp. suite à l'exposition à un antifongique, d'après Perlin <i>et al.</i> .....	53
Figure 15. Mécanismes de résistance aux azolés chez <i>Candida</i> spp.....	55
Figure 16. Substrats spécifiques et communs des pompes Cdr1p et CaMdr1p .....	56
Figure 17. Mécanismes de résistance associés au biofilm chez <i>C. albicans</i> , d'après Taff <i>et al.</i> .....	59
Figure 18. Plan d'une plaque pour un antifongique testé sur 8 isolats différents .....	65

# Liste des tableaux

Tableau 1. Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en TH en France (2008-2014).....	14
Tableau 2. Indications principales de la TH pour les nouveaux inscrits sur liste d'attente (2013).....	14
Tableau 3. Principaux facteurs de risque d'IFI chez les transplantés hépatiques .....	18
Tableau 4. Définitions des IFI selon les critères définis par le groupe de consensus EORTC/MSG (2008) .....	22
Tableau 5. Principales causes de faux positifs lors du dosage du BDG.....	24
Tableau 6. Modalités du calcul pour établir le « <i>Candida</i> score ».....	26
Tableau 7. Techniques recommandées par l'ESCMID dans le diagnostic des CI.....	27
Tableau 8. Antifongiques disponibles pour le traitement des IFI .....	32
Tableau 9. Traitement prophylactique recommandé par l'ESCMID pour les CI (2012).....	33
Tableau 10. Recommandations de l'ESCMID pour le traitement empirique et préemptif des CI.....	34
Tableau 11. Sensibilité intrinsèque aux antifongiques pour certaines espèces de <i>Candida</i> , d'après Arendrup <i>et al.</i> .....	38
Tableau 12. Principaux facteurs impliqués dans la résistance clinique aux antifongiques.....	39
Tableau 13. CBP 2014 de l'EUCAST et du CLSI chez <i>Candida</i> spp. permettant de classer les isolats sensibles ou résistants selon les CMI obtenues <i>in vitro</i> .....	44
Tableau 14. Sensibilité <i>in vitro</i> et mutations <i>FKS</i> de 20 <i>Candida</i> spp. résistants aux échinocandines isolés en France (2004-2010) .....	50
Tableau 15. Principales substitutions d'acides aminés liées à des mutations décrites dans les HS des gènes <i>FKS</i> chez <i>Candida</i> spp.....	51
Tableau 16. Relation entre sensibilité aux azolés et succès thérapeutique, d'après Pfaller <i>et al.</i> .....	60
Tableau 17. Seuils de sensibilité utilisés pour l'interprétation des antifongigrammes (Etest®) .....	63
Tableau 18. Seuils de sensibilité utilisés pour l'interprétation des antifongigrammes (EUCAST v8.0).....	66
Tableau 19. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes <i>FKS</i> .....	66
Tableau 20. Séquences (acides aminés) des HS étudiés .....	68
Tableau 21. Amorces utilisées pour le génotypage.....	68
Tableau 22. Caractéristiques démographiques des deux populations de l'étude .....	70

Tableau 23. Motifs de la TH dans les deux populations de l'étude .....	70
Tableau 24. Nombre de patients dans les différents groupes constitués lors de l'étude .....	71
Tableau 25. Indications des traitements antifongiques pour les patients inclus.....	72
Tableau 26. Résultats des prélèvements reçus (carte fongique) pour les patients du groupe 1 .....	72
Tableau 27. Résultats des prélèvements reçus (carte fongique) pour les patients du groupe 2 .....	73
Tableau 28. Résultats des prélèvements reçus (carte fongique) pour les patients du groupe 3 .....	73
Tableau 29. Résultats des antifongigrammes chez le patient 14.....	75
Tableau 30. Sensibilité des isolats aux échinocandines chez le patient 14 .....	76
Tableau 31. Résultats des antifongigrammes chez le patient 16.....	76
Tableau 32. Sensibilité des isolats aux échinocandines chez le patient 16 .....	77
Tableau 33. Résultats des antifongigrammes chez le patient 54.....	77
Tableau 34. Résultats du séquençage des gènes <i>FKS</i> chez <i>C. glabrata</i> pour le patient 14.....	78
Tableau 35. Synthèse des résultats du séquençage des gènes <i>FKS</i> chez <i>C. glabrata</i> pour le patient 14 .....	79
Tableau 36. Résultats du séquençage des gènes <i>FKS</i> chez <i>C. dubliniensis</i> pour le patient 16	79
Tableau 37. Synthèse des résultats du séquençage des gènes <i>FKS</i> chez <i>C. dubliniensis</i> pour le patient 16 .....	80
Tableau 38. Résultats du séquençage des gènes <i>FKS</i> chez <i>C. albicans</i> pour le patient 54.....	80
Tableau 39. Résistance aux antifongiques (Etest <sup>®</sup> et EUCAST) parmi les mutants <i>FKS</i> .....	81

# Liste des abréviations

- 5-FC : 5-fluorocytosine
- ABC : ATP-Binding Cassette
- ABCD : amphotéricine B en dispersion colloïdale
- ABLC : amphotéricine B lipidique
- AI : aspergillose invasive
- AMB : amphotéricine B
- ANF : anidulafungine
- BEH : bulletin épidémiologique hebdomadaire
- BDG : (1,3)- $\beta$ -D-glucane
- CAGTA : *Candida albicans* Germ Tube Antibody
- CBP : Breakpoints cliniques
- CDC : Center for Disease Control and Prevention
- CHC : carcinome hépatocellulaire
- CI : candidose invasive
- CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMI : concentration minimale inhibitrice
- CMV : cytomégalovirus
- CS : caspofungine
- DM : dispositifs médicaux
- ECIL : European Conference on Infections in Leukaemia
- EORTC : European Organization of Research and Treatment for Cancer
- ESCMID : European Society of Microbiology and Infectious Diseases
- EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- GM : galactomannane
- HS : Hot-Spot
- IDSA : Infectious Disease Society of America
- IFI : infection fongique invasive

- IRM : imagerie par résonance magnétique
- ITS : Internal Transcribed Spacer
- L-AMB : amphotéricine B liposomale
- LBA : liquide broncho-alvéolaire
- LCR : liquide céphalo-rachidien
- MCF : micafungine
- MEC : matrice extracellulaire
- MELD : Model for End-Stage Liver Disease
- MFS : Major Facilitator Superfamily
- MLST : Multilocus Sequence Typing
- MSG : Mycosis Study Group
- NGS : séquençage « nouvelle génération »
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PKC : protéine kinase C
- pmh : par million d'habitants
- TGI : tractus gastro-intestinal
- TH : transplantation hépatique

# Introduction

Les candidoses invasives constituent un problème majeur dans les services de réanimation et la mortalité associée est importante.

Dès lors, la mise en place d'une prophylaxie antifongique est primordiale chez les patients à risque. Un traitement antifongique doit également être initié rapidement en cas de suspicion d'infection. Les principales molécules utilisées appartiennent à la classe des azolés ou à celle des échinocandines. Le diagnostic microbiologique est complexe et peut être mis à défaut. Cela implique souvent la poursuite du traitement malgré l'absence de documentation mycologique, ce qui accentue la pression de sélection.

Depuis plusieurs années, nous assistons à une augmentation des résistances décrites sous traitement pour *Candida* spp., à la fois pour les azolés et pour les échinocandines.

De part une forte immunodépression, les patients transplantés hépatiques peuvent développer une infection fongique invasive et sont susceptibles de recevoir des traitements antifongiques. Ils font donc partie des populations à risque concernant l'apparition de résistances.

Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer l'impact d'un traitement par une échinocandine sur l'apparition de résistances chez *Candida* spp. parmi des patients transplantés hépatiques à l'hôpital Henri Mondor (Créteil, France).

Dans un premier temps, je traiterai des généralités concernant les infections fongiques invasives chez les transplantés hépatiques et la résistance aux antifongiques. Ensuite, j'exposerai les résultats de cette étude qui constitue mon travail de thèse d'exercice.

# Généralités

## I. Infections fongiques invasives en post-transplantation hépatique

### A. La transplantation hépatique

Aujourd'hui, la transplantation hépatique (TH) est un enjeu majeur de santé publique. Dans un contexte d'augmentation de l'incidence des insuffisances hépatiques terminales (carcinomes hépatocellulaires, cirrhoses...), elle reste en effet souvent la seule option thérapeutique.

En France, les transplantations sont gérées par l'Agence de la biomédecine. Créée par la loi de bioéthique de 2004, cette agence sanitaire sous tutelle du ministère de la santé exerce des missions d'encadrement, d'accompagnement, d'évaluation et d'information, notamment dans le cadre des transplantations.

Depuis 1990, le nombre de TH en France a fortement augmenté (Figure 1).

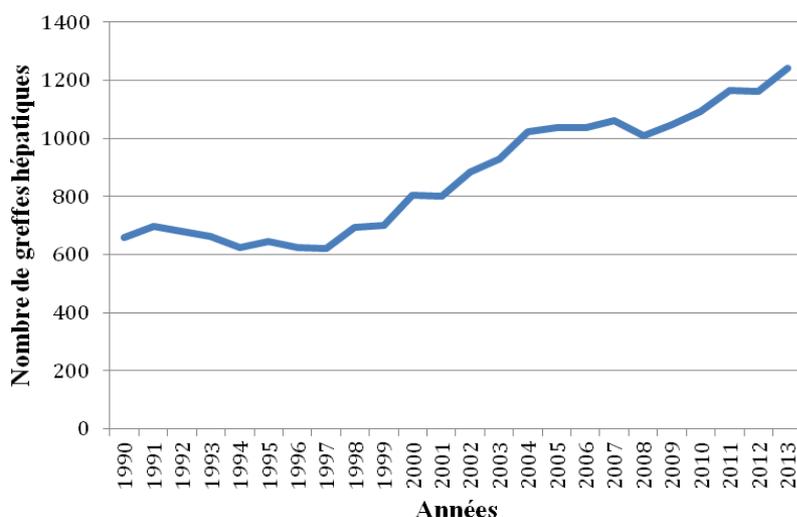


Figure 1. Evolution du nombre de TH en France (1990-2013)

Cette augmentation porte le taux de TH à 18,9 par million d'habitants (pmh) en 2013, ce qui est proche de celui observé aux Etats-Unis (20,3 pmh en 2013).

Au total, l'activité cumulée de TH toute période confondue est de 22 157 en France. Parmi elles, 459 ont été réalisées à partir d'un donneur vivant depuis 1998, mais les principaux donneurs restent les patients en état de mort encéphalique.

En parallèle, les candidats à la TH sont chaque année de plus en plus nombreux, comme le souligne le Tableau 1.

**Tableau 1. Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en TH en France (2008-2014)**

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<b>Liste d'attente</b>							
Malades restant en attente au 1 <sup>er</sup> janvier de chaque année	574	669	806	932	941	1104	1265
Nouveaux inscrits dans l'année	1372	1466	1580	1531	1722	1820	
Décédés dans l'année	107	136	170	136	183	206	
Sortis de la liste d'attente	159	146	192	222	215	212	
<b>Greffes dans l'année</b>	1011	1047	1092	1164	1161	1241	

Ainsi, à l'exception de l'année 2011, le taux d'accroissement annuel des malades restant inscrits au 1<sup>er</sup> janvier sur liste d'attente dépasse les 14 % depuis 5 ans (20,5 % en 2009, 15,6 % en 2010, 17,3 % en 2012, 14,6 % en 2013).

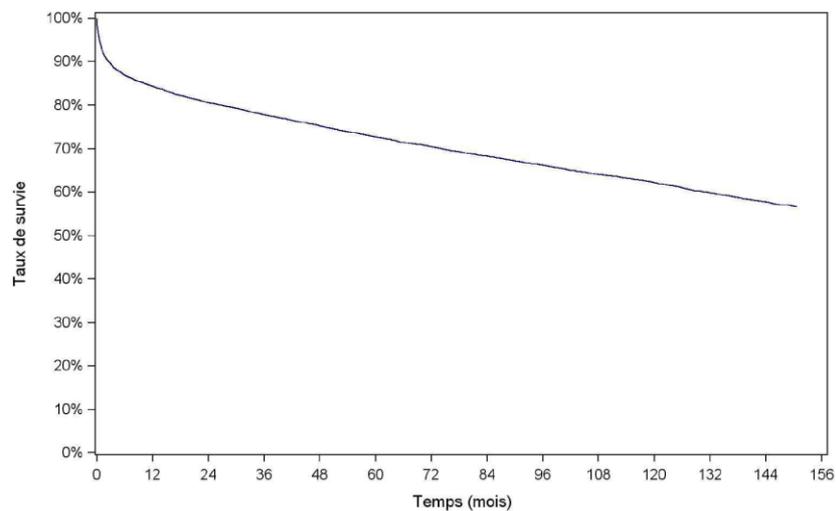
Le carcinome hépatocellulaire (CHC) et la cirrhose alcoolique sont les indications principales de TH en 2013 et représentent respectivement 25,8 % et 28 % des cas. Les indications des TH pour les nouveaux inscrits en 2013 sont regroupées dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Indications principales de la TH pour les nouveaux inscrits sur liste d'attente (2013)**

	Nombre	Pourcentage (%)
<b>Cirrhose alcoolique</b>	509	28
<b>Cirrhose post-hépatite (B, C ou D)</b>		
Cirrhose post-hépatite C	183	10,1
Cirrhose post-hépatite B ou B + D	31	1,7
<b>Tumeur hépatique</b>		
CHC	470	25,8
Autre tumeur	22	1,3
<b>Défaillance hépatique aiguë</b>	94	5,2
<b>Pathologie biliaire</b>	124	6,8
<b>Autre cause</b>	226	12,4
<b>Replantation élective ou non</b>	161	8,9

Les chiffres antérieurs montrent que c'est l'indication « cirrhose alcoolique » qui a le plus progressé depuis 2008 (55,8 % en 5 ans). En revanche, l'indication « cirrhose post-hépatite B » a diminué de 20 % en 4 ans, tandis que l'indication « cirrhose virale post-hépatite C » est stable. Cela peut s'expliquer par les progrès réalisés ces dernières années avec les thérapies antivirales B et C. Il faut néanmoins rester prudent sur l'interprétation de ces chiffres car l'indication principale de TH n'est pas toujours évidente et est souvent multifactorielle (hépatite virale, alcool, intoxication médicamenteuse...).

Globalement, la survie du receveur après une TH réalisée entre 1993 et 2012 est de 93,1 % à un mois, 72,7 % à 5 ans et 62,1 % à 10 ans (Figure 2).



**Figure 2. Survie globale du receveur après TH (1993-2012)**

L'âge du receveur joue un rôle avec des receveurs pédiatriques ayant une survie inférieure à celle des 18-54 ans. Les retransplantations tardives (plus de 3 mois après la transplantation initiale) ont également une meilleure survie par rapport aux retransplantations précoces (moins de 8 jours et entre 8 jours et 3 mois). Enfin, les risques de décès sont significativement plus élevés pour les malades avec un MELD (Model for End-Stage Liver Disease) score supérieur à 35.

Une fois la TH effectuée, un traitement immunosuppresseur est administré au patient pour diminuer le risque de rejet du greffon. Une corticothérapie est initiée pour la grande majorité des patients. Parmi les autres traitements, le tacrolimus est la principale anticalcineurine utilisée (83,6 % des TH), et est souvent associé à l'acide mycophénolique comme antimétabolite (87,8 % des TH).

En conclusion, l'activité de TH augmente constamment dans notre pays depuis plus de 20 ans. Le taux de survie moyen après transplantation reste supérieur à 50 % même après plusieurs années, mais varie selon les pathologies ayant motivé la greffe. L'introduction des traitements immunosuppresseurs est une avancée majeure contribuant à obtenir ces bons taux de survie. Cependant, elle implique un risque de complication infectieuse, dont nous allons parler par la suite <sup>1</sup>.

## **B. Infections non fongiques en post-transplantation hépatique**

Les infections chez les transplantés hépatiques font partie des causes majeures de morbidité et de mortalité dans cette population et sont aussi plus fréquentes que dans les autres transplantations d'organes.

Leur survenue est favorisée par plusieurs facteurs dont le degré d'altération de l'état général pré-opératoire (en particulier l'état nutritionnel), les conditions opératoires et le degré d'immunodépression systémique post-opératoire. L'existence d'une infection sous-jacente est aussi un facteur favorisant pour une autre infection.

Les pathogènes peuvent être acquis *de novo*, être liés aux soins, se réactiver, mais aussi être transmis par le donneur d'organe. En plus d'avoir un effet direct, ils peuvent être à l'origine d'effets indirects, comme le rejet du greffon ou une surinfection.

Dans une récente étude s'intéressant aux infections liées aux soins survenant chez les transplantés hépatiques (367 cas inclus), 37,3 % des patients développent une infection bactérienne <sup>2</sup>.

Ces infections bactériennes sont les plus fréquentes (70 % des cas), et sont suivies par les infections virales (20 % des cas) et les infections fongiques (8 % des cas).

## **C. Infections fongiques invasives en post-transplantation hépatique**

### **1. Généralités**

Les traitements immunosuppresseurs chez les transplantés hépatiques impliquent une augmentation du risque d'infection, en particulier les infections fongiques invasives (IFI). Selon les études, 5 % à 42 % des transplantés hépatiques développeront au moins une infection fongique. Ce type d'infection survient plus fréquemment en TH que dans les autres types de transplantation <sup>3</sup>.

On distingue les infections superficielles (cutanéomuqueuses) des infections invasives (infections disséminées pouvant atteindre un ou plusieurs organes). Ces dernières sont parfois diagnostiquées tardivement car les symptômes sont souvent aspécifiques et d'installation insidieuse. Elles mettent souvent en jeu le pronostic vital du patient.

Les infections à *Candida* spp. sont les plus fréquentes, suivies par les aspergilloses. La mortalité globale associée varie de 25 % à 69 % et semble plus importante pour les aspergilloses.

## 2. Incidence

La fréquence globale des IFI a augmenté ces dernières années. Cela est lié à l'augmentation croissante des populations à risque : patients transplantés, patients atteints d'un cancer ou encore ceux recevant des thérapies immunosuppressives.

*Candida* spp. et particulièrement *C. albicans* représentent la majorité des agents responsables d'IFI. Les autres étiologies par ordre décroissant sont : *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans* et d'autres levures, comme *Histoplasma capsulatum*.

Aux Etats-Unis, *Candida* spp. se place ainsi au quatrième rang des étiologies concernant les hémocultures positives <sup>4</sup>, avec une incidence annuelle allant de 6,0 à 13,3 cas pour 100 000 habitants <sup>4-6</sup>. Comparativement, en Europe, *Candida* spp. se situe dans le top 10 des pathogènes retrouvés dans les hémocultures, avec une incidence annuelle rapportée de 1,9 à 4,8 cas pour 100 000 habitants <sup>7</sup>.

Dans une étude prenant en compte 834 transplantés hépatiques entre 1989 et 1992, 6,6 % développent une infection fongique : 65 % de candidoses, 16 % d'aspergilloses, et 16 % de cryptococcoses. La mortalité globale de ces infections est alors de 54,5 % <sup>8</sup>.

Depuis, les méthodes chirurgicales et les soins post-opératoires se sont améliorés, faisant diminuer l'incidence des IFI dans cette population <sup>8</sup>.

Ainsi, dans l'étude EPIC II, qui est une étude rétrospective plus récente s'intéressant aux infections à *Candida* spp. dans les services de réanimation, la prévalence globale des candidémies était de 6,9 cas pour 1000 patients <sup>9</sup>.

Malgré cette diminution d'incidence, les IFI chez les transplantés hépatiques ont encore aujourd'hui un fort taux de mortalité : 92-100 % pour les aspergilloses invasives (AI), 70 % pour les candidoses invasives (CI) <sup>10</sup>.

## 3. Délai de survenue

Des études montrent que les IFI chez les transplantés hépatiques surviennent principalement dans une période précoce après la TH :

- Grauhan *et al.* rapportent que la majorité des IFI surviennent dans les 2 mois après la TH <sup>11</sup> ;
- Rabkin *et al.* retrouvent un temps moyen de développement d'une IFI de 15 jours après la TH <sup>12</sup> ;
- après analyse de 35 cas d'IFI, Husain *et al.* estiment que la durée médiane d'apparition de l'infection est de 13,5 jours, avec 72 % des infections survenant dans le premier mois après la TH <sup>10</sup>.

Cependant, d'autres auteurs suggèrent une différence dans le délai d'apparition des IFI selon l'agent étiologique. En effet, dans une étude de Singh *et al.* effectuée entre 1998 et 2001, 55 % des AI apparaissent dans les 90 jours après la transplantation, soit un délai plus long que celui observé pour les CI <sup>13</sup>.

Cette notion est à prendre en compte dans l'approche à avoir concernant la mise en place d'une prophylaxie antifongique.

#### 4. Facteurs de risque

L'identification des facteurs de risque prédisposant aux IFI chez les transplantés hépatiques est d'une importance capitale afin de guider la mise en place d'une prophylaxie.

Concernant les AI, Rosenhagen *et al.* rapportent les facteurs de risque suivants : retransplantation, infection à cytomégalovirus (CMV), dialyse, insuffisance rénale, thrombocytopénie et leucopénie <sup>14</sup>.

Pour les CI, Husain *et al.* soulignent que les facteurs de risque comportent l'utilisation préalable d'antibiotiques pour prévenir une péritonite bactérienne, une dialyse post-transplantation, une opération chirurgicale longue et compliquée, une transfusion per-opératoire, l'utilisation d'antibiotiques, une hospitalisation prolongée (en particulier en réanimation), des chirurgies abdominales répétées après la transplantation, la colonisation à *Candida* et la maladie à CMV <sup>10</sup>. Sur ce dernier point, il est d'ailleurs prouvé qu'une prophylaxie anti-CMV efficace permet de réduire l'incidence des IFI en l'absence de prophylaxie antifongique <sup>15</sup>.

Par ailleurs, dans une population de 152 patients transplantés hépatiques, Briegel *et al.* identifient deux autres facteurs de risque indépendants pour la survenue d'une IFI : la quantité de plasma transfusé due à une défaillance initiale du greffon et une insuffisance rénale aiguë nécessitant une hémofiltration ou une hémodialyse <sup>16</sup>.

Au total, les facteurs de risque d'IFI chez les transplantés hépatiques sont classés suivant le moment de la TH : facteurs de risque pré-opératoires, per-opératoires et post-opératoires. Nous les regroupons dans le Tableau 3.

**Tableau 3. Principaux facteurs de risque d'IFI chez les transplantés hépatiques**

Avant la TH	Pendant la TH	Après la TH
Age > 65 ans ou < 1 mois	Retransplantation	Retransplantation
Diabète	Type de transplantation	Hémodialyse
Déficit immunitaire constitutionnel ou acquis	Durée de l'intervention > 11 heures	Reprise chirurgicale
Sévérité de l'insuffisance hépatique	Anastomose bilio-digestive	Dysfonction du greffon
Hépatite fulminante	Transfusions massives	Bactériémie
MELD score > 20	Ventilation mécanique	Antibiothérapie à large spectre
UNOS-1	Dialyse MARS	Infection à CMV
Modification de la flore intestinale		Infection à HHV-6
Hémodialyse		Séjour en réanimation > 5 jours
Dispositif invasif		Nutrition parentérale totale
Statuts sérologiques vis à vis du CMV chez le donneur et le receveur		Corticothérapie
Chimiothérapie		Immunosuppresseurs
Corticothérapie		
Pancréatite		
Colonisation fongique		

De plus, de récentes recommandations d'experts rapportent les facteurs de risque spécifiques de CI chez les patients transplantés (Figure 3) <sup>17</sup>.

<b>Liver</b>	<b>High-Risk Liver Transplant Recipients:</b> <b>Major:</b> Retransplantation, fulminant hepatic failure, MELD $\geq$ 30 Renal failure requiring replacement therapy  <b>Minor:</b> MELD score 20-30, Split, Living-donor, choledochojejunostomy (Roux-en-Y), High transfusion requirement ( $\geq$ 40 units of cellular blood products), Renal failure not requiring replacement therapy (CrCl <50 mL/min), Early reintervention, multifocal Colonization/infection by <i>Candida</i> spp.
--------------	--

Figure 3. Facteurs de risque de CI chez les transplantés hépatiques, d'après Gavaldà *et al.*

## 5. Epidémiologie

Nous avons vu précédemment que les candidoses étaient de loin les IFI les plus fréquentes chez les transplantés hépatiques.

*C. albicans* est l'espèce la plus souvent retrouvée : 50 % à 70 % des cas selon les études <sup>18</sup>. Parmi les autres espèces, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées. Avec *C. albicans*, elles englobent plus de 90 % des candidoses <sup>19, 20</sup>. D'autres espèces sont plus rarement identifiées : *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. dubliniensis* et *C. norvegensis*.

Certaines espèces de *Candida* sont des endogènes commensaux du microbiote digestif (*C. albicans*, *C. glabrata*) tandis que d'autres sont des saprophytes cutanés (*C. parapsilosis*) et des muqueuses (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*).

Les CI peuvent avoir une porte d'entrée endogène (digestive et/ou cutanéomuqueuse) dès lors qu'un facteur favorisant survient (immunodépression, chirurgie, mise en place de cathéter...). L'utilisation d'antibiotique perturbe les microbiotes et peut donc aussi favoriser une infection fongique.

Bien que ce soit plus rare, l'isolat infectant peut avoir une origine exogène : contamination croisée, colonisation du greffon. Sur ce dernier point, des mesures de précaution sont recommandées : analyse mycologique des liquides de conservation d'organe, dépistage infectieux chez le donneur (sang, urines), signalement et prélèvement de toute brèche digestive chez le donneur au moment de l'incision...

Dans une étude française prospective (2002-2010) s'intéressant à l'incidence des candidémies en réanimation et ayant analysé plus de 2571 isolats, les proportions des différentes espèces retrouvées sont : *C. albicans* (56 %), *C. glabrata* (18,6 %), *C. parapsilosis* (11,5 %), *C. tropicalis* (9,3 %), *C. krusei* (2,9 %) et *C. kefyr* (1,8 %). La mortalité associée est de 51 % <sup>21</sup>.

A l'échelle européenne, une étude prospective multicentrique (2006-2008) s'intéressant aux CI chez les patients de réanimation chirurgicale et ayant analysé 807 isolats chez plus de 779 patients obtient des résultats assez proches : *C. albicans* (54 %), *C. parapsilosis* (18,5 %), *C.*

*glabrata* (13,8 %), *C. tropicalis* (6 %), *C. krusei* (2,5 %) <sup>22</sup>. *C. parapsilosis* arrive ainsi en seconde position sauf concernant les chirurgies abdominales où *C. glabrata* reste deuxième.

Quand on regarde la distribution des espèces en fonction des services cliniques, les études épidémiologiques récentes, notamment la cohorte internationale SENTRY, ne montrent pas de différences majeures entre les patients de réanimation et les autres. Dans les deux cas, les espèces les plus prévalentes sont les mêmes : *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. krusei* <sup>20, 23-25</sup>.

Il est important de souligner le fait que l'épidémiologie des CI varie selon les zones géographiques. Une étude évaluant la distribution géographique mondiale des candidémies rapporte ainsi que *C. albicans* est l'espèce la plus fréquente en Europe du Nord, en Europe Centrale et aux Etats-Unis tandis que les *Candida* non-*albicans* semblent prédominer en Europe du sud, en Asie et en Amérique du Sud. La plus forte proportion de *C. glabrata* se situe dans l'Europe du Nord et en Europe Centrale où il arrive juste après *C. albicans*. Toutefois, *C. parapsilosis* arrive second dans des régions plus au sud : Italie, Espagne, Amérique du sud. Pour *C. tropicalis*, la plus forte proportion est observée en Argentine et en Asie de l'est. Pour *C. krusei*, sa prévalence reste faible quelle que soit la région géographique <sup>26</sup>.

Ces données épidémiologiques changent depuis quelques années, avec de nombreuses études rapportant l'émergence des *Candida* non-*albicans* <sup>20, 21, 27-29</sup>. On attribue ce phénomène à l'utilisation des azolés en traitement prophylactique ou curatif. L'utilisation des échinocandines joue également un rôle.

Une récente étude de Lortholary *et al.* <sup>29</sup> montre ainsi que :

- les *Candida* moins sensibles ou résistants au fluconazole, en particulier *C. glabrata* et *C. krusei*, sont plus fréquemment isolés parmi les patients qui ont reçu un traitement récent par fluconazole ( $\leq 30$  jours) ;
- les *Candida* moins sensibles ou résistants à la caspofungine (CS) sont plus fréquemment isolés chez des patients qui reçoivent cette molécule ;
- la fréquence de *C. parapsilosis*, espèce connue pour avoir une sensibilité diminuée aux échinocandines, augmente après le traitement par CS (13 % *versus* 31 %).

Les autres facteurs avancés pouvant expliquer ces changements sont : une durée d'utilisation plus importante des cathéters veineux centraux, une chirurgie gastro-intestinale récente, l'âge plus avancé des patients transplantés ou encore l'utilisation des corticoïdes.

## 6. Diagnostic

La mise en évidence d'une IFI repose sur des signes cliniques, l'imagerie et les examens biologiques.

Le diagnostic précoce est difficile, car les signes cliniques sont non spécifiques et d'installation insidieuse. Le diagnostic biologique traditionnel par culture peut également être

mis en défaut pour différentes raisons, notamment un traitement antifongique préalable et des cultures parfois longues ou effectuées à partir d'un site non stérile et d'interprétation difficile.

Au total, il y a souvent un retard au diagnostic. C'est pourquoi des critères diagnostiques ont été mis en place pour aider le clinicien dans ses choix thérapeutiques.

### **a. Critères diagnostiques**

L'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) en Europe et le MSG (Mycoses Study Group) aux Etats-Unis ont avancé un certain nombre de critères afin de standardiser le diagnostic des IFI <sup>30</sup>. Cette classification permet de les différencier en 3 catégories : possible, probable ou prouvée.

Les différents critères utilisés sont :

#### **Critères d'hôte :**

- neutropénie récente :  $< 500/\text{mm}^3$  pendant plus de 10 jours ;
- allogreffes de cellules souches hématopoïétiques ;
- corticoïdes prolongés :  $> 0,3 \text{ mg/kg/j}$  de prednisone ou équivalent pendant plus de 3 semaines ;
- autres immunosuppresseurs cellulaires T dans les 90 derniers jours (ciclosporine, anti-TNF... ) ;
- déficit immunitaire constitutionnel.

#### **Critères cliniques et/ou radiologiques :**

- infection respiratoire basse avec au moins un des 3 signes suivants au scanner : lésion dense, bien circonscrite avec ou sans signe du halo ; croissant gazeux ; cavité ;
- trachéobronchite avec au moins un des signes suivants vu en fibroscopie bronchique : ulcération, nodule, pseudomembrane, plaque ou escarre ;
- infection naso-sinusienne à l'imagerie avec au moins un des 3 signes suivants : douleur aiguë localisée, ulcération nasale avec zone de nécrose, œdème péri-orbitaire ;
- infections du système nerveux central avec au moins un des 2 signes suivants : lésions focales à l'imagerie, rehaussement méningé au scanner ou à l'IRM (imagerie par résonance magnétique) ;
- candidose disséminée (dont hépatosplénique) avec au moins un des 2 signes suivants survenant dans les suites d'une candidémie dans les 15 jours : petits abcès hépatiques +/- spléniques, exsudats rétinien à l'examen ophtalmologique.

### **Critères mycologiques :**

- Détection directe :
  - examen cytologique, examen microscopique direct ou culture d'un champignon dans un crachat, un LBA (liquide broncho-alvéolaire), une aspiration sinusienne ou un brossage bronchique.
- Détection indirecte :
  - aspergillose : antigène galactomannane (GM) dans le plasma, le sérum, le LBA ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) ;
  - infections fongiques autres que cryptococcose et zygomycose : (1,3)- $\beta$ -D-glucane sérique (BDG).

Selon la présence ou l'absence de ces critères, on distingue ensuite les infections possibles, probables ou prouvées (Tableau 4).

**Tableau 4. Définitions des IFI selon les critères définis par le groupe de consensus EORTC/MSG (2008)**

<b>Infection prouvée</b>	<b>Infection probable</b>	<b>Infection possible</b>
Mise en évidence du champignon par examen microscopique direct ou culture à partir du sang et de prélèvements tissulaires ou de sites normalement stériles (hors sinus, urines, LBA)	1 critère lié à l'hôte + 1 critère clinique + 1 critère mycologique	1 critère lié à l'hôte + 1 critère clinique

Ces critères sont utilisés lors de l'inclusion de patients dans des protocoles cliniques pour assurer une homogénéité des études. Toutefois, ils ne sont pas toujours exploités dans la pratique clinique<sup>31</sup>.

### **b. Tests sériques**

Jusqu'ici, le biomarqueur idéal pour le diagnostic des IFI chez les immunodéprimés, notamment les transplantés hépatiques n'existe pas puisque ceux actuellement utilisés peuvent être influencés par de nombreux facteurs.

L'identification de l'espèce de *Candida* par les méthodes traditionnelles (examen microscopique direct, culture puis identification) peut nécessiter plusieurs jours et les cultures positives sont souvent issues de sites non stériles (plus faciles à prélever), les hémocultures (Gold Standard) n'étant positives que dans environ 50 % des cas<sup>32</sup>. Dès lors, le diagnostic est au départ souvent guidé par la clinique et l'imagerie.

Récemment, de nouvelles méthodes de diagnostic des IFI ont été ajoutées aux méthodes de déjà disponibles. Il s'agit du GM, l'antigène mannane, l'anticorps anti-mannane et le BDG. Le GM ne sera pas abordé ici puisqu'il concerne le diagnostic des AI.

i. Antigène mannane et anticorps anti-mannane

L'antigène mannane est un polysaccharide retrouvé dans la paroi cellulaire des *Candida*. Il est libéré dans le sang lors d'une CI. Les tests commercialisés en Europe détectant l'antigène mannane et les anticorps anti-mannane sont le Platelia *Candida* Ag Plus<sup>®</sup> et le Platelia *Candida* Ab Plus<sup>®</sup> (Bio-Rad).

Une revue publiée en 2010 par l'ECIL (European Conference on Infections in Leukaemia) montre que la sensibilité et la spécificité de l'antigène mannane et de l'anticorps anti-mannane sont respectivement de 58 % et 93 % et 59 % et 83 % quand ils sont utilisés séparément. Cette sensibilité s'élève à 83 % sans réduction significative de la spécificité (86 %) quand les tests sont combinés<sup>33</sup>. Il est donc recommandé d'utiliser les deux tests dans le diagnostic des CI.

Un autre intérêt de ces tests à la précocité de leurs positivités. Yera *et al.* obtiennent ainsi des tests positifs chez 73 % des patients de leur cohorte, 2 à 15 jours avant la positivité des hémocultures<sup>34</sup>. De même, dans une étude sur les candidoses hépatospléniques, au moins un test est positif avant les signes radiologiques chez 86 % des patients<sup>35</sup>. Néanmoins, dans une étude rétrospective sur les candidémies en réanimation, Poissy *et al.* rapportent que l'antigène mannane est moins sensible et apparaît plus tardivement que le BDG<sup>36</sup>.

Il faut aussi garder à l'esprit que la performance de ces tests varie selon l'espèce de *Candida*. Ils sont assez sensibles pour *C. albicans* (80-100 %), *C. glabrata* et *C. tropicalis*. En revanche, il sont moins performants pour *C. parapsilosis* et *C. krusei* (40-50 %). Les performances varient aussi selon la population : détection des anticorps plus facile chez les patients non neutropéniques que chez les patients immunodéprimés<sup>37</sup>.

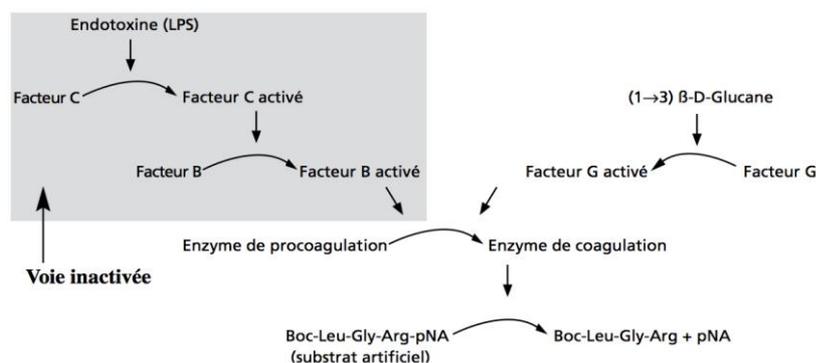
D'autres études sont ainsi nécessaires pour évaluer leur performance, en particulier chez les patients transplantés hépatiques.

ii. (1,3)- $\beta$ -D-glucane

Le BDG est un polysaccharide majeur de la paroi de nombreux champignons (hors zygomycètes et *Cryptococcus* spp.).

Pour le détecter, différents tests diagnostiques existent dans le monde. Celui commercialisé en France est le Fungitell<sup>®</sup> (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA, USA).

Il s'agit d'un dosage colorimétrique reposant sur la capacité du BDG à activer la cascade de la coagulation au sein d'un lysat d'amœbocytes issu de l'hémolymph de *Limulus polyphemus* (Figure 4).



**Figure 4. Capacité du BDG à activer la cascade de la coagulation au sein d'un lysat d'amœbocytes issu de l'hémolymph de *Limulus polyphemus***

Dans ce test, le facteur C a été éliminé du lysat afin d'éviter une éventuelle activation pour le LPS. Le BDG active le facteur G (un zymogène à sérine protéase), ce qui induit l'activation de la cascade et la formation de p-Nitro-Aniline (pNA), une molécule colorée. Dès lors, à l'aide d'une courbe d'étalonnage et de la mesure de la densité optique (405 nm), il est possible de mesurer la concentration de BDG présent dans l'échantillon.

La zone de mesure est de 31 à 500 pg/mL. Les valeurs < 60 pg/mL sont considérées comme négatives. Des valeurs entre 60 et 79 pg/mL suggèrent une possible infection fongique. Celles  $\geq$  80 pg/mL sont considérées comme positives.

Concernant les transplantés hépatiques, Akamatsu *et al.* ont étudié l'impact d'un traitement antifongique préemptif à partir d'une valeur de BDG à 40 pg/mL (test Fungitec G<sup>®</sup>, Seikagaku Biobusiness, Tokyo, Japon), confirmée sur un deuxième sérum prélevé dans les 48 heures. La sensibilité et la spécificité du BDG pour la détection des IFI sont de 58 % et 83 % respectivement, avec une valeur prédictive positive de 35 % et une valeur prédictive négative de 93 %. Cette stratégie mérite des études plus poussées pour déterminer notamment un seuil de positivité approprié pour l'initiation du traitement <sup>38</sup>.

L'un des inconvénients de ce test est qu'il existe potentiellement de nombreuses causes de faux positifs, le BDG étant aussi présent dans l'environnement.

Les principales causes de faux positifs sont regroupées dans le Tableau 5.

**Tableau 5. Principales causes de faux positifs lors du dosage du BDG**

<b>Faux positifs lors du dosage du (1,3)-<math>\beta</math>-D-glucane</b>
Bactériémie (en particulier pour les bacilles à Gram négatif par présence d'endotoxines)
Traitement par albumine ou par immunoglobulines
Utilisation de membranes ou de filtres de cellulose (hémodialyse)
Utilisation de compresses en coton (chirurgie)
Utilisation de certains antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, colistine, triméthoprime-sulfaméthoxazole...)

### iii. Test CAGTA

Le test CAGTA (*Candida albicans* Germ Tube Antibody) est un autre test sérique qui a été introduit afin d'améliorer le diagnostic des CI. L'un de ses inconvénients semble être le manque de spécificité. Une récente étude effectuée en réanimation souligne ainsi un faible pouvoir discriminatoire entre colonisation et infection <sup>39</sup>.

Au total, ces tests sériques sont importants pour le diagnostic des IFI et une combinaison de ceux-ci peut être utile pour détecter les réactions faussement positives. Toutefois, ils ne peuvent pas suffire à eux seuls pour diagnostiquer une IFI.

### **c. Tests génotypiques**

La biologie moléculaire peut permettre la détection rapide d'un large panel de champignons, et être utilisée pour détecter précocement une infection ainsi que pour en suivre son évolution.

De nombreuses méthodes existent : PCR (Polymerase Chain Reaction) nichée, PCR-ELISA, hybridation sur sondes spécifiques, séquençage, PCR en temps réel... Ces techniques sont plus ou moins spécifiques (PCR *Candida*, PCR *Aspergillus*, PCR pan-fongique) et peuvent être utilisées sur différentes matrices (sang, prélèvement respiratoire, biopsie...).

Les régions génomiques recherchées se situent en général au niveau des gènes codant les ARN ribosomiaux (18S, 28S et 5,8S), en particulier sur le domaine D1/D2 de la sous-unité 26S ou alors sur les régions ITS (Internal Transcribed Spacer) : ITS1 et ITS2.

Les performances sont variables selon les études. Par exemple, en comparant le test Fungitell<sup>®</sup> à une PCR *Candida*, une étude rapporte que la PCR a une meilleure sensibilité pour le diagnostic de CI (80 % *versus* 56 %), avec une spécificité similaire (70 % *versus* 73 %) <sup>40</sup>. Cela est d'autant plus vrai dans les candidoses profondes (89 % de sensibilité pour la PCR *versus* 53 % pour le Fungitell<sup>®</sup>). Dans la même étude, il est aussi montré que la sensibilité des hémocultures combinées à la PCR ou au BDG chez les patients atteints de CI est de 98 % et 79 % respectivement <sup>40</sup>. Dès lors, cela suggère que la PCR couplée aux hémocultures serait un bon moyen diagnostique. Une autre étude faisant une méta-analyse sur l'intérêt de la PCR dans le diagnostic des CI retrouve une sensibilité variant de 73 % à 100 %, avec une spécificité allant de 92 % à 100 % <sup>41</sup>. De plus, dans l'étude de Avni *et al.*, il y a une tendance à une plus faible spécificité dans le diagnostic des CI chez les patients colonisés <sup>41</sup>.

Enfin, en Europe, une PCR multiplex en temps réel (SeptiFast, Roche) qui détecte 19 bactéries et 6 champignons (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* et *A. fumigatus*) a été testée dans plusieurs études chez des patients neutropéniques fébriles ou en sepsis. Dans une de ces études, la sensibilité du test était de 94 %, avec un seul faux négatif (candidémie à *C. famata*) <sup>42</sup>.

Au total, l'une des grandes limites de l'utilisation de la PCR dans les CI est le manque de standardisation ainsi que l'absence de grandes études multicentriques sur leurs performances.

## d. Bilan de colonisation

### i. Index de colonisation

Il est admis depuis longtemps que la colonisation fongique est un facteur de risque de candidémie et certains auteurs ont tenté de mettre au point des « scores » afin d'aider à la mise en place d'un traitement antifongique.

Ainsi en 1994 Pittet *et al.* proposent le concept de l'index de colonisation <sup>43</sup>. Son calcul est simple : nombre de sites colonisés avec la même espèce/nombre total de sites étudiés. Un patient est considéré comme colonisé si cet index est  $> 0,5$ , et plus la valeur est élevée, plus le risque de développer une infection est important.

Un index de colonisation corrigé a ensuite été introduit : index de colonisation multiplié par le *ratio* du nombre de sites fortement colonisés (culture  $\geq 10^5$  UFC/mL) sur le nombre de sites totaux colonisés. Cela a notamment permis d'augmenter la spécificité, avec une valeur prédictive positive de 100 % quand l'index de colonisation corrigé est  $\geq 0,4$ .

En 2004, une étude de Piarroux *et al.* démontre l'intérêt de ce score chez des patients admis en réanimation. En effet, il y a moins de candidoses prouvées par rapport au groupe contrôle (3,8 % *versus* 7 %) chez les patients traités de manière préemptive par fluconazole dès que l'index de colonisation corrigé est  $\geq 0,4$  <sup>44</sup>.

Toutefois, une autre étude de Pétri *et al.* effectuée chez des patients de réanimation rapporte un taux de colonisation de 56 % pour un taux d'infection de seulement 2 % <sup>45</sup>.

### ii. « Candida score »

Après avoir effectué une étude chez plus de 1699 patients non neutropéniques de réanimation, Léon *et al.* ont élaboré le « *Candida score* » <sup>46</sup>. Ce score avait alors une sensibilité de 81 % et une spécificité de 74 %. Les modalités de son calcul sont présentées dans le Tableau 6.

**Tableau 6. Modalités du calcul pour établir le « *Candida score* »**

---

***Candida score* = 1 x (nutrition parentérale) + 1 x (chirurgie)**

**+ 1 x (colonisation multifocale à *Candida spp.*) + 2 x (sepsis sévère)**

Codage de toutes les variables : absence = 0, présence = 1

Une colonisation multifocale à *Candida spp.* est définie par plus de deux sites colonisés

Indication à un traitement antifongique précoce : « *Candida score* »  $> 2,5$

---

Par la suite, il a été montré que son intérêt réside surtout dans la bonne valeur prédictive négative pour les CI, qui est de 97,7 % quand le score est  $\geq 3$  <sup>47</sup>.

## e. Recommandations internationales

Les techniques diagnostiques recommandées par l'European Society of Microbiology and Infectious Disease (ESCMID) pour les CI sont les suivantes (Tableau 7) <sup>48</sup>.

Tableau 7. Techniques recommandées par l'ESCMID dans le diagnostic des CI

Situation clinique	Techniques recommandées
Candidémie	Hémocultures
	Mannane/Anti-mannane
	(1,3)- $\beta$ -D-glucane
Candidose profonde	Hémoculture
	(1,3)- $\beta$ -D-glucane
	Examen microscopique direct, culture et histopathologie des tissus et/ou liquides biologiques stériles

A noter que pour les hémocultures, il est préconisé de prélever 3 paires par jour, avec une incubation minimale de 5 jours. Concernant les tests sériques, des dosages répétés sont recommandés.

## 7. Candidoses invasives

Les candidoses sont les infections fongiques les plus fréquentes chez les transplantés hépatiques.

En plus des candidémies, les principales manifestations cliniques rapportées sont des endophtalmies, endocardites, ostéites, arthrites, atteinte hépatique et rénale (abcès). Concernant les transplantés hépatiques, il faut aussi évoquer le risque important d'infection intra-abdominale après la chirurgie : abcès abdominaux, cholangites récurrentes et péritonites <sup>49</sup>.

Certaines équipes effectuent une décontamination digestive sélective avec des antifongiques ne passant pas la barrière intestinale : nystatine, amphotéricine B (AMB) et le clotrimazole. Cela permet de réduire la charge fongique intestinale, ce qui limite en théorie le risque de translocation. L'efficacité clinique de cette pratique reste néanmoins inconnue.

## 8. Autres infections fongiques invasives

### a. Aspergillose

Après les candidoses, les aspergilloses sont les infections fongiques les plus fréquentes chez les transplantés hépatiques. Elles n'en restent pas moins d'une grande importance car l'amélioration des techniques chirurgicales et du suivi médical chez ces patients ne s'est pas accompagnée d'une baisse de leur fréquence. La mortalité reste encore élevée, jusqu'à 80 % dans certaines études <sup>50</sup>.

*Aspergillus* spp. est ubiquitaire dans l'environnement, à l'extérieur comme à l'intérieur de l'hôpital ou des habitats. L'inhalation de spores peut entraîner une pathologie pulmonaire, avec de possibles disséminations au niveau du système nerveux central et d'autres organes. En pratique, seules quelques espèces sont pathogènes chez l'homme. La plus fréquente est *A. fumigatus*.

Le diagnostic est complexe du fait d'une culture fongique parfois négative et de l'absence de signes cliniques bien spécifiques. L'imagerie est souvent d'une grande aide. En effet, des opacités nodulaires entourées d'une zone d'atténuation (signe du « halo ») peuvent être présentes. Plus tardivement, des lésions nodulaires avec infiltration pulmonaire diffuse en verre dépoli peuvent apparaître.

Le traitement doit être institué devant toute suspicion d'infection, sans attendre les résultats biologiques. Il fait généralement appel au voriconazole.

## **b. Cryptococcose**

La cryptococcose est la troisième cause d'IFI chez les transplantés hépatiques. *C. neoformans* est un champignon saprophyte ubiquitaire dans le monde. Il est trouvé dans les fientes d'oiseaux, en particulier des pigeons. Des sources non aviaires sont également décrites.

L'infection se développe généralement après inhalation de spores de l'environnement. L'atteinte pulmonaire initiale peut être asymptomatique ou non. Lorsqu'il y a dissémination de l'infection, elle affecte le plus souvent le système nerveux central avec l'apparition d'une méningo-encéphalite<sup>49, 51</sup>. D'autres organes peuvent également être atteints.

Une étude effectuée sur la cryptococcose chez des transplantés estime que la maladie survient dans 12 cas pour 1000 patients. Les signes cliniques rapportés sont présents en moyenne 30 mois après la transplantation. Les principales manifestations signalées sont une pneumopathie isolée (46 %), une méningite isolée (36 %), une infection disséminée à plusieurs organes (11 %), ou d'un seul organe (7 %). Le taux de mortalité associé est de 25 %<sup>52</sup>.

Le diagnostic biologique repose sur l'isolement de la levure à partir du sang circulant, du LCR, des urines ou encore des produits pulmonaires. La levure peut également être vue à l'examen microscopique direct du LCR à l'aide de l'encre de Chine. La culture peut être longue (jusqu'à 10 jours) et sa négativité n'exclue pas le diagnostic. Des techniques recherchant l'antigène cryptococcique dans le sang et le LCR existent. Elles améliorent la sensibilité du diagnostic et permettent un diagnostic plus rapide.

Des recommandations concernant la prise en charge de l'infection sont publiées par l'Infectious Disease Society of America (IDSA)<sup>53</sup>. Le traitement de départ fait appel à l'AMB associé à la 5-fluorocytosine (5-FC) pendant au moins 2 semaines, suivi d'un relais par fluconazole pendant plusieurs semaines.

### **c. Pneumocystose**

*Pneumocystis jiroveci* est responsable d'infections dont l'incidence est reconnue chez les patients immunodéprimés (1-11 % chez les transplantés hépatiques sans prophylaxie).

Cette incidence décroît dès lors qu'il y a mise en place d'une prophylaxie par triméthoprime-sulfaméthoxazole.

La pneumocystose apparaît le plus souvent dans les 7 mois après la TH et se caractérise par une triade symptomatique (fièvre, toux, dyspnée) associée à des infiltrats interstitiels bilatéraux à l'imagerie. Dans certains cas, une détresse respiratoire est observée.

Le diagnostic biologique repose essentiellement sur des prélèvements respiratoires (LBA, crachats induits...) dans lesquels un examen microscopique direct et une PCR sont réalisés. Dans de rares cas, une biopsie pulmonaire est requise pour le diagnostic.

Un traitement doit être systématiquement mis en place en cas de diagnostic confirmé microbiologiquement, étant donné une mortalité élevée (7-88 % selon les études). L'association triméthoprime-sulfaméthoxazole par voie intraveineuse est le traitement standard. Une autre possibilité est l'utilisation de pentamidine (seule ou combinée au triméthoprime-sulfaméthoxazole) ou de primaquine associée à de la clindamycine <sup>54</sup>.

### **d. Histoplasmose**

*H. capsulatum* est notamment présent dans le sol de certaines régions (Etats-Unis, Amérique du sud...). Ce champignon opportuniste peut passer d'une forme filamenteuse sporogène dans le sol à une forme de levure chez l'homme.

L'incidence de l'histoplasmose chez les patients transplantés hépatiques est faible, avec seulement de petites séries décrites <sup>55-58</sup>. Le plus souvent, la contamination se fait par réactivation chez le receveur mais des cas de transmission par le donneur ont été décrits. Botterel *et al.* ont ainsi rapporté une histoplasmose transmise par le greffon chez un patient transplanté hépatique <sup>56</sup>. Les signes cliniques sont peu spécifiques avec fièvre, toux, dyspnée, et asthénie.

Le diagnostic biologique fait appel à la culture. Elle peut s'effectuer à partir du sang circulant ou de la moelle osseuse, voire de biopsies d'organes. L'anatomo-pathologie peut également être utile.

Selon les recommandations de l'IDSA, le traitement doit commencer par l'AMB. L'itraconazole peut aussi être efficace. Il est d'ailleurs parfois recommandé en relais par voie orale, après un traitement par AMB <sup>59, 60</sup>.

## D. Traitements des candidoses invasives en post-transplantation hépatique

### 1. Les molécules disponibles

A la différence des bactéries, les champignons sont des organismes eucaryotes. Cela a longtemps été un frein au développement d'antifongiques. Depuis les années 2000, l'arsenal des antifongiques systémiques s'est néanmoins considérablement élargi, avec l'apparition de nouveaux triazolés (voriconazole, posaconazole...) et d'une nouvelle classe thérapeutique (échinocandines).

Comme le souligne la Figure 5, on distingue les molécules qui agissent sur la paroi cellulaire (échinocandines) et la membrane plasmique (polyènes) de celles qui agissent sur les acides nucléiques (5-FC) et la synthèse des stérols (azolés) <sup>61</sup>.

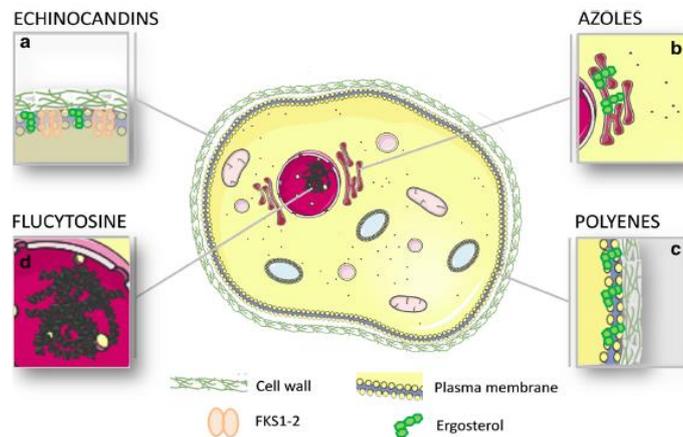


Figure 5. Mécanismes d'action des différents antifongiques, d'après Maubon *et al.*

(A) Les échinocandines ciblent la paroi fongique en inhibant la synthèse du BDG. (B) Les azolés ciblent la membrane cellulaire en inhibant la synthèse de l'ergostérol au niveau du réticulum endoplasmique. (C) Les polyènes se fixent à la membrane cellulaire ce qui crée des pores à l'origine d'une fuite électrolytique. (D) La 5-FC agit dans le compartiment nucléaire, où ses toxiques métaboliques inhibent la synthèse des acides nucléiques.

#### a. Polyènes

Aujourd'hui, les polyènes sont principalement représentés par l'AMB et ses dérivés lipidiques : AMB liposomale (L-AMB), amphotéricine B lipidique (ABLC) et amphotéricine B en dispersion colloïdale (ABCD). La fixation de cette molécule macrocyclique à l'ergostérol permet la formation de pores dans la membrane fongique. Cela conduit à une fuite extracellulaire des électrolytes et à un effet fongicide. L'AMB a également une activité de peroxydation des lipides membranaires et intracellulaires. D'autre part, des études suggèrent qu'elle est capable de s'agréger et d'agir comme une « éponge » extrayant l'ergostérol de la membrane cellulaire <sup>62</sup>.

Un inconvénient de l'AMB est qu'elle peut aussi se fixer au cholestérol, molécule proche de l'ergostérol et présente dans les membranes cellulaires humaines. Dès lors, elle est responsable d'une forte toxicité, en particulier rénale. Les nouvelles formulations augmentent sa spécificité et diminuent sa toxicité.

### **b.5-fluorocytosine**

La 5-FC est un analogue pyrimidique qui pénètre dans la cellule via la cytosine perméase (Fcy2p). Il est converti en 5-fluorouracil (5-FU) sous l'action de la cytosine déaminase (Fcy1p). Le 5-FU est ensuite phosphorylé par l'uracil phosphoribosyl transférase (Fur1p) et inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN par inhibition de la thymidilate synthétase.

### **c. Azolés**

Parmi les azolés, on distingue les imidazolés (miconazole et kétoconazole) et les triazolés (fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole). Ces derniers sont moins toxiques et plus spécifiques. Ce sont donc eux qui sont utilisés dans le traitement des IFI. Récemment, un nouveau triazolé à spectre large, l'isavuconazole, a été développé.

Ils bloquent la synthèse de l'ergostérol, le principal stérol de la membrane cellulaire fongique, en inhibant la lanostérol-14- $\alpha$ -déméthylase (Erg11p ou Cyp51p).

Cela aboutit à plusieurs effets :

- déplétion d'ergostérol et changements dans la perméabilité membranaire ;
- perturbation de l'activité des protéines liées à la membrane ;
- synthèse et accumulation de stérols toxiques méthylés (lié à l'activité de l'Erg3p).

Par ailleurs, il semblerait que les azolés agissent aussi sur la paroi fongique mais à un niveau moindre. Des études rapportent en effet des réponses cellulaires de compensation similaires à celles observées sur des cellules soumises à un traitement agissant sur la paroi cellulaire<sup>63, 64</sup>.

### **d.Echinocandines**

Les échinocandines sont des lipopeptides. Elles sont actuellement représentées par 3 molécules : la CS, la micafungine (MCF) et l'anidulafungine (ANF).

Elles agissent en inhibant la sous-unité catalytique Fksp de la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase, une enzyme catalysant la première étape de l'élongation du BDG, composant majeur de la paroi fongique. Il s'agit d'une cible idéale puisqu'elle est absente des cellules humaines.

Le maintien de la paroi cellulaire étant essentiel, les échinocandines ont habituellement une activité fongicide *in vitro* sur les isolats de *Candida* sensibles. Elles sont aussi actives *in vitro* et *in vivo* sur les biofilms fongiques. En revanche, elles possèdent une activité fongistatique sur les filamenteux et n'ont pas d'action sur les Mucorales, *C. neoformans* et *Fusarium* spp.

En termes de tolérance, les toxicités hépatiques et rénales sont faibles, et il existe peu d'interactions médicamenteuses. Toutefois, elles présentent une faible biodisponibilité par voie orale, ce qui justifie une utilisation par voie intraveineuse, et diffusent peu dans le système nerveux central, l'œil et les urines.

Au total, il existe donc quatre classes d'antifongiques pouvant être utilisées dans le traitement des IFI. Les caractéristiques de chaque molécule sont regroupées dans le Tableau 8.

**Tableau 8. Antifongiques disponibles pour le traitement des IFI**

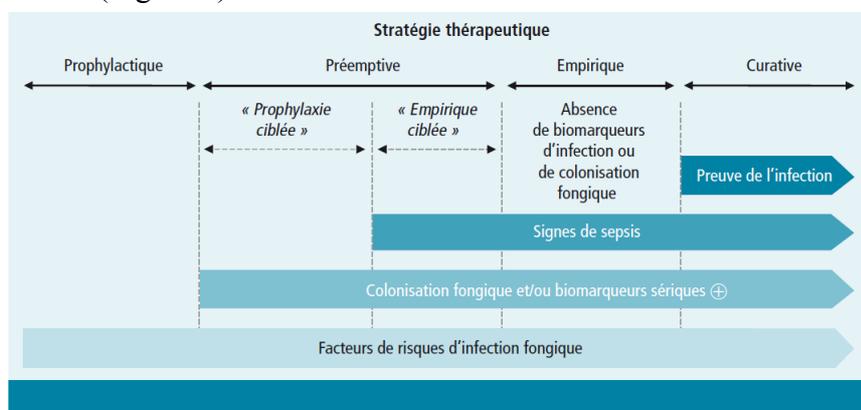
Famille	Molécule	Spécialité	Voie d'administration <sup>a</sup>	Posologie usuelle
<b>Polyènes</b>	Amphotéricine B	Fungizone <sup>®</sup>	IV	1 mg/kg/j
		Ambisome <sup>®</sup>	IV	3 mg/kg/j
		Abelcet <sup>®</sup>	IV	5 mg/kg/j
<b>Azolés</b>	Fluconazole	Triflucan <sup>®</sup>	IV/PO	400 mg/j
		Sporanox <sup>®</sup>	PO	400 mg/j
		Vfend <sup>®</sup>	IV/PO	400 mg/j
		Noxafil <sup>®</sup>	PO	800 mg/j
<b>Echinocandines</b>	Caspofungine	Cancidas <sup>®</sup>	IV	50 mg/j
		Mycamine <sup>®</sup>	IV	100 mg/j
		Anidulafungine	IV	100 mg/j
<b>Analogues de pyrimidines</b>	5-fluorocytosine	Ancotil <sup>®</sup>	IV/PO	100 mg/kg/j

<sup>a</sup> IV, intraveineuse ; PO, *per os*.

## 2. Les différentes stratégies thérapeutiques

Différentes stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées en fonction de l'estimation du risque d'IFI et du degré de certitude diagnostique.

On distingue ainsi plusieurs types de traitement : prophylactique, préemptif, empirique (ou anticipé) et curatif (Figure 6).



**Figure 6. Les différents types de traitements antifongiques,**

**d'après le BEH (bulletin épidémiologique hebdomadaire) d'avril 2013**

L'IDSA et l'ESCMID ont établi des recommandations pour l'initiation d'un traitement prophylactique, préemptif, empirique et curatif. Concernant les transplantés hépatiques, les

recommandations à suivre sont celles proposées pour les patients de réanimation non-neutropéniques, aucune recommandation spécifique n’ayant été faite pour cette catégorie de patients.

### a. Traitement préventif

Les critères pour débiter un traitement antifongique prophylactique sont encore mal définis et doivent tenir compte du risque potentiel de toxicité, de sélection de résistance et des coûts engendrés.

Les recommandations de l’ESCMID (2012) :

Elles sont regroupées dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Traitement prophylactique recommandé par l’ESCMID pour les CI (2012)**

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE
Recent abdominal surgery AND recurrent gastrointestinal perforations or anastomotic leakages	To prevent intraabdominal <i>Candida</i> infection	Fluconazole 400 mg/day	B	I
		Caspofungin 70/50 mg/day	C	II <sub>u</sub>
Critically ill surgical patients with an expected length of ICU stay ≥3 day Ventilated for 48 h and expected to be ventilated for another ≥72 h	To delay the time to fungal infection	Fluconazole 400 mg/day	C	I
	To prevent invasive candidiasis/candidaemia	Fluconazole 100 mg/day	C	I
Ventilated, hospitalized for ≥3 day, received antibiotics, CVC, and ≥1 of: parenteral nutrition, dialysis, major surgery, pancreatitis, systemic steroids, immunosuppression Surgical ICU patients	To prevent invasive candidiasis/candidaemia	Caspofungin 50 mg/day	C	II <sub>a</sub>
	To prevent invasive candidiasis/candidaemia	Ketoconazole 200 mg/day	D	I
Critically ill patients with risk factors for invasive candidiasis/candidaemia Surgical ICU with catabolism	To prevent invasive candidiasis/candidaemia	Itraconazole 400 mg/day	D	I
	To prevent invasive candidiasis/candidaemia	Nystatin 4 Mio IU/day	D	I

Selon l’ESCMID, le fluconazole est donc recommandé en prophylaxie chez les patients ayant eu une chirurgie abdominale récente, des perforations gastro-intestinales ou des fuites anastomotiques récurrentes.

Les recommandations de l’IDSA (2016) :

L’IDSA a établi des recommandations pour les patients de réanimation. Elle préconise l’utilisation du fluconazole (400 mg/jour soit 6 mg/kg/j) chez les patients à haut risque. Les échinocandines sont recommandées en alternative.

Bien qu’il n’y ait pas de réel consensus chez les transplantés hépatiques, une prophylaxie antifongique courte est donc habituellement recommandée après TH chez les patients à haut risque.

En l’absence de traitement antifongique préventif, l’incidence d’IFI est de 36 % chez les patients transplantés hépatiques à haut risque de développer une CI ou une aspergillose<sup>65</sup>. Au contraire, en l’absence de facteurs de risque, la fréquence d’IFI est inférieure à 4 %<sup>66</sup>. Des études rétrospectives et prospectives sur des cohortes validées ont rapporté que des patients ayant au moins deux facteurs de risque sont plus à risque de développer une IFI et devraient faire l’objet d’une prophylaxie antifongique<sup>67</sup>.

Dans l'étude de Saliba *et al.* <sup>68</sup>, il est démontré que les patients avec un MELD score supérieur à 20 et surtout au-dessus de 30 sont plus à risque de faire des infections fongiques. Selon eux, les patients ayant un MELD score supérieur ou égal à 20 doivent donc être mis sous prophylaxie antifongique précocement après TH. Malheureusement, les critères d'identification des patients à haut risque restent flous et controversés <sup>69</sup>.

En conclusion, compte-tenu des études antérieures montrant l'influence importante des infections fongiques sur la morbidité et mortalité des TH ainsi que l'effet bénéfique de la prophylaxie, il est important de savoir identifier avec précision les patients à haut risque afin d'entreprendre une prophylaxie ciblée. De récentes recommandations d'experts détaillent ainsi les facteurs de risque des CI à prendre en compte pour l'instauration d'un traitement prophylactique (Figure 3).

## b. Traitements préemptif et empirique

### Les recommandations de l'ESCMID :

Elles sont regroupées dans le Tableau 10.

**Tableau 10. Recommandations de l'ESCMID pour le traitement empirique et préemptif des CI**

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE
Adult ICU patients with fever despite broad-spectrum antibiotics and APACHE II > 16	To resolve fever	Fluconazole 800 mg/day	D	I
ICU patients persistently febrile, but without microbiological evidence	To reduce overall mortality	Fluconazole or echinocandin	C	II <sub>u</sub>
ICU patients with candida isolated from respiratory secretions	To cure invasive candidiasis or candidaemia early	Any antifungal	D	II <sub>u</sub>
ICU patients with positive (1,3)- $\beta$ -D-glucan test <sup>a</sup>	To cure invasive candidiasis or candidaemia early	Any antifungal	C	II <sub>u</sub>
Any patient with <i>Candida</i> isolated from a blood culture	To cure invasive candidiasis	Antifungal treatment	A	II

Pour le traitement empirique (patient à haut risque de CI et ayant une fièvre persistante sans critères microbiologiques d'infection), un traitement antifongique précoce est associé à un meilleur taux de survie, mais le moment optimal pour l'initiation de ce traitement reste indéterminé.

De plus, étant donné le peu de données, aucune recommandation n'est faite par l'ESCMID quant au choix de l'antifongique à utiliser. Il faut utiliser un des antifongiques recommandés en cas de candidémie (une échinocandine, voire le fluconazole) mais le choix sera fait selon l'épidémiologie locale et les interactions médicamenteuses pour chaque patient.

Pour le traitement préemptif (patient à haut risque de CI avec des critères microbiologiques en faveur d'une candidose mais sans preuve d'infection invasive), les recommandations de l'ESCMID sont aussi assez floues par manque d'études validées. En tout cas, il est admis que l'isolement de *Candida* dans les sécrétions respiratoires ne doit pas entraîner l'instauration d'un traitement mais doit être considéré comme un site supplémentaire de colonisation parmi d'autres. L'initiation d'un traitement suite à la détection du BDG dans le sérum ou plasma

reste controversée et mérite selon l'ESCMID des études complémentaires. En effet, il ne possède pas une assez bonne valeur prédictive positive du diagnostic de CI pour en faire le critère majeur d'initiation d'un traitement préemptif. Cependant, il fait partie intégrante des tests diagnostiques utiles devant une suspicion de CI en raison de son excellente valeur prédictive négative.

#### Les recommandations de l'IDSA (2016) :

L'IDSA recommande l'initiation d'un traitement antifongique empirique chez les patients à risque de CI et ne présentant pas d'autres causes de fièvre. Le traitement à instaurer est similaire à celui d'une CI prouvée, soit une échinocandine parmi la CS (dose de charge de 70 mg puis 50 mg/jour), la MCF (100 mg/jour), et l'ANF (dose de charge de 200 mg puis 100 mg/jour), soit le fluconazole (dose de charge de 800 mg [12mg/kg], puis 400 mg/jour [6 mg/kg]).

Une échinocandine est à privilégier dans les cas suivants :

- patient cliniquement modérément sévère à sévère ;
- haut risque d'infection à *C. glabrata* ou *C. krusei* ;
- exposition récente aux azolés.

Un traitement par fluconazole peut être envisagé chez un patient non sévère et connu pour être colonisé avec une espèce de *Candida* sensible aux azolés ou qui n'a pas eu d'exposition récente aux azolés. La L-AMB (Ambisome® 0,5-1 mg/kg/j ou Abelcet® 3-5 mg/kg/j) est une alternative en cas d'intolérance aux autres antifongiques. Dans tous les cas, la durée de traitement recommandée est de 2 semaines si l'état du patient s'améliore.

Cependant, peu d'études ont examiné avec précision l'impact d'un traitement empirique ou préemptif sur les CI. Une étude de Piarroux *et al.* rapporte qu'un traitement préemptif par fluconazole, chez des patients colonisés de réanimation chirurgicale, est associé à une diminution de l'incidence des cas de candidoses prouvées<sup>44</sup>. Dans une autre étude, ce même traitement précoce chez des patients en post-chirurgie abdominale a un impact sur la résolution de la fièvre, l'incidence des candidémies, la durée d'hospitalisation en réanimation et la mortalité<sup>70</sup>. Cependant, dans une étude plus récente, le traitement empirique par fluconazole n'est pas associé à une meilleure issue comparé au *placebo*<sup>71</sup>.

Malgré ces recommandations, les critères d'initiation d'un traitement antifongique empirique ou préemptif restent donc mal définis. L'instauration précoce d'un tel traitement semble réduire la morbidité, la mortalité et la durée d'hospitalisation mais l'utilisation large de ces agents antifongiques doit être mesurée au risque de la toxicité, des coûts engendrés et de l'émergence des résistances.

### **c. Traitement curatif**

Pour le traitement curatif des CI, trois grands groupes (incluant deux sociétés scientifiques) ont établis leurs propres recommandations internationales : l'ESCMID en 2012 <sup>48</sup>, l'IDSA en 2016 <sup>72</sup> et l'ECIL en 2009 <sup>73</sup>.

Par manque d'études ciblées chez les patients transplantés d'organes solides, la stratégie thérapeutique pour le traitement curatif suit celle utilisée chez les patients non neutropéniques. Pour le traitement initial, les trois groupes recommandent en première intention l'utilisation d'une échinocandine. D'autre part, ils recommandent tous le retrait des cathéters intraveineux potentiellement infectés. Un antifongique à spectre plus étroit (fluconazole) peut être ensuite instauré si le patient est stable, selon l'identification de l'espèce de *Candida* en cause et sa sensibilité aux antifongiques (antifongogramme indispensable).

Des hémocultures quotidiennes sont fortement conseillées et le traitement doit être maintenu jusqu'à 14 jours après la dernière hémoculture négative. Enfin, des examens complémentaires à la recherche de foyers secondaires sont recommandés (échocardiographie transœsophagienne, fond d'œil, recherche d'un thrombus si présence de cathéters).

### **d. Autres données sur les traitements chez les transplantés hépatiques**

#### **i. Polyènes**

De nombreuses études prospectives <sup>74-76</sup> démontrent un faible taux d'IFI après administration de la L-AMB aux transplantés hépatiques considérés comme à haut risque d'infections fongiques.

Dans une étude de Saliba *et al.* <sup>77</sup>, une faible dose d'ABLC a été administrée en prophylaxie chez des patients à haut risque d'IFI à la dose de 1 mg/kg/j pendant une semaine puis 2,5 mg/kg 2 fois par semaine pendant deux semaines. Les résultats montrent qu'une prophylaxie ciblée par ABLC chez des patients à haut risque réduit le taux moyen d'infections fongiques. Pour les infections à *Candida*, le taux de colonisation ainsi que le nombre de CI probables ou prouvées nécessitant un traitement antifongique systémique et le nombre d'infections invasives abdominales ou biliaires étaient significativement moins importantes comparé au groupe à faible risque sans prophylaxie. Les bénéfices d'une prophylaxie par ABLC sont maintenus durant la première année après la TH même avec une médiane de dose et de durée d'administration plus faible, ce qui pourrait diminuer le coût mais sans diminuer le taux des infections. Le taux d'IFI était de 14,8 % chez les patients recevant la prophylaxie. La dose d'ABLC administrée est plus faible que celle recommandée par l'IDSA. De plus, dans cette étude, à la dose de 1 mg/kg/j, il n'y a pas eu de néphrotoxicité au bout d'un an, ce qui avait été déjà démontré dans d'autres études avec l'ABLC <sup>78</sup> et la L-AMB <sup>79</sup>.

## ii. Azolés

Le traitement par fluconazole en première intention peut être utilisé en prophylaxie, mais étant donné l'émergence des espèces de *Candida non-albicans*, le choix de la molécule antifongique est à adapter en fonction de l'épidémiologie locale intra-hospitalière. Il est cependant préférable d'utiliser le fluconazole pour les infections à *C. parapsilosis* en raison de concentrations minimales inhibitrices (CMI) plus basses que la CS, mais il reste à démontrer que ce traitement par fluconazole est plus efficace que les échinocandines dans ce cas précis. Enfin, il n'y a pas de données prouvant la supériorité d'une association d'antifongiques sur la monothérapie <sup>80</sup>.

## iii. Echinocandines

D'autres études se sont penchées sur l'efficacité et les bénéfices d'un traitement prophylactique par échinocandines. Certaines équipes rapportent qu'elles sont mieux tolérées et aussi efficaces que les dérivés lipidiques de l'AMB avec un succès d'environ 60 à 75 % <sup>81</sup>, <sup>82</sup>. Il est à noter que les échinocandines sont aussi préférées dans le cas d'une exposition récente aux azolés ou en cas de risque d'infection à *C. krusei* ou *C. glabrata*.

### Caspofungine :

Concernant la CS, une étude prospective rapporte qu'elle est utile en prophylaxie contre les IFI chez les transplantés hépatiques à haut risque <sup>83</sup>. En effet, dans cette étude, le succès thérapeutique défini tel que l'absence d'IFI durant les 100 jours après la mise sous traitement est de 88,7 %, après 21 jours de CS chez 71 patients. Cependant, l'utilisation concomitante de ciclosporine avec la CS est associée à des élévations transitoires des transaminases, et la CS a dû être arrêtée chez 6 des 71 patients à cause de la toxicité. De même, dans une autre étude, la CS est reliée à un risque majoré d'insuffisance rénale aiguë <sup>84</sup>.

### Micafungine :

Pour la MCF, plusieurs études démontrent son efficacité et sa non infériorité par rapport à la CS <sup>85</sup> et l'AMB <sup>86</sup>. D'ailleurs, comme l'ANF, elle possède des CMI plus basses que la CS. Dans un essai comparant la MCF à l'ABLC, Sun *et al.* démontrent une diminution du risque d'IFI chez les TH à haut risque (retransplantation, ré-intervention, dialyse post-TH) à un taux comparable à celui des TH à faible risque non traités <sup>87</sup>. De plus, il n'a pas été mis en évidence de risque majoré d'atteinte hépatique ou rénale. Dans un essai clinique international randomisé, chez plus de 345 transplantés hépatiques à haut risque d'IFI, Saliba *et al.* comparent la MCF aux autres antifongiques utilisés en prévention dans les différents centres (fluconazole, L-AMB ou CS). Ils démontrent la non infériorité de la MCF avec 96,5 % de succès clinique *versus* 93,6 % pour les autres <sup>88</sup>.

## Anidulafungine :

L'ANF possède une activité puissante *in vitro* contre les espèces de *Candida* et *Aspergillus*<sup>89</sup>,<sup>90</sup> et une bonne tolérance hépatique et rénale<sup>91, 92</sup>. L'une de ses caractéristiques est son élimination exclusive par biotransformation en métabolites dégradés, sans passage hépatique ou élimination rénale. Elle ne requiert donc pas d'adaptation de posologie en cas d'insuffisance hépatique ou rénale et donc pas de dosage sérique<sup>93</sup>. De plus, il n'y a pas d'interaction avec la cyclosporine et le Tacrolimus car elle n'interfère pas avec le cytochrome P450<sup>94,95</sup>. Un autre avantage de l'ANF est sa forte activité sur un large spectre de *Candida* (CMI plus basses que la CS) dont *C. glabrata* et *C. krusei*, contre lesquels les autres agents fongiques sont connus pour avoir une moins bonne action<sup>96</sup>. Un essai randomisé montre que l'ANF serait supérieure au fluconazole en terme d'efficacité clinique et microbiologique<sup>97</sup>.

## **II. Résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.**

### **A. Les différents types de résistances**

On distingue deux types de résistances aux antifongiques, la résistance microbiologique et la résistance clinique.

#### **1. La résistance microbiologique**

La résistance microbiologique se détermine par un test *in vitro* et correspond à la non sensibilité d'un champignon vis à vis d'un agent antifongique. Elle peut être intrinsèque ou acquise.

La résistance intrinsèque est retrouvée naturellement chez certaines espèces de *Candida*, sans exposition préalable à un antifongique. Pour les azolés, elle concerne principalement *C. glabrata* et *C. krusei*. Pour les échinocandines, il s'agit surtout de *C. parapsilosis*. Nous donnons quelques exemples dans le Tableau 11<sup>98</sup>.

**Tableau 11. Sensibilité intrinsèque aux antifongiques pour certaines espèces de *Candida*, d'après Arendrup *et al.***

	<b>Amphotéricine B</b>	<b>Echinocandines</b>	<b>Fluconazole</b>
<i>C. albicans</i>	S	S	S
<i>C. dubliniensis</i>	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	S	S	I
<i>C. krusei</i>	S	S	R
<i>C. parapsilosis</i>	S	I	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S

Des « Clinical Breakpoints » (CBP) ont été établis par l'EUCAST pour les espèces les plus courantes. Cela permet une classification en différentes catégories : S (sensible), I (intermédiaire) et R (résistant).

La résistance acquise correspond au développement d'une résistance chez un isolat appartenant à une espèce habituellement sensible à l'antifongique testé, et chez qui la pression d'agents antifongiques a pu modifier l'expression génique.

Elle est généralement moins fréquente que la résistance intrinsèque et s'explique par le fait que la résistance chez les levures est uniquement chromosomique. Dès lors, il n'existe pas de transmission horizontale. De plus, la transmission croisée entre les patients et les soignants semble être rare, même si des cas ont été décrits, notamment chez *C. albicans*<sup>99,100</sup>.

Néanmoins, des données suggèrent que la résistance acquise émerge dans certains pays.

## 2. La résistance clinique

La résistance clinique correspond à la persistance d'une infection fongique malgré une thérapie antifongique bien conduite. Bien que la résistance microbiologique contribue à son apparition, d'autres facteurs liés à l'hôte, au champignon ou à l'antifongique rentrent en jeu. Nous regroupons les principaux facteurs mis en cause dans le Tableau 12.

**Tableau 12. Principaux facteurs impliqués dans la résistance clinique aux antifongiques**

Facteurs liés à l'hôte	Facteurs liés à l'antifongique	Facteurs liés au champignon
Immunité affaiblie		
Pathologie sous-jacente (insuffisance rénale...)	Posologie insuffisante	Inoculum initial important
Site de l'infection (infections abdominales, infections oculaires, abcès, infections sur cathéters...)	Biodisponibilité diminuée sur certains sites (matériel infecté, infections oculaires, abcès...)	Production de biofilm
Présence de matériel étranger		Résistance microbiologique

Ainsi, les patients les plus à risque de développer une résistance clinique présentent souvent différents facteurs de comorbidité et une pharmacocinétique instable.

## B. Epidémiologie de la résistance

### 1. Généralités

L'épidémiologie de la résistance aux antifongiques est un sujet en pleine évolution. Du fait d'une variété d'antifongiques disponibles limitée et d'une augmentation du nombre des patients à risque, la pression antifongique est de plus en plus importante.

Ainsi, outre l'émergence d'isolats intrinsèquement moins sensibles (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*...), l'incidence des résistances acquises augmente.

Nous savons depuis longtemps qu'il existe des différences de sensibilité entre les espèces de *Candida*.

Ainsi, si nous prenons l'exemple du fluconazole <sup>19</sup> :

- *C. krusei* possède une résistance intrinsèque avec un taux de résistance globale de 78,3 % ;
- *C. glabrata* a une sensibilité dose-dépendante, avec un taux de résistance de 15,7 % ;
- les résistances intrinsèques sont rares pour *C. albicans* (1,4 %), *C. parapsilosis* (3,6 %) et *C. tropicalis* (4,1 %).

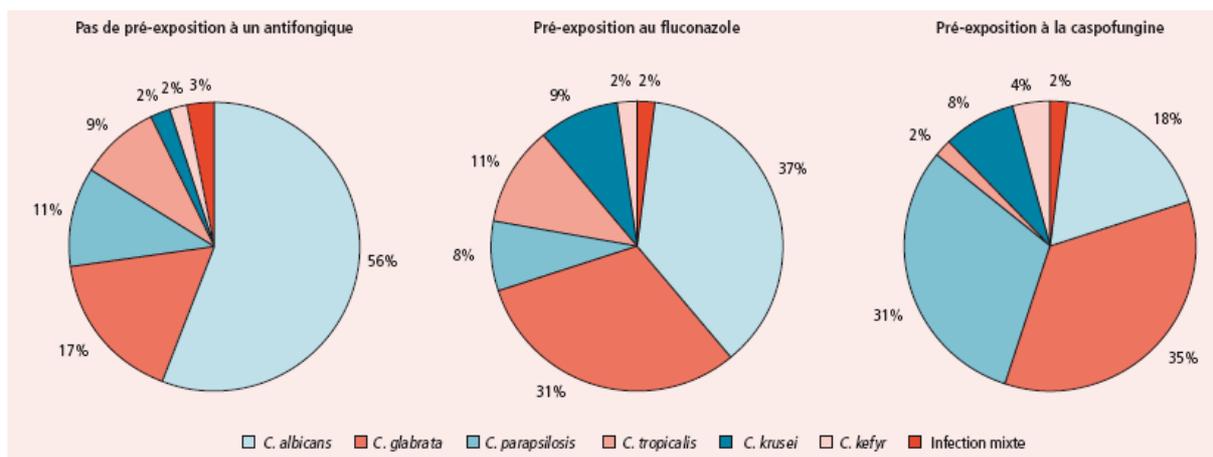
Concernant les échinocandines, on observe une activité antifongique importante sur la plupart des espèces. Toutefois, des CMI élevées sont observées chez *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii*. Ce phénomène est lié à un polymorphisme naturel sur les gènes *FKS* <sup>101</sup>.

Les conséquences, bien que variables selon les régions du globe, sont notamment :

- une modification de l'épidémiologie des infections à *Candida* avec l'émergence d'espèces intrinsèquement résistantes (*Candida non-albicans*) au dépend de *C. albicans* ;
- une augmentation des résistances acquises sous traitement.

Plusieurs études, dont celle de Montagna *et al.* <sup>25</sup>, montrent ainsi qu'une pré-exposition à un azolé augmente le risque d'avoir une résistance *in vitro*.

En France, entre 2002 et 2010, l'Observatoire des levures souligne bien l'impact que peut avoir une exposition aux antifongiques sur l'émergence d'espèces intrinsèquement résistantes <sup>21</sup> (Figure 7).



**Figure 7. Répartition des espèces de *Candida* non rares responsables d'un premier épisode de fongémie, selon l'exposition dans les 30 jours précédents au fluconazole (n = 135), à la CS (n = 53) ou à aucun antifongique (n = 2383), d'après l'Observatoire des levures d'Ile-de-France (2002-2010)**

On observe ainsi que la proportion de *C. glabrata* augmente lors d'une pré-exposition au fluconazole, et que la proportion de *C. parapsilosis* augmente lors d'une pré-exposition à la CS.

## 2. Epidémiologie de la résistance pour les échinocandines

Depuis leur introduction, les échinocandines sont de plus en plus utilisées pour la prophylaxie et le traitement des IFI, et rentrent aujourd'hui dans les recommandations de l'ESCMID et de l'IDSA.

Des données du réseau de surveillance du CDC (Center for Disease Control and Prevention) d'Atlanta (USA) vont dans ce sens et indiquent que plus de 60 % des candidémies impliquent un traitement par une échinocandine <sup>6</sup>. En France, une étude de l'Observatoire des levures effectuée entre 2002 et 2010 s'est intéressée aux isolats issus des candidémies. Elle ne rapporte pas de changements majeurs au cours du temps concernant les profils de sensibilité aux antifongiques, mais montre néanmoins l'influence des traitements sur l'épidémiologie des espèces incriminées <sup>21</sup>.

La résistance aux échinocandines reste encore rare chez *C. albicans* (< 1 %), *C. tropicalis* (< 5 %) et *C. krusei* (< 7 %). Elle est plus fréquente chez *C. glabrata* (8-15 % selon les études), espèce déjà souvent résistante aux azolés <sup>98, 102</sup>.

Cette singularité de *C. glabrata* fait que de nombreux chercheurs s'y sont intéressés :

- une étude souligne que la fréquence de *C. glabrata* résistants aux échinocandines est passée de 4,9 % à 12,3 % entre 2001 et 2010 <sup>103</sup> ;
- dans une étude effectuée au Texas sur les candidémies à *C. glabrata*, des mutations *FKS* sont présentes dans 18 % des cas, avec une pré-exposition à une échinocandine comme seul facteur de risque indépendant responsable de ces mutations <sup>104</sup> ;
- Alexander *et al.* rapportent des mutations *FKS* chez 7,9 % de 313 *C. glabrata* issus d'hémocultures, avec dans 80 % des cas une CMI élevée à la CS <sup>103</sup> ;
- il est montré que 7 jours d'exposition à une échinocandine peuvent suffire à induire des mutations *FKS* chez *C. glabrata* <sup>103, 105</sup>. Le même phénomène a été observé chez *C. kefyr* durant les premiers jours de traitement <sup>106</sup>.

Toutes ces données sont notamment à mettre en rapport avec le fait que *C. glabrata* présente la particularité d'être haploïde, ce qui facilite l'expression phénotypique de la résistance.

En France, une étude monocentrique de Fekkar *et al.* met en relation la large utilisation des échinocandines avec l'émergence de *Candida* résistants aux échinocandines (8 isolats chez 6 patients entre 2011 et 2012), avec un échec clinique associé dans tous les cas <sup>107</sup>.

Cette émergence de la résistance aux échinocandines doit nous amener à avoir une approche plus rationnelle concernant les traitements antifongiques. Par exemple, alors que l'IDSA encourage la transition d'une échinocandine vers le fluconazole dans le cas où l'isolat est sensible au fluconazole, l'ESCMID recommande un traitement d'au moins 10 jours par une échinocandine avant de faire cette transition. Dès lors, le risque de voir apparaître un isolat résistant aux échinocandines est plus important.

### 3. Epidémiologie de la résistance pour les azolés

De nombreuses espèces de *Candida* sont considérées comme intrinsèquement moins sensibles aux azolés : *C. ciferrii*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. humicola*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. palmiophila*, *C. rugosa* et *C. valida* <sup>19, 108, 109</sup>.

Pfaller *et al.* ont effectué une étude de surveillance pendant 10,5 ans sur plus de 190 000 isolats issus de 41 pays <sup>19</sup>. Au total, 90,2 % des isolats de cette étude sont sensibles au fluconazole. Cependant, 13 des 31 espèces étudiées sont de sensibilité diminuée à cette molécule. Cette résistance augmente même au fil du temps chez *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. sake* et *C. pelliculosa*. En revanche, la résistance au voriconazole reste rare (< 5 % des isolats) dans cette étude.

Dans une autre étude rétrospective américaine, Oxman *et al.* rapportent que 19 % des infections à *Candida* impliquent des isolats résistants ou de sensibilité diminuée au fluconazole. Ainsi, *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, espèces généralement considérées comme sensibles au fluconazole, comptent 36 % de isolats de sensibilité diminuée au fluconazole et 48 % de isolats résistants <sup>110</sup>.

Enfin, l'étude Chinas-SCAN (étude multicentrique dans 68 services de réanimation en Chine), réalisée chez des patients de réanimation, montre que la résistance au fluconazole est de 9,6 % chez *C. albicans* et de 19,3 % chez *C. parapsilosis* <sup>111</sup>.

### 4. Epidémiologie de la résistance croisée

La résistance croisée aux azolés concerne plusieurs espèces dont *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* <sup>112</sup>. On l'observe également chez les échinocandines pour *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei* <sup>113</sup>. Elle reste peu fréquente entre les classes d'antifongiques <sup>114, 115</sup>.

Cependant, plusieurs études rapportent l'émergence de *C. glabrata* multi-résistants :

- sur 162 isolats résistants au fluconazole, Pfaller *et al.* rapportent 11,1 % de résistance aux échinocandines <sup>102</sup> ;
- sur 78 isolats résistants au fluconazole, Alexander *et al.* retrouvent 14,1 % de résistance aux échinocandines <sup>103</sup> ;
- sur 77 isolats résistants aux échinocandines, 36 % sont résistants au fluconazole dans une étude de Pham *et al.* <sup>116</sup>.

## C. Méthodes de détection

### 1. Méthodes phénotypiques

L'augmentation de l'incidence des IFI et du nombre d'antifongiques disponibles suscite un besoin d'avoir des tests de détermination de la sensibilité aux antifongiques qui soient précis, reproductibles et cliniquement pertinents.

Dans ce contexte, le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, ancien NCCLS) aux Etats-Unis, et l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) en Europe ont tous les deux développé des tests de sensibilité standardisés reposant sur la microdilution. Ces tests sont les méthodes de référence, mais il en existe d'autres.

Leur but est d'établir un marqueur *in vitro* (la CMI) pour ensuite catégoriser les isolats (sensibles, intermédiaires ou résistantes) pour une molécule donnée afin d'orienter le traitement.

Ces tests phénotypiques ont une bonne reproductibilité intra- et inter-laboratoire. Cela permet de fournir des données fiables pour la détermination de « Breakpoints » (seuils de sensibilité) cliniques (CBP) afin d'interpréter les résultats. Il est à noter que l'ESCMID recommande de tester la sensibilité aux antifongiques<sup>117</sup>.

#### a. Méthodes de référence

Il s'agit des méthodes élaborées par l'EUCAST et le CLSI pour les levures. Bien qu'il y ait des points communs entre les deux techniques (base RPMI-1640, 24 heures d'incubation), des différences existent :

- taille de l'inoculum ( $0,5-2,5 \times 10^3$  CFU/mL pour le CLSI,  $0,5-2,5 \times 10^5$  CFU/mL pour l'EUCAST) ;
- concentration de glucose dans le RPMI (0,2 % pour le CLSI, 2 % pour l'EUCAST) ;
- puits de microdilution (à fonds ronds pour le CLSI, à fonds plats pour l'EUCAST) ;
- méthode de détermination des CMI (visuelle pour le CLSI et par spectrophotométrie pour l'EUCAST).

Pour interpréter les résultats des CMI, le CLSI et l'EUCAST donnent des CBP pour les azolés et les échinocandines. Cependant, ces CBP ne sont pas les mêmes entre le CLSI et l'EUCAST.

Un isolat classé « sensible » implique une forte probabilité de succès thérapeutique, un isolat classé « intermédiaire » implique un effet incertain du traitement alors qu'un isolat classé « résistant » implique une forte probabilité d'échec du traitement.

Au départ, les CBP étaient les mêmes pour toutes les espèces. Cela a posé des problèmes pour la détection des isolats résistants (CBP trop élevés), en particulier pour *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*. C'est dans ce contexte que des résistances cliniques aux échinocandines ont été rapportées chez des mutants *FKS* classés incorrectement dans la catégorie « sensibles »<sup>118-120</sup>. Des changements ont donc été effectués.

Les principaux ont concerné *C. glabrata* et *C. parapsilosis* :

- pour *C. glabrata*, la catégorie « sensible » a été supprimée pour le fluconazole par le CLSI et l'EUCAST. Tous les isolats sont donc « intermédiaires » ou « résistantes » au fluconazole. L'EUCAST recommande même de ne pas tester le fluconazole chez *C. glabrata*, à l'image de ce qui se fait chez *C. krusei*, et de ne pas l'utiliser en clinique pour une infection à *C. glabrata*<sup>121</sup> ;
- pour *C. parapsilosis*, l'EUCAST recommande la suppression de la catégorie « sensible » pour les échinocandines<sup>122</sup>, mais pas le CLSI.

Il existe donc aujourd'hui des CBP différents selon les espèces. Ils sont susceptibles d'évoluer dans le temps et sont fondés sur plusieurs paramètres :

- CMI habituelles de l'espèce ;
- pharmacocinétique et pharmacodynamique de la molécule concernée (PK/PD) ;
- mécanismes de résistance ;
- expérience clinique.

Les CBP de l'EUCAST et du CLSI établis en 2014 sont représentés dans le Tableau 13.

**Tableau 13. CBP 2014 de l'EUCAST et du CLSI chez *Candida* spp. permettant de classer les isolats sensibles ou résistants selon les CMI obtenues *in vitro***

Antifungal drug	Method	CBPs (µg/mL)											
		<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		Other species	
		S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>
Anidulafungin	CLSI <sup>a</sup>	0.25	1	0.12	0.5	0.25	1	2	8	0.25	1	ND	ND
	EUCAST <sup>b</sup>	0.03	0.03	0.06	0.06	0.06	0.06	0.002	4	0.06	0.06	IE	IE
Caspofungin	CLSI	0.25	1	0.12	0.5	0.25	1	2	8	0.25	1	ND	ND
	EUCAST	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Micafungin	CLSI	0.25	1	0.06	0.25	0.25	1	2	8	0.25	1	ND	ND
	EUCAST	0.016	0.16	0.03	0.03	IE	IE	0.002	2	IE	IE	IE	IE
Fluconazole	CLSI	2	8	-	64	NA	NA	2	8	2	8	ND	ND
	EUCAST	2	4	0.002	32	NA	NA	2	4	2	4	2	4
Itraconazole	CLSI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EUCAST	0.06	0.06	IE	IE	IE	IE	0.12	0.12	0.12	0.12	IE	IE
Posaconazole	CLSI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EUCAST	0.06	0.06	IE	IE	IE	IE	0.06	0.06	0.06	0.06	IE	IE
Voriconazole	CLSI	0.12	1	IE	IE	0.5	2	0.12	1	0.12	1	ND	ND
	EUCAST	0.12	0.12	IE	IE	IE	IE	0.12	0.12	0.12	0.12	IE	IE

Comme le montre ce tableau, l'EUCAST ne donne pas de CBP pour la CS, contrairement au CLSI. Pour autant, les deux organismes reconnaissent le manque de reproductibilité inter-laboratoire pour cette molécule et ne recommandent pas de la tester<sup>123, 124</sup>.

D'autre part, l'EUCAST rapporte que certaines mutations diminuent la sensibilité *in vitro* à l'ANF et à la CS, mais pas à la MCF. Il recommande donc de tester l'ANF comme marqueur de la résistance aux échinocandines (meilleure sensibilité par rapport à la MCF).

Ces méthodes de référence présentent plusieurs inconvénients, parmi lesquels :

- technique longue et coûteuse ;
- variabilité inter-laboratoire des CMI pour la CS ;
- résultats disponibles après 24 heures d'incubation.

Enfin, il est à noter que le CLSI a aussi développé une méthode en base agar (M44-A), avec l'utilisation de disques imprégnés d'antifongiques. Il s'agit d'une méthode alternative attractive car elle est plus simple à mettre en œuvre, moins chère que les méthodes de référence, et adaptée aux antifongiques hydrosolubles comme le fluconazole et le voriconazole. Elle est standardisée chez *Candida* spp. pour les molécules suivantes : fluconazole, voriconazole, CS et MCF.

### **b. Tests commerciaux**

Pour faciliter le travail des biologistes hospitaliers, il existe d'autres méthodes pour déterminer la sensibilité des levures aux antifongiques.

Trois méthodes sont actuellement sur le marché : le Sensititre YeastOne Colorimetric Plate<sup>®</sup> (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA), le Vitek-2 Yeast Susceptibility Test<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et le Etest<sup>®</sup> (bioMérieux)<sup>102, 125</sup>. Ce dernier utilise des bandelettes imprégnées d'antifongiques tandis que les deux autres se réalisent en milieu liquide.

Les performances de ces tests sont comparables aux méthodes de référence<sup>102, 125</sup>. Celle de l'Etest<sup>®</sup> a ainsi été évaluée sur des hémocultures positives et les résultats sont hautement concordants avec la méthode de référence du CLSI, avec aucune discordance pour les échinocandines. Il y a cependant 7 % de faux positifs et 0,6 % de faux négatifs pour la résistance au fluconazole<sup>126</sup>. Une autre étude montre que l'Etest<sup>®</sup> avec une CMI supérieure à 0,25 µl/mL pour la CS a une sensibilité de 100 % et une spécificité de 94 % pour la détection des isolats avec une mutation *FKS*<sup>127</sup>. Enfin, certaines études suggèrent même que l'Etest<sup>®</sup> est supérieur aux méthodes de référence pour la détection des *C. glabrata* résistants à l'AMB<sup>128</sup>.

## **2. Méthodes moléculaires**

L'un des problèmes des méthodes phénotypiques précédemment évoquées est la difficulté dans certaines situations à distinguer les isolats résistants des isolats sensibles aux échinocandines.

De plus, les valeurs brutes des CMI ne sont pas toujours suffisantes pour prédire le succès thérapeutique. Par exemple, *C. parapsilosis* présente des CMI élevées aux échinocandines et les échecs du traitement restent rares.

Enfin, les méthodes moléculaires sont d'autant plus importantes que plusieurs études cliniques montrent que les mutations *FKS* sont le facteur indépendant le plus important pour prédire la réponse à une thérapie par échinocandines chez les patients avec une CI, en particulier chez les patients pré-exposés<sup>127, 129, 130</sup>. Nous présentons les résultats d'une étude (Figure 8) qui souligne l'intérêt de la détection des mutations *FKS* par rapport à l'évaluation des CMI dans la prédiction d'un échec thérapeutique<sup>105</sup>.

Predictor variable	No. of successes (n = 44)	No. of failures (n = 22)	P value	Odds ratio	95% CI	% PPV <sup>a</sup>	% NPV <sup>b</sup>
Presence of <i>FKS</i> mutation	1	9	0.0001	29.7	3.44–257.5	90 (9/10)	77 (43/56)
Prior echinocandin exposure	8	13	0.002	6.50	2.07–20.4	62 (13/21)	80 (36/45)
Caspofungin MIC of >0.5 µg/ml (BMD-RPMI)	6	7	0.10	2.96	0.85–10.3	54 (7/13)	72 (38/52)
Caspofungin MIC of >0.06 µg/ml (BMD-AM3)	2	8	0.002	12.0	2.27–63.4	80 (8/10)	75 (42/56)
Caspofungin MIC of >0.25 µg/ml (YeastOne)	6	9	0.03	4.39	1.31–14.7	60 (9/15)	75 (38/51)
Caspofungin MIC of >0.25 µg/ml (Etest)	3	11	0.0001	13.7	3.24–57.7	79 (11/14)	79 (41/52)

<sup>a</sup> Positive predictive value (PPV) is the percentage of positive tests associated with failure.

<sup>b</sup> Negative predictive value (NPV) is the percentage of negative tests associated with success.

#### Figure 8. Intérêt de la détection des mutants *FKS* chez *C. glabrata* pour la prédiction des échecs cliniques

D'autre part, le délai de rendu du résultat pour les méthodes phénotypiques est relativement long (jusqu'à 48 heures). A l'image de ce qui a pu être fait pour la résistance aux azolés chez *A. fumigatus*, la détection directe de isolats de *Candida* résistants au sein d'un échantillon clinique permettrait de gagner du temps en éliminant les durées nécessaires à la réalisation d'une culture et d'un antifongigramme<sup>131</sup>.

Dès lors, des méthodes de biologie moléculaire ont été développées pour caractériser les mutations *FKS*. L'un des inconvénients est que les mécanismes de la résistance non connus ne sont pas détectés.

Il existe aujourd'hui différentes techniques dont le séquençage « nouvelle génération » ou Next Generation Sequencing (NGS), l'Allele-Specific Real-Time PCR Assay, les puces à ADN, ou encore la Microsphere-Based Technologie, comme le Luminex Mag Pix (Luminex, Austin, TX).

Par exemple, Dudiuk *et al.* ont développé une trousse de PCR performante pour *C. glabrata* permettant en moins de 4 heures de détecter les 10 mutations *FKS* les plus fréquentes parmi celles associées à une résistance clinique<sup>132</sup>.

Récemment, une étude utilisant le NGS s'est intéressée à la détection de *Candida* multi-résistants. Six gènes impliqués dans la résistance à différentes classes d'antifongiques ont été étudiés sur plus de 40 isolats : *ERG11*, *ERG3*, *TAC1*, *CgPDRI*, *FKS1*, *FKS2*. Cette étude montre qu'il s'agit d'une technique fiable pour détecter les mutations. Elle présente l'avantage de pouvoir mettre en évidence de nouvelles mutations et souligne l'intérêt d'avoir une approche multigénique, puisque des mutations dans différents gènes sont rapportées chez

un même isolat. La signification de ces mutations multiples reste néanmoins à déterminer (événements fortuits, résultat de la pression antifongique, mécanisme moléculaire compensateur...) <sup>133</sup>.

Le NGS est donc prometteur et présente l'avantage de pouvoir avoir une approche plus globale via le séquençage de plusieurs gènes. Il facilite ainsi l'obtention d'une cartographie exhaustive des mutations de résistance.

Cependant, il persiste l'inconvénient que toutes les mutations *FKS* n'ont pas les mêmes conséquences sur la résistance clinique <sup>118, 129</sup>. Et ce sont souvent les mêmes mutations retrouvées lors des échecs thérapeutiques.

A ce jour, il n'existe pas de méthodes standardisées permettant la détection des mutations *FKS*. Cette pratique reste du domaine de la recherche et n'est pas encore utilisée quotidiennement dans les laboratoires de microbiologie clinique.

### 3. Autres méthodes

D'autres méthodes existent pour déterminer la résistance microbiologique aux antifongiques. Elles reposent sur des technologies comme la spectrométrie de masse, la cytométrie en flux, la technologie « X-plate » ou encore l'oxyde d'aluminium poreux <sup>125</sup>. Concurrencées par la biologie moléculaire et les méthodes phénotypiques traditionnelles, elles ne sont pas actuellement utilisées en microbiologie clinique de routine mais méritent toutefois d'être citées.

De Carolis *et al.* ont utilisé une méthode utilisant la spectrométrie de masse afin de détecter la résistance à la CS chez des champignons (*Candida* et *Aspergillus*) porteurs ou non de mutations *FKS* après 15 heures d'exposition à l'antifongique <sup>134</sup>. Les résultats sont bons (94,1 % de similitudes avec la méthode de référence du CLSI) avec un gain de temps (1 heure *versus* 24 heures en méthode traditionnelle). Plus récemment, des auteurs ont décrit une version simplifiée de cette approche, permettant une discrimination entre un isolat sensible et résistant après seulement 3 heures d'incubation.

Concernant la cytométrie en flux, l'effet de l'agent antifongique peut être évalué en observant la fluorescence qui s'altère en fonction de la viabilité cellulaire.

D'autre part, Chadwick *et al.* ont décrit la technologie « X-plate ». Elle permet de détecter à la fois l'espèce de *Candida* et sa sensibilité au fluconazole. Cette méthode chromogénique en milieu agar produit des résultats cohérents par rapport aux méthodes de référence <sup>135</sup>.

Enfin, à l'aide de la microscopie, il est possible de déterminer la capacité des espèces microbiennes à pousser sur un support poreux d'oxyde d'aluminium en présence d'antifongique <sup>136</sup>. En utilisant cette technique, Ingham *et al.* ont été capables de détecter et de quantifier des microcolonies de *Candida* en 2 heures. Ces dernières étaient ensuite testées pour évaluer leurs sensibilités à l'AMB, l'ANF, la CS (3-5 heures de culture), le voriconazole et l'itraconazole (7 heures de culture) <sup>136</sup>.

## D. Mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistance aux antifongiques décrits à ce jour chez *Candida* sont nombreux. Plusieurs d'entre eux peuvent être présents de façon concomitante ou séquentielle chez un même isolat.

La résistance implique des changements dans le génome et peut aussi affecter la virulence. Sa persistance va dépendre du Fitness (capacité répliquative) relatif entre les génotypes sensibles et résistants. A ce titre, Cowen *et al.* se sont intéressés à l'expression génique chez *C. albicans* pendant plus de 330 générations (soit environ 100 jours) en présence et en absence de fluconazole. Ils montrent que les isolats qui acquièrent une résistance sous fluconazole ont un Fitness qui diminue au départ, et qui augmente ensuite malgré l'exposition continue à l'antifongique<sup>137</sup>. Ces résultats suggèrent des mécanismes de compensation.

Nous décrivons ici les principaux mécanismes de résistance connus pour les échinocandines et les autres classes d'antifongiques.

### 1. Résistance aux échinocandines

Les échinocandines sont des lipopeptides agissant par inhibition non compétitive de la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase, une enzyme responsable de la synthèse du BDG, un composant clé de la paroi fongique. Cette action engendre la formation d'une paroi cellulaire non fonctionnelle et conduit à la mort cellulaire.

Actuellement, il existe deux principaux mécanismes de résistance qui sont décrits<sup>138</sup> (Figure 9).

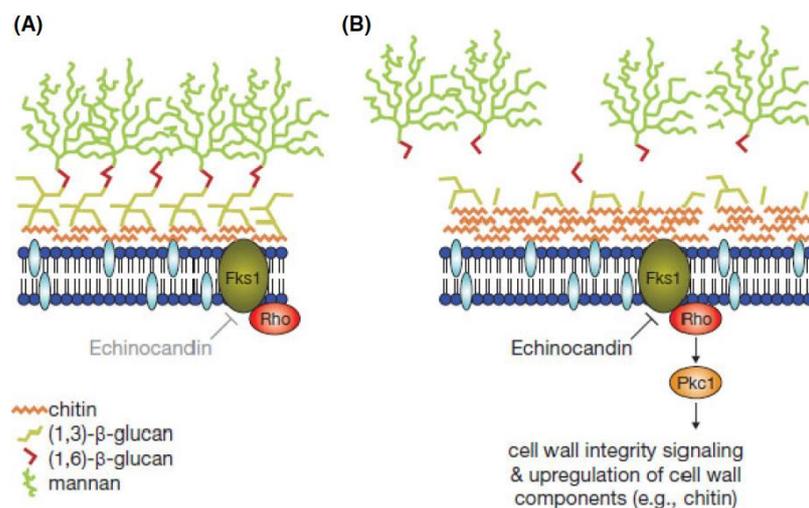


Figure 9. Mécanismes de résistance aux échinocandines chez *Candida* spp.

(A) Des mutations ponctuelles intrinsèques dans des régions spécifiques codant la sous-unité *FKS* de la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase confèrent la résistance en diminuant l'effet de l'antifongique sur la cellule. (B) Rho1 est un régulateur positif de la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase et contribue à la résistance en stimulant la réponse cellulaire liée au stress, qui augmente de la composition en chitine de la paroi.

Il est intéressant de remarquer que le mécanisme d'efflux, connu pour conférer une résistance aux azolés, n'est pas décrit chez les échinocandines.

### a. Mutations dans les gènes *FKS*

La sensibilité diminuée ou la résistance aux échinocandines est souvent reliée à des mutations ponctuelles et intrinsèques dans les gènes *FKS*, qui codent une sous-unité de la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase. Il existe 3 gènes *FKS* appelés *FKS1*, *FKS2* et *FKS3*.

*FKS1* est essentiel chez *C. albicans* et les autres *Candida*. *FKS2* est fonctionnel et redondant par rapport à *FKS1* chez *C. glabrata*. *FKS3* est très faiblement exprimé par rapport aux autres gènes et peu associé à la résistance.

Les mutations *FKS* se trouvent dans des régions spécifiques connues pour jouer un rôle important dans l'activité catalytique de la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase. Elles ont été mises en évidence autour de deux régions hautement conservées, appelées « Hot-Spot 1 » (HS1) et « Hot-Spot 2 » (HS2). Une troisième région « Hot-Spot » (HS3) a été identifiée dans *FKS1* chez *S. cerevisiae*, mais elle n'est à ce jour pas reliée à des échecs thérapeutiques.

Ces mutations peuvent être responsables d'une résistance microbiologique même lorsqu'elles sont présentes à l'état hétérozygote.

#### i. Mutations dans *FKS1*

Les mutations *FKS1* sont les plus décrites et concernent *C. albicans* ainsi que la plupart des *Candida*. Elles sont surtout retrouvées sur les acides aminés 641 à 649 (dans le HS1) et sur les acides aminés 1345 à 1365 (dans le HS2) <sup>139, 140</sup>.

Les substitutions des acides aminés Ser645 (S645P, S645F et S645Y) et Phe641 sont les plus fréquentes, responsables des phénotypes les plus prononcés. Elles représentent plus de 80 % des cas de résistance chez *C. albicans*. Des mutations *FKS1* ont aussi été décrites chez *C. glabrata* (substitutions S629 et S663 notamment), *C. krusei*, *C. tropicalis* et *C. dubliniensis* <sup>139, 140</sup>. Les fréquences relatives des mutations *FKS1* causant des résistances aux échinocandines chez *C. albicans* sont représentées sur la Figure 10 <sup>141</sup>.

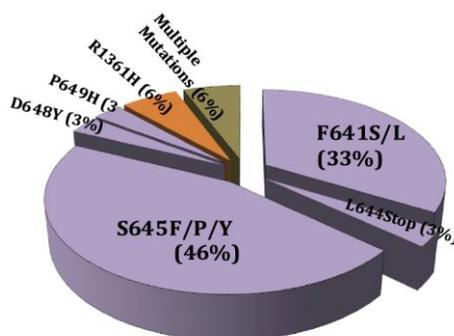


Figure 10. Fréquences relatives des substitutions d'acides aminés pour le gène *FKS1* causant des résistances aux échinocandines chez *C. albicans*

## ii. Mutations dans *FKS2*

Les mutations *FKS2* sont plus spécifiques de *C. glabrata*, chez qui elles ont une fréquence deux fois plus importante que dans *FKS1*. L'expression de *FKS2* est calcineurine-dépendante et down-réglée par FK506<sup>142</sup>. Les substitutions les plus fréquentes sur *FKS2* chez *C. glabrata* se situent au niveau de la sur Ser663 et de la Phe659<sup>143</sup>.

A titre d'exemple, une étude française s'est intéressée à l'acquisition de la résistance aux échinocandines chez *Candida* spp. entre septembre 2004 et avril 2010<sup>144</sup>. Pendant cette période, elle met en évidence 20 IFI avec des isolats résistants aux échinocandines et une mutation *FKS* caractérisée. Les caractéristiques microbiologiques des isolats et les mutations associées sont regroupées dans le Tableau 14.

**Tableau 14. Sensibilité *in vitro* et mutations *FKS* de 20 *Candida* spp. résistants aux échinocandines isolés en France (2004-2010)**

Patient no.	Strain	Species	MIC, µg/m, AM3/RPMI 1640 medium			Fksp mutation	
			Caspofungin	Micafungin	Anidulafungin	Gene	Mutation
1*	05BL1-38	<i>C. albicans</i>	1/2	0.25/1	0.06/0.125	<i>FKS1</i> (HS1)	F641S
2*	ODL13-1254	<i>C. albicans</i>	1/2	1/1	0.5/0.5	<i>FKS1</i> (HS1)	S645Y
3†	06BL2-127	<i>C. albicans</i>	2/2	1/0.5	0.125/0.125	<i>FKS1</i> (HS1)	F641S‡ + S645P‡
4	ODL19-1894	<i>C. albicans</i>	4/2	2/2	0.125/0.25	<i>FKS1</i> (HS1)	S645P
5*	08BL1-94	<i>C. albicans</i>	2/4	0.25/1	0.06/0.5	<i>FKS1</i> (HS2)	R1361G§
6*	08BL2-143	<i>C. albicans</i>	8/4	4/2	0.25/0.5	<i>FKS1</i> (HS1)	S645P
7*	09BL1-43	<i>C. albicans</i>	1/2	0.25/1	0.06/0.25	<i>FKS1</i> (HS1)	F641S
8*	09BL1-77	<i>C. albicans</i>	0.5/0.5	0.5/0.25	0.015/0.03	<i>FKS1</i> (HS1)	R647G§
9	06BL1-34	<i>C. krusei</i>	4/8	2/4	1/2	<i>FKS1</i> (HS1)	L648W§,¶
10*	10BL1-50	<i>C. krusei</i>	2/4	1/2	0.06/1	<i>FKS1</i> (HS1)	F645L§,¶
11	ODL7-647	<i>C. glabrata</i>	8/8	0.5/1	0.25/0.125	<i>FKS2</i>	DelF658#
12*	07BL2-157	<i>C. glabrata</i>	4/1	1/0.5	0.25/0.5	<i>FKS2</i>	DelF658#
13*	06BL1-33	<i>C. glabrata</i>	8/8	4/8	2/2	<i>FKS2</i>	S663P
14*	ODL21-2028	<i>C. glabrata</i>	1/1	0.25/0.25	0.25/0.25	<i>FKS1</i>	S629P
15*	ODL22-2183	<i>C. glabrata</i>	8/2	0.25/0.25	0.25/1	<i>FKS2</i>	S663P
16	ODL23-2221	<i>C. glabrata</i>	1/4	0.06/2	0.06/0.25	<i>FKS1</i> + <i>FKS2</i>	F625I§ ( <i>FKS1</i> ) + P667T§ ( <i>FKS2</i> )
17*	08BL2-142	<i>C. glabrata</i>	1/4	0.25/2	0.25/2	<i>FKS2</i>	S663P
18	09BL1-55	<i>C. glabrata</i>	8/4	2/4	0.5/0.5	<i>FKS2</i>	S663P
19	10BL1-19	<i>C. glabrata</i>	0.5/4	0.06/0.5	0.06/1	<i>FKS2</i>	F659S + L664V§
20	10BL1-67	<i>C. glabrata</i>	4/4	0.5/1	0.125/1	<i>FKS2</i>	DelF658#

\*Parentage of initial isolate available.

†In this patient, another isolate with reduced susceptibility to echinocandin was retrieved. This isolate harbored an S645P mutation in *FKS1*.

‡Heterozygous mutation.

§Mutations not already described (13).

¶Strains had also an L701M mutation.

#Deletion.

Une autre étude nord-américaine s'est intéressée à l'impact des mutations *FKS* sur les valeurs de CMI chez des *C. glabrata*. Elle montre que toutes ces mutations ne sont pas responsables d'une augmentation de CMI<sup>130</sup>. Nous regroupons les résultats dans la Figure 11.

Antifungal Agent	No. of isolates at MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )											
	(no. of isolates with FKS substitutions/no. of isolates with HS substitutions)											
	=0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
<b>Micafungin</b>	6 (0/0)	63 (8/2)	19 (3/2)	9 (6/4)	7 (5/5)	6 (6/6)	3 (3/3)	1 (1/1)	2 (2/2)	2 (2/2)		1 (1/1)
FKS alterations (no. of isolates if >1)		L630I D632Y D140Y+ A1749V L195F A995T Y1279P +T926P G680S F384Y	F625Y P1371S T926P	D666Y F659S(3) A1479V A450T	F625S S663F S663F +T926P F649Y F649V	S663P L664R(2) L662W F659Y F659V	S629P S663Y +G680S L662W +E78D +T926P	S629P	S663P +T926P	S629P S663P		S629P +R631S
<b>Anidulafungin</b>		3 (0/0)	11 (2/1)	40 (5/0)	32 (4/2)	10 (4/3)	3 (3/3)	12 (11/11)	5 (5/5)		3 (3/3)	
FKS alterations (no. of isolates if >1)			L630I G680S	D140Y+ A1749V L195F Y1279P +T926P F384Y T926P	D666Y P1371S A450T A995T	D632Y F625Y A1479V F659S	S663F S663F +T926P F659S	F625S F659S F659Y(2) F659V(2) L664R(2) L662W S663P S663Y +G680S	S629P(2) +R631S S663P +T926P	S629P S663(2)		
<b>Caspofungin</b>		1 (0/0)	20 (1/1)	34 (1/0)	25 (3/2)	19 (13/6)	6 (6/6)	3 (3/3)	4 (4/4)	1 (1/1)	1 (1/1)	4 (4/4)
FKS alterations (no. of isolates if >1)			L630I	A450T	D632Y F625Y T926P	D140Y+ A1749V L195F A995T A1749V Y1279P +T926P F659S S663F L664R D666Y P1371S S663F +T629P G680S F384Y	F625S F659S(2) L664R L662W S663Y +G680S	F659Y S663P +E78D +T926P	F649V F659Y S629P +R631S S663P +T926P	S663P	F659V	S629P(3) S663P

Figure 11. Distribution des CMI pour les échinocandines selon la méthode de référence du CLSI chez 119 *C. glabrata* et mutations *FKS* associées. Les mutations *FKS1* sont en caractères gras, et les mutations HS sont soulignées. Les CBP utilisés sont ceux du CLSI. Les isolats classés sensibles sont sur fond vert, les classes intermédiaires sur fond jaune et les résistantes sur fond rouge.

Nous regroupons les principales substitutions d'acides aminés liées à des mutations dans HS1 et HS2 sur les gènes *FKS* chez *Candida* dans la Tableau 15<sup>145</sup>.

Tableau 15. Principales substitutions d'acides aminés liées à des mutations décrites dans les HS des gènes *FKS* chez *Candida* spp. En rouge, les mutations décrites. En bleu, les polymorphismes naturels pouvant impliquer une sensibilité diminuée.

	<i>FKS1</i>		<i>FKS2</i>	
	Hot Spot 1	Hot Spot 2	Hot Spot 1	Hot Spot 2
<i>C. albicans</i>	F <sub>641</sub> LTL <b>S</b> LRDP	D <b>W</b> IRRYTL		
<i>C. glabrata</i>	F <sub>625</sub> LIL <b>S</b> LRDP	D <b>W</b> IRRYTL	F <sub>659</sub> LIL <b>S</b> LRDP	D <b>W</b> IRRYTL
<i>C. parapsilosis</i>	F <sub>652</sub> LTL <b>S</b> IRDA	D <b>W</b> IRRYTL		
<i>C. tropicalis</i>	F... LIL <b>S</b> IRDP	D <b>W</b> IRRYTL		
<i>C. krusei</i>	F <sub>655</sub> LIL <b>S</b> IRDP	D <b>W</b> IRRYTL		
<i>C. dubliniensis</i>	F <sub>641</sub> LTL <b>S</b> IRDP	D <b>W</b> IRRYTL		
<i>C. guilliermondii</i>	F <sub>632</sub> MAL <b>S</b> IRDP	D <b>W</b> IRRYTL		

Toutes ces mutations n'ont pas encore été reliées à des échecs cliniques. Il faut également rappeler que le niveau de résistance conféré par ces mutations dépend de l'expression relative des gènes, pouvant varier de 1 à 20<sup>142, 143</sup>.

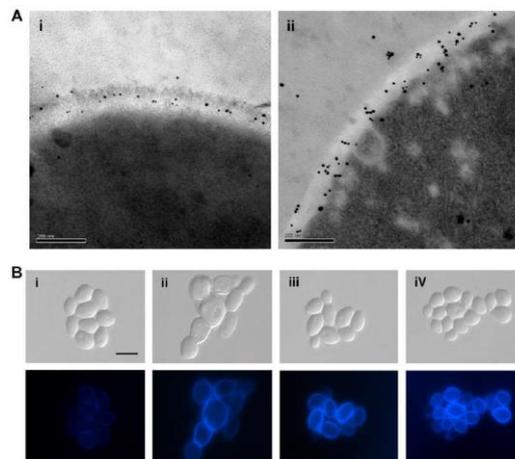
### b. Réponse adaptative au stress

D'autres facteurs que les mutations *FKS* semblent intervenir dans la résistance aux échinocandines.

Du fait d'une forte liaison aux protéines plasmatiques, l'efficacité des échinocandines peut diminuer. Dès lors, au lieu d'avoir un effet fongicide, un effet fongistatique peut être observé dans certains cas<sup>146, 147</sup>. Cela permet la mise en place d'un mécanisme de tolérance, appelé réponse adaptative au stress, qui permettrait la survie cellulaire.

Cette réponse implique des modifications dans la paroi fongique, très dynamique et capable d'augmenter la production d'un ou de plusieurs de ses composants quand un autre est inhibé, afin de maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire.

Des études *in vitro* montre ainsi qu'il y a une augmentation de la synthèse de chitine chez certains *Candida* en réponse à l'inhibition de la synthèse de BDG par les échinocandines<sup>64, 148, 149</sup>. A titre d'exemple, la Figure 12 représente les résultats de l'une de ces études effectuée sur *C. albicans* en présence de CS et/ou de Calcofluor White, un agent qui perturbe aussi la paroi fongique<sup>148</sup>.



**Figure 12. Impacts de la CS et du Calcofluor White sur la synthèse de chitine chez *C. albicans***

(A) Microscopie électronique montrant des particules d'or colloïdal contenant de la chitine avant (i) et après traitement par une concentration de 0,032 µg/mL de CS (ii) (B) Evaluation de la quantité de chitine chez *C. albicans* avec du Calcofluor white mais sans CS (i) avec 0,032 µg/mL de CS (ii) avec 200 mM de CaCl<sub>2</sub> (iii) avec pré-exposition au CaCl<sub>2</sub> puis 0,032 µg/mL de CS.

Ce phénomène mettrait en jeu dans un premier temps des protéines transmembranaires détectant la perte d'intégrité de la paroi cellulaire. Dans un second temps, la protéine kinase C (PKC) et des voies de signalisation mobilisant le Ca<sup>2+</sup> et des calcineurines permettraient la

modification de la composition de la paroi fongique<sup>148, 150</sup>. Le blocage de ce mécanisme par des inhibiteurs de la PKC ou de la calcineurine restaure l'activité fongicide, ce qui conforte cette hypothèse<sup>151, 152</sup>. Cette réponse aux échinocandines fait partie des différents mécanismes de réponse au stress chez *C. albicans*, que nous présentons dans la Figure 13<sup>153</sup>.

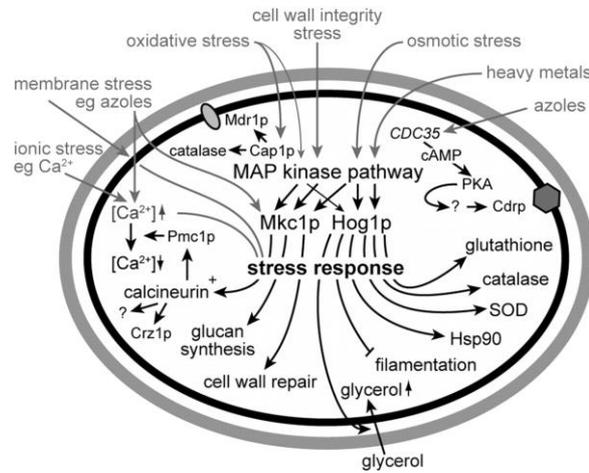


Figure 13. Mécanismes de réponse au stress chez *C. albicans*

Par ailleurs, chez la souris, cette hausse du taux de chitine a été associée à une résistance aux échinocandines. Elle s'est matérialisée *in vitro* par la capacité de croître à des concentrations hautes en antifongique, on parle alors d'effet paradoxal<sup>154</sup>. D'autres études *in vitro* observent aussi cet effet paradoxal.

L'impact clinique de cette réponse adaptative n'est pas très clair. Chez l'invertébré *Galleria mellonella*, elle est associée à une virulence moindre<sup>155</sup>. On peut penser qu'elle prédispose les cellules à l'apparition de mutants *FKS*, comme le souligne la Figure 14<sup>145</sup>.

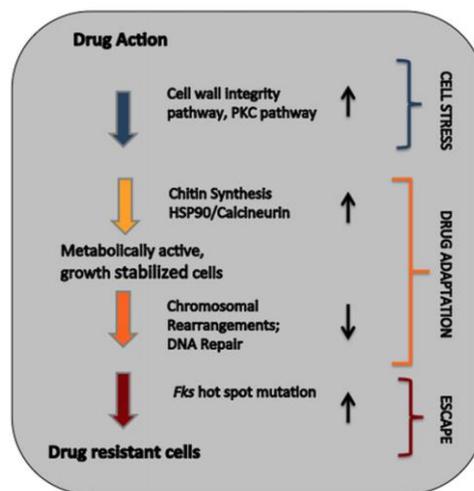


Figure 14. Différentes étapes pouvant mener à l'apparition de mutations *FKS* chez *Candida* spp. suite à l'exposition à un antifongique, d'après Perlin *et al.*

## 2. Résistance aux autres classes d'antifongiques

### a. Résistance aux polyènes

La résistance aux polyènes (AMB et nystatine) est peu décrite chez *Candida* et les connaissances sur les mécanismes impliqués restent encore aujourd'hui incomplètes.

Cela est en partie lié au fait que les isolats cliniques résistants à ces polyènes sont rares, l'effet fongicide limitant la sélection de mutants.

Des études montrent que la résistance peut être associée à des changements de composition dans les stérols membranaires, avec parfois une disparition de l'ergostérol (molécule cible de l'AMB) au profit d'autres stérols. Des mutations dans la voie de synthèse de l'ergostérol ont ainsi été décrites : *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* et *ERG11* <sup>156</sup>.

Les techniques de références ne sont pas très performantes pour la détection de cette résistance, et la technique de l'Etest<sup>®</sup> semble mieux adaptée.

### b. Résistance à la 5-fluorocytosine

La résistance à la 5-FC peut apparaître rapidement, ce qui ne permet pas de l'utiliser en monothérapie. Il existe deux principaux mécanismes de résistance.

Le premier est la diminution de la pénétration intracellulaire de la molécule liée à des mutations dans *FCY2*, qui code pour la cytosine perméase.

Le deuxième mécanisme est une altération du métabolisme de la molécule ou de son métabolite actif (5-FU) liée à des mutations dans *FCY1* (codant la cytosine déaminase et responsable de la conversion en 5-FU) ou *FURI* (responsable de la conversion du 5-FU en 5-fluorouridine monophosphate). Ce type de mutations est notamment décrit chez *C. albicans* et *C. lusitaniae* <sup>157, 158</sup>.

L'une des cibles de la molécule étant la thymidilate synthétase, une augmentation de l'expression du gène codant cette enzyme pourrait compenser les effets antifongiques.

Enfin, il existe aussi une résistance intrinsèque à la 5-FC chez *C. krusei* et pour certaines sous-populations de *C. albicans*.

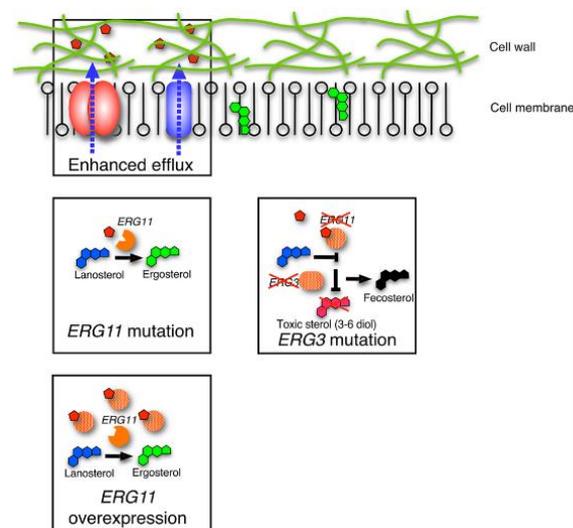
Des CBP existent dans les documents du CLSI mais pas dans ceux de l'EUCAST. Ils ne reposent que sur des données historiques et partiellement sur des données de pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD).

### c. Résistance aux azolés

Les azolés bloquent la synthèse d'ergostérol, un important composant de la membrane cellulaire fongique. Pour cela, ils inhibent la lanostérol 14- $\alpha$ -stérol déméthylase, une enzyme impliquée dans la conversion du lanostérol en ergostérol. Cela conduit à l'accumulation d'un

composé toxique, le 14- $\alpha$ -méthyl-3,6-diol, et à la diminution du contenu en ergostérol dans la membrane fongique. Dès lors, la croissance cellulaire est inhibée.

Les principaux mécanismes de résistance aux azolés décrits chez *Candida* sont présentés dans la Figure 15<sup>61</sup>.



**Figure 15. Mécanismes de résistance aux azolés chez *Candida* spp.**

L'induction de pompes d'efflux réduit les concentrations intracellulaires d'antifongiques et implique une résistance à tous les azolés (transporteurs ABC) ou à certains azolés (transporteurs MFS). La modification (diminution de l'affinité de la 14- $\alpha$ -stérol déméthylase) ou l'Up-Regulation d'ERG11 (surproduction de 14- $\alpha$ -stérol déméthylase) prévient la fixation de l'antifongique sur son site cible. Des mutations dans *ERG3* bloquent la formation de stérols toxiques.

Plusieurs de ces mécanismes de résistance peuvent coexister chez un même isolat, ce qui peut conduire à un effet additif ou à l'apparition de résistances croisées entre les azolés.

#### i. Induction de pompes à efflux

Le principal mécanisme de résistance décrit chez les azolés est l'augmentation du nombre de pompes d'efflux via des mutations « gain de fonction » au sein des gènes des facteurs de transcription régulant leur expression. Cela réduit la concentration de l'azolé au niveau intracellulaire et de l'enzyme cible.

Ces pompes d'efflux sont naturelles chez *Candida* et appartiennent à deux grandes familles de protéines : la Major Facilitator Superfamily (MFS), codée par les gènes *MDR* (en particulier *MDR1*), et le groupe des transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette), codés par les gènes *CDR* (en particulier *CDR1* et *CDR2*).

L'augmentation de production des transporteurs ABC et MFS est respectivement liée à des mutations dans les gènes *TAC1* et *MRR1*, qui codent des facteurs de transcription des gènes codant pour les transporteurs.

Sont représentés dans la Figure 16 les principaux substrats concernant Cdr1p et CaMdr1p, des transporteurs appartenant respectivement à la famille des transporteurs ABC et MFS <sup>159</sup>.

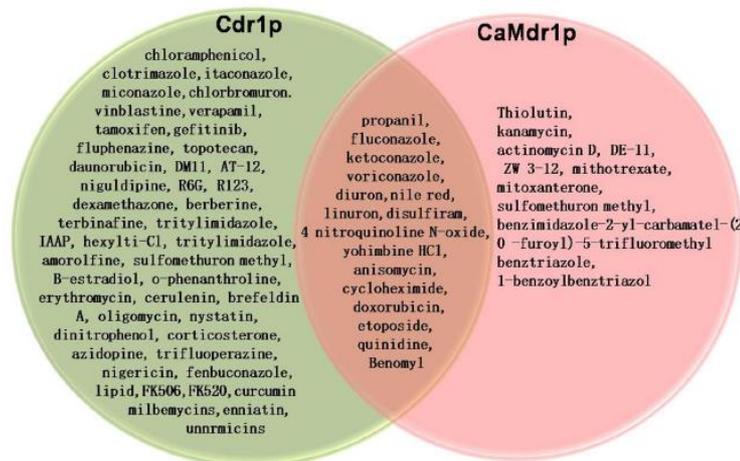


Figure 16. Substrats spécifiques et communs des pompes Cdr1p et CaMdr1p

Nous voyons donc que l'induction des pompes d'efflux codées par les gènes *CDR* (transporteurs ABC) confère une résistance à presque tous les azolés, alors que l'induction des pompes d'efflux codées par les gènes *MDR* (transporteurs MFS) semble être plus spécifique au fluconazole et au voriconazole <sup>160</sup>.

Ce mécanisme de résistance a déjà été rapporté comme conférant une résistance clinique aux azolés chez *C. albicans* (*MDR1*, *CDR1*, *CDR2*), *C. glabrata* (*CgCDR1*, *CgCDR2*) et *C. dubliniensis* (*CdMDR1*, *CdCDR1*) <sup>161, 162</sup>.

#### ii. Modification de l'enzyme cible

Un autre mécanisme de résistance est la modification de l'enzyme cible des azolés, la lanostérol 14- $\alpha$ -stérol déméthylase (*Erg11p* ou *Cyp51*), codée par le gène *ERG11*.

*ERG11* est un gène très polymorphique et certaines mutations ne sont pas responsables de la résistance. Celles qui le sont modifient l'affinité de l'enzyme pour les azolés. Ces derniers ne peuvent alors plus jouer leurs rôles d'inhibiteurs. A noter que *C. krusei* présente naturellement ce type de résistance au fluconazole.

#### iii. Surexpression de l'enzyme cible

En augmentant la production de l'enzyme cible, le champignon peut diminuer sa sensibilité à l'activité des azolés. Une augmentation du nombre de copies de *ERG11* à la suite de réarrangements chromosomiques est un autre mécanisme qui aboutit aux mêmes effets.

Chez certains patients, on trouve ainsi des isolats de *Candida* avec une sensibilité diminuée aux azolés, avec des concentrations d'*ERG11p* plus importantes que chez des isolats sensibles <sup>163</sup>. Ce phénomène est notamment observé lorsqu'il existe une mutation dans les gènes codant le facteur de régulation *UPC2*.

Ce mécanisme est rarement vu seul et n'induit qu'une augmentation modérée des CMI, ce qui suggère qu'il doit être associé à d'autres mécanismes pour aboutir à une résistance <sup>160</sup>.

iv. Mutations dans le gène *ERG3*

Le dernier mécanisme de résistance aux azolés implique des mutations dans *ERG3*, qui préviennent la formation de 14- $\alpha$ -méthyl-3,6-diol à partir du 14- $\alpha$ -méthylfécostérol. Dès lors, les stérols méthylés toxiques sont moins nombreux et il y a synthèse de fécostérol capable de remplacer l'ergostérol dans la membrane fongique. La cellule fongique peut donc survivre et devient résistante aux azolés. Il s'agit d'un mécanisme de résistance peu fréquent, décrit initialement chez *C. albicans*, et qui confère une résistance croisée à l'AMB.

### **3. Autres mécanismes de résistance**

#### **a. Perte de l'hétérozygotie**

La plasticité génomique de *C. albicans* joue un rôle important dans le développement de la résistance aux antifongiques. Sur les gènes associés à la résistance, la perte de l'hétérozygotie ou des réarrangements chromosomiques amplifiant le nombre de copies des gènes sont les principaux mécanismes décrits.

La perte de l'hétérozygotie est un événement important dans la génération de la diversité phénotypique chez *C. albicans* <sup>164</sup>. Alors que les cellules diploïdes portent deux copies de chaque gène, et parce que la majorité des mutations sont récessives, les nouvelles mutations ont en général peu ou pas d'effets. La recombinaison entre des paires de chromosomes peut impliquer la perte d'hétérozygotie et démasque le phénotype de résistance lié à des mutations précédemment acquises. Il est à noter que cela ne concerne pas *C. glabrata*, espèce déjà haploïde, et chez qui la résistance s'exprime donc plus facilement.

Chez *C. albicans*, cet événement est observé sur des isolats soumis à différentes pressions. Forche *et al.* démontrent ainsi que la perte de l'hétérozygotie chez *C. albicans* augmentent sous l'influence de différents facteurs : stress thermique (39 °C), stress oxydatif (peroxyde d'hydrogène) et utilisation du fluconazole. De plus, il y a une corrélation entre l'intensité du stress et le taux de perte d'hétérozygotie <sup>164</sup>.

#### **b. Production de biofilms**

L'utilisation des dispositifs médicaux (DM) tels que les cathéters, en particulier chez les patients immunodéprimés, a connu un essor important ces dernières années. *Candida* peut adhérer à ces DM et former ensuite un biofilm. Il s'agit d'une importante structure à l'origine de multiples problèmes. En effet, les *Candida* peuvent alors échapper à la réponse immunitaire, se développer, et être à l'origine de mycoses systémiques. Ces biofilms posent aussi le problème du traitement car ils engendrent une diminution de la sensibilité aux antifongiques.

La résistance liée au biofilm est multifactorielle. Elle met en jeu des mécanismes de résistance classiques (en particulier les pompes à efflux, décrites chez les *Candida* planctoniques) à des mécanismes de résistance spécifiques au biofilm : modification de la synthèse de stérols, croissance et densité cellulaire modifiée, apparition de cellules persistantes (tolérantes aux antifongiques) et présence d'une matrice extracellulaire (MEC) <sup>165</sup>.

#### Rôle des pompes à efflux :

Comme vu précédemment, les pompes à efflux jouent un rôle important dans la résistance aux azolés. En plus de permettre la résistance aux azolés, elles joueraient un rôle dans la phase précoce de formation du biofilm, notamment dans la communication intercellulaire entre les levures.

#### Rôle de la synthèse de stérols :

Les cellules présentes dans le biofilm présentent de plus faibles concentrations en ergostérol par rapport aux cellules planctoniques, en particulier dans la phase tardive de formation du biofilm. Cela permettrait de maintenir la fluidité membranaire des levures tout en limitant l'efficacité potentielle de molécules comme les azolés ou l'AMB.

#### Rôle du taux de croissance cellulaire :

Les antifongiques sont actifs sur les cellules qui se divisent. Une autre hypothèse pour expliquer que le biofilm induit une résistance aux antifongiques est donc que les cellules s'y divisent moins vite, par manque de nutriments. Cette hypothèse a déjà été validée pour certains biofilms bactériens mais reste à prouver pour les levures <sup>166, 167</sup>.

#### Impact de la densité cellulaire et du Quorum Sensing :

Il est prouvé que la densité cellulaire au sein du biofilm est plus importante que chez les cellules planctoniques. Cela aboutit à un inoculum plus important, ce qui fait suspecter une moindre sensibilité aux antifongiques <sup>168</sup>. Le Quorum Sensing de cette densité cellulaire met notamment en jeu deux molécules, le tyrosol et le farnésol. Ce dernier inhibe la formation du biofilm tandis que le tyrosol a un effet opposé <sup>169-171</sup>.

#### Rôles de la MEC :

La MEC est un élément clé de la formation du biofilm. Elle est notamment composée de polymères de BDG et d'ADN extracellulaire. Elle joue un rôle majeur en séquestrant l'antifongique, ce qui lui empêche d'atteindre sa cible, tout en promouvant l'adhérence de nouvelles cellules. On pense également qu'elle pourrait empêcher l'absorption d'un certain nombre de nutriments destinés aux cellules. Les échinocandines semblent plus actives que les autres molécules sur le biofilm. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'elles empêchent la formation de BDG <sup>172</sup>.

## Rôles des cellules persistantes :

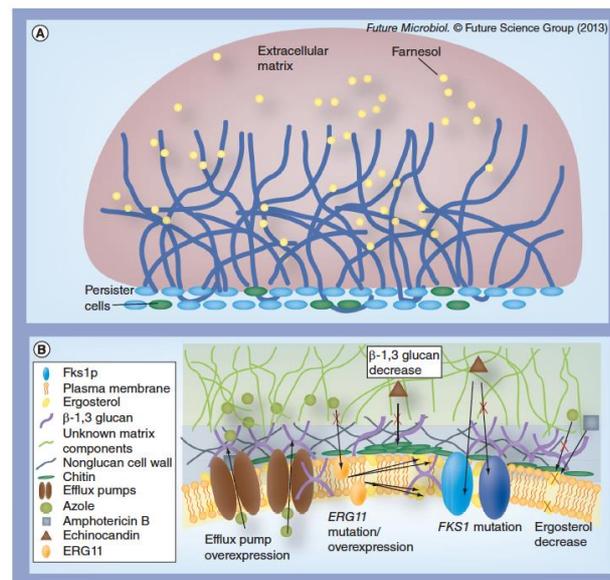
Il s'agit d'un sous-ensemble de cellules tolérantes à de nombreux antifongiques, en particulier l'AMB et les azolés. L'analyse transcriptomique de ces cellules montre des modifications sur différents gènes impliqués dans la voie de synthèse de l'ergostérol (*ERG1*, *ERG25*) et du (1,6)- $\beta$ -D-glucane (*SKN1*, *KRE1*). Cela suggère que le passage en cellule persistante implique des modifications dans la paroi et la membrane.

Ces cellules sont particulièrement décrites chez *C. krusei* et *C. albicans*, et peuvent causer des échecs thérapeutiques <sup>165, 173</sup>.

## Influence de la réponse au stress :

La réponse au stress impliquée dans le biofilm implique notamment la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), la voie des calcineurines (phosphatase importante pour l'homéostasie, la morphogenèse et la virulence cellulaire) et la voie de Hsp90 (protéine chaperonne). Elle jouerait un rôle dans la formation du biofilm <sup>165, 174</sup>.

L'ensemble de ces mécanismes de résistance associés au biofilm est résumé dans la Figure 17 <sup>165</sup>.



**Figure 17. Mécanismes de résistance associés au biofilm chez *C. albicans*, d'après Taff *et al.***

En pratique clinique et dans les services de réanimation, les candidoses peuvent être favorisées par la formation de biofilms, en particulier au niveau des cathéters. Certains antifongiques sont plus efficaces que d'autres sur ces structures. C'est notamment le cas de la L-AMB et des échinocandines <sup>175</sup>. A l'inverse, les levures dans les biofilms sont plus de 1000 fois plus résistantes aux azolés <sup>176</sup>.

Le traitement d'un biofilm de *C. albicans* par des enzymes de type DNase permet de potentialiser l'activité des échinocandines et de l'AMB. En revanche, l'activité du fluconazole reste faible <sup>177</sup>.

Une autre question se pose concernant le biofilm de *Candida* présent au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI). Nous savons que le TGI est un site avec de nombreuses espèces de *Candida*. Des études de génotypage ont montré que les isolats colonisants sont souvent les isolats responsables des CI <sup>178</sup>. Dès lors, il existe un risque de sélection de variants résistants au niveau du TGI pouvant causer des infections intra-abdominales après chirurgie : péritonite, abcès intra-abdominaux... Récemment, une étude de Shields *et al.* évoque même la possibilité que les *Candida* spp. abdominaux pourrait être un réservoir de la résistance aux échinocandines <sup>179</sup>. Cette notion est à prendre en compte dans les études de résistances, qui souvent ne répertorient que les isolats des hémocultures alors que les isolats de nombreuses infections profondes ou disséminées ne sont jamais isolés à partir du sang circulant.

## E. Impacts microbiologiques

La résistance microbiologique aux antifongiques a été associée à des échecs thérapeutiques et à une augmentation des coûts liés aux soins.

A ce titre, Pfaller *et al.* montrent que les échecs thérapeutiques sont plus fréquents chez les patients avec des *Candida* résistants au fluconazole et au voriconazole que chez les patients avec des isolats sensibles ou de sensibilité diminuée à ces molécules <sup>180</sup> (Tableau 16).

**Tableau 16. Relation entre sensibilité aux azolés et succès thérapeutique, d'après Pfaller *et al.***

Azole	Infection	Species	Category <sup>1</sup>	MIC breakpoint ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	No. of events	% success
Fluconazole	Candidaemia and mucosal candidiasis	<i>C. albicans</i> ,	Susceptible	$\leq 2$	550	92
		<i>C. tropicalis</i> ,	Susceptible dose-dependent	4	52	83
		<i>C. parapsilosis</i>	Resistant	$\geq 8$	212	37
Voriconazole	Candidaemia and invasive candidiasis	<i>C. albicans</i> ,	Susceptible	$\leq 0.125$	173	75.7
		<i>C. tropicalis</i> ,	Susceptible dose-dependent	0.25–0.5	9	100.0
		<i>C. parapsilosis</i>	Resistant	$\geq 1$	8	37.5

Lors d'une étude américaine réalisée sur 298 greffés de moelle osseuse entre 2002 et 2004 et recevant du fluconazole comme prophylaxie antifongique, Alexander *et al.* rapportent 8 cas d'infections <sup>181</sup>. Sur ces 8 cas, 7 concernent *C. glabrata* et 4 d'entre eux ont une résistance croisée pour le fluconazole, le voriconazole, l'itraconazole et le posaconazole.

Les cas d'échecs thérapeutiques associés à des hausses de CMI et des mutations *FKS* existent aussi pour les échinocandines <sup>118, 182–185</sup>. Ils peuvent apparaître rapidement, comme le souligne le cas d'un *C. kefyr* porteur d'une mutation dans le HS1 de *FKS1* apparue pendant les premiers jours d'un traitement par CS <sup>106</sup>, ainsi que le cas similaire d'un *C. krusei* avec une mutation dans HS1 de *FKS1* seulement 10 jours après le début d'un traitement par CS <sup>186</sup>.

D'autre part, ces mutations *FKS* ont été rapportées comme étant le seul facteur indépendant associé à un échec clinique, et leurs détection permet de mieux prédire la réponse au traitement <sup>187</sup>.

Concernant les mutations *FKS* et la production de biofilm, une étude récente montre que la production de biofilm par les mutants *FKS* est similaire à celle de souches sans mutations *FKS* <sup>188</sup>.

# Matériel et méthodes

## I. Sélection des patients

Notre étude concerne les patients ayant bénéficié d'une TH à l'hôpital Henri Mondor (Créteil, France) du 1<sup>er</sup> janvier 2013 au 30 juin 2013 (étude rétrospective) et du 1<sup>er</sup> janvier 2015 au 30 juin 2015 (étude prospective). Tous les types de TH ont été inclus (donneur cadavérique, donneur domino, foie entier ou partagé, retransplantation, transplantation multi-organe foie-rein).

## II. Prélèvements

### A. Prélèvements reçus

Une fois par semaine après la TH (considérée comme le J0), une carte fongique est systématiquement prélevée. Cette cartographie comprend les sites suivants : bouche, nez, axillaire, aine, anus (un écouvillon par site de prélèvement).

En fonction du contexte clinique, d'autres types de prélèvements non systématiques sont reçus au laboratoire : prélèvements respiratoires, liquides de ponction, cathéters, hémocultures...

### B. Mise en culture

Les prélèvements des cartes fongiques reçus au laboratoire sont ensemencés sur un milieu chromogène et spécifique pour la recherche de *Candida* (BBL™ CHROMagar™ *Candida* Medium, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) et incubés à 37 °C. La lecture des cultures se fait à 24 heures et 48 heures d'incubation.

Le milieu utilisé inhibe la croissance des bactéries et contient des substrats chromogènes qui libèrent des composés de diverses couleurs lorsqu'ils sont dégradés par des enzymes spécifiques. Cela permet l'identification présomptive directe de *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. krusei* sur la boîte de Pétri d'isolement. Les colonies de *C. albicans* sont d'un vert clair à moyen, celles de *C. tropicalis* sont bleu verdâtre à bleu métallisé, et celles de *C. krusei* rose pâle avec un contour blanchâtre en périphérie. D'autres espèces de levure peuvent prendre leur couleur naturelle (crème) ou un aspect rose ou mauve clair à foncé comme pour *C. glabrata*.

Dans certains cas, en particulier pour les prélèvements autres que ceux des cartes fongiques, il y a un ensemencement sur un tube Sabouraud (Sabouraud Chloramphenicol Gentamicine Agar, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et incubation à 37 °C.

## C. Souchage

Tous les isolats retrouvés en culture ont été souchés sur cryo-billes dans du glycérol (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et conservés au congélateur à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## D. Identification

Les méthodes d'identification utilisées en routine à partir des cultures sont : tests d'agglutination (Krusei-color<sup>®</sup>, Bichro-dubli<sup>®</sup>, Bichro-latex *albicans*<sup>®</sup>, Fumouze Diagnostics), tests enzymatiques (*glabrata* RTT<sup>®</sup>, Fumouze Diagnostics) et galeries biochimiques (API<sup>®</sup> ID32C, bioMérieux).

Cependant, dans le cas où un isolat est résistant à au moins une échinocandine par la technique de l'Ettest<sup>®</sup> chez un patient, une identification par la spectrométrie de masse (Microflex, Brüker Daltonics, Allemagne) a été réalisée pour tous les isolats du patient concerné.

Cette identification par spectrométrie de masse a été effectuée sur des colonies fraîches (48-72 heures de culture).

Pour cela, des colonies ont été introduites dans 300  $\mu\text{L}$  d'eau distillée afin d'obtenir un Mac Farland (McF) de 4-5. 900  $\mu\text{L}$  d'éthanol concentré à 70 % ont ensuite été ajoutés. Après une centrifugation pendant 2 minutes à 13 000 rotations par minute (rpm), le surnageant a été éliminé puis 50  $\mu\text{L}$  d'acide formique et 50  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile ont été introduits. Enfin, après une nouvelle centrifugation pendant 2 minutes à 13 000 rpm, 2  $\mu\text{L}$  du surnageant puis 1  $\mu\text{L}$  de matrice ont été déposés sur la cible.

Le standard qui a été utilisé pour valider la technique est celui de chez Brüker (BTS correspondant à un *Escherichia coli*).

Les critères d'acceptation pour l'identification d'un isolat par la spectrométrie de masse ont été les suivants : première proposition avec un score supérieur à 2, ou trois premières propositions avec un score supérieur à 1,7.

## III. Détermination de la sensibilité aux antifongiques

### A. Méthode Ettest<sup>®</sup>

#### 1. Sélection des isolats à tester

Parmi les patients inclus en 2013 et en 2015, un Ettest<sup>®</sup> a été réalisé pour les isolats des patients colonisés et/ou infectés à *Candida* et traités par une échinocandine. Des patients colonisés et non traités ont également été inclus étant afin de constituer un groupe contrôle. Toutes les espèces ont été testées excepté *C. parapsilosis* étant donné qu'elle présente

naturellement des CMI élevées pour les échinocandines.

Les antifongiques testés ont été l'ANF et la MCF. La CS n'a pas été testée en première intention étant donné les recommandations actuelles de l'EUCAST et du CLSI.

## 2. Technique

Les CMI de routine ont été réalisées en milieu gélosé RPMI (bioMérieux) à l'aide de bandelettes Etest<sup>®</sup> (bioMérieux) et selon les recommandations du fournisseur, en particulier :

- préparation d'un inoculum 0.5 McF, mesuré par spectrophotométrie (DENSIMAT, bioMérieux) ;
- 2 fois de suite, écouvillonnage en ensemençant à 3 reprises toute la surface de la gélose, en tournant la boîte de 60 ° à chaque fois pour assurer une distribution uniforme de l'inoculum ;
- application des bandelettes Etest<sup>®</sup> 15 à 20 minutes après l'écouvillonnage, ce qui laisse le temps à la gélose RPMI d'absorber l'humidité en excès.

Les valeurs des CMI ont été déterminées au seuil de 80 % d'inhibition et les seuils de sensibilité utilisés sont ceux du fournisseur (Tableau 17).

**Tableau 17. Seuils de sensibilité utilisés pour l'interprétation des antifongogrammes (Etest<sup>®</sup>)**

ANTIFUNGAL MIC µg/mL	CODE (2)	PERFORMANCE (3)	N	% EA (4)	INTERPRETIVE CRITERIA (12) MIC µg/mL	S ≤	S-DD (8)	I	R ≥	QUALITY CONTROL (6)	MIC µg/mL						
Amphotericin B 0.002-32	AP	Yeast	621	98	Not available (7)					<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.25 - 1					
		Mould	176	90						<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	0.5 - 2					
										<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.125 - 0.5					
Anidulafungin 0.002-32	AND	Yeast	395	100	<i>C. albicans, C. tropicalis, C. krusei</i>	0.25	-	0.5	1	<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.5 - 4					
		Mould	169	96						<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	0.016 - 0.125					
										<i>C. parapsilosis, C. guilliermondii</i>	2	-	4	8	<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.002 - 0.008
										<i>C. albicans, C. tropicalis, C. krusei</i>	0.25	-	0.5	1	<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.25 - 2
Caspofungin 0.002-32	CS	Yeast	209	99	<i>C. albicans, C. tropicalis, C. krusei</i>	0.25	-	0.5	1	<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.25 - 2					
										<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	0.25 - 1					
										<i>C. glabrata</i>	0.12	-	0.25	0.5	<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.064 - 0.25
										<i>C. parapsilosis, C. guilliermondii</i>	2	-	4	8	<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.064 - 0.25
Fluconazole 0.016-256	FL	Yeast	1090	95	<i>C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis</i>	2	4	-	8	<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	1 - 8					
										<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	128 - ≥256					
										<i>C. glabrata</i>	-	≤ 32	-	64	<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.125 - 0.5
										<i>C. krusei</i>	Not available (7)		<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.125 - 0.5		
Flucytosine 0.002-32	FC	Yeast	483	96	Not available (7)					<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.064-0.25					
										<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	≥ 32					
										<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.5 - 2					
										<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.064 - 0.25					
Itraconazole 0.002-32	IT	Yeast	498	94	Not available (7)					<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.064 - 0.25					
		Mould	698	94							<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	0.25 - 1				
											<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.064 - 0.25				
											<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.064 - 0.25				
Ketoconazole 0.002-32	KE	Yeast	380	95	Not available (7)					<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.032 - 0.125					
										<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	0.25 - 1					
										<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.008 - 0.032					
										<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.008 - 0.032					
Micafungin 0.002-32	MYC	Yeast	220	100	<i>C. albicans, C. tropicalis, C. krusei</i>	0.25	-	0.5	1	<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.25 - 2					
										<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	0.032 - 0.25					
										<i>C. glabrata</i>	0.06	-	0.12	0.25	<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.004 - 0.032
										<i>C. parapsilosis, C. guilliermondii</i>	2	-	4	8	<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.004 - 0.032
Posaconazole 0.002-32	POS	Yeast	419	93	Not available (7)					<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.032 - 0.25					
		Mould	222	98							<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	0.125 - 0.5				
											<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.032 - 0.125				
											<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.032 - 0.125				
Voriconazole 0.002-32	VO	Yeast	631	96	<i>C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis</i>	0.12	0.25-0.5	-	1	<i>C. parapsilosis</i>	AT CC <sup>®</sup> 22019 <sup>TM</sup>	0.016 - 0.064					
		Mould	423	99							<i>C. krusei</i>	AT CC <sup>®</sup> 6258 <sup>TM</sup>	0.25 - 1				
											<i>C. glabrata</i>	Not available (7)		<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>	0.004 - 0.016	
											<i>C. krusei</i>	0.5	1	-	2	<i>C. albicans</i>	AT CC <sup>®</sup> 90028 <sup>TM</sup>

Pour *C. dubliniensis*, nous avons utilisé les CBP de *C. albicans* étant donné qu'il a été montré que les seuils de sensibilité sont similaires pour chaque échinocandine pour ces deux espèces

## B. Méthode EUCAST

Dans le cas où l'un des isolats est catégorisé intermédiaire ou résistant à une échinocandine (ANF ou MCF), des CMI en milieu liquide par la méthode de référence EUCAST ont été réalisées pour la CS, l'ANF et la MCF pour tous les isolats du patient concerné afin de confirmer la résistance microbiologique.

La détermination des CMI en milieu liquide a été réalisée par la méthode EUCAST. Les recommandations de l'EUCAST (procédure EUCAST EDef 7.2) ont été suivies pour la réalisation de ces tests. Les contrôles qualités ont été les suivants : *C. parapsilosis* ATCC 22019 et *C. krusei* ATCC 6258.

### 1. Préparation du milieu liquide RPMI

Le milieu RPMI a été réalisé en ajoutant à 900 mL d'eau distillée : 20,8 g de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France), 69,06 g de MOPS (acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique) (Sigma-Aldrich) et 36 g de glucose. Cela permet d'obtenir un milieu avec une concentration en glucose de 20 g/L.

Le pH de la solution a ensuite été ajusté à 7,0 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium concentrée à 1M puis de l'eau distillée a été ajoutée ensuite afin d'obtenir un volume final de 1 litre.

Pour stériliser le mélange, la solution a été filtrée sur un filtre stérilisant à 0,22 µm.

### 2. Préparation des différentes dilutions d'antifongiques et de la solution de travail

A partir de poudres d'antifongiques d'ANF, de MCF et de CS (Sigma-Aldrich), des solutions d'une concentration de 1600 µg/mL d'antifongique ont été réalisées en ajoutant de l'eau distillée.

La formule utilisée pour calculer la quantité d'eau distillée à ajouter à la poudre d'antifongique a été la suivante :

$$\text{Volume} = \frac{\text{Poids(g)} \times \text{Pureté} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right)}{\text{Concentration} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}$$

A partir des solutions mères concentrées à 1600 µg/mL, différentes dilutions ont ensuite été effectuées à l'aide du DMSO et du RPMI afin d'obtenir des solutions avec des concentrations d'antifongiques variant de 16 µg/mL à 0,03125 µg/mL, ce qui constitue les solutions de travail.

### 3. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été réalisé à partir de cultures de 18-24 heures à 37 °C. Des colonies sont ajoutées dans de l'eau distillée stérile afin d'obtenir un 0,5 McF (DENSIMAT, bioMérieux), soit  $1-5 \times 10^6$  CFU/mL.

### 4. Inoculation des plaques

Les plaques utilisées contiennent 96 puits (8 lignes et 12 colonnes). Pour chaque ligne, dans les puits numérotés de 1 à 10, il a été introduit 100 µL de solution de travail (avec une concentration décroissante d'antifongique), puis 100 µL d'inoculum. Pour le puits 11 (témoin positif), il a été introduit 100 µL d'inoculum avec 100 µL d'eau stérile. Pour le puits 12 (témoin négatif), il a été introduit utilise 100 µL de RPMI avec 100 µL d'eau stérile. Il est représenté dans la Figure 18 le plan d'une plaque pour un antifongique testé sur 8 isolats.

N° isolat	Concentration finale d'antifongique dans le puits (mg/L)										Témoin positif	Témoin négatif
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016		
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

Figure 18. Plan d'une plaque pour un antifongique testé sur 8 isolats différents

Les plaques ont ensuite été mises à incuber pendant 24 heures à 35 °C.

### 5. Lecture et interprétation des résultats

La lecture des résultats a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espagne) utilisant une longueur d'onde de 530 nm.

La moyenne des densités optiques (DO) mesurées pour les 8 témoins négatifs a été soustraite de toutes les autres DO observées dans les autres puits de la plaque.

Pour les échinocandines, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus basse avec une inhibition de croissance  $\geq 50$  % par rapport au témoin positif.

Les CBP utilisés ont été ceux de l'EUCAST v8.0 (Tableau 18).

**Tableau 18. Seuils de sensibilité utilisés pour l'interprétation des antifongogrammes (EUCAST v8.0)**

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)												Non-species related breakpoints <sup>1</sup>		
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. guilliermondii</i>				
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	
Amphotericin B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
Anidulafungin	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	
Caspofungin	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	
Fluconazole	2	4	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	2	4	
Isavuconazole	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	
Itraconazole	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.12	0.12	0.12	0.12	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	
Micafungin	0.016	0.016	0.03	0.03	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	0.002	2	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE	IE	
Posaconazole	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.06	0.06	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	
Voriconazole	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	IE	IE	IE	IE	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	

## IV. Séquençage des gènes *FKS*

Tous les isolats avec une résistance microbiologique par la technique de référence de l'EUCAST ont été séquencés au niveau des HS des gènes *FKS*.

Les gènes séquencés et les amorces utilisées sont regroupés dans le Tableau 19.

**Tableau 19. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes *FKS***

Noms des amorces utilisées	Amorces <sup>a</sup>	Séquence (5'-3')
<i>C. glabrata</i>		
<i>FKS1</i> -HS1	Fw	TTGTTGCAGTCGCTACATTGC
	Rv	TAGAAAGATTTACCAACGGAAA
<i>FKS2</i> -HS1	Fw	GCTTCTCAGACTTTCACCG
	Rv	CAGAATAGTGTGGAGTCAAGACG
<i>C. albicans</i>		
<i>FKS1</i> -HS1	Fw	TCATTGCTGTGGCCACTTTAG
	Rv	TAGAAAGATTTACCAACGGAAA
<i>FKS1</i> -HS2	Fw	AAGATTGGTGCGYGGTATGGG
	Rv	RGTDGCAAAACCTCTAGCAGT
<i>C. dubliniensis</i>		
<i>FKS1</i> -HS1	Fw	TATTCTTTGCTGTCATGCCCTT
	Rv	ACCCAAATAGAATGAACGACCA
<i>FKS1</i> -HS2	Fw	AAGATTGGTGCGYGGTATGGG
	Rv	RGTDGCAAAACCTCTAGCAGT

<sup>a</sup> Fw, Forward ; Rv, Reverse.

## **A. Extraction et dosage de l'ADN**

Après une lyse cellulaire mécanique à l'aide de billes en céramique (Magna Lyser Green Beads, Roche Diagnostics, Meylan, France), 50 µL de protéinase K (Qiagen Sciences Ing., Germantown, MD, USA) ont été ajoutés à l'échantillon et la solution a été mise à incuber pendant 1 heure à 37 °C. L'extraction de l'ADN fongique a ensuite été effectuée à l'aide du kit QIAamp DNA Blood Mini-kit (Qiagen Sciences Ing.). La procédure figure en Annexe 1. La quantité d'ADN contenue dans l'extrait a ensuite été dosée (Quant-iT™ Assays, Invitrogen).

## **B. Amplification de l'ADN**

Pour *C. glabrata* et *C. albicans*, les différents constituants qui ont été utilisés pour réaliser le mélange réactionnel figurent dans l'Annexe 2. A 70 µL de mélange réactionnel, il a été ajouté 20 ng de l'ADN extrait dilué dans de l'eau pour préparation injectable (ppi) afin d'obtenir un volume final de 100 µL. L'amplification a été faite sur un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler Gradient) avec le programme d'amplification suivant :

- 95 °C 10 minutes (dénaturation initiale) ;
- 40 cycles : 95 °C 30 secondes, 55 °C 30 secondes, 72 °C 1 minute ;
- 72 °C 10 minutes (élongation finale) ;
- 4 °C ∞ (conservation).

Concernant *C. dubliniensis*, les différents constituants qui ont été utilisés pour réaliser le Mélange réactionnel (Coffret FastStart) figurent dans l'Annexe 3. A 23 µL de Mélange réactionnel, il a été ajouté 2 µL de l'ADN extrait dilué à 10 ng/L dans de l'eau pour préparation injectable (ppi) afin d'obtenir un volume final de 25 µL. L'amplification a été faite sur un thermocycleur (LC480 FAC) avec le programme d'amplification suivant :

- 95 °C 8 minutes (dénaturation initiale) ;
- 35 cycles : 95 °C 30 secondes, 60 °C 30 secondes, 72 °C 1 minute ;
- 72 °C 5 minutes (élongation finale) ;
- 4 °C ∞ (conservation).

## **C. Visualisation de l'amplification**

La visualisation de l'amplification a été réalisée sur un gel d'agarose 1,2 % à l'aide d'Agarose Ultra Pure™ (Invitrogen), d'un tampon TAE 50X (Promega) dilué à 1X, et de Syber Safe DNA (Invitrogen). Le marqueur de taille utilisé a été le DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche Diagnostics).

## **D. Purification et dosage de l'ADN**

La purification de l'ADN a été effectuée à l'aide du kit MinElute PCR Purification Kit Protocol-250 (Qiagen Sciences Ing.). La procédure utilisée figure dans l'Annexe 4. Les amplicons ont ensuite été dosés par spectrophotométrie (Invitrogen).

## E. Séquençage des amplicons

Pour le séquençage par la méthode de Sanger, les produits de PCR purifiés ont été envoyés à une plate-forme de séquençage (Eurofins scientifique, Paris). Les séquences ont été analysées en utilisant Seqscape v2.5. Les séquences (acides aminés) des HS étudiés sont décrites dans le Tableau 20.

**Tableau 20. Séquences (acides aminés) des HS étudiés**

HS	Acides aminés
<i>FKS1-HS1</i> ( <i>C. albicans</i> et <i>C. dubliniensis</i> )	F641LTLSLRDP <sup>649</sup>
<i>FKS1-HS1</i> ( <i>C. glabrata</i> )	F625LILSLRDP <sup>633</sup>
<i>FKS1-HS2</i> ( <i>C. albicans</i> et <i>C. dubliniensis</i> )	(NIAPAV)D1351WIRRYTL <sup>1358</sup>
<i>FKS2-HS1</i> ( <i>C. glabrata</i> )	F659LILSLRDP <sup>667</sup>

## V. Génotypage des isolats

Le génotypage des *C. glabrata* a été réalisé en analysant 3 séquences microsatellites contenues respectivement dans le précurseur mitochondrial RNase P (*RMP2*), le gène de la métallothionéine I (*MTI*) et le gène de la 5,6-stérol désaturase (*ERG3*)<sup>190</sup>. Le génotypage des *C. albicans* a été réalisé en analysant 3 marqueurs microsatellites contenues respectivement dans le gène du facteur d'élongation de type 3 (*EF3*), le gène de la protéine du cycle de division cellulaire (*CDC3*) et le gène de l'imidazole glycérol phosphate déshydratase (*HIS*)<sup>191</sup>. Les séquences des amorces utilisées (Sigma-Aldrich) sont décrites dans le Tableau 21.

**Tableau 21. Amorces utilisées pour le génotypage**

Marqueur	Amorces <sup>a</sup>	Séquence (5' - 3')
<i>RPM2</i>	Fw	ATCTCCCAACTTCTCGTAGCC
	Rv	ACTTGAACGACTTGAACGCC
<i>ERG3</i>	Fw	AGTGCGAGTGTATGTAAAGAATG
	Rv	CGTATACCTTATCTCCGTTCAA
<i>MTI</i>	Fw	CAGCAATAATAGCTTCTGACTATGAC
	Rv	GACAGGAGCAACCGTTAGGA
<i>CDC3</i>	Fw	CAGATGATTTTTTGTATGAGAAGAA
	Rv	CAGTCACAAGATTAAAATGTTCAAG
<i>EF3</i>	Fw	TTTCTCTTCCTTTTATATAGAA
	Rv	GGATTCAGTAGCAGCAGACA
<i>HIS3</i>	Fw	TGGCAAAAATGATATTCCAA
	Rv	TACACTATGCCCAAACACA
<i>AAT1a</i>	Fw	ATCAAACACTAAATTTTTGAC
	Rv	CGGCAACATGATTAGCCC
<i>AAT1b</i>	Fw	ATGGCTTATCAAGGTTTTGC
	Rv	GTAGCATAAACTGAATAATCA
<i>ACC1</i>	Fw	GCCAGAGAAATTTTGATCCAATGT
	Rv	TTCATCAACATCATCCAAGTG
<i>ADP1</i>	Fw	GAGCCAAGTATGAATGACTTG
	Rv	TTGATCAACAAACCCGATAAT
<i>GLN4</i>	Fw	GAGATAGTTAAGAATAAAAAAGTTG
	Rv	GTCTCTTTCGTCTTTAGGACCCAATC
<i>MPIb</i>	Fw	ACCAGAAATGGCC
	Rv	GCAGCCATACATTCAATTAT
<i>RPN2</i>	Fw	TTTATGCATGCTGGTACTACTGATG
	Rv	TAACCCCACTACTCAAAGCAGCAGCCT
<i>SYA1</i>	Fw	AGAAGAATAGTTGCTCTTACTG
	Rv	GTTGCCCTTACCACCAGCTT
<i>VPS13</i>	Fw	CGTTGAGAGATATTCGACTT
	Rv	ACGGATCGATCGCCAATCC
<i>ZWF1b</i>	Fw	GTTTCATTTGATCCTGAAGC
	Rv	GCCATTGATAAGTACCTGGAT

<sup>a</sup> Fw, Forward ; Rv, Reverse. Rv

Les PCR ont été réalisées en utilisant un thermocycleur GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) dans un volume de 25 µL contenant 2 µL d'ADN. La composition du mélange de PCR était la suivante : tampon de PCR 2,5 µL, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate, 0,5 µM de chacune des amorces, et 1,25 U d'AmpliTaq Gold (Roche). Après une étape initiale de dénaturation de 8 minutes à 95 °C, 30 cycles de 95 °C pendant 30 secondes, 60 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 1 minute ont été effectués, suivie d'une étape supplémentaire de 5 minutes à 72 °C. Deux microlitres du mélange PCR ont ensuite été ajoutés à 20 µL de formamide contenant 0,5 µL de colorant Genescan 400HD ROX (ThermoFisher, Villebon sur Yvette, France) et dénaturé pendant 2 minutes à 95 °C. Les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse sur un analyseur ABI 310 séquence et les données analysées avec le logiciel Genescan (Applied Biosystems).

Le génotypage de *C. dubliniensis* a été effectué par la technique du MLST (Multilocus Sequence Typing). Dix loci différents ont été utilisés pour l'analyse : *AAT1a*, *AAT1b*, *ACC1*, *ADP1*, *GLN4*, *MPIb*, *RPN2*, *SYA1*, *VPS13*, et *ZWF1b*<sup>192</sup>. Les séquences des amorces utilisées (Sigma-Aldrich) sont décrites dans le Tableau 21. Les PCR ont été effectuées selon le même protocole que pour les marqueurs microsatellites.

## **VI. Données cliniques et thérapeutiques**

Pour chaque patient, des données cliniques et thérapeutiques ont été recueillies grâce à la partie « renseignements cliniques » de la feuille de demande, au logiciel de la base de données de l'hôpital (Médiweb), au logiciel de base de données spécifique au service de réanimation chirurgicale (logiciel 4D) et aux dossiers papiers accessibles dans le service. Ces différentes données ont été recueillies en étroite collaboration avec le service clinique.

# Résultats

## I. Patients

### A. Caractéristiques

Il a été inclus 52 et 42 patients en 2013 et 2015 respectivement.

Les caractéristiques des deux populations sont regroupées dans le Tableau 22.

**Tableau 22. Caractéristiques démographiques des deux populations de l'étude**

	2013	2015	Total
<b>Nombre de patients</b>	52	42	94
<b>Âges extrêmes (années)</b>	31-69	22-70	22-70
<b>Âge moyen (années)</b>	54,8	53,9	54,5
<b>Âge médian (années)</b>	55	54	54,5
<b>Sex ratio M/F</b>	2,9	3,7	3,25

Concernant les motifs de la TH, Nous regroupons l'ensemble des causes de TH des patients inclus dans le Tableau 23.

**Tableau 23. Motifs de la TH dans les deux populations de l'étude**

	2013	2015
<b>Cirrhose</b>	<b>27 (51,9 %)</b>	<b>20 (47,6 %)</b>
Cirrhose alcoolique	15	4
Cirrhose alcoolique + NASH	4	3
Cirrhose NASH	0	2
Cirrhose virale C	2	3
Cirrhose biliaire	2	3
Cirrhose alcoolique + virale C	2	4
Cirrhose virale B	1	1
Cirrhose alcoolique + NASH + virale B	1	0
<b>Carcinome hépatocellulaire</b>	<b>19 (36,5 %)</b>	<b>12 (28,6 %)</b>
Cirrhose alcoolique	7	7
Cirrhose alcoolique + NASH	5	0
Cirrhose NASH	0	1
Cirrhose virale C	4	0
Cirrhose virale C + NASH	1	0
Cirrhose alcoolique + virale B	0	1
Cirrhose alcoolique + virale C	0	2
Cirrhose alcoolique + NASH + virale C	1	0
Cirrhose virale B	1	1
<b>Autres causes</b>	<b>6 (11,5 %)</b>	<b>10 (23,8 %)</b>
Polykystose hépato-rénale	1	0
HAA cortico-résistante	1	0
Hépatite auto-immune + cholangite sclérosante	0	1
Atrésie des voies biliaires	0	1
Maladie de Wilson	0	1
Cholangite ischémique	1	0
Cholangite sclérosante primitive	1	2
Hépatite fulminante	1	1
Neuropathie amyloïde	1	4

La cirrhose reste la première étiologie dans tous les cas, avec en particulier la cirrhose alcoolique. Les CHC représentent la deuxième cause et sont souvent liés à l'intoxication alcoolique. Il existe enfin d'autres étiologies plus rares (neuropathie amyloïde, cholangite sclérosante primitive...) qui représentent néanmoins plus de 23,8 % des TH dans notre cohorte 2015.

## B. Classification clinique

Afin de faciliter l'interprétation de nos résultats, nous avons pour chaque année classé les patients dans différents groupes selon le traitement antifongique reçu et le délai de suivi.

Les groupes constitués sont les suivants :

- groupe 1 comprenant les patients n'ayant pas reçu de traitement antifongique ;
- groupe 2 comprenant les patients ayant reçu du fluconazole ou de l'AMB ;
- groupe 3 comprenant les patients ayant reçu une échinocandine ;
- groupe 4 comprenant les patients suivis une seule semaine.

Concernant le groupe 2, il est à noter qu'un seul patient a reçu de l'AMB. Il s'agit d'un patient de 2015 ayant des antécédents d'infections à Mucorales et *Aspergillus*. Pour les autres patients de ce groupe, le fluconazole a été administré à visée prophylactique, empirique, préemptive ou curative.

Concernant le groupe 3, la CS est l'échinocandine principalement utilisée. Néanmoins, la MCF a été administrée chez 2 patients en 2015.

Nous avons décidé de ne pas analyser les patients du groupe 4, étant donné le faible délai de suivi.

Au total, nous regroupons le nombre de patients de chaque groupe dans le Tableau 24.

**Tableau 24. Nombre de patients dans les différents groupes constitués lors de l'étude**

	2013	2015
<b>Groupe 1 (%)</b>	12 (23 %)	19 (45,2 %)
<b>Groupe 2 (%)</b>	9 (17,3 %)	5 (11,9 %)
<b>Groupe 3 (%)</b>	26 (50 %)	17 (40,4 %)
<b>Groupe 4 (%)</b>	5 (9,6 %)	1 (2,4 %)

Si on analyse les indications des traitements, on s'aperçoit que dans la majorité des cas il s'agit d'un traitement prophylactique et que les échinocandines sont les principales molécules utilisées dans cette indication (Tableau 25).

**Tableau 25. Indications des traitements antifongiques pour les patients inclus**

	2013 (52 patients)	2015 (42 patients)	Total (94 patients)
<b>Total traités</b>	35 (67 %)	22 (52 %)	57 (60,1 %)
<b>Prophylaxie</b>			
Amphotéricine B	0 (0 %)	1 (2 %)	1 (1 %)
Fluconazole	9 (17 %)	4 (9,5 %)	13 (13,8 %)
Caspofungine	26 (50 %)	15 (36 %)	37 (39,3 %)
Micafungine	0 (0 %)	2 (5 %)	2 (2,1 %)
<b>Curatif</b>			
Caspofungine	4 (7,7 %)	0 (0 %)	4 (4,2 %)

## II. Prélèvements reçus

### A. Groupe 1

Concernant les cartes fongiques, un total de 303 prélèvements pour 12 patients a été reçu en 2013, contre 170 pour 19 patients en 2015.

Nous avons distingué les sites digestifs (bouche, anus) des sites cutanés (nez, axillaire, aine).

Le nombre de cultures positives selon les sites et les différents *Candida* isolés est mentionné dans le Tableau 26.

**Tableau 26. Résultats des prélèvements reçus (carte fongique) pour les patients du groupe 1<sup>a</sup>**

	2013		2015	
	Sites digestifs	Sites cutanés	Sites digestifs	Sites cutanés
<b>Prélèvements totaux</b>	93 (12)	149 (12)	68 (19)	102 (19)
<b>Prélèvements positifs</b>	46 (9)	10 (4)	17 (6)	7 (7)
<b>Prélèvements négatifs</b>	47 (3)	139 (8)	51 (13)	95 (12)
<i>C. albicans</i>	44 (9)	6 (4)	13 (5)	5 (2)
<i>C. glabrata</i>	5 (1)	2 (1)	3 (2)	3 (2)
<i>C. parapsilosis</i>	0 (0)	2 (1)	0 (0)	0 (0)
<i>C. kefyr</i>	0 (0)	0 (0)	5 (1)	0 (0)
<i>C. krusei</i>	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
<i>C. lambica</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)

<sup>a</sup> Entre parenthèses est mentionné le nombre de patients concernés

## B. Groupe 2

Concernant les cartes fongiques de ce groupe, un total de 205 prélèvements pour 9 patients a été reçu en 2013, contre 90 pour 5 patients en 2015 (Tableau 27).

**Tableau 27. Résultats des prélèvements reçus (carte fongique) pour les patients du groupe 2 <sup>a</sup>**

	2013		2015	
	Sites digestifs	Sites cutanés	Sites digestifs	Sites cutanés
<b>Prélèvements totaux</b>	81 (9)	124 (9)	36 (5)	54 (5)
<b>Prélèvements positifs</b>	30 (7)	7 (4)	10 (2)	6 (2)
<b>Prélèvements négatifs</b>	51 (2)	117 (5)	26 (3)	48 (3)
<i>C. albicans</i>	23 (7)	7 (4)	10 (2)	6 (2)
<i>C. glabrata</i>	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. krusei</i>	7 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. lambica</i>	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup> Entre parenthèses est mentionné le nombre de patients concernés

## C. Groupe 3

Concernant les cartes fongiques du groupe 3, un total de 1154 prélèvements pour 26 patients a été reçu en 2013, contre 410 pour 17 patients en 2015 (Tableau 28).

**Tableau 28. Résultats des prélèvements reçus (carte fongique) pour les patients du groupe 3 <sup>a</sup>**

	2013		2015	
	Sites digestifs	Sites cutanés	Sites digestifs	Sites cutanés
<b>Prélèvements totaux</b>	454 (26)	700 (26)	159 (17)	251 (17)
<b>Prélèvements positifs</b>	265 (23)	218 (19)	74 (15)	48 (12)
<b>Prélèvements négatifs</b>	189 (3)	452 (7)	85 (2)	203 (5)
<i>C. albicans</i>	110 (12)	105 (10)	44 (10)	31 (9)
<i>C. glabrata</i>	178 (9)	122 (9)	32 (7)	23 (6)
<i>C. parapsilosis</i>	7 (4)	11 (4)	0 (0)	0 (0)
<i>C. lusitaniae</i>	7 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
<i>C. sake</i>	2 (2)	3 (1)	0 (0)	0 (0)
<i>C. famata</i>	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. tropicalis</i>	10 (3)	8 (3)	8 (3)	7 (2)
<i>C. kefyr</i>	3 (2)	2 (1)	3 (2)	0 (0)
<i>C. krusei</i>	0 (0)	0 (0)	3 (2)	0 (0)
<i>C. inconspicua</i>	2 (2)	0 (0)	8 (2)	1 (1)

<sup>a</sup> Entre parenthèses est mentionné le nombre de patients concernés

### III. Résistance aux échinocandines

#### A. Dépistage de la résistance

Le dépistage de la résistance aux échinocandines par la méthode en diffusion a été réalisé chez les patients traités par une échinocandine et colonisés à *Candida* (hors *C. parapsilosis*) : 22 patients en 2013 et 17 patients en 2015. Concernant les populations témoins (patients colonisés à *Candida* mais non traités), elles sont composées de 7 patients pour l'année 2013 et de 4 patients pour l'année 2015.

Au total, une résistance aux échinocandine a été trouvée chez 3 patients traités, ce qui correspond à 7,7 % des patients colonisés et/ou infectés à *Candida* et traités par une échinocandine. Concernant les patients témoins, aucune résistance n'a été détectée.

En 2013, les patients avec des isolats résistants aux échinocandines sont les patients 14 et 16.

Le patient 14 a reçu de la CS (83 jours, 70 mg/jour puis 50 mg/jour) dans le cadre d'une prophylaxie (forte colonisation à *C. glabrata*, épuration extra-rénale, polytransfusion per-opératoire).

Le patient 16 a reçu de la CS à plusieurs reprises. Elle a été introduite dans un premier temps 23 jours dans le cadre d'un traitement curatif suite à une péritonite et une candidémie à *C. glabrata*. Un nouveau traitement de 36 jours par CS sera ensuite instauré, en particulier suite à une infection de prothèse biliaire avec *C. glabrata*, *C. albicans* et *C. tropicalis*. Après une retransplantation, la CS sera introduite une troisième fois et la présence de plusieurs prélèvements positifs (prothèse biliaire, collection abdominale, abcès, liquide péritonéal) avec différentes espèces retrouvées (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*) fera débiter un traitement par AMB pendant 9 jours, qui sera relayé par un traitement par voriconazole.

Le patient de 2015 avec un isolat résistant aux échinocandines est le patient 54. Il a reçu 21 jours de CS et 11 jours de fluconazole en prophylaxie avant d'avoir un isolat de *C. albicans* résistant.

Les CMI retrouvées pour les isolats de ces patients sont présentées dans les Tableaux 29, 31 et 33. Les critères d'interprétation sont ceux du CLSI. Pour le *C. dubliniensis*, il n'existe pas de critères établis et nous nous sommes basés sur les valeurs données pour *C. albicans*.

## B. Confirmation par la méthode EUCAST

Des antifongigrammes par la méthode de référence EUCAST ont été réalisés chez tous les isolats des patients 14, 16 et 54. Nous présentons dans les tableaux 29, 31 et 33 les résultats des CMI obtenues par cette méthode ainsi par la méthode en diffusion pour chaque patient.

### Patient 14 :

Tableau 29. Résultats des antifongigrammes chez le patient 14

Jour par rapport à la TH/Site	CMI (µg/mL) <sup>a</sup>				
	CS	ANF		MCF	
	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST
J-2/Bouche	0,5	0,012	0,062	0,023	0,031
J-2/Nez	0,5	0,012	0,062	0,016	0,031
J-2/Inguinal	0,5	0,008	0,031	0,016	0,031
J-2/Rectum	0,25	0,016	0,031	0,016	0,015
J-2/Urine	0,5	0,012	0,062	0,016	0,015
J-1/LBA	0,25	0,012	0,062	0,023	0,015
J6/Bouche	0,5	0,008	0,062	0,012	0,015
J6/Nez	0,5	0,012	0,062	0,023	0,015
J6/Axillaire	0,5	0,012	0,031	0,023	0,015
J6/Rectum	0,5	0,012	0,062	0,016	0,015
J6/Urine	0,5	0,016	0,062	0,016	0,015
J12/Bouche	0,25	0,012	0,062	0,016	0,015
J12/Nez	0,25	0,012	0,062	0,016	0,015
J12/ Axillaire	0,5	0,008	0,062	0,016	0,015
J12/Rectum	0,5	0,002	0,062	0,023	0,031
J12/Urine	2	0,047	<b>0,125</b>	0,064	<b>0,062</b>
J19/Bouche	0,5	0,012	0,031	0,023	0,015
J19/Axillaire	0,5	0,012	0,031	0,016	0,015
J19/Rectum	0,5	0,008	0,031	0,023	0,015
J19/Urine	2	0,25	<b>0,125</b>	0,064	<b>0,062</b>
J26/Inguinal	2	0,19	<b>0,125</b>	0,064	<b>0,062</b>
J26/Rectum	2	0,19	<b>0,125</b>	0,064	0,01563
J26/Urine	2	0,047	<b>0,125</b>	0,032	<b>0,062</b>
J33/Urine	1	0,125	<b>0,125</b>	0,094	<b>0,062</b>
J40/Bouche	0,25	0,016	0,031	0,016	0,015
J40/Inguinal	1	0,25	<b>0,125</b>	0,032	<b>0,062</b>
J40/Rectum	1	0,19	<b>0,125</b>	0,047	<b>0,062</b>
J40/Urine	1	0,19	<b>0,125</b>	0,064	<b>0,062</b>
J40/LBA	0,25	0,016	0,031	0,016	0,015
J42/LBA	0,5	0,006	0,031	0,023	0,015
J47/Rectum	0,5	0,008	0,062	0,016	0,015
J47/Urine	2	0,047	<b>0,25</b>	0,064	<b>0,062</b>
J54/Bouche	0,5	0,012	0,031	0,016	0,015
J54/Inguinal	1	0,125	<b>0,125</b>	0,047	0,031
J54/Rectum	0,5	0,012	0,062	0,016	<b>0,125</b>
J54/Urine	1	0,023	<b>0,125</b>	0,047	<b>0,062</b>
J61/Rectum	1	0,25	<b>0,125</b>	<b>0,19</b>	<b>0,125</b>
J61/Urine	4	<b>0,38</b>	<b>0,5</b>	<b>0,38</b>	<b>0,25</b>
J68/Urine	4	<b>0,38</b>	<b>1</b>	<b>0,38</b>	<b>0,25</b>
J75/Bouche	0,25	0,016	0,0625	0,023	0,015
J75/Inguinal	4	<b>0,38</b>	<b>2</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>
J75/Rectum	4	0,125	<b>0,5</b>	0,125	<b>0,5</b>
J75/Urine	2	0,25	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>
J82/Bouche	0,25	0,008	0,062	0,016	0,015
J82/Urine	4	0,064	<b>1</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>
J89/Inguinal	4	<b>0,38</b>	<b>1</b>	<b>0,38</b>	<b>0,5</b>
J89/Rectum	2	<b>0,38</b>	<b>1</b>	0,125	<b>8</b>
J96/Axillaire	0,5	0,016	0,031	0,016	0,015

<sup>a</sup> Les isolats résistants sont en rouge.

Tous les isolats du patient ainsi que l'interprétation des CMI sont représentés dans le Tableau 30.

Tableau 30. Sensibilité des isolats aux échinocandines chez le patient 14 <sup>a, b</sup>

Jour/TH	Traitement	Colonisation fongique						
		Bouche	Nez	Axillaire	Inguinal	Anus	Urine	Autres
J-2		CG	CG		CG	CG	CG	CG (LBA)
J6		CG	CG	CG		CG	CG	
J12		CG	CG	CG		CG	CG	
J19		CG	CG (ND)	CG		CG	CG	
J26					CG	CG	CG	
J33	CS	CG (ND)					CG	
J40		CG	CG (ND)	CG (ND)	CG	CG	CG	CG (LBA)
J47	J0-J96					CG	CG	
J54		CG			CG	CG	CG	
J61	Prophylaxie					CG	CG	
J68						CG (ND)	CG	CG (LBA)
J75		CG	CG (ND)	CG (ND)	CG	CG	CG	
J82		CG	CG (ND)		CG (ND)	CG (ND)	CG	
J89					CG	CG		
J96			CG (ND)	CG				
<b>Sortie</b>								

<sup>a</sup> ND, non disponible ; CG, *C. glabrata*.

<sup>b</sup> Les isolats sensibles sont en vert, les isolats résistants sont en rouge.

### Patient 16 :

Tableau 31. Résultats des antifongogrammes chez le patient 16

Jour par rapport à la TH /Site	CMI (µg/mL) <sup>a</sup>				
	CS	ANF		MCF	
	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST
J15/Bouche	0.25	0.006	0.01563	0.016/	<b>0.03125</b>
J43/Rectum	0.5	0.004	0.01563	0.032	<b>0.03125</b>
J43/Bile	0.5	0.008	0.01563	0.023	<b>0.03125</b>
J113/Bouche	4	0.19	<b>0.5</b>	<b>0.38</b>	<b>0.5</b>
J115/Liquide de drain	4	0.25	<b>0.5</b>	0.25	<b>0.5</b>
J120/Bouche	0.125	0.008	0.01563	0.047	0.01563
J120/Abcès	2	0.25	<b>0.125</b>	<b>0.38</b>	<b>0.5</b>
J120/Collection abdominale	4	0.25	<b>0.5</b>	<b>0.38</b>	<b>0.5</b>
J127/Liquide péritonéal	2	0.25	<b>0.125</b>	0.25	<b>0.5</b>

<sup>a</sup> Les isolats résistants sont en rouge.

Tous les isolats du patient ainsi que l'interprétation des CMI sont représentés dans le tableau 32.

**Tableau 32. Sensibilité des isolats aux échinocandines chez le patient 16 <sup>a, b</sup>**

Jour/TH	Traitement	Colonisation fongique		
		Bouche	Anus	Autres
J-2	CS			
J8		CD (ND)		
J15	J12-J35	CD		
J22	Curatif			
J29				
J36				
J43			CD	CD (Bile)
<b>Sortie Réanimation</b>				
J86	CS			
J110		J86-J122		
J113	Curatif	CD		CD (Drain abdominal)
J120	AMB	CD		CD (Collection abdominale et abcès abdominal)
J127	J122-J131 Curatif			CD (Liquide péritonéal)

**Disparition du *C. dubliniensis* jusqu'à la fin de l'hospitalisation**

<sup>a</sup> ND, non disponible ; CD, *C. dubliniensis*.

<sup>b</sup> Les isolats sensibles sont en vert, les isolats résistants sont en rouge.

### **Patient 54 :**

**Tableau 33. Résultats des antifongogrammes chez le patient 54**

Jour par rapport à la TH/Site	CMI (µg/mL) <sup>a</sup>				
	CS		ANF		MCF
	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST
J0/Inguinal	0.125	0,016	0.01563	0,004	0.01563
J10/Bouche	0.125	0,008	0.01563	0,064	0.01563
J18/Bouche	0.25	0,016	0.01563	0,002	0.01563
J32/Rectum	4	<b>0,5</b>	<b>0.125</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>

<sup>a</sup> Les isolats résistants sont en rouge.

## IV. Séquençage des gènes *FKS*

Pour les *C. glabrata*, il a été recherché des mutations dans HS1 de *FKS1* et *FKS2* (sites de mutations les plus fréquents). Pour *C. dubliniensis* et *C. albicans*, il a été recherché des mutations dans HS1 de *FKS1* et dans HS2 de *FKS2*. Pour chaque patient, il a également été testé des isolats sensibles aux échinocandines afin de vérifier l'absence de mutation au départ.

### Patient 14 :

Tableau 34. Résultats du séquençage des gènes *FKS* chez *C. glabrata* pour le patient 14

Jour par rapport à la TH/Site	CMI (µg/mL) <sup>a, b</sup>					Génotype <i>FKS</i>
	CS	ANF		MCF		
	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	
J-2/Bouche	0,5	0,012	0,062	0,023	0,031	
J-2/Nez	0,5	0,012	0,062	0,016	0,031	
J-2/Inguinal	0,5	0,008	0,031	0,016	0,031	Sauvage
J-2/Rectum	0,25	0,016	0,031	0,016	0,015	Sauvage
J-2/Urine	0,5	0,012	0,062	0,016	0,015	Sauvage
J-1/LBA	0,25	0,012	0,062	0,023	0,015	
J6/Bouche	0,5	0,008	0,062	0,012	0,015	
J6/Nez	0,5	0,012	0,062	0,023	0,015	
J6/Axillaire	0,5	0,012	0,031	0,023	0,015	
J6/Rectum	0,5	0,012	0,062	0,016	0,015	
J6/Urine	0,5	0,016	0,062	0,016	0,015	
J12/Bouche	0,25	0,012	0,062	0,016	0,015	
J12/Nez	0,25	0,012	0,062	0,016	0,015	
J12/ Axillaire	0,5	0,008	0,062	0,016	0,015	
J12/Rectum	0,5	0,002	0,062	0,023	0,031	
J12/Urine	2	0,047	<b>0,125</b>	0,064	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J19/Bouche	0,5	0,012	0,031	0,023	0,015	
J19/Axillaire	0,5	0,012	0,031	0,016	0,015	
J19/Rectum	0,5	0,008	0,031	0,023	0,015	
J19/Urine	2	0,25	<b>0,125</b>	0,064	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J26/Inguinal	2	0,19	<b>0,125</b>	0,064	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J26/Rectum	2	0,19	<b>0,125</b>	0,064	0,01563	<i>FKS2</i> -F659S
J26/Urine	2	0,047	<b>0,125</b>	0,032	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J33/Urine	1	0,125	<b>0,125</b>	0,094	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J40/Bouche	0,25	0,016	0,031	0,016	0,015	
J40/Inguinal	1	0,25	<b>0,125</b>	0,032	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J40/Rectum	1	0,19	<b>0,125</b>	0,047	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J40/Urine	1	0,19	<b>0,125</b>	0,064	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J40/LBA	0,25	0,016	0,031	0,016	0,015	
J42/LBA	0,5	0,006	0,031	0,023	0,015	
J47/Rectum	0,5	0,008	0,062	0,016	0,015	
J47/Urine	2	0,047	<b>0,25</b>	0,064	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J54/Bouche	0,5	0,012	0,031	0,016	0,015	
J54/Inguinal	1	0,125	<b>0,125</b>	0,047	0,031	<i>FKS2</i> -F659S
J54/Rectum	0,5	0,012	0,062	0,016	<b>0,125</b>	Sauvage
J54/Urine	1	0,023	<b>0,125</b>	0,047	<b>0,062</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J61/Rectum	1	0,25	<b>0,125</b>	<b>0,19</b>	<b>0,125</b>	<i>FKS2</i> -F659S
J61/Urine	4	<b>0,38</b>	<b>0,5</b>	<b>0,38</b>	<b>0,25</b>	<i>FKS2</i> -F659S, <i>FKS2</i> -S663A
J68/Urine	4	<b>0,38</b>	<b>1</b>	<b>0,38</b>	<b>0,25</b>	<i>FKS2</i> -F659S, <i>FKS2</i> -S663A
J75/Bouche	0,25	0,016	0,0625	0,023	0,015	
J75/Inguinal	4	<b>0,38</b>	<b>2</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<i>FKS2</i> -F659S, <i>FKS2</i> -S663A
J75/Rectum	4	0,125	<b>0,5</b>	0,125	<b>0,5</b>	<i>FKS2</i> -F659S, <i>FKS2</i> -S663A
J75/Urine	2	0,25	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<i>FKS2</i> -F659S, <i>FKS2</i> -S663A
J82/Bouche	0,25	0,008	0,062	0,016	0,015	
J82/Urine	4	0,064	<b>1</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<i>FKS2</i> -F659S, <i>FKS2</i> -S663A
J89/Inguinal	4	<b>0,38</b>	<b>1</b>	<b>0,38</b>	<b>0,5</b>	<i>FKS2</i> -F659S, <i>FKS2</i> -S663A
J89/Rectum	2	<b>0,38</b>	<b>1</b>	0,125	<b>8</b>	<i>FKS2</i> -F659S, <i>FKS2</i> -S663A et <i>FKS2</i> -D666E
J96/Axillaire	0,5	0,016	0,031	0,016	0,015	

<sup>a</sup> J0 correspond au jour de la TH.

<sup>b</sup> Les isolats résistants sont en rouge.

Concernant les *C. glabrata* de ce patient, il n'existe pas de mutations au départ sur les isolats sensibles aux échinocandines. Il apparaît à J12 une première substitution sur les isolats résistants (F659S) dans HS1 de *FKS2* et la substitution S663A dans le même HS se surajoute à la première ensuite. L'apparition de cette seconde substitution est corrélée à la hausse des CMI vis à vis des échinocandines. Enfin, une troisième substitution (D666E) apparaît sur un isolat rectal à J89, avec la aussi une hausse des CMI. Les résultats du séquençage *FKS* selon les sites pour ce patient sont présentés dans la Tableau 35.

Tableau 35. Synthèse des résultats du séquençage des gènes *FKS* chez *C. glabrata* pour le patient 14 <sup>a, b</sup>

Jour/TH	Traitement	Colonisation fongique		
		Inguinal	Anus	Urine
J-2		CG	CG	CG
J6				
J12				CG
J19				CG
J26		CG	CG	CG
J33				CG
J40	CS	CG	CG	CG
J47				CG
J54	J0-J96	CG		CG
J61			CG	CG
J68	Prophylaxie			CG
J75		CG	CG	CG
J82				CG
J89		CG	CG	
J96				

#### Sortie

<sup>a</sup> ND, non disponible ; CG, *C. glabrata*.

<sup>b</sup> Les isolats sensibles aux échinocandines et sans mutations *FKS* (contrôles négatifs) sont en vert, les isolats en jaune portent la substitution HS1-*FKS2* F659S, les isolats en orange portent les substitutions HS1-*FKS2* F659S et S663A, l'isolats en rouge porte les substitutions HS1-*FKS2* F659S, S663A et D666E.

### Patient 16 :

Concernant les *C. dubliniensis* de ce patient, il n'existe pas de mutations au départ sur les isolats sensibles aux échinocandines. Il apparaît ensuite la substitution S645P sur les isolats résistants dans HS1 de *FKS1*.

Tableau 36. Résultats du séquençage des gènes *FKS* chez *C. dubliniensis* pour le patient 16

Jour par rapport à la TH/Site	CMI (µg/mL) <sup>a, b</sup>						Génotype <i>FKS</i>
	CAS		ANF		MCF		
	EUCAST	Ettest <sup>®</sup>	EUCAST	Ettest <sup>®</sup>	EUCAST		
J15/ Bouche	0,25	0.006	0.01563	0.016/	<b>0.03125</b>	Sauvage	
J43/Rectum	0,5	0.004	0.01563	0.032	<b>0.03125</b>	Sauvage	
J43/Bile	0,5	0.008	0.01563	0.023	<b>0.03125</b>	Sauvage	
J113/ Bouche	4	0.19	<b>0.5</b>	<b>0.38</b>	<b>0.5</b>	<i>FKS1</i> -S645P	
J115/Liquide de drain	4	0.25	<b>0.5</b>	0.25	<b>0.5</b>	<i>FKS1</i> -S645P	
J120/ Bouche	0.125	0.008	0.01563	0,047	0.01563	Sauvage	
J120/Abcès	2	0.25	<b>0.125</b>	<b>0.38</b>	<b>0.5</b>	<i>FKS1</i> -S645P	
J120/Collection abdominale	4	0.25	<b>0.5</b>	<b>0.38</b>	<b>0.5</b>	<i>FKS1</i> -S645P	
J127/Liquide péritonéal	2	0.25	<b>0.125</b>	0.25	<b>0.5</b>	<i>FKS1</i> -S645P	

<sup>a</sup> J0 correspond au jour de la TH.

<sup>b</sup> La classification des isolats a été basée selon les CBP de l'EUCAST, en se basant sur ceux de *C. albicans*.

Les résultats du séquençage *FKS* selon les sites pour ce patient sont présentés dans le Tableau 37.

**Tableau 37. Synthèse des résultats du séquençage des gènes *FKS* chez *C. dubliniensis* pour le patient 16 <sup>a, b</sup>**

Jour/TH	Traitement	Colonisation fongique		
		Bouche	Anus	Autres
J-2	CS			
J8		CD (ND)		
J15	J12-J35	CD		
J22				
J29	Curatif			
J36				
J43			CD	CD (Bile)
<b>Sortie Réanimation</b>				
J86	CS			
J110		J86-J122		
J113	Curatif	CD		CD (Drain abdominal)
J120	AMB	CD		CD (Collection abdominale et abcès abdominal)
	J122-J131			
J127	Curatif			CD (Liquide péritonéal)
<b>Disparition du <i>C. dubliniensis</i> jusqu'à la fin de l'hospitalisation</b>				

<sup>a</sup> ND, non disponible ; CD, *C. dubliniensis*.

<sup>b</sup> Les isolats sensibles aux échinocandines et sans mutations *FKS* (contrôles négatifs) sont en vert, les isolats en rouge portent la substitution HS1-*FKSI* S645P.

### **Patient 54 :**

Concernant les *C. albicans* de ce patient, il n'existe pas de mutations au départ sur les isolats sensibles aux échinocandines. Il apparaît ensuite une substitution (S645P) dans HS1 de *FKSI*.

**Tableau 38. Résultats du séquençage des gènes *FKS* chez *C. albicans* pour le patient 54**

Jour par rapport à la TH/Site	CMI (µg/mL) <sup>a, b</sup>					Génotype <i>FKS</i>
	CAS		ANF		MCF	
	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	
J0/Inguinal	0,125	0,016	0,015	0,004	0,015	Sauvage
J10/Bouche	0,125	0,008	0,015	0,064	0,015	
J18/Bouche	0,125	0,016	0,015	0,002	0,015	
J32/Rectum	4	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<i>FKSI</i> -S645P

<sup>a</sup> J0 correspond au jour de la TH.

<sup>b</sup> La classification des isolats a été basée selon les CBP de l'EUCAST.

Au total, en tenant compte des CBP actuels, la méthode de référence de l'EUCAST semble plus sensible que la méthode des Etest® pour la détection des mutants *FKS* (Tableau 39).

**Tableau 39. Résistance aux antifongiques (Etest® et EUCAST) parmi les mutants *FKS***

Mutants <i>FKS</i> (n)	Méthode de l'EUCAST		Méthode de référence des Etest®	
	Résistants à l'anidulafungine (%)	Résistants à la micafungine (%)	Résistants à l'anidulafungine (%)	Résistants à la micafungine (%)
<i>C. glabrata</i> (22)	22 (100 %)	21 (95,4 %)	5 (22,7 %)	8 (36,4 %)
<i>C. dubliniensis</i> (5)	5 (100 %)	5 (100 %)	0 (0 %)	3 (60 %)
<i>C. albicans</i> (1)	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)

## V. Génotypage des isolats

Les isolats sensibles et résistants concernant *C. glabrata*, *C. dubliniensis* et *C. albicans* isolés des patients 14, 16 et 54 appartiennent respectivement au même génotype. Pour *C. glabrata*, les tailles des séquences microsatellites pour *RMP2*, *MTI* et *ERG3* sont respectivement de 128, 242 et 228 paires de bases. Pour *C. albicans*, les tailles pour *EF3*, *CDC3* et *HIS* sont de 136-145, 116-128 et 152-252 paires de bases respectivement. Enfin, l'utilisation de la technique MLST n'a pas révélé de différences concernant les isolats de *C. dubliniensis*.

## Discussion

Cette étude nous a permis de déterminer l'impact d'un traitement par échinocandine sur l'acquisition de résistances sous traitement chez des patients transplantés hépatiques. Il s'agit de la première étude de ce type en France pour cette population de patients.

En tenant compte des deux cohortes étudiées (2013 et 2015), 94 patients transplantés ont été inclus. Parmi eux, 39 étaient colonisés ou infectés à *Candida* et traités par une échinocandine. Il a été détecté au moins un isolat résistant aux échinocandines chez 3 d'entre eux (7,7 %) : patients 14, 16 et 54. Il a ainsi été trouvé 28 isolats résistants : 22 *C. glabrata* (patient 14), 5 *C. dubliniensis* (patient 16) et 1 *C. albicans* (patient 54). Tous étaient au départ porteur d'un isolat sensible et les mutants *FKS* sont donc apparus après la mise sous traitement. Aucune résistance n'a été détectée chez les patients témoins. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études récentes. Dans celle effectuée par Beyda *et al.*, qui avait pour objectif de déterminer les facteurs de risque concernant l'apparition de mutations *FKS* parmi des isolats de *C. glabrata* retrouvés dans les hémocultures (72 patients inclus), il a été identifié en analyse multivariée que la pré-exposition aux échinocandines dans les 60 jours précédant l'épisode de candidémie était le seul facteur prédictif<sup>104</sup>. De même, après analyse de plus de 313 isolats de *C. glabrata* issus d'hémocultures, Alexander *et al.* ont montré que cette pré-exposition aux échinocandines était un facteur prédictif de l'apparition de mutants *FKS*<sup>103</sup>. Enfin, dans une étude rétrospective effectuée sur 39 patients (35 candidémies et 4 abcès intra-abdominaux) et s'intéressant aux facteurs d'échecs thérapeutiques sous échinocandines pour des CI à *C. glabrata*, Shields *et al.* ont aussi montré que la pré-exposition aux échinocandines était significativement associée à la présence de mutations *FKS*. Dans cette même étude, une chirurgie gastro-intestinale et une nutrition parentérale totale dans les 30 jours avant la CI sont aussi associés significativement à l'apparition de mutations *FKS*<sup>127</sup>.

Pour le patient 14, le premier isolat de *C. glabrata* résistant a été mis en évidence après seulement 14 jours de traitement prophylactique par la CS. La capacité pour *C. glabrata* à devenir résistant rapidement a déjà été décrite. Ainsi, dans une étude de Beyda *et al.*, sur 13 patients ayant développé une candidémie avec un *C. glabrata* porteur d'une mutation *FKS*, la durée moyenne de pré-exposition à une échinocandine est de 13 jours. Dans une autre étude ayant analysé 10 *C. glabrata* mutants *FKS*, Alexander *et al.* trouvent un délai médian de pré-exposition aux échinocandines plus important (55 jours) avant l'apparition de mutants *FKS*, mais dans l'un des cas, la pré-exposition retrouvée n'est que de 7 jours<sup>105</sup>. Cela serait notamment liée à la nature haploïde du génome de *C. glabrata*<sup>193</sup>. Une étude récente suggère que des mutations dans le gène *MSH2*, impliqué dans la réparation de l'ADN, seraient fréquentes chez *C. glabrata* (55 % des 357 isolats étudiés) et pourrait promouvoir l'apparition de la résistance, en particulier l'acquisition de mutations *FKS*. Dans cette étude, les mutants

*MSH2* ont ainsi une faculté à résister aux antifongiques *in vitro* et dans un modèle murin de colonisation à *C. glabrata* (étude des *C. glabrata* fécaux)<sup>194</sup>.

La substitution initialement trouvée chez les *C. glabrata* du patient 14 est la F659S. Elle a été détectée dans les urines 12 jours après la TH. On la retrouve ensuite sur des prélèvements inguinaux et rectaux, mais pas sur les autres sites testés (bouche, nez, axillaire). Après 49 jours de traitement prophylactique supplémentaire, la substitution S663A s'est surajoutée à la F659S. Enfin, après 28 jours de traitement supplémentaire, la substitution D666E apparaît en plus des deux précédentes sur un isolat rectal. Toutes ces mutations ont été trouvées sur HS1 *FKS2*, ce qui est le cas pour la majorité des isolats de *C. glabrata* résistants aux échinocandines<sup>139, 195, 196</sup>. Les deux premières substitutions retrouvées (F659S et S663A) se situent sur les acides aminés les plus fréquemment substitués chez les *C. glabrata* mutants *FKS*. Ainsi, dans une étude s'intéressant à la fréquence des mutations *FKS* chez *C. glabrata* parmi une collection mondiale d'isolats issus de candidémie (28 mutants *FKS* inclus), 50 % des isolats portent une substitution sur F659 ou S663<sup>130</sup>. Concernant F659, on retrouve principalement la substitution F659S et concernant S663, la substitution S663P est la plus fréquente. Il s'agit du premier patient chez qui la substitution S663A est décrite et l'apparition successive de ces deux substitutions avait déjà été rapportée pour ce patient par une autre méthode de séquençage à très haut débit<sup>133</sup>. En revanche, la présence des 3 mutations apparues successivement n'avait jamais été décrite.

Concernant les CMI des *C. glabrata* résistants, la présence de la première substitution (F659S) est associée à un bas niveau de résistance (CMI à 0,125 et 0,06 µg/mL pour l'ANF et la MCF respectivement) qui correspond à des CMI 2 à 4 fois plus élevées que celles trouvées chez les isolats sensibles. Dans l'étude de Castanheira *et al.*, 3 *C. glabrata* portent la substitution F659S, et les CMI retrouvées sont entre 0,25 et 1 µg/mL pour l'ANF et 0,06 µg/mL pour la MCF en utilisant la méthode de référence du CLSI<sup>130</sup>. Dans l'étude de Pham *et al.*, les CMI en utilisant la méthode de référence du CLSI sont de 2 µg/mL et 0,25 µg/mL respectivement pour l'ANF et la MCF<sup>116</sup>. Dans notre étude, l'apparition de la seconde substitution (S663A), qui n'a jamais été décrite chez un autre patient, s'est accompagnée d'une multiplication des CMI aux échinocandines de 8 à 16 fois par rapport aux isolats sensibles. Enfin, l'isolat portant les 3 substitutions (F659S, S663A et D666E) présente des CMI aux échinocandines 16 à 512 fois plus élevées par rapport aux isolats sensibles.

Quand on met en relation les valeurs des CMI obtenues en Etest® et les résultats du séquençage *FKS* pour les *C. glabrata* du patient 14, on remarque que la majorité des isolats portant la substitution F659S sont classés intermédiaires pour l'ANF et sensibles pour la MCF selon les critères du CLSI. Ce n'est qu'à partir de l'apparition de la seconde substitution (S663A) que les isolats deviennent tous résistants à la MCF. Ces résultats suggèrent donc que

l'ANF est plus sensible pour détecter la présence de mutations *FKS* chez *C. glabrata* par la méthode Etest®. Pour autant, il est connu que toutes les mutations *FKS* n'entraînent pas les mêmes variations de CMI<sup>130</sup>. Concernant les CMI obtenues par la méthode de référence de l'EUCAST, les isolats sont classés résistants pour l'ANF et la MCF dès l'apparition de la première mutation. C'est également le cas pour le *C. albicans* résistant. Ces résultats suggèrent donc que pour notre étude, avec les CBP actuels, la sensibilité de la méthode de référence est plus sensible pour la détection de mutations *FKS* que la méthode en diffusion Etest®.

Le patient porteur d'isolats de *C. glabrata* résistants aux échinocandines n'a pas développé d'infection à *C. glabrata*, peut-être grâce à la prophylaxie. Néanmoins, ces résultats illustrent l'impact que peut avoir un traitement prolongé par CS sur l'apparition de résistances microbiologiques parmi les isolats colonisant les muqueuses. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une récente étude suggérant que les isolats de *Candida* qui colonisent les muqueuses, en particulier *C. glabrata*, peuvent être un réservoir d'isolats résistants. Dans cette étude danoise multicentrique, les auteurs s'intéressent à la résistance aux antifongiques parmi les isolats buccaux de *Candida* après traitement d'une candidémie (193 patients, 205 isolats sanguins et 220 isolats oraux inclus) et trouvent que la résistance acquise au fluconazole et à l'ANF est fréquente parmi les patients pré-exposés aux azolés ou aux échinocandines. De plus, dans environ 90 % des cas, le génotype entre l'isolat buccal et l'isolat sanguin était le même, ce qui doit donc inciter microbiologistes et cliniciens à être vigilants concernant les isolats colonisants<sup>197</sup>.

Concernant le patient 16, il a été mis en évidence 5 isolats de *C. dubliniensis* résistants aux échinocandines. Dans tous les cas, la substitution S645P située sur le HS1 *FKSI* a été retrouvée. Cette substitution a également été retrouvée chez un *C. albicans* pour le patient 54. Les substitutions sur S645 sont fréquentes chez *C. albicans*<sup>141</sup>. Perlin *et al.* retrouvent ainsi qu'elles représentent 46 % des substitutions *FKS* détectées pour cette espèce. Cette substitution a également été rapportée chez *C. dubliniensis*, avec une CMI déterminée par la méthode de référence du CLSI à 2 µg/mL et 1 µg/mL respectivement pour l'ANF et la MCF<sup>198</sup>. L'apparition d'isolats de *C. dubliniensis* résistants sous échinocandine est cependant très peu décrite dans la littérature, et n'a été rapportée que sur des études d'analyse d'isolats sans connaître le retentissement clinico-biologique<sup>198</sup>.

Le génotypage des isolats montre que les isolats sensibles et résistants sont identiques pour chaque espèce. Cela suggère donc que les substitutions ont été acquises *de novo* sous l'effet de la pression antifongique, ce qui est en accord avec la littérature actuelle<sup>144, 193</sup>.

La majorité des 28 isolats résistants aux échinocandines a été retrouvée dans les urines ou autour de sites abdominaux. En effet, pour le patient 14, les *C. glabrata* résistants sont uniquement retrouvés dans les urines (11 isolats), au niveau inguinal (5 isolats) et au niveau rectal (6 isolats). Pour le patient 16, les isolats résistants sont retrouvés dans divers sites abdominaux : abcès, collection abdominale, liquide de drain et liquide péritonéal. Les échinocandines diffusent peu dans les urines et des concentrations subinhibitrices d'échinocandines sur ce site peuvent expliquer la sélection d'isolats résistants. Concernant les sites abdominaux, il a été rapporté que les concentrations de CS et de MCF dans la bile et l'ascite correspondent respectivement à 30 % et 15 % de celles calculées dans le sérum <sup>199, 200</sup>. De plus, une étude utilisant plusieurs modèles animaux rapporte que 35 % d'une seule dose de CS est présente à 24 heures dans le foie, et que les taux intra-hépatiques sont de 14,2 % et 2,8 % à 5 jours et 12 jours respectivement, alors même que les taux sériques sont nuls <sup>201</sup>. Cette demi-vie prolongée par rapport au sérum pourrait expliquer la sélection d'isolats résistants sur ces sites. Une étude récente suggère ainsi que le compartiment abdominal est un site particulièrement propice au développement d'isolats résistants chez *Candida*. Dans cette étude, 27 isolats chez 25 patients avec une candidose abdominale ont été inclus et la majorité des isolats portant une mutation *FKS* (5/6) étaient des *C. glabrata* <sup>179</sup>.

Pour l'ensemble des 28 isolats résistants étudiés, seuls les gènes *FKS* ont été analysés. Cependant, différentes études rapportent l'existence d'isolats multi-résistants, en particulier pour *C. glabrata*. Ainsi sur 162 isolats de *C. glabrata* résistants au fluconazole, Pfaller *et al.* rapportent 11,1 % d'isolats résistants aux échinocandines <sup>102</sup>. De même, sur 77 isolats résistants aux échinocandines, Pham *et al.* retrouvent 36 % d'isolats résistants au fluconazole <sup>116</sup>. Concernant un isolat du patient 14, Garnaud *et al.* avaient rapporté les substitutions F659S et S663A dans *FKS2* mais aussi la T370I dans *CgPDR11*, qui peut contribuer à la résistance aux azolés <sup>133</sup>. D'autres gènes pourraient être étudiés sur les isolats de *C. glabrata* de notre étude, en particulier *MSH2*. Healey *et al.* rapportent en effet que *MSH2* pourrait être utile en tant que marqueur pour déterminer la propension de *C. glabrata* à devenir résistant aux antifongiques <sup>194</sup>.

## Conclusion et perspectives

Les candidoses invasives constituent un problème majeur dans les services de réanimation. La prophylaxie est donc primordiale chez les patients à risque. En contrepartie, elle implique un risque important d'émergence d'isolats résistants en cas d'utilisation prolongée des échinocandines.

Dans cette étude, nous confirmons l'impact que peut avoir un traitement par échinocandine sur l'apparition de souches résistants. En effet, 7,7 % des patients traités et porteurs de *Candida* développent une résistance microbiologique associée à la présence de mutations *FKS*. Cette apparition d'isolats résistants peut se faire relativement rapidement, en particulier pour *C. glabrata*, et il existe un risque d'accumulation des mutations *FKS* en cas de poursuite du traitement.

Les sites urinaires et abdominaux semblent plus propices au développement de telles résistances. Dès lors, il faut être attentif sur la survenue d'infections systémiques à point de départ digestif, en particulier après une chirurgie abdominale.

Les cliniciens et les microbiologistes doivent donc rester vigilants sur l'apparition de résistances microbiologiques chez *Candida* et ce même en l'absence d'infections. La prophylaxie doit être ciblée et de durée limitée. En cas de traitement prolongé, les prélèvements et les antifongigrammes doivent être répétés, en particulier pour les sites urinaires et digestifs.

A l'avenir, les nouvelles techniques de biologie moléculaire devraient permettre une détection plus facile et plus précoce des mutations *FKS* et des isolats multi-résistants. Elles vont aussi permettre une meilleure compréhension des mécanismes promoteurs de la résistance.

# Annexes

## Procédure pour l'extraction d'ADN fongique

- 1) A l'aide d'un cøse, racler au scalpel plusieurs colonies issues d'un repiquage de 24-48 heures et les dissocier dans un tube MagNA Lyser Green Beads (Roche).
- 2) Ajouter 400 µL de tampon ATL (Qiagen Sciences Ing.).
- 3) Effectuer 1-3 cycles de MagNA Lyser à 5000 rpm pendant 30 secondes.
- 4) Ajouter 50 µL de Protéinase K (Qiagen Sciences Ing.) et incuber la solution pendant 1 heure à 56 °C.
- 5) Centrifuger 10 minutes à 10 000 rpm.
- 6) Transvaser la totalité du surnageant dans un tube Eppendorf et ajouter 400 µL de tampon AL (Qiagen Sciences Ing.), puis incuber le mélange 10 minutes à 70 °C.
- 7) Ajouter 500 µL d'éthanol absolu et transférer la totalité du mélange sur une colonne.
- 8) Centrifuger 1 minute à 8000 rpm.
- 9) Jeter l'effluent et ajouter 500 µL de tampon AW1 (Qiagen Sciences Ing.).
- 10) Centrifuger 1 minute à 8000 rpm.
- 11) Jeter l'effluent et ajouter 500 µL de tampon AW2 (Qiagen Sciences Ing.).
- 12) Centrifuger 3 minutes à 13 000 rpm.
- 13) Jeter l'effluent et centrifuger à vide 1 minute à 13 000 rpm.
- 14) Jeter le tube collecteur et mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,7 mL puis ajouter 100 µL tampon AE (Qiagen Sciences Ing.).
- 15) Incuber le mélange 5 minutes à 65 °C.
- 16) Centrifuger 1 minute à 8000 rpm, jeter la colonne et conserver l'effluent.

**Annexe 1. Procédure pour l'extraction de l'ADN fongique avec le kit QIAamp DNA Blood Mini-kit (Qiagen)**

**Composition du mélange réactionnel pour l'amplification (*C. albicans*, *C. glabrata*)**

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)
<b>H<sub>2</sub>O (µL)</b>			35,5
<b>PCR Gold Buffer (X)</b> (Applied Biosystems Roche)	10	1	10
<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b> (Applied Biosystems Roche)	25	1,5	6
<b>Mélange réactionnel dNTP</b> (Eurobio)	2,5	0,2	8
<b>Amorce Fw (MWG)</b>	10	0,5	5
<b>Amorce Rv (MWG)</b>	10	0,5	5
<b>Ampli Taq Gold</b> (Applied Biosystems Roche)	5	0,03	0,5
<b>Volume final (µL)</b>			70

**Annexe 2. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification (*C. albicans* et *C. glabrata*)**

### Composition du mélange réactionnel pour l'amplification (*C. dubliniensis*)

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume ( $\mu\text{L}$ )
<b>H<sub>2</sub>O (<math>\mu\text{L}</math>)</b>			15,25
<b>Buffer MgCl<sub>2</sub> free (X)</b>	10	1	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	25	2,5	2,5
<b>Mélange réactionnel dNTP (mM)</b>	10	0,2	0,5
<b>Amorce Fw</b>	10	0,4	1
<b>Amorce Rv</b>	10	0,4	1
<b>Ampli Taq Gold (U/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	5	0,2	0,25
<b>Volume final (<math>\mu\text{L}</math>)</b>			23

### Annexe 3. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification (*C. dubliniensis*)

### **Procédure pour purification de l'ADN**

- 1) Dans un tube Eppendorf de 1,7 mL, ajouter 1 volume d'amplicons pour 5 volumes de Buffer PB (Qiagen Sciences Ing.).
- 2) Ajouter 10 µL d'acétate de sodium 3M.
- 3) Transvaser la totalité de la solution dans une colonne MinElute (Qiagen Sciences Ing.).
- 4) Centrifuger 1 minute à 10 000 rpm.
- 5) Jeter le tube collecteur et en placer un nouveau.
- 6) Centrifuger 1 min à 10 000 rpm, et jeter le tube collecteur pour en placer un nouveau.
- 7) Pour éluer, distribuer 16 µL de Buffer EB (Qiagen Sciences Ing.) sur la colonne et laisser incuber 1-5 minutes à température ambiante.
- 8) Centrifuger deux fois 1 minute à 10 000 rpm, puis jeter la colonne et conserver l'effluent.

#### **Annexe 4. Procédure pour purification de l'ADN**

1 **Echinocandin resistance in *Candida* spp. isolated from liver transplant recipients**

2

3 Running Title: Echinocandin resistance in *Candida* spp.

4

5 Gwénolé Prigent,<sup>a</sup> Nawel Aït-Ammar,<sup>a,b</sup> Eric Levesque,<sup>c</sup> Arnaud Fekkar,<sup>d</sup> Jean-Marc Costa,<sup>b,e</sup>

6 Sarra El Anbassi,<sup>a</sup> Françoise Foulet,<sup>a</sup> Christophe Duvoux,<sup>f</sup> Jean-Claude Merle,<sup>c</sup> Eric

7 Dannaoui,<sup>b,g</sup> Françoise Botterel<sup>a,b,#</sup>

8 G.P. and N.A.A. contributed equally to this work.

9

10 Unité de Parasitologie-Mycologie, Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène,

11 Parasitologie-Mycologie, DHU VIC, CHU Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France<sup>a</sup>; EA

12 Dynamyc UPEC, ENVA, Faculté de Médecine, Créteil, France<sup>b</sup>; Réanimation Digestive et

13 Hépatobiliaire, Service d'Anesthésie et des Réanimations Chirurgicales, CHU Henri Mondor,

14 AP-HP, Créteil, France<sup>c</sup>; Service de Parasitologie-Mycologie, CHU La Pitié-Salpêtrière, AP-

15 HP, Paris, France<sup>d</sup>; Laboratoire Cerba, Saint-Ouen-l'Aumône, France<sup>e</sup>; Service d'Hépatologie,

16 CHU Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France<sup>f</sup>; Unité de Parasitologie-Mycologie, Service de

17 Microbiologie, Université Paris-Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Européen Georges

18 Pompidou, AP-HP, France<sup>g</sup>

19

20 #Address correspondence to Françoise Botterel, francoise.botterel@aphp.fr

21

22

23

24

25

26 **Abstract**

27 Liver transplant recipients are at risk of invasive fungal infections, especially candidiasis.  
28 Echinocandin is recommended as prophylactic treatment but is increasingly associated with  
29 resistance. Our aim was to assess echinocandin drug resistance in *Candida* spp. isolated from  
30 liver transplant recipients treated with this antifungal class. For this, all liver-transplanted  
31 patients in a University Hospital (Créteil, France) between January and June of 2013 and 2015  
32 were included. Susceptibilities of *Candida* isolates to echinocandins were tested by Etest<sup>®</sup> and  
33 EUCAST reference method. Isolates were analysed by *FKS* sequencing and genotyped based  
34 on microsatellites or MLST profiles. Ninety-four patients were included, 39 patients were  
35 colonized or infected and treated by echinocandin. Echinocandin resistance appeared in 3  
36 (8%) of the treated patients within one month of treatment. One patient was colonized by  
37 resistant *C. glabrata*, one by resistant *C. dubliniensis* and one by resistant *C. albicans*.  
38 Molecular analysis found three mutations in *FKS2* HS1 (F659S, S663A and D666E) for *C.*  
39 *glabrata*, and one mutation in *FKS1* HS1 (S645P) for *C. dubliniensis* and *C. albicans*.  
40 Susceptible and resistant isolates belonged to the same genotype. To our knowledge, this is  
41 the first study on echinocandin resistance in *Candida* spp. in liver transplant population. Most  
42 resistant isolates were found around/in the digestive sites, maybe due to lower diffusion of  
43 echinocandin in these sites. This work documents the risk of resistance emergence against  
44 echinocandin, even after short-term treatment.

45  
46  
47  
48  
49  
50

51 **Introduction**

52 Patients undergoing liver transplantation (LT) are specifically at risk of developing invasive  
53 fungal infection (IFI). It has been shown that IFI occurs early after LT ( $\leq 2$  months) (1).  
54 Invasive candidiasis (IC) is the most common post-LT IFI with *Candida albicans* (50 to 60%)  
55 and *Candida glabrata* (about 20%), as the main responsible species (2).

56 Antifungal prophylaxis is now a standard intervention for liver transplant recipients. After  
57 using fluconazole or liposomal amphotericin B for several years, echinocandin is now the new  
58 recommended treatment in patients with major risk factors for at least 2-4 weeks or until  
59 resolution of risk factors (3). Echinocandin drugs, which inhibit the synthesis of beta 1,3  
60 glucan in the fungal cell wall, are attractive thanks to their good *in vitro* activity against  
61 *Candida* spp. (4, 5), excellent safety profile, and favorable pharmacokinetics (6). However,  
62 their expanding use can promote the emergence of resistance in *Candida* spp. especially  
63 among patients receiving long-term therapy (7, 8). The molecular mechanisms underlying the  
64 acquired clinical resistance include point mutations within hot spot (HS) regions of *FKS* genes  
65 encoding subunits of glucan synthase (9, 10). These mutations are an important risk factor of  
66 therapy failure (11). However, it has been reported that the development of such resistance is  
67 directly linked to prior exposure (7). In the literature, mutations inducing *C. albicans*  
68 resistance are most commonly found on *FKS1* gene especially on amino acids 641 to 649 and  
69 amino acids 1345 to 1365 in HS1 and HS2, respectively. The substitutions concerning Ser-  
70 -645 (S645P/F/Y) and Phe-641 (F641S/L) are the most frequent and are responsible for the  
71 most pronounced phenotypes (12–14). Mutations in *C. glabrata* are most commonly found on  
72 *FKS2* gene (15), with the most frequent substitutions on Ser-663 (S663F/P) and Phe-659  
73 (F659S/V/Y) (8). Echinocandin resistance has also been described in other *Candida* species,  
74 especially in *C. krusei* and *C. tropicalis* (16, 17).

75 Only two case-reports on echinocandin resistance in liver transplant recipient population are

76 available (7, 18). In this work, our aim was to assess echinocandin drug resistance in *Candida*  
77 spp. developed in liver transplant recipients after the initiation of echinocandin treatment.

## 78 **Materials and methods**

79 **Study design, patients and isolates.** The study population included all patients transplanted  
80 in our LT centre (Henri Mondor University Hospital, Créteil, France) between January and  
81 June of 2013 and 2015. Data were collected prospectively from the patients' records. The  
82 study was approved by the local Ethical Committee, and the database was declared to the  
83 *Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés* (CNIL) (n° 1699340).

84 The first phase of the study was directed to assess echinocandin drug resistance and to  
85 determine its location and its time of onset under antifungal pressure. This phase was  
86 conducted in patients who received echinocandin as curative or prophylactic treatment in  
87 compliance with Gavalda *et al.* recommendation (3), because they were at high risk of IFI  
88 infection. For such, these patients received caspofungin at 70 mg at day 1 followed by 50  
89 mg/day, or micafungin at 100 mg/day. Patients who were at risk of IC received fluconazole at  
90 400 mg/day. In case of IC, patients were given a curative antifungal treatment by caspofungin  
91 or micafungin for at least 48h, the time needed until the identification of the responsible  
92 *Candida* spp. and having its susceptibility results.

93 All patients were subjected to weekly monitoring of *Candida* colonization and were screened  
94 for *Candida* infections in blood cultures and in other sterile sites according to clinical signs.

95 As part of this routine surveillance of *Candida* colonization, swabs were systematically taken  
96 from five superficial sites (mouth, nose, axillary surface, inguinal fold, and anus), the day of  
97 admission to undergo LT and once per week thereafter until discharge from the ICU or death.

98 Colonization is defined as the isolation of *Candida* spp. isolates from at least one surveillance  
99 site.

100

101 **Isolates identification and storage.** All clinical samples were cultured on CHROMagar  
102 plates (Becton Dickinson) and incubated for at least 48h at 37°C. *Candida* isolates were  
103 identified by MALDI-TOF (Microflex, Bruker) following standard extraction. The fungus  
104 species was identified using the MALDI BioTyper database version 3.0. For *C. dubliniensis*  
105 isolates, the species type was confirmed using *ITS1* and *ITS2* gene sequencing after mass  
106 spectrometry identification (19). All isolates were initially stored at - 20°C on cryobeads  
107 (bioMérieux).

108 **Antifungal susceptibility testing.** Micafungin, anidulafungin, and caspofungin Etest<sup>®</sup> strips  
109 (bioMérieux) were used to screen susceptibility of all *Candida* isolates of patients treated with  
110 echinocandin. When a resistant isolate was spotted, all the other isolates of that patient were  
111 subjected to Etest<sup>®</sup> and EUCAST broth microdilution method testing. For Etest<sup>®</sup>, isolates  
112 were tested according to manufacturer's instructions. A yeast suspension adjusted at 0.5  
113 McFarland was used to inoculate RPMI 1640 agar plates (bioMérieux). Etest<sup>®</sup> strips  
114 (bioMérieux) were then applied and plates were incubated for 48h at 37°C. An 80 %  
115 inhibition endpoint was applied for MIC determination as recommended for echinocandins.  
116 For EUCAST (20), anidulafungin (Pfizer Pharmaceutical Group) and micafungin (Astellas  
117 Pharma, Inc.) were tested at concentrations ranging from 0.015 to 8 mg/L in RPMI 1640  
118 (Sigma-Aldrich) buffered to pH 7.0 with MOPS (Sigma-Aldrich) and supplemented with  
119 glucose to a final concentration of 2%. Inoculated plates were incubated for 24h at 37°C.  
120 Caspofungin was not used because none of the two reference methods (CLSI and EUCAST)  
121 are currently recommended to test *Candida* susceptibility to caspofungin due to problems in  
122 test reproducibility (21). MIC values were determined spectrophotometrically (Multiskan™  
123 FC Microplate Photometer, Thermo Scientific), as the lowest drug concentration that resulted  
124 in inhibition of  $\geq 50\%$  of fungal growth in comparison with the growth in a drug-free control  
125 well. For both techniques (EUCAST and Etest<sup>®</sup>), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and

126 *Candida krusei* ATCC 6258 were used as quality control strains. EUCAST MIC results were  
127 interpreted according to breakpoints published in the EUCAST breakpoints table v8.0  
128 ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints)). As there is currently no Etest-specific  
129 breakpoints, Etest MIC values were interpreted according to CLSI breakpoints (22) as  
130 recommended by the manufacturer. For comparison, Etest MICs were also interpreted using  
131 the current EUCAST breakpoints. For *C. dubliniensis*, we tentatively used the same  
132 breakpoints as for *C. albicans*. Indeed, it has been shown that the wild-type upper limit of the  
133 MIC distribution of each of the echinocandins is identical in these two species (23).

134 **DNA extraction.** To extract DNA, the yeasts were first disrupted with MagNA Lyser Green  
135 Beads (Roche Diagnostics) in MagNA Lyser Instrument (Roche). Then, proteinase K (Qiagen  
136 Sciences Ing.) was added and the mix was incubated for 1h at 56°C. DNA was extracted using  
137 the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Sciences Ing.) following the manufacturer's  
138 instructions.

139 **PCR amplification and sequencing of HS regions within *FKS* genes.** We looked for  
140 mutations in HS regions within *FKS* genes in all EUCAST and Etest<sup>®</sup> resistant isolates and in  
141 susceptible isolates that were recovered before and after the collection of a resistant one. HS1  
142 and HS2 regions of *FKS1* and *FKS2* genes of *C. glabrata* and HS1 and HS2 of *FKS1* gene of  
143 *C. albicans* were sequenced as previously described (24, 25). Primers used for HS1 and HS2  
144 of *FKS1* gene of *C. dubliniensis* were designed from GenBank ascension number  
145 XM\_002416855.1. The primers used in this study were for *FKS1* HS1  
146 5'-TATTCTTTGCTGTCATGCCCTT-3' and 5'-ACCCAAATAGAATGAACGACCA-3',  
147 for *FKS1* HS2 5'-AAGATTGGTGCYGGTATGGG-3' and  
148 5'-RGTDGCAAAACCTCTAGCAGT-3'.

149 Each sample reaction mixture contained 0.5 µM of each primer, 1X PCR gold buffer (Applied  
150 Biosystems), 1.5 mM of MgCL<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 2.5 mM of dNTP solution (Eurobio),

151 0.03 U of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) and RNase-free water, up to a final reaction  
152 volume of 100  $\mu$ L containing 20 ng of genomic DNA. Amplification was performed on a  
153 Mastercycler gradient (Eppendorf). The PCR conditions were initial denaturation at 95°C for  
154 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s,  
155 extension at 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 10 min. The amplicons were  
156 purified upon passing through columns of the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen  
157 Sciences Ing.) and both strands were sequenced by Sanger's method (Eurofins Scientific).  
158 Sequences alignments were analyzed using SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) and  
159 compared with the genome database sequences (GenBank accession numbers XM\_446406  
160 and XM\_448401 for *FKS1* and *FKS2* of *C. glabrata*, respectively, XM\_716336.1, for *FKS1*  
161 of *C. albicans*, XM\_002416855.1 for *FKS1* of *C. dubliniensis*).

162 **PCR amplification and sequencing of *C. glabrata* *MSH2* gene.** We looked for mutations in  
163 part of *MSH2* gene where most predominant mutations were found according to (26). The  
164 primers used in this study were for *MSH2Fragment2* 5'-TCACGTGGATTTCAGCAGTT-3',  
165 for *MSH2Fragment2* 5'-TCGTTGCCTAATAGTTTTGCC-3', for *MSH2Fragment3*  
166 5'-TCGGTGGTTACCATAGTCCCTA-3', and for *MSH2Fragment3*  
167 5'-TCTGGGACCTTCAAACTAAACTG-3'. PCR reaction mixture conditions and  
168 sequencing were the same as above. Sequences alignments were analyzed using SeqScape  
169 v2.5 (Applied Biosystems) and compared with the *C. glabrata* genome database sequences  
170 (GenBank accession number CR380955).

171 **Genotyping.** Genotyping was performed on all *FKS* sequenced isolates. Genotyping of *C.*  
172 *glabrata* and *C. albicans* was performed as previously described (27, 28). Three  
173 microsatellites within the mitochondrial RNase P precursor (*RMP2*) gene, the metallothionein  
174 I (*MTI*) gene, and the 5,6-sterol desaturase (*ERG3*) gene were amplified for *C. glabrata* (27).  
175 Other 3 microsatellites within the elongation factor 3 gene (*EF3*), the cell division cycle

176 protein gene (*CDC3*), and the imidazole glycerol phosphate dehydratase gene (*HIS*) were  
177 amplified for *C. albicans* (28). Microsatellites PCR amplification was carried out using a  
178 GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) in a 25 $\mu$ l volume containing 20 ng of  
179 DNA. The composition of the PCR mixture was as follows: 0.5  $\mu$ M of each primer, 1 $\times$  PCR  
180 buffer, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, and 1.25 U of AmpliTaq Gold. The PCR  
181 conditions were initial denaturation at 95°C for 8 min, followed by 30 cycles of denaturation  
182 at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, and final extension  
183 at 72°C for 5 min. PCR products were diluted to 1/100, 1/500, or 1/1000 according to the  
184 intensities of PCR. They were added to HiDi formamide and 400HD size standard (Applied  
185 Biosystems), and were denatured for 5 min at 95°C. They were then loaded on ABI 3130 XL  
186 genetic analyzer (Applied Biosystems). The peak areas and the sizes of amplicons were  
187 determined using GeneScan Analysis Software v4.0 (Applied Biosystems).

188 Genotyping of *C. dubliniensis* was based on Multilocus Sequence Typing (MLST) profiles.  
189 Ten different loci were used for the MLST analyses: *AAT1a*, *AAT1b*, *ACC1*, *ADP1*, *GLN4*,  
190 *MPIb*, *RPN2*, *SYA1*, *VPS13*, and *ZWF1b* (29). PCR reaction mixture conditions and  
191 sequencing were the same as above. Sequences alignments were analyzed using SeqScape  
192 v2.5 (Applied Biosystems).

## 193 Results

194 **Patients and isolates included.** A total of 94 liver transplant recipients were enrolled during  
195 the first six months of 2013 ( $n = 52$ ) and during the same period of 2015 ( $n = 42$ ). The median  
196 age of the recipients was 54.5 [22-70] years. Most of them (77%) were men. The two most  
197 common aetiologies for LT were cirrhosis (50%) and hepatocellular carcinoma (33%).  
198 Among these 94 patients, 56 (60%) received antifungal treatment, which included  
199 caspofungin ( $n = 41$  [73 %]), micafungin ( $n = 2$  [4 %]) and fluconazole ( $n = 13$  [23%]). Of the  
200 patients treated by echinocandin, 39 [91 %] were colonized and/or developed an IC.

201 **Echinocandin susceptibility test results.** Echinocandin resistance was detected in 3 (8%) of  
202 the treated patients. The isolates revealed one patient with resistant *C. glabrata* (P1), one with  
203 resistant *C. dubliniensis* (P2) and one with resistant *C. albicans* (P3). The echinocandin  
204 treatment was prophylactic for P1 and P3, and curative for P2. Echinocandin MICs of all  
205 isolates from these patients were tested using Etest<sup>®</sup> for all echinocandins and EUCAST  
206 reference method for only anidulafungin and micafungin (Table 1). In case of P1, 24 resistant  
207 *C. glabrata* isolates were recovered from the urine ( $n = 11$ ), anus ( $n = 7$ ), and inguinal fold ( $n$   
208  $= 6$ ) (Table 2). The first resistant isolates appeared in the anus and the urine 14 days after  
209 initiation of caspofungin treatment. High MICs were then detected in the inguinal fold but not  
210 in other sites. For P2, five resistant *C. dubliniensis* isolates were recovered from the  
211 abdominal fluids ( $n = 4$ ) and mouth ( $n = 1$ ). The first resistant isolate was detected in the  
212 mouth 27 days after the beginning of caspofungin treatment. Moreover, this patient had had  
213 prior caspofungin exposure for 23 days three months ago to treat IC (Table 3). Whereas for  
214 P3, the only resistant isolate was recovered in the anus though the patient was not on  
215 caspofungin treatment at then but had received 24-day prophylactic treatment of caspofungin,  
216 which was stopped a week earlier.

#### 217 **Identification of mutations in *FKS* genes**

218 For P1, *FKS2* HS1 mutations were detected in 22 resistant *C. glabrata* isolates. The first  
219 mutation F659S appeared after 14 days of treatment, the second mutation S663A appeared  
220 after 63 days of treatment, associated with the first one. The third mutation D666E appeared  
221 after 89 days of treatment once (D89 anus isolate) (Table 1). In this isolate, a mutated double  
222 population was observed : one population with F659S and S663A mutations and the other  
223 with F659S and D666E mutations (Figure 1). For P2, one mutation in *FKS1* HS1 (S645P) was  
224 found in five *C. dubliniensis*. For P3, the same *FKS* mutation in *FKS1* HS1 (S645P) was  
225 detected in one *C. albicans*. For these three patients, no mutation was detected in the

226 susceptible isolates for which *FKS* was sequenced (Table 1).

### 227 **Genotyping**

228 Susceptible and resistant isolates of *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, and *C. albicans* harvested  
229 from P1, P2, and P3, respectively, belonged all to the same genotype. For *C. glabrata*, the  
230 sizes of *RMP2*, *MTI*, and *ERG3* microsatellites were 128, 242, and 228 bases pairs (bp),  
231 respectively. For *C. albicans*, the sizes of the 2 alleles of *EF3*, *CDC3*, and *HIS* microsatellites  
232 were 136-145, 116-128, and 152-152 bp, respectively. MLST of *C. dubliniensis* did not reveal  
233 any difference in polymorphism positions.

### 234 **Correlation between *FKS* mutations and MIC**

235 Upon using the EUCAST reference method, resistance was detected in 27/27 (100%) and  
236 25/27 (93%) of the *FKS* mutant isolates for anidulafungin and micafungin, respectively. In  
237 contrast, the mutant isolates were detected as resistant or intermediate isolates by Etest<sup>®</sup> in  
238 15/27 (56%), 14/27 (52%), and 27/27 (100%) of the isolates for anidulafungin, micafungin,  
239 and caspofungin, respectively, when MIC values were interpreted with the CLSI clinical  
240 breakpoints (as recommended by the manufacturer). However, when the EUCAST  
241 breakpoints were used to interpret MIC results, Etest<sup>®</sup> detected resistance in 24/27 (89%) and  
242 27/27 (100%) of the mutant isolates for anidulafungin and micafungin, respectively.

243 For *C. glabrata*, the first mutation F659S alone was associated with a low level of resistance  
244 (EUCAST MIC of 0.125 and 0.06 mg/L for anidulafungin and micafungin, respectively)  
245 which already represents an increase up to 4 fold compared with the *FKS* wild type (WT)  
246 susceptible parent isolate. The resistance level increased with the second mutation (F659S and  
247 S663A) with MICs up to 32 fold higher than those of WT. Finally, for D89 anus isolate MICs  
248 were 32 to 512 fold higher than those of WT. Part of *MSH2* gene of four *C. glabrata* isolates  
249 (D-2 anus, D12 urine, D61 urine, and D89 anus) was sequenced and no mutation was found.

250

251 **Discussion**

252 To our knowledge, this is the first study that investigated echinocandin drug resistance in  
253 *Candida* spp. in a liver transplant recipient population. Our results have shown that of the 39  
254 patients treated by echinocandin, 3 (8%) acquired a resistant isolate. The same prevalence  
255 (8%) was reported for *C. tropicalis* in a hematology population where patients were treated by  
256 echinocandins (17). In our study, this prevalence was maybe underestimated due to the use of  
257 Etest<sup>®</sup> as a screening method rather than EUCAST; the latter seems more sensitive in  
258 detecting resistant isolates.

259 Genotyping revealed that, in the three concerned patients, resistant and susceptible isolates  
260 were isogenic. This confirms, as previously demonstrated in several studies (7, 30–33), that  
261 susceptible isolates acquired resistance under selection pressure in antifungal treated patients.  
262 In our cases, the resistance developed rapidly, in less than 1 month. It appeared more rapidly  
263 in *C. glabrata* (14 days of echinocandin treatment) than in *C. albicans* (24 days) or *C.*  
264 *dubliniensis* (27 days with a pre-exposure period of 23 days, i.e. 51 days before). This rapid  
265 emergence of echinocandin resistance in *C. glabrata* has already been described and related to  
266 its haploid nature (30).

267 Positions of the first two mutations (Phe-659 and Ser-663) were already reported in other  
268 echinocandin-resistant *C. glabrata* isolates (9, 34, 35). The substitution S663A and its  
269 association F659S were described for the first time, in the same patient, by Garnaud *et al* in a  
270 previous study on detection of resistance by Next Generation Sequencing (NGS) (36). The  
271 third mutation (D666E) is very rare and found in less than 4% of resistant *C. glabrata* isolates  
272 (37). It was not detected by NGS in Garnaud *et al.* study (36) because the samples collections  
273 stopped at D70 i.e. before the development of the third mutation. This mutation was only  
274 found on D89 anus isolate and associated with F659S (Figure 1). This association (F659S and  
275 D666E) is described for the first time. It would be interesting to analyze the fitness cost of

276 these mutations in an animal model and to test the kinetics of glucane synthase inhibition.  
277 Recently, MSH2 gene has been shown to promote echinocandin resistance (26). For this  
278 reason, we sequenced parts of MSH2 gene in four isolates recovered at different time points  
279 during echinocandin treatment, yet no mutation was detected in this gene. Our results clearly  
280 show the impact of echinocandin prophylactic treatment on the emergence of resistant *C.*  
281 *glabrata* spp. These findings are in consistency with a recent study that suggests that  
282 colonizing mucosal flora may act as a reservoir of resistant *Candida* spp, in particular for *C.*  
283 *glabrata* (31).

284 Our results show that during the appearance of the first two mutations in *C. glabrata*,  
285 anidulafungin Etest<sup>®</sup> was better than micafungin Etest<sup>®</sup>. Caspofungin Etest<sup>®</sup> also showed a  
286 good performance at detecting mutant isolates. Besides, a better performance of Etest<sup>®</sup> was  
287 obtained when EUCAST breakpoints were applied. For EUCAST method, anidulafungin  
288 seems also to be the best echinocandin marker for detection of resistance, which is consistent  
289 with the use of anidulafungin as a marker for echinocandins susceptibility testing (38).  
290 However, it should be highlighted that our data are restricted to several isolates taken from  
291 one patient and that the present study was not designed to evaluate the performance of  
292 antifungal susceptibility testing methods.

293 The resistant *C. dubliniensis* isolates of P2 and the resistant *C. albicans* isolate of P3 harbored  
294 an S645P substitution in *FKSI* HS1 which is a commonly found mutation in *C. albicans* (12).  
295 Although the latter mutation has already been reported for *C. dubliniensis* (39), the  
296 appearance of resistant isolates during echinocandin therapy remains a phenomenon that has  
297 never been reported in the literature for this species.

298 Most echinocandin resistant isolates were sampled from or around the digestive sites, like  
299 abdominal aspirates, drainage and peritoneal fluids. This is probably due to the low diffusion  
300 of echinocandin in these sites (40, 41), which leads to sub-inhibitory concentrations, thus

301 promoting emergence of resistance. In previous case reports, the caspofungin and micafungin  
302 concentrations in the bile and ascites fluid were 30% and 15% of their serum level,  
303 respectively (41, 42). Thus, as previously mentioned by a recent study, our results suggest that  
304 the abdomen could be the origin for the development of echinocandin-resistant *Candida*  
305 spp.(42) . Echinocandins exhibit concentration-dependent effects on *Candida* spp. Preclinical  
306 pharmacokinetic and pharmacodynamic studies support that the administration of large,  
307 infrequent doses is a better strategy to achieve higher maximum concentrations of the drug in  
308 the serum (43). Moreover, once-weekly micafungin therapy seems to be as efficacious as  
309 daily therapy in a murine model of disseminated candidiasis (44). Because this strategy  
310 cannot be applied in human, it could be just advised to modify the antifungal treatment in case  
311 of abdominal candidiasis so as to have a better diffusion in the abdominal sites.

312 In conclusion, our study sheds more light on the risk of emergence of resistance during  
313 echinocandin curative or prophylactic treatment, especially in the digestive sites. These  
314 resistant isolates are not always associated with an infection, but must be taken into account  
315 since it was shown that colonizing isolates are generally the same as those responsible for  
316 candidemia isolates (45, 46). Accordingly, we are keen to raise awareness among clinicians  
317 and microbiologists on the emergence of echinocandin resistance, even during prophylactic  
318 treatment. Resistance can occur rapidly which suggests that it would be important to stop  
319 prophylaxis as soon as possible.

#### 320 **Acknowledgment**

321 We thank Dr Suhad Assad for her critical linguistic reviewing and Chloé Guillot for her  
322 technical assistance.

323 AF has received payment for lectures from Merck, travel grants from Astellas, Gilead, Merck,  
324 and Pfizer. AF has also been a consultant for Pfizer. ED has received grants from Gilead,  
325 Ferrer, and Biorad, and payment for lectures from Gilead, MSD, and Schering. ED has also

326 been a consultant for Astellas and Innothra. FB received grants from Astellas, and payment  
327 for lectures from Merck. GP, NAA, EL, JMC, SEA, FF, CD, JCM declare no conflict of  
328 interest.

329 **Funding information:**

330 This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial,  
331 or non-profit sectors. The data were obtained as part of routine work at the University  
332 Hospital of Créteil, France.

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351 **References**

- 352 1. **Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang CH, Olyaei A, Pfaller M,**  
353 **Steinbach WJ, Webster KM, Marr KA.** 2010. Epidemiology and outcome of invasive  
354 fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* **12**:220–229.
- 355 2. **Romero FA.** 2011. Infections in liver transplant recipients. *World J Hepatol* **3**:83.
- 356 3. **Gavaldà J, Meije Y, Fortún J, Roilides E, Saliba F, Lortholary O, Muñoz P, Grossi**  
357 **P, Cuenca-Estrella M, ESCMID Study Group for Infections in Compromised**  
358 **Hosts.** 2014. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Clin*  
359 *Microbiol Infect* **20 Suppl 7**:27–48.
- 360 4. **Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ.**  
361 2008. *In Vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin,  
362 caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* **46**:150–  
363 156.
- 364 5. **Dannaoui E, Lortholary O, Raoux D, Bougnoux ME, Galeazzi G, Lawrence C,**  
365 **Moissenet D, Poilane I, Hoinard D, Dromer F, Group and the YEASTS Group.**  
366 2008. Comparative *in vitro* activities of caspofungin and micafungin, determined using  
367 the Method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, against  
368 yeast isolates obtained in France in 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:778–  
369 781.
- 370 6. **Denning DW.** 2003. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet* **362**:1142–1151.
- 371 7. **Dannaoui E, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Grenouillet F, Cassaing S,**  
372 **Baixench M-T, Bretagne S, Dromer F, Lortholary O, French Mycoses Study**  
373 **Group.** 2012. *Candida* spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010.  
374 *Emerg Infect Dis* **18**:86–90.
- 375 8. **Arendrup MC, Perlin DS.** 2014. Echinocandin resistance: an emerging clinical

- 376 problem? *Curr Opin Infect Dis* **27**:484–492.
- 377 9. **Perlin DS**. 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*  
378 **10**:121–130.
- 379 10. **Baixench M-T, Aoun N, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S,**  
380 **Ramires S, Piketty C, Dannaoui E**. 2007. Acquired resistance to echinocandins in  
381 *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chemother* **59**:1076–1083.
- 382 11. **Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Kwa AL, Cheng S, Du C, Clancy CJ**. 2012. The  
383 presence of an *FKS* mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of  
384 echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*.  
385 *Antimicrob Agents Chemother* **56**:4862–4869.
- 386 12. **Perlin DS**. 2011. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol*  
387 **6**:441–457.
- 388 13. **Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS**. 2009. Correlating echinocandin MIC and kinetic  
389 inhibition of *fksI* mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for  
390 interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:112–122.
- 391 14. **Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS**. 2009. Effect of *Candida*  
392 *glabrata FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-  
393 D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob*  
394 *Agents Chemother* **53**:3690–3699.
- 395 15. **Castanheira M, Woosley LN, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller MA**. 2014.  
396 Frequency of *fks* mutations among *Candida glabrata* isolates from a 10-year global  
397 collection of bloodstream infection isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:577–580.
- 398 16. **Forastiero A, Garcia-Gil V, Rivero-Menendez O, Garcia-Rubio R, Monteiro MC,**  
399 **Alastruey-Izquierdo A, Jordan R, Agorio I, Mellado E**. 2015. Rapid Development of

- 400 *Candida krusei* Echinocandin Resistance during Caspofungin Therapy. Antimicrob  
401 Agents Chemother **59**:6975–6982.
- 402 17. **Garcia-Effron G, Kontoyiannis DP, Lewis RE, Perlin DS.** 2008. Caspofungin-  
403 Resistant *Candida tropicalis* Strains Causing Breakthrough Fungemia in Patients at High  
404 Risk for Hematologic Malignancies. Antimicrob Agents Chemother **52**:4181–4183.
- 405 18. **Thompson GR, Wiederhold NP, Vallor AC, Villareal NC, Lewis JS, Patterson TF.**  
406 2008. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive  
407 candidiasis secondary to *Candida glabrata* Infection. Antimicrob Agents Chemother  
408 **52**:3783–3785.
- 409 19. **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of  
410 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p 315–322 In Innis M, Gelfand D,  
411 Sninsky J, White TJ (ed), PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.  
412 Academic Press, San Diego, CA.
- 413 20. **Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, EUCAST-AFST.** 2012.  
414 EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the  
415 determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents  
416 for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). Clin Microbiol Infect **18**:E246-247.
- 417 21. **Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Canton**  
418 **E, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Fothergill A, Fuller J,**  
419 **Gaustad P, Gonzalez GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Meis JF, Moore**  
420 **CB, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pukinskas SRBS, St-Germain G, Szeszs MW,**  
421 **Turnidge J.** 2013. Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp.  
422 using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent?  
423 Antimicrob Agents Chemother **57**:5836–5842.

- 424 22. **Pfaller MA, Diekema DJ.** 2012. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of  
425 *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution  
426 Methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* **50**:2846–2856.
- 427 23. **Arendrup MC, Rodriguez-Tudela J-L, Park S, Garcia-Effron G, Delmas G,**  
428 **Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Perlin DS.** 2011. Echinocandin susceptibility  
429 testing of *Candida* spp. using EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 standard  
430 procedures: analysis of the influence of bovine serum albumin supplementation, storage  
431 time, and drug lots. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1580–1587.
- 432 24. **Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Raoux D, Hoinard D, Dromer F, Dannaoui E,**  
433 **European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing.** 2008. Mutations in the  
434 *fksl* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated  
435 caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European  
436 Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother*  
437 **52**:3092–3098.
- 438 25. **Zimbeck AJ, Iqbal N, Ahlquist AM, Farley MM, Harrison LH, Chiller T, Lockhart**  
439 **SR.** 2010. *FKS* mutations and elevated echinocandin MIC values among *Candida*  
440 *glabrata* isolates from U.S. population-based surveillance. *Antimicrob Agents*  
441 *Chemother* **54**:5042–5047.
- 442 26. **Healey KR, Zhao Y, Perez WB, Lockhart SR, Sobel JD, Farmakiotis D,**  
443 **Kontoyiannis DP, Sanglard D, Taj-Aldeen SJ, Alexander BD, Jimenez-Ortigosa C,**  
444 **Shor E, Perlin DS.** 2016. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen  
445 *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nat Commun* **7**:11128.
- 446 27. **Foulet F, Nicolas N, Eloy O, Botterel F, Gantier J-C, Costa J-M, Bretagne S.** 2005.  
447 Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*  
448 **43**:4574–4579.

- 449 28. **Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S.** 2001. Analysis of microsatellite markers  
450 of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol* **39**:4076–4081.
- 451 29. **McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjon E, Diogo D, Bounoux M-E,**  
452 **Borecká-Melkusova S, Bujdákova H, Murphy P, d’Enfert C, Sullivan DJ.** 2008.  
453 Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis*  
454 is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **46**:652–  
455 664.
- 456 30. **Lewis JS, Wiederhold NP, Wickes BL, Patterson TF, Jorgensen JH.** 2013. Rapid  
457 emergence of echinocandin resistance in *Candida glabrata* resulting in clinical and  
458 microbiologic failure. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:4559–4561.
- 459 31. **Jensen RH, Johansen HK, Søes LM, Lemming LE, Rosenvinge FS, Nielsen L,**  
460 **Olesen B, Kristensen L, Dzajic E, Astvad KMT, Arendrup MC.** 2015. Posttreatment  
461 antifungal resistance among colonizing *Candida* isolates in candidemia patients: results  
462 from a systematic multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **60**:1500–1508.
- 463 32. **Jensen RH, Astvad KMT, Silva LV, Sanglard D, Jørgensen R, Nielsen KF,**  
464 **Mathiasen EG, Doroudian G, Perlin DS, Arendrup MC.** 2015. Stepwise emergence  
465 of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance *in vivo* in *Candida*  
466 *albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. *J Antimicrob Chemother* **70**:2551–  
467 2555.
- 468 33. **Tadec L, Talarmin J-P, Gastinne T, Bretonnière C, Miegville M, Le Pape P, Morio**  
469 **F.** 2016. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and  
470 outcome of candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses* **59**:296–303.
- 471 34. **Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu M-J, Register E, Li W, Vyas V, Fan H,**  
472 **Abruzzo G, Flattery A, Gill C, Chrebet G, Parent SA, Kurtz M, Tepler H,**  
473 **Douglas CM, Perlin DS.** 2005. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p

- 474 account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates.  
475 Antimicrob Agents Chemother **49**:3264–3273.
- 476 35. **Garcia-Effron G, Chua DJ, Tomada JR, DiPersio J, Perlin DS, Ghannoum M,**  
477 **Bonilla H.** 2010. Novel *FKS* mutations associated with echinocandin resistance in  
478 *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother **54**:2225–2227.
- 479 36. **Garnaud C, Botterel F, Sertour N, Bougnoux M-E, Dannaoui E, Larrat S,**  
480 **Hennequin C, Guinea J, Cornet M, Maubon D.** 2015. Next-generation sequencing  
481 offers new insights into the resistance of *Candida* spp. to echinocandins and azoles. J  
482 Antimicrob Chemother **70**:2556–2565.
- 483 37. **Pham CD, Iqbal N, Bolden CB, Kuykendall RJ, Harrison LH, Farley MM,**  
484 **Schaffner W, Beldavs ZG, Chiller TM, Park BJ, Cleveland AA, Lockhart SR.** 2014.  
485 Role of *FKS* Mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and  
486 multidrug resistance. Antimicrob Agents Chemother **58**:4690–4696.
- 487 38. **Arendrup MC, Rodriguez-Tudela J-L, Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M, Donnelly**  
488 **JP, Hope W.** 2011. EUCAST technical note on anidulafungin. Clin Microbiol Infect  
489 **17**:E18–E20.
- 490 39. **Castanheira M, Wosley LN, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN, Pfaller MA.** 2010.  
491 Low prevalence of *fksl* hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida*  
492 strains. Antimicrob Agents Chemother **54**:2655–2659.
- 493 40. **Yamada N, Kumada K, Kishino S, Mochizuki N, Ohno K, Ogura S.** 2011.  
494 Distribution of micafungin in the tissue fluids of patients with invasive fungal infections.  
495 J Infect Chemother **17**:731–734.
- 496 41. **Goicoechea M, Fierer J, Johns S.** 2004. Treatment of candidal cholangitis with  
497 caspofungin therapy in a patient with a liver transplant: documentation of biliary  
498 excretion of caspofungin. Clin Infect Dis **38**:1040–1041.

- 499 42. **Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Clancy CJ.** 2014. Abdominal candidiasis is a  
500 hidden reservoir of echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:7601–  
501 7605.
- 502 43. **Andes DR, Reynolds DK, Van Wart SA, Lepak AJ, Kovanda LL, Bhavnani SM.**  
503 2013. Clinical pharmacodynamic index identification for micafungin in esophageal  
504 candidiasis: dosing strategy optimization. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:5714–5716.
- 505 44. **Gumbo T, Drusano GL, Liu W, Kulawy RW, Fregeau C, Hsu V, Louie A.** 2007.  
506 Once-weekly micafungin therapy is as effective as daily therapy for disseminated  
507 candidiasis in mice with persistent neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:968–  
508 974.
- 509 45. **Mann PA, McNicholas PM, Chau AS, Patel R, Mendrick C, Ullmann AJ, Cornely**  
510 **OA, Patino H, Black TA.** 2009. Impact of antifungal prophylaxis on colonization and  
511 azole susceptibility of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5026–5034.
- 512 46. **Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schröppel K, Srikantha T, Galask R, Soll DR.**  
513 1995. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo  
514 microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA  
515 fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol* **33**:1501–1509.
- 516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524

525 Table 1. MICs values, as determined by EUCAST and Etest<sup>®</sup>, and *FKS* sequencing results of  
526 studied strains

Time/Source <sup>a</sup>	Antifungals tested and MICs (mg/L) results <sup>b</sup>					<i>FKS</i> genotype <sup>c</sup>
	ANF		MICA		CAS	
	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	EUCAST	Etest <sup>®</sup>	
<b>Patient 1</b>						
<i>C. glabrata</i>						
D-2/Mouth	0.012	0.062	0.023	0.031	0.125	Not performed
D-2/Nose	0.012	0.062	0.016	0.031	0.125	Not performed
D-2/Inguinal	0.012	0.031	0.016	0.031	0.125	Wild-type
D-2/Anus	0.016	0.031	0.016	0.015	0.125	Wild-type
D-2/Urine	0.012	0.062	0.016	0.015	0.125	Wild-type
D-2/BAL	0.012	0.062	0.023	0.015	0.125	Not performed
D6/Mouth	0.012	0.062	0.023	0.015	0.125	Not performed
D6/Nose	0.012	0.062	0.023	0.015	0.125	Not performed
D6/Axillary	0.012	0.031	0.023	0.015	0.125	Not performed
D6/Anus	0.012	0.062	0.016	0.015	0.125	Not performed
D6/Urine	0.016	0.062	0.016	0.015	0.125	Not performed
D12/Mouth	0.012	0.062	0.016	0.015	0.125	Not performed
D12/Nose	0.012	0.062	0.016	0.015	0.125	Not performed
D12/Axillary	0.012	0.062	0.016	0.015	0.125	Not performed
D12/Anus	0.047	0.062	0.064	0.031	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D12/Urine	0.125	0.125 (R)	0.064	0.062 (R)	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D19/Mouth	0.016	0.031	0.016	0.015	0.125	Not performed
D19/Axillary	0.012	0.031	0.016	0.015	0.125	Not performed
D19/Anus	0.012	0.031	0.023	0.015	0.125	Not performed
D19/Urine	0.25 (I)	0.125 (R)	0.064	0.062 (R)	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D26/Inguinal	0.19 (I)	0.125 (R)	0.064	0.062 (R)	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D26/Anus	0.19 (I)	0.125 (R)	0.064	0.015	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D26/Urine	0.064	0.125 (R)	0.064	0.062 (R)	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D33/Urine	0.125	0.125 (R)	0.094(I)	0.062 (R)	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D40/Mouth	0.016	0.031	0.016	0.015	0.125	Not performed
D40/Inguinal	0.19 (I)	0.125 (R)	0.047	0.062 (R)	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D40/Anus	0.125	0.125 (R)	0.047	0.062 (R)	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>
D40/Urine	0.25 (I)	0.125 (R)	0.064	0.062 (R)	0.38 (I)	<i>FKS2-F659S</i>

D40/BAL	0.016	0.031	0.016	0.015	0.125	Not performed
D47/Anus	0.012	0.062	0.016	0.015	0.38 (I)	Wild-type
D47/Urine	0.064	0.25 (R)	0.047	0.062 (R)	0.38 (I)	FKS2-F659S
D54/Mouth	0.012	0.031	0.016	0.015	0.125	Not performed
D54/Inguinal	0.125	0.125 (R)	0.047	0.031	0.38 (I)	FKS2-F659S
D54/Anus	0.012	0.062	0.016	0.125 (R)	0.125	Wild-type
D54/Urine	0.032	0.125 (R)	0.047	0.062 (R)	0.38 (I)	FKS2-F659S
D61/Anus	0.25 (I)	0.125 (R)	0.25 (R)	0.125 (R)	0.38 (I)	FKS2-F659S
D61/Urine	0.25 (I)	0.5 (R)	0.25 (R)	0.25 (R)	0.75 (R)	FKS2-F659S/FKS2-S663A
D68/Urine	0.38 (I)	1 (R)	0.38 (R)	0.25 (R)	0.75 (R)	FKS2-F659S/FKS2-S663A
D75/Mouth	0.016	0.062	0.023	0.015	0.125	Not performed
D75/Inguinal	0.38 (I)	2 (R)	0.25 (R)	0.5 (R)	0.38 (I)	FKS2-F659S/FKS2-S663A
D75/Anus	0.25 (I)	0.5 (R)	0.25 (R)	0.5 (R)	0.5 (R)	FKS2-F659S/FKS2-S663A
D75/Urine	0.25 (I)	0.5 (R)	0.25 (R)	0.25 (R)	0.5 (R)	FKS2-F659S/FKS2-S663A
D82/Mouth	0.012	0.062	0.016	0.015	0.125	Not performed
D82/Urine	0.25 (I)	1 (R)	0.19 (I)	0.5 (R)	0.5 (R)	FKS2-F659S/FKS2-S663A
D89/Inguinal	0.38 (I)	1 (R)	0.25 (R)	0.5 (R)	0.38 (I)	FKS2-F659S/FKS2-S663A
D89/Anus	0.38 (I)	1 (R)	0.25 (R)	8 (R)	4 (R)	FKS2-F659S/FKS2-S663A /FKS2-D666E
D96/Axillary	0.016	0.031	0.016	0.015	0.125	Not performed
<b>Patient 2</b>						
<i>C. dubliniensis</i>						
D15/Mouth	0.006	0.015	0.016	0.015	0.064	Wild-type
D43/Anus	0.004	0.015	0.032	0.015	0.064	Wild-type
D43/Bile	0.008	0.015	0.023	0.015	0.064	Wild-type
D113/Mouth	0.19	0.5 (R)	0.38 (I)	0.5 (R)	1 (R)	FKSI-S645P
D113/Drainage fluid	0.25	0.5 (R)	0.25	0.5 (R)	1.5 (R)	FKSI-S645P
D120/Mouth	0.008	0.015	0.047	0.015	0.125	Wild-type
D120/Abscess	0.25	0.125(R)	0.38 (I)	0.5 (R)	3 (R)	FKSI-S645P
D120/Abdominal collection	0.25	0.5 (R)	0.38 (I)	0.5 (R)	1 (R)	FKSI-S645P
D127/Peritoneal fluid	0.25	0.125(R)	0.25	0.5 (R)	1.5 (R)	FKSI-S645P
<b>Patient 3</b>						
<i>C. albicans</i>						
D0/Inguinal	0.016	0.015	0.004	0.015	0.125	Wild-type
D10/Mouth	0.008	0.015	0.064	0.015	0.125	Not performed
D18/Mouth	0.016	0.015	0.002	0.015	0.125	Not performed
D32/Anus	0.5 (I)	0.125 (R)	0.5 (I)	1 (R)	0.38 (I)	FKSI-S645P

527 Abbreviations: MICs: Minimum Inhibitory Concentrations; ANF: anidulafungin; MICA:  
528 micafungin; R: resistant; I: intermediate; BAL: bronchoalveolar lavage.

529 <sup>a</sup> D0 corresponds to the day of liver transplantation

530 <sup>b</sup> For EUCAST broth microdilution method, isolate categorizations were performed according  
531 to the EUCAST breakpoints (BP). For the Etest<sup>®</sup> method, isolate categorizations were  
532 performed according to manufacturer's instructions: for *C. albicans* and *C. dubliniensis*  
533  $S \leq 0.25$ , I 0.38-0.75,  $R \geq 1$ , for *C. glabrata*  $S \leq 0.125$ , I 0.19-0.38,  $R \geq 0.5$ , for anidulafungin and  
534 micafungin  $S \leq 0.06$ , I 0.094-0.19,  $R \geq 0.25$ . The categorization is marked between brackets only  
535 for the resistant and intermediate isolates

536 <sup>c</sup> For *C. glabrata*, FKS1 HS1, FKS1 HS2, FKS2 HS1 and FKS2 HS2 sequencing were  
537 performed. For *C. albicans* and *C. dubliniensis*, FKS1 HS1 and FKS1 HS2 sequencing were  
538 performed

539

540 Table 2. *C. glabrata* isolates from patient 1 (P1)

Days <sup>a</sup> of surveillance	Treatment	Fungal surveillance culture					Others	
		Mouth	Nose	Axillary	Inguinal	Anus	Urine	BAL
D-2		S	S	-	S	S	S	S
D6		S	S	S	-	S	S	
D12		S	S	S	-	R	R	
D19		S	-	S	-	S	R	
D26		-	-	-	R	R	R	
D33		-	-	-	-	-	R	
D40	CAS	S	-	-	R	R	R	S
D47	D0-D96	-	-	-	-	R	R	
D54		S	-	-	R	R	R	
D61		-	-	-	-	R	R	
D68		-	-	-	-	-	R	
D75		S	-	-	R	R	R	
D82		S	-	-	-	-	R	
D89		-	-	-	R	R	-	
D96		-	-	S	-	-	-	

541 Abbreviations: S: isolates susceptible to echinocandins using the Etest<sup>®</sup> and EUCAST

542 reference method; R: isolate resistant or intermediate to echinocandins using the Etest<sup>®</sup> and

543 EUCAST reference method; -: negative culture or unavailable isolate; BAL: bronchoalveolar  
 544 lavage; D: day; CAS: caspofungin  
 545 <sup>a</sup>considering D0 the day of liver transplantation  
 546  
 547 Table 3. *C. dubliniensis* isolates from patient 2 (P2)

Days <sup>a</sup> of surveillance	Treatment	Fungal surveillance culture					Others	
		Mouth	Nose	Axillary	Inguinal	Anus	Urine	Other
<b>D1</b>		-	-	-	-	-	-	
<b>D8</b>		-	-	-	-	-	-	
<b>D15</b>	CAS	-	-	-	-	-	-	
<b>D22</b>	D12-D35	S	-	-	-	-	-	
<b>D43</b>		-	-	-	-	S	-	S (Bile)
Hospital discharge								
<b>D86</b>	CAS	-	-	-	-	-	-	
<b>D113</b>	D86-122	R	-	-	-	-	-	R (Drain)
<b>D120</b>		S	-	-	-	-	-	R (Abdominal abscess)
<b>D127</b>	AMB	-	-	-	-	-	-	R (Peritoneal fluid)
	D122-131							
<b>D134</b>		-	-	-	-	-	-	
<b>D154</b>		-	-	-	-	-	-	
<b>D162</b>	VOR	-	-	-	-	-	-	
<b>D169</b>	D131-186	-	-	-	-	-	-	
<b>D176</b>		-	-	-	-	-	-	
<b>D183</b>		-	-	-	-	-	-	

548 Abbreviations: S: isolate susceptible to anidulafungin and micafungin using the EUCAST  
 549 reference method; R: isolate resistant to anidulafungin and micafungin using the EUCAST  
 550 reference method; -: negative culture or unavailable isolate; D: day; CAS: caspofungin; AMB:  
 551 liposomal amphotericin B; VOR: voriconazole  
 552 <sup>a</sup>considering D0 the day of liver transplantation  
 553  
 554 Figure 1. DNA sequencing chromatogram (A) and amino acids alignments (B) of the  
 555 FKS2HS1 region in different *Candida glabrata* isolates from patient.  
 556 Line 1, *C. glabrata* wild-type genome database sequence used for alignment (GenBank  
 557 accession number XM\_448401.); line 2, *C. glabrata* wild type isolate; line 3, F659S mutation  
 558 found in resistant isolates from D12 to D61; line 4, F659S and S663A mutations found in

559 resistant isolates from D61 to D89; line 5, F659S and D666E mutations found only in the  
560 isolate D89 anus. This isolate harbors another population with F659S and S663A mutations  
561 (line 4).

562

563

564

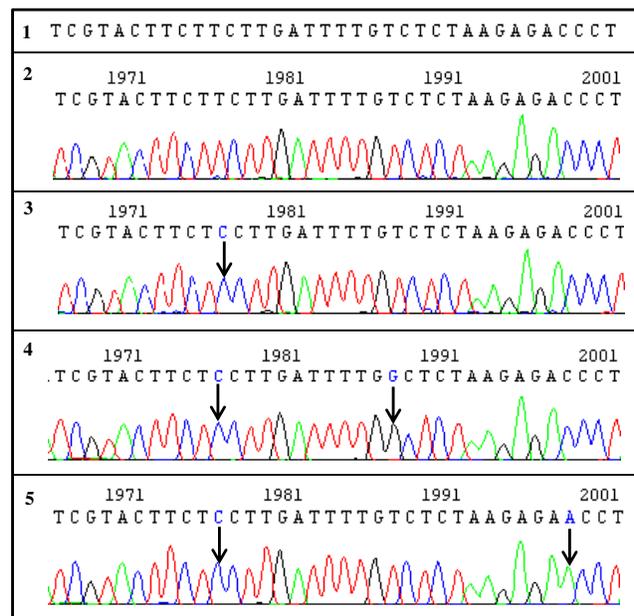
565

566

567

568

A



B

	651	661	671
1	AAKYSESYF	FLILSLRDP	IRIL
2	AAKYSESYF	FLILSLRDP	IRIL
3	AAKYSESYF	SLILSLRDP	IRIL
4	AAKYSESYF	SLILALRDP	IRIL
5	AAKYSESYF	SLILSLREP	IRIL

Figure 1. DNA sequencing chromatogram (A) and amino acids alignments (B) of the FKS2HS1 region in different *Candida glabrata* isolates from patient.

Line 1, *C. glabrata* wild-type genome database sequence used for alignment (GenBank accession number XM\_448401.);

line 2, *C. glabrata* wild type isolate;

line 3, F659S mutation found in resistant isolates from D12 to D61;

line 4, F659S and S663A mutations found in resistant isolates from D61 to D89;

line 5, F659S and D666E mutations found only in the isolate D89 anus. This isolate harbors another population with F659S and S663A mutations (line 4).

## Références bibliographiques

1. Rapport de l'Agence de biomédecine : greffe hépatique, bilan 2013.
2. Avkan-Oguz, V. *et al.* Risk Factors for Early Bacterial Infections in Liver Transplantation. *Transplant. Proc.* **45**, 993–997 (2013).
3. Pappas, P. G. *et al.* Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **50**, 1101–1111 (2010).
4. Wisplinghoff, H. *et al.* 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.* **39**, 309–317 (2004).
5. Diekema, D. J. *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1298–1302 (2002).
6. Cleveland, A. A. *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.* **55**, 1352–1361 (2012).
7. Tortorano, A. M. *et al.* Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**, 359–366 (2006).
8. Fung, J. J. Fungal infection in liver transplantation. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* **4 Suppl 3**, 18–23 (2002).
9. Kett, D. H., Azoulay, E., Echeverria, P. M., 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.* **39**, 665–670 (2011).
10. Husain, S. *et al.* Changes in the spectrum and risk factors for invasive candidiasis in liver transplant recipients: prospective, multicenter, case-controlled study. *Transplantation* **75**, 2023–2029 (2003).
11. Grauhan, O. *et al.* Fungal infections in liver transplant recipients. *Langenbecks Arch. Für Chir.* **379**, 372–375 (1994).
12. Rabkin, J. M. *et al.* Association of fungal infection and increased mortality in liver transplant recipients. *Am. J. Surg.* **179**, 426–430 (2000).
13. Singh, N. *et al.* Trends in risk profiles for and mortality associated with invasive aspergillosis among liver transplant recipients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **36**, 46–52 (2003).
14. Rosenhagen, M., Feldhues, R., Schmidt, J., Hoppe-Tichy, T. & Geiss, H. K. A risk profile for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Infection* **37**, 313–319 (2009).
15. Badley, A. D. *et al.* Prophylaxis of cytomegalovirus infection in liver transplantation: a randomized trial comparing a combination of ganciclovir and acyclovir to acyclovir. NIDDK Liver Transplantation Database. *Transplantation* **64**, 66–73 (1997).
16. Briegel, J. *et al.* Risk factors for systemic fungal infections in liver transplant recipients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **14**, 375–382 (1995).
17. Gavaldà, J. *et al.* Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 27–48 (2014).
18. Arendrup, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr. Opin. Crit. Care* **16**, 445–452 (2010).

19. Pfaller, M. A. *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1366–1377 (2010).
20. Pfaller, M. A., Messer, S. A., Moet, G. J., Jones, R. N. & Castanheira, M. *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 (2011).
21. The French Mycosis Study Group *et al.* Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002–2010). *Intensive Care Med.* **40**, 1303–1312 (2014).
22. Klingspor, L. *et al.* Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 87.e1–87.e10 (2015).
23. Bassetti, M. *et al.* Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 4167–4172 (2013).
24. Puig-Asensio, M. *et al.* Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit. Care Med.* **42**, 1423–1432 (2014).
25. Montagna, M. T. *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection* **41**, 645–653 (2013).
26. Falagas, M. E., Roussos, N. & Vardakas, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **14**, e954–966 (2010).
27. Chow, J. K. *et al.* Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **46**, 1206–1213 (2008).
28. Samonis, G. *et al.* *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infection in patients in a tertiary hospital: an analysis of microbiological data. *Scand. J. Infect. Dis.* **40**, 414–419 (2008).
29. Lortholary, O. *et al.* 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 (2011).
30. De Pauw, B. *et al.* Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 1813–1821 (2008).
31. Eschenauer, G. A., Lam, S. W. & Carver, P. L. Antifungal prophylaxis in liver transplant recipients. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **15**, 842–858 (2009).
32. Clancy, C. J. & Nguyen, M. H. Finding the ‘Missing 50%’ of Invasive Candidiasis: How Nonculture Diagnostics Will Improve Understanding of Disease Spectrum and Transform Patient Care. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 1284–1292 (2013).
33. Mikulska, M. *et al.* The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* **14**, R222 (2010).
34. Yera, H., Sendid, B., Francois, N., Camus, D. & Poulain, D. Contribution of

- serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **20**, 864–870 (2001).
35. Prella, M. *et al.* Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **51**, 95–101 (2005).
36. Poissy, J. *et al.* Presence of *Candida* cell wall derived polysaccharides in the sera of intensive care unit patients: relation with candidaemia and *Candida* colonisation. *Crit. Care Lond. Engl.* **18**, R135 (2014).
37. Arendrup, M. C. *et al.* Detection of candidaemia in patients with and without underlying haematological disease. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 855–862 (2010).
38. Akamatsu, N., Sugawara, Y., Kaneko, J., Tamura, S. & Makuuchi, M. Preemptive Treatment of Fungal Infection Based on Plasma (1 → 3)β-D-Glucan Levels after Liver Transplantation. *Infection* **35**, 346–351 (2007).
39. Martín-Mazuelos, E. *et al.* β-D-Glucan and *Candida albicans* germ tube antibody in ICU patients with invasive candidiasis. *Intensive Care Med.* **41**, 1424–1432 (2015).
40. Nguyen, M. H. *et al.* Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction, -D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1240–1248 (2012).
41. Avni, T., Leibovici, L. & Paul, M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 665–670 (2011).
42. Lucignano, B. *et al.* Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2252–2258 (2011).
43. Pittet, D., Monod, M., Suter, P. M., Frenk, E. & Auckenthaler, R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann. Surg.* **220**, 751 (1994).
44. Piarroux, R. *et al.* Assessment of preemptive treatment to prevent severe candidiasis in critically ill surgical patients. *Crit. Care Med.* **32**, 2443–2449 (2004).
45. Petri, M. G. *et al.* Epidemiology of invasive mycosis in ICU patients: a prospective multicenter study in 435 non-neutropenic patients. Paul-Ehrlich Society for Chemotherapy, Divisions of Mycology and Pneumonia Research. *Intensive Care Med.* **23**, 317–325 (1997).
46. León, C. *et al.* A bedside scoring system ('*Candida* score') for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit. Care Med.* **34**, 730–737 (2006).
47. León, C. *et al.* Usefulness of the '*Candida* score' for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: A prospective multicenter study. *Crit. Care Med.* **37**, 1624–1633 (2009).
48. Cuenca-Estrella, M. *et al.* ESCMID\* \*This guideline was presented in part at ECCMID 2011. European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 9–18 (2012).
49. Kusne, S. & Blair, J. E. Viral and fungal infections after liver transplantation--part II. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **12**, 2–11 (2006).
50. Singh, N. *et al.* Combination of voriconazole and caspofungin as primary therapy for invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients: a prospective, multicenter, observational study. *Transplantation* **81**, 320–326 (2006).
51. Vilchez, R. A., Fung, J. & Kusne, S. Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **2**, 575–580

(2002).

52. Vilchez, R. *et al.* Longitudinal study of cryptococcosis in adult solid-organ transplant recipients. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **16**, 336–340 (2003).

53. Perfect, J. R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **50**, 291–322 (2010).

54. Kostakis, I. D., Sotiropoulos, G. C. & Kouraklis, G. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Liver Transplant Recipients: A Systematic Review. *Transplant. Proc.* **46**, 3206–3208 (2014).

55. Cuellar-Rodriguez, J. *et al.* Histoplasmosis in solid organ transplant recipients: 10 years of experience at a large transplant center in an endemic area. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **49**, 710–716 (2009).

56. Botterel, F. *et al.* A case of disseminated histoplasmosis likely due to infection from a liver allograft. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **18**, 662–664 (1999).

57. Vinayek, R., Balan, V., Pinna, A., Linden, P. K. & Kusne, S. Disseminated histoplasmosis in a patient after orthotopic liver transplantation. *Clin. Transplant.* **12**, 274–277 (1998).

58. Oh, Y. S., Lisker-Melman, M., Korenblat, K. M., Zuckerman, G. R. & Crippin, J. S. Disseminated histoplasmosis in a liver transplant recipient. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **12**, 677–681 (2006).

59. Wheat, J. *et al.* Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **30**, 688–695 (2000).

60. Wheat, L. J. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **45**, 807–825 (2007).

61. 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).

62. Anderson, T. M. *et al.* Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 400–406 (2014).

63. Sorgo, A. G. *et al.* Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **10**, 1071–1081 (2011).

64. Pfaller, M. & Riley, J. Effects of fluconazole on the sterol and carbohydrate composition of four species of *Candida*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **11**, 152–156 (1992).

65. Singh, N., Paterson, D. L., Gayowski, T., Wagener, M. M. & Marino, I. R. Preemptive prophylaxis with a lipid preparation of amphotericin B for invasive fungal infections in liver transplant recipients requiring renal replacement therapy. *Transplantation* **71**, 910–913 (2001).

66. San-Juan, R. *et al.* Universal prophylaxis with fluconazole for the prevention of early invasive fungal infection in low-risk liver transplant recipients. *Transplantation* **92**, 346–350 (2011).

67. Raghuram, A. *et al.* Invasive fungal infections following liver transplantation: Incidence, risk factors, survival, and impact of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* (2003-2007). *Liver Transpl.* **18**, 1100–1109 (2012).

68. Saliba, F. *et al.* Fungal infections after liver transplantation: outcomes and risk factors revisited in the MELD era. *Clin. Transplant.* **27**, E454–E461 (2013).

69. Biancofiore, G. *et al.* Antifungal prophylaxis in liver transplant recipients: a randomized *placebo*-controlled study. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **15**, 341–347 (2002).
70. Shan, Y.-S., Sy, E. D., Wang, S.-T., Lee, J.-C. & Lin, P.-W. Early presumptive therapy with fluconazole for occult *Candida* infection after gastrointestinal surgery. *World J. Surg.* **30**, 119–126 (2006).
71. Schuster, M. G. *et al.* Empirical fluconazole *versus placebo* for intensive care unit patients: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **149**, 83–90 (2008).
72. Pappas, P. G. *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.* **62**, e1–e50 (2016).
73. Maertens, J. *et al.* European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3--2009 update. *Bone Marrow Transplant.* **46**, 709–718 (2011).
74. Shah, T., Lai, W. K., Gow, P., Leeming, J. & Mutimer, D. Low-dose amphotericin for prevention of serious fungal infection following liver transplantation. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* **7**, 126–132 (2005).
75. Singhal, S. *et al.* Targeted prophylaxis with amphotericin B lipid complex in liver transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **6**, 588–595 (2000).
76. Castroagudín, J. F. *et al.* Prospective interventional study to evaluate the efficacy and safety of liposomal amphotericin B as prophylaxis of fungal infections in high-risk liver transplant recipients. *Transplant. Proc.* **37**, 3965–3967 (2005).
77. Saliba, F. *et al.* Outcomes associated with amphotericin B lipid complex (ABLC) prophylaxis in high-risk liver transplant patients. *Med. Mycol.* **51**, 155–163 (2013).
78. Hellinger, W. C. *et al.* Risk stratification and targeted antifungal prophylaxis for prevention of aspergillosis and other invasive mold infections after liver transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **11**, 656–662 (2005).
79. Veerareddy, P. R. & Vobalaboina, V. Lipid-based formulations of amphotericin B. *Drugs Today Barc. Spain 1998* **40**, 133–145 (2004).
80. Rex, J. H. *et al.* A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus *placebo versus* fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **36**, 1221–1228 (2003).
81. Méan, M., Marchetti, O. & Calandra, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit. Care Lond. Engl.* **12**, 204 (2008).
82. Mora-Duarte, J. *et al.* Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 2020–2029 (2002).
83. Fortún, J. *et al.* Prophylaxis with caspofungin for invasive fungal infections in high-risk liver transplant recipients. *Transplantation* **87**, 424–435 (2009).
84. Doria, C. *et al.* A retrospective analysis of the use of caspofungin in recipients of liver transplant with a modified high index of suspicion for fungal infection. A critical review of mortality, acute cellular rejection, infections, and changes in the liver function tests while on caspofungin. *Clin. Transplant.* **25**, 569–575 (2011).
85. Pappas, P. G. *et al.* Micafungin *versus* caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **45**, 883–893 (2007).
86. Kuse, E.-R. *et al.* Micafungin *versus* liposomal amphotericin B for candidaemia and

- invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet Lond. Engl.* **369**, 1519–1527 (2007).
87. Sun, H.-Y., Cacciarelli, T. V. & Singh, N. Micafungin *Versus* Amphotericin B Lipid Complex for the Prevention of Invasive Fungal Infections in High-Risk Liver Transplant Recipients: *Transplant. J.* **96**, 573–578 (2013).
88. Saliba F, Fischer L., Bahra M., Cointault O., Laterre P-F., Tweddle L., Karas A. Efficacy and Safety of Micafungin as Antifungal Prophylaxis in High-risk Liver Transplantation. (2013).
89. Serrano, M. del C. *et al.* *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**, 131–135 (2003).
90. Marco, F., Pfaller, M. A., Messer, S. A. & Jones, R. N. Activity of MK-0991 (L-743,872), a new echinocandin, compared with those of LY303366 and four other antifungal agents tested against blood stream isolates of *Candida* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **32**, 33–37 (1998).
91. Vazquez, J. A. & Sobel, J. D. Anidulafungin: a novel echinocandin. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **43**, 215–222 (2006).
92. Menichetti, F. Anidulafungin, a new echinocandin: effectiveness and tolerability. *Drugs* **69 Suppl 1**, 95–97 (2009).
93. Cleary, J. D. Echinocandins: pharmacokinetic and therapeutic issues. *Curr. Med. Res. Opin.* **25**, 1741–1750 (2009).
94. Dowell, J. A., Stogniew, M., Krause, D., Henkel, T. & Weston, I. E. Assessment of the safety and pharmacokinetics of anidulafungin when administered with cyclosporine. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 227–233 (2005).
95. Dowell, J. A., Stogniew, M., Krause, D., Henkel, T. & Damle, B. Lack of pharmacokinetic interaction between anidulafungin and tacrolimus. *J. Clin. Pharmacol.* **47**, 305–314 (2007).
96. Sganga, G. *et al.* Anidulafungin—A New Therapeutic Option for *Candida* Infections in Liver Transplantation. *Transplant. Proc.* **44**, 1982–1985 (2012).
97. Reboli, A. C. *et al.* Anidulafungin *versus* fluconazole for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 2472–2482 (2007).
98. Arendrup, M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20 Suppl 6**, 42–48 (2014).
99. Guinea, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20 Suppl 6**, 5–10 (2014).
100. Stéphan, F. *et al.* Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **35**, 1477–1483 (2002).
101. Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D. & Perlin, D. S. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2305–2312 (2008).
102. Pfaller, M. A. *et al.* Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazole-Resistant Bloodstream Isolates of *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1199–1203 (2012).
103. Alexander, B. D. *et al.* 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 (2013).

104. Beyda, N. D. *et al.* FKS Mutant *Candida glabrata*: Risk Factors and Outcomes in Patients With Candidemia. *Clin. Infect. Dis.* **59**, 819–825 (2014).
105. Shields, R. K., Nguyen, M. H., Press, E. G., Updike, C. L. & Clancy, C. J. Caspofungin MICs Correlate with Treatment Outcomes among Patients with *Candida glabrata* Invasive Candidiasis and Prior Echinocandin Exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3528–3535 (2013).
106. Fekkar, A. *et al.* Rapid Emergence of Echinocandin Resistance during *Candida kefyr* Fungemia Treatment with Caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2380–2382 (2013).
107. Fekkar, A. *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.* **33**, 1489–1496 (2014).
108. Chen, S. C. A. *et al.* Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 662–669 (2009).
109. Lockhart, S. R., Messer, S. A., Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Identification and Susceptibility Profile of *Candida fermentati* from a worldwide collection of *Candida guilliermondii* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 242–244 (2009).
110. Oxman, D. A. *et al.* Candidaemia associated with decreased *in vitro* fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern? *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1460–1465 (2010).
111. Liu, W. *et al.* Invasive candidiasis in intensive care units in China: *in vitro* antifungal susceptibility in the China-SCAN study. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 162–167 (2014).
112. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163 (2007).
113. Pfaller, M. *et al.* Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 624–629 (2011).
114. Messer, S. A. *et al.* Activities of micafungin against 315 invasive clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida* spp. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 324–326 (2006).
115. Niimi, K. *et al.* Overexpression of *Candida albicans* *CDR1*, *CDR2*, or *MDR1* does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1148–1155 (2006).
116. Pham, C. D. *et al.* Role of FKS Mutations in *Candida glabrata*: MIC Values, Echinocandin Resistance, and Multidrug Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 4690–4696 (2014).
117. Lortholary, O. *et al.* ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18 Suppl 7**, 68–77 (2012).
118. Perlin, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol.* **6**, 441–457 (2011).
119. Pfaller, M. A. *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.* **14**, 164–176 (2011).
120. Arendrup, M. C. *et al.* Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1185–1193 (2009).
121. Pfaller, M. A. *et al.* Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of

CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **13**, 180–195 (2010).

122. Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C. & Hope, W. W. Breakpoints for antifungal agents: An update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist. Updat.* **16**, 81–95 (2013).

123. Espinel-Ingroff, A. *et al.* 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 (2013).

124. Shields, R. K., Nguyen, M. H., Press, E. G., Updike, C. L. & Clancy, C. J. Anidulafungin and Micafungin MIC Breakpoints Are Superior to That of Caspofungin for Identifying FKS Mutant *Candida glabrata* Strains and Echinocandin Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 6361–6365 (2013).

125. Posteraro, B. & Sanguinetti, M. The future of fungal susceptibility testing. *Future Microbiol.* **9**, 947–967 (2014).

126. Guinea, J. *et al.* 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 (2010).

127. Shields, R. K. *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.* **56**, 4862–4869 (2012).

128. Krogh-Madsen, M., Arendrup, M. C., Heslet, L. & Knudsen, J. D. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **42**, 938–944 (2006).

129. Lackner, M. *et al.* 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 (2014).

130. Castanheira, M. *et al.* Frequency of *FKS* Mutations among *Candida glabrata* Isolates from a 10-Year Global Collection of Bloodstream Infection Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 577–580 (2014).

131. Zhao, Y., Stensvold, C. R., Perlin, D. S. & Arendrup, M. C. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* from bronchoalveolar lavage fluid samples of patients with chronic diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1497–1504 (2013).

132. Dudiuk, C. *et al.* Set of Classical PCRs for Detection of Mutations in *Candida glabrata* *FKS* Genes Linked with Echinocandin Resistance. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2609–2614 (2014).

133. Garnaud, C. *et al.* Next-generation sequencing offers new insights into the resistance of *Candida* spp. to echinocandins and azoles. *J. Antimicrob. Chemother.* (2015). doi:10.1093/jac/dkv139

134. De Carolis, E. *et al.* Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Caspofungin Susceptibility Testing of *Candida* and *Aspergillus* Species. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2479–2483 (2012).

135. Chadwick, S. G. *et al.* X-Plate Technology: a new method for detecting fluconazole resistance in *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* **62**, 720–726 (2013).

136. Ingham, C. J. *et al.* Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide. *PloS One* **7**, e33818 (2012).

137. Cowen, L. E., Kohn, L. M. & Anderson, J. B. Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **183**, 2971–2978 (2001).

138. Beyda, N. D., Lewis, R. E. & Garey, K. W. Echinocandin resistance in *Candida*

species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann. Pharmacother.* **46**, 1086–1096 (2012).

139. Park, S. *et al.* Specific Substitutions in the Echinocandin Target Fks1p Account for Reduced Susceptibility of Rare Laboratory and Clinical *Candida* sp. Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3264–3273 (2005).

140. Garcia-Effron, G., Kontoyiannis, D. P., Lewis, R. E. & Perlin, D. S. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4181–4183 (2008).

141. Perlin, D. S. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. *Drugs* **74**, 1573–1585 (2014).

142. Katiyar, S. K. *et al.* *FKS1* and *FKS2* Are Functionally Redundant but Differentially Regulated in *Candida glabrata*: Implications for Echinocandin Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 6304–6309 (2012).

143. Garcia-Effron, G., Lee, S., Park, S., Cleary, J. D. & Perlin, D. S. 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.* **53**, 3690–3699 (2009).

144. Dannaoui, E. *et al.* *Candida* spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004–2010. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 86–90 (2012).

145. Perlin, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* n/a–n/a (2015). doi:10.1111/nyas.12831

146. Földi, R. *et al.* Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **73**, 338–342 (2012).

147. Kovács, R. *et al.* Killing rates exerted by caspofungin in 50 % serum and its correlation with *in vivo* efficacy in a neutropenic murine model against *Candida krusei* and *Candida inconspicua*. *J. Med. Microbiol.* **63**, 186–194 (2014).

148. Walker, L. A., Gow, N. A. R. & Munro, C. A. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet. Biol. FG B* **47**, 117–126 (2010).

149. Walker, L. A. *et al.* Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* **4**, e1000040 (2008).

150. M Munro, C. A. *et al.* The PKC, HOG and Ca<sup>2+</sup> signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **63**, 1399–1413 (2007).

151. 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.* **48**, 959–976 (2003).

152. 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).

153. Cannon, R. D. *et al.* *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiol. Read. Engl.* **153**, 3211–3217 (2007).

154. Lee, K. K. *et al.* Elevated Cell Wall Chitin in *Candida albicans* Confers Echinocandin Resistance *In vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 208–217 (2012).

155. Rueda, C., Cuenca-Estrella, M. & Zaragoza, O. 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 (2014).

156. Vincent, B. M., Lancaster, A. K., Scherz-Shouval, R., Whitesell, L. & Lindquist, S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol.* **11**,

e1001692 (2013).

157. Spampinato, C. & Leonardi, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Res. Int.* **2013**, 204237 (2013).
158. Florent, M. *et al.* Nonsense and missense mutations in *FCY2* and *FCY1* genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2982–2990 (2009).
159. Prasad, R. & Rawal, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front. Pharmacol.* **5**, 202 (2014).
160. Kanafani, Z. A. & Perfect, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **46**, 120–128 (2008).
161. Sanglard, D. *et al.* Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2378–2386 (1995).
162. White, T. C. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1482–1487 (1997).
163. Lopez-Ribot, J. L. *et al.* Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2932–2937 (1998).
164. Forche, A. *et al.* Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*. *mBio* **2**, (2011).
165. Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A. & Andes, D. R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* **8**, 1325–1337 (2013).
166. Duguid, I. G., Evans, E., Brown, M. R. & Gilbert, P. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**, 803–810 (1992).
167. Evans, D. J., Allison, D. G., Brown, M. R. & Gilbert, P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**, 177–184 (1991).
168. Perumal, P., Mekala, S. & Chaffin, W. L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2454–2463 (2007).
169. Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H. & Douglas, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot. Cell* **5**, 1770–1779 (2006).
170. Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. & Fink, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5048–5052 (2004).
171. Hornby, J. M. *et al.* Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2982–2992 (2001).
172. Kuhn, D. M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1773–1780 (2002).
173. Mathé, L. & Van Dijck, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr. Genet.* **59**, 251–264 (2013).
174. Robbins, N. *et al.* Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms.

*PLoS Pathog.* **7**, e1002257 (2011).

175. Delattin, N., Cammue, B. P. A. & Thevissen, K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med. Chem.* **6**, 77–90 (2014).

176. Lamfon, H., Porter, S. R., McCullough, M. & Pratten, J. 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 (2004).

177. Martins, M., Henriques, M., Lopez-Ribot, J. L. & Oliveira, R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses* **55**, 80–85 (2012).

178. Reagan, D. R., Pfaller, M. A., Hollis, R. J. & Wenzel, R. P. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2733–2738 (1990).

179. Shields, R. K., Nguyen, M. H., Press, E. G. & Clancy, C. J. Abdominal candidiasis is a hidden reservoir of echinocandin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 7601–7605 (2014).

180. Pfaller, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am. J. Med.* **125**, S3–13 (2012).

181. Alexander, B. D., Schell, W. A., Miller, J. L., Long, G. D. & Perfect, J. R. *Candida glabrata* fungemia in transplant patients receiving voriconazole after fluconazole. *Transplantation* **80**, 868–871 (2005).

182. Kabbara, N. *et al.* 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 (2008).

183. Pfeiffer, C. D. *et al.* Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2373–2380 (2010).

184. Yang, Y.-L., Li, S.-Y., Cheng, H.-H., Lo, H.-J. & TSARY Hospitals. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. *BMC Infect. Dis.* **5**, 99 (2005).

185. Myoken, Y., Kyo, T., Sugata, T., Murayama, S. Y. & Mikami, Y. Breakthrough fungemia caused by fluconazole-resistant *Candida albicans* with decreased susceptibility to voriconazole in patients with hematologic malignancies. *Haematologica* **91**, 287–288 (2006).

186. Forastiero, A. *et al.* Rapid development of *Candida krusei* echinocandin resistance during caspofungin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2015).

187. Baixench, M.-T. *et al.* Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 1076–1083 (2007).

188. Marcos-Zambrano, L. J. *et al.* Echinocandin-resistant yeast species: biofilm production and anti-biofilm activity of echinocandins and liposomal amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2016). doi:10.1128/AAC.03065-15

189. Arendrup, M. C. *et al.* Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* spp. Using EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 Standard Procedures: Analysis of the Influence of Bovine Serum Albumin Supplementation, Storage Time, and Drug Lots. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1580–1587 (2011).

190. Foulet, F. *et al.* Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4574–4579 (2005).

191. Botterel, F., Desterke, C., Costa, C. & Bretagne, S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4076–4081 (2001).

192. McManus, B. A. *et al.* Multilocus sequence typing reveals that the population

structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 652–664 (2008).

193. Lewis, J. S., Wiederhold, N. P., Wickes, B. L., Patterson, T. F. & Jorgensen, J. H. Rapid Emergence of Echinocandin Resistance in *Candida glabrata* Resulting in Clinical and Microbiologic Failure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4559–4561 (2013).

194. Healey, K. R. *et al.* Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nat. Commun.* **7**, 11128 (2016).

195. Perlin, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **10**, 121–130 (2007).

196. Garcia-Effron, G. *et al.* Novel *FKS* Mutations Associated with Echinocandin Resistance in *Candida* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 2225–2227 (2010).

197. Jensen, R. H. *et al.* Posttreatment Antifungal Resistance among Colonizing *Candida* Isolates in Candidemia Patients: Results from a Systematic Multicenter Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1500–1508 (2015).

198. Castanheira, M., Messer, S. A., Jones, R. N., Farrell, D. J. & Pfaller, M. A. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **44**, 320–326 (2014).

199. Goicoechea, M., Fierer, J. & Johns, S. Treatment of candidal cholangitis with caspofungin therapy in a patient with a liver transplant: documentation of biliary excretion of caspofungin. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **38**, 1040–1041 (2004).

200. Yamada, N. *et al.* Distribution of micafungin in the tissue fluids of patients with invasive fungal infections. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* **17**, 731–734 (2011).

201. Sandhu, P. *et al.* Disposition of caspofungin, a novel antifungal agent, in mice, rats, rabbits, and monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1272–1280 (2004).

## RÉSUMÉ

Les candidoses invasives constituent un problème majeur dans les services de réanimation. La prophylaxie est donc primordiale chez les patients à risque. En contrepartie, elle implique un risque important d'émergence d'isolats résistants en cas d'utilisation prolongée des échinocandines.

Dans cette étude, nous confirmons l'impact que peut avoir un traitement par échinocandine sur l'apparition de souches résistantes. En effet, 7,7 % des patients traités et porteurs de *Candida* développent une résistance microbiologique associée à la présence de mutations *FKS*. Cette apparition d'isolats résistants peut se faire relativement rapidement, en particulier pour *C. glabrata*, et il existe un risque d'accumulation des mutations *FKS* en cas de poursuite du traitement.

Les sites urinaires et abdominaux semblent plus propices au développement de telles résistances. Dès lors, il faut être attentif sur la survenue d'infections systémiques à point de départ digestif, en particulier après une chirurgie abdominale.

Les cliniciens et les microbiologistes doivent donc rester vigilants sur l'apparition de résistances microbiologiques chez *Candida* et ce même en l'absence d'infections. La prophylaxie doit être ciblée et de durée limitée. En cas de traitement prolongé, les prélèvements et les antifongigrammes doivent être répétés, en particulier pour les sites urinaires et digestifs.

## DISCIPLINE

Mycologie Médicale

## MOTS CLÉS

*Candida*, transplantation hépatique, candidose invasive, colonisation fongique, concentration minimale inhibitrice, résistance aux échinocandines

## ADRESSE DE L'AUTEUR

PRIGENT Gwénolé  
335, rue de Vaugirard  
75015 Paris