

Assemblée Générale ANOFEL

Thèse d'Exercice

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

Directeur de thèse : **Dr. Florent MORIO**



UR 1155

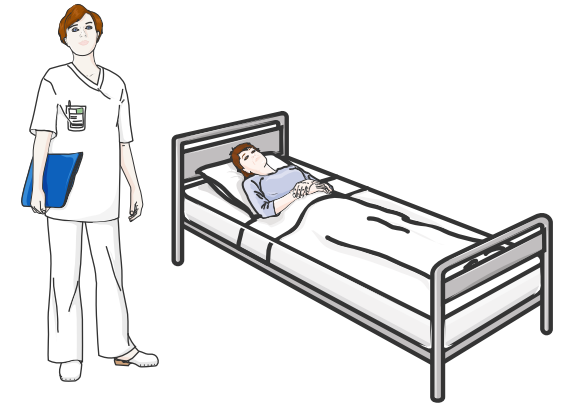
Directeur : **Pr. Patrice LE PAPE**

Sophie HARTUIS

29 mars 2022

Candida parapsilosis

- Levure ascomycète, commensale et saprophyte
- Retrouvée au niveau de la peau (flore normale)
- Transmission horizontale décrite
- **Résistance aux azolés croissante**
 - ✓ Plus fréquente que chez *C. albicans*
 - ✓ Description de cas groupés d'infections invasives à l'hôpital notamment en France ¹⁻⁵
- Quels mécanismes de résistance ?
 - plus de 80 mutations décrites chez des souches cliniques notamment FLC-R



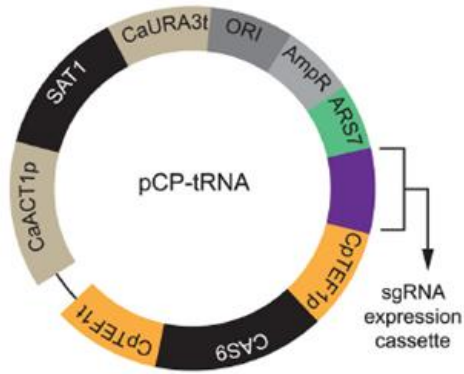
Objectif

Étudier l'impact de ces mutations sur l'activité *in vitro* des ATFs
(corrélation du génotype au phénotype)

¹ Thomaz *et al.*, Front Microbiol 2018 ; ² Singh *et al.*, JAC 2019 ; ³ Martini *et al.*, Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020 ; ⁴ Arastehfar *et al.*, Front. Cell. Infect. Microbiol. 2021 ;

⁵ Fekkar *et al.*, AAC 2021

Edition du génome de *C. parapsilosis* avec CRISPR-Cas9



Plasmide pCP-tRNA

Transformation chez *E. coli* DH5 α



**ADN donneur
(Repair template)**

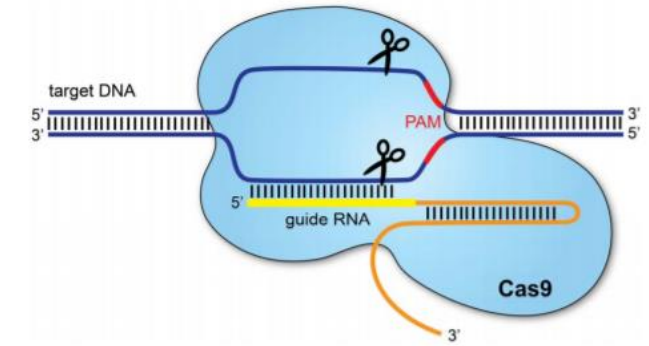
Portant la mutation à insérer

Transformation chimique

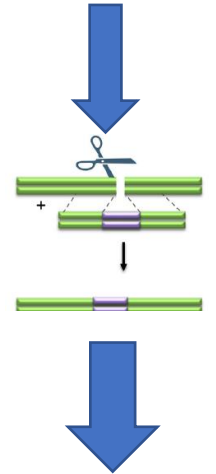
**Sélection avec
Nourséothricine**



**Durée totale de la manipulation :
~ 3 semaines**



Recombinaison
homologue



Confirmation par
PCR/séquençage



Tests de sensibilité *in vitro*

✓ Objectif : introduction des mutations à l'état hétérozygote/ homozygote

Gènes	Mutations aa (nt)
<i>ERG11</i>	Y132F (A395T) K143R (A428G) R398I (G1193T)
<i>TAC1</i>	G650E (G1949A) L978W (T2933G)
<i>MRR1</i>	G583R (G1747A) K873N (A2619C)
<i>ERG3</i>	G111R (G331A)

→ Sur deux fonds génétiques

Avantages

- Efficacité élevée
- Absence d'intégration de marqueurs
- Applicable aux souches cliniques (absence de marqueur d'auxotrophie)

« Inconvénient »

- Réglementation européenne pour les OGM (Directive 2009/41/CE)

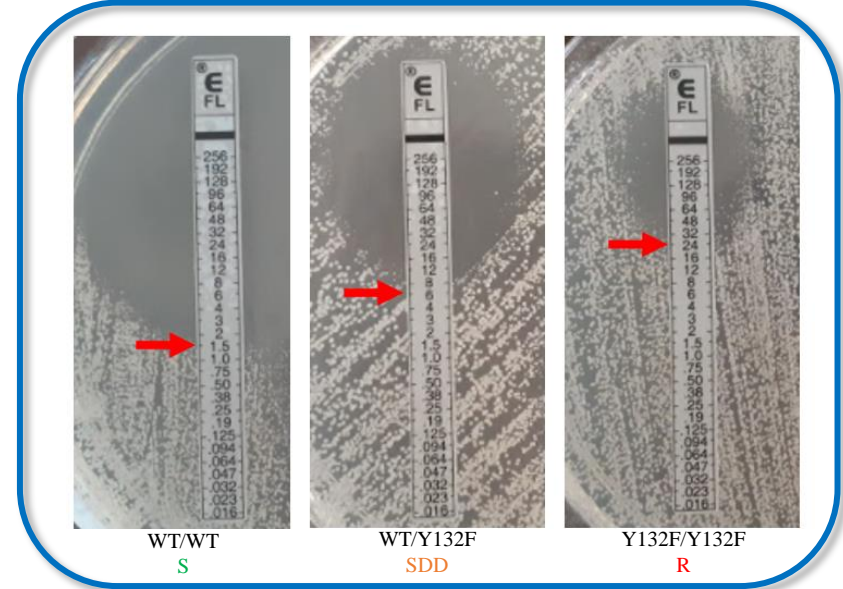
Faits marquants

- **23 mutants obtenus**
- **Impact du dosage allélique** → résistance plus marquée si mutation présente sur les deux allèles (homozygote)
- Présence d'**une seule mutation** peut suffire pour conférer la résistance *in vitro* et **prédire l'échec thérapeutique** du FLC (CMI > Breakpoint)
- **Posaconazole** et **Isavuconazole** globalement **peu impactés**
- Profil de **tolérance** vis-à-vis des ATFs azolés et impact sur la sensibilité à l'AMB et MIC → **Mutants G111R (*ERG3*)**

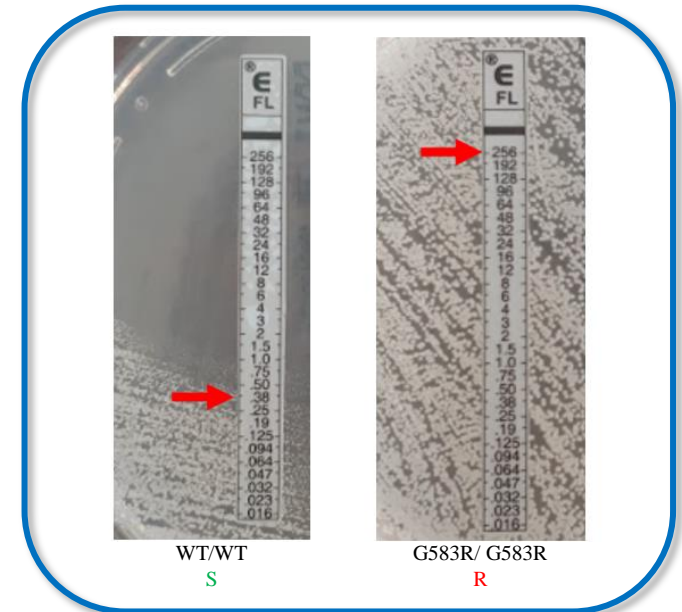
Travaux en cours / Perspectives

- Elargir l'étude de la sensibilité *in vitro* aux imidazolés
- Confirmer nos données *in vivo* (*Galleria mellonella*)
- Quel coût associé à la résistance ?

ATCC 22019



STZ5



Merci de votre attention